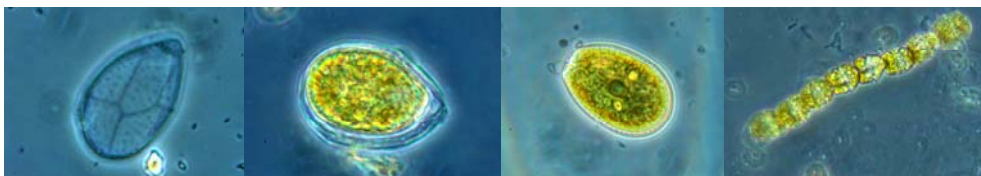


Avances y Tendencias en Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas



**Actas de la IX Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas
Cartagena 7 – 10 Mayo 2007**

Editado por Javier Gilabert

Título: Avances y Tendencias en Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas

(Actas de la IX Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas,
Cartagena 7-10 Mayo 2007)

Edita: Javier Gilabert Universidad Politécnica de Cartagena

Portada: *Ostreopsis siamensis*, *Ostreopsis ovata*, *Prorocentrum lima*
y *Gymnodinium catenatum* (fotografías Javier Gilabert).

Fecha de publicación: Julio 2008

ISBN: 978-84-96997-06-6



La IX Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas tuvo lugar del 7 al 10 de mayo de 2007 en la sede de la Universidad Politécnica de Cartagena. Esta edición acogió a más de 120 expertos de Portugal y España abarcando un amplio campo de disciplinas como la taxonomía, ecología, genética y química del fitoplancton tóxico. En la reunión participó un nutrido grupo de responsables de Sanidad Ambiental de diferentes organismos públicos que la enriquecieron enormemente.

Se presentaron cerca más de setenta comunicaciones incluyendo 44 presentaciones orales. Este volumen recoge un total de 47 de los trabajos presentados. Se organiza en dos partes. La primera contiene 20 trabajos y comienza con la sesión inaugural sobre la “Modulación de la dinámica de las proliferaciones algales nocivas por la turbulencia a pequeña escala” para seguir con los resultados de los sistemas de monitorización de fitoplancton tóxico en las diferentes regiones costeras de la Península Ibérica. Algunos trabajos recogen series temporales de hasta 4 años y otros recogen información sobre las especies tóxicas encontradas. Se recoge, por ejemplo, dos casos, uno en Almería y otro en Águilas (Murcia), donde se detectaron afecciones respiratorias en un número elevado de personas que necesitaron atención médica. Esta parte comprende también una serie de ponencias sobre los problemas asociados al cultivo de determinadas especies y la asociación entre bacterias y fitoplancton detectada mediante marcadores moleculares. Termina con los resultados de un ejercicio de intercalibración interlaboratorio para el recuento de células tóxicas.

La segunda parte, dedicada fundamentalmente a Biotoxinas, comienza con una descripción de alguna actividades que realiza el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marina y sigue con los trabajos de monitorización de toxinas en las costas de la Península Ibérica. Se destaca la aparición de yessotoxinas en mejillón tanto en áreas mediterráneas como atlánticas y se resaltan las nuevas metodologías para la identificación y caracterización de toxinas mediante técnicas de LC-MS. También se analiza la respuesta de diferentes tipos de células a algunas toxinas. Junto con varios estudios referentes a la estructura molecular de algunos derivados del ácido okadaico se analizan finalmente los últimos avances analíticos de microcistinas.

Este volumen es una clara muestra de los avances y tendencias de la investigación ibérica en fitoplancton tóxico y biotoxinas y así se recoge en su título. El comité organizador de la IX Reunión Ibérica quiere agradecer el trabajo de los moderadores de las sesiones por la agilidad en el cumplimiento del apretado calendario de ponencias y la moderación de las vivas discusiones mantenidas en todas las sesiones. Se ha visto cumplido así, una vez más, el espíritu de estas Reuniones: la discusión científica sobre los últimos avances en esta materia.

Durante la reunión se presentó la iniciativa de una Red Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas que ayude a la integración y gestión de la información que se genera tanto en Portugal como en España. Así lo muestra el número de participantes y la calidad de las ponencias. Cuando salen a la luz estas páginas sabemos que está ya avanzada la preparación de una página web interactiva de la que todos los usuarios e interesados en las proliferaciones de fitoplancton tóxico se verán ampliamente beneficiados.

Finalmente queremos agradecer a la Fundación Séneca y la Universidad Politécnica de Cartagena por su colaboración económica para la organización de esta reunión.

Javier Gilabert
Presidente Comité Organizador

COMITÉ CIENTÍFICO

Jordi Camp	(Institut de Ciències del Mar, CSIC, Barcelona)
Jorge Diogène	(IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Tarragona)
José Javier Fernández	(Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio González, Universidad de La Laguna)
Santiago Fraga	(Instituto Español de Oceanografía, Vigo)
Susana Franca	(LME/CQH, Instituto Nacional de Saúde, Lisboa)
Ana García Cabado	(ANFACO-CECOPESCA)
Javier Gilabert	(Universidad Politécnica de Cartagena)
Mónica Lion	(COI-IEO Centro Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas, Vigo)
Antonello Novelli	(Inst. Univ. de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo)
Luz Mamán	(Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros, Huelva)
Emma Orive	(Universidad del País Vasco, Bilbao)
Yolanda Pazos	(Instituto Tecnológico Control Medio Marino, Pontevedra)

COMITÉ ORGANIZADOR

Javier Gilabert Cervera
M^a del Rosario Castellar
José María Obón de Castro
Sil-lá Abad Martínez
Isabel Rodríguez Carvajal
José Costal Camiñas
Nelma Teixeira
Raquel Barros

Universidad Politécnica de Cartagena,
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

ÍNDICE

Modulación de la dinámica de HABs por la turbulencia de pequeña escala. E. Berdalet y M. Estrada.	1
Microplancton tóxico y nocivo en las Rías Gallegas en los años 2003 a 2006. Y. Pazos y Á. Morono.	13
Evolución del Fitoplancton tóxico en las costas andaluzas durante el periodo 2003-2006. D. Jaén, L. Mamán, R. Fernández e I. Márquez.	29
Resultados del programa de seguimiento de fitoplancton tóxico y biotoxinas en las zonas de producción de bivalvos de Cataluña: años 2003-2006 y primer trimestre del 2007. M. Fernández, M. Delgado, M. Vila, N. Sampetro, J. Camp, D. Furones y J. Diogène.	37
Seguimiento y plan de vigilancia de fitoplancton tóxico en las costas de Águilas (Murcia) en verano de 2006. J. Gilabert, E. Gómez, A. Hernández, M.J. Herrera, J. Tudela, M.J. García, C. Gutiérrez.	47
Brote con clínica respiratoria en la provincia de Almería por posible Exposición a microalgas. P. Barroso, P. Rueda de la Puerta, T. Parrón, P. Marín y J. Guillén.	59
Presencia de especies tóxicas de fitoplancton en la evaluación del estado ecológico de las masas de agua costeras de las Islas Baleares M. Puigserver, N. Moneris y G. Moyà.	61
<i>Gymnodinium chlorophorum</i> causante de proliferaciones de altas biomasa en aguas recreativas de las Islas Baleares (veranos 2004-2006). H. Illoul, M. Masó, A. Reñé y S. Anglès.	69
Fitoplancton potencialmente tóxico en la costa Sur de Murcia (SO Mar Mediterráneo). N. Bouza y M. Aboal.	77
Fitoplancton potencialmente tóxico o nocivo en las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental). C. Assadi, V. Tasso y M. García Carrascosa.	87
Proliferación de <i>Skeletonema tropicum</i> Cleve (Bacillariophyceae) en el Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental) C. Assadi, V. Tasso y M. García Carrascosa.	93

Seguimiento del fitoplancton en el estuario del río Nervión. Identificación de especies potencialmente tóxicas.	
E. Orive, A. Laza y S. Seoane.	99
Proliferación masiva de cianobacterias en el embalse de Ullibarri-Gamboa.	
L. Muro, S. Ortiz de Landaluce, N. Cifuentes, A. Vara y E. Costas.	103
Mortandades en Masa Producidas por Cianobacterias Tóxicas en el Parque Nacional de Doñana.	
N. Perdígones, M. Rouco, F. Marv, E. Costas y V. López-Rodas.	111
Desarrollo de sondas para la detección de <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> en la costa Catalana, España: estudios preliminares.	
L. M. Elandaloussi, R.A. Venail, S. Quijano-Scheggia, M. Fernández-Tejedor, E. Garcés, J. Camp, J. Diogene y K. Andree.	117
Identificación y localización de bacterias asociadas al dinoflagelado tóxico <i>Alexandrium minutum</i> mediante TSA-FISH.	
L. Palacios e I. Marín.	125
Modelo mecnstico para el crecimiento de dinoflagelados tóxicos. Caso de <i>Protoceratium reticulatum</i>.	
F. García, J.J. Gallardo, A. Sánchez, M.C. Cerón, E.H. Belarbi y E. Molina.	131
Estudio de la influencia del contenido de macronutrientes del medio en el crecimiento del dinoflagelado <i>Protoceratium reticulatum</i>.	
A. Sánchez, J.J. Gallardo, M.C. Cerón, H. E.H. Belarbi, F. García y E. Molina.	137
Daño celular por fuerzas de corte en cultivos de dinoflagelados Tóxicos.	
J.J. Gallardo, A. Sánchez, M.C. Cerón, E.H. Belarbi, F. García y E. Molina.	145
Purificación de cultivos mediante separación de células con citometría de flujo	
S. Abad, I. Rodríguez-Carvajal, J. Gilabert.	153
Estimación de incertidumbre de recuentos celulares de <i>Dinophysis acuminata</i> por el método Uthermhl: Resultado de un ejercicio de intercalibración interlaboratorio.	
Y. Pazos, L. Mamn y M. Delgado.	159
Actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas.	
M.L. Rodríguez-Velasco, B. Ben-Gigirey, A. Villar-González y L.M. Botana.	169

Monitorização de PSP na costa portuguesa através de espécies-indicadoras.	
P. Vale, S.S. Gomes, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues.	177
Avaliação do risco de exposição a toxinas DSP ao longo da costa portuguesa por LC-MS: anos 2003 a 2006.	
P.Vale, S.M. Rodrigues, M.J. Botelho, S.S. Gomes.	181
Evolución de los episodios tóxicos detectados en las zonas de producción de moluscos en la costa gallega entre los años 2003 y 2006.	
J. Correa, A. Vidal, M. Goicoechea, C. Salgado y F. Arévalo.	187
Ecossistema costeiro de Aveiro (Portugal): Proliferações de <i>Gymnodinium catenatum</i> e detecção de toxinas PSP.	
M.J. Botelho, T. Vidal, S. Palma, S.S. Gomes, S.M. Rodrigues, P. Vale, M.G. Vilarinho y M.T. Moita.	199
Programa de control de biotoxinas en las costas andaluzas 2003-2006: Observaciones sobre el comportamiento de distintas especies ante episodios tóxicos tipo PSP.	
M.A. Ocaña, M. Gordillo, L. Mamán, L. Fernández e I. Márquez.	205
Evidencia de Yessotoxinas en mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) de la Bahía de Alfacs, Delta del Ebro.	
J. Diogène, B. Paz, M. Fernández, E. Mallat, E. Cañete, A. Caillaud, L. Elandalousi, P. de la Iglesia, A.G. Cabado, J. Lago, J. Vieites, J. Franco.	215
Monitorização de iessotoxinas em mexilhão na Baía de Lisboa.	
S.S. Gomes, S. Palma, M.J. Botelho, M.T. Moita, P. Vale.	223
Estudio comparativo de distribución vertical de toxicidad PSP en mejillón de cultivo.	
M. Gordillo, M.A. Ocaña, L. Mamán, L. Fernández e I. Márquez.	231
Análisis morfológico, molecular y contenido de toxinas de <i>Dinophysis cf ovum</i>, registrado en las Rías Baixas en Mayo de 2005.	
N. Raho, G. Pizarro, L. Escalera, B. Reguera e I. Marín.	237
Identificación y caracterización por LC-MS de derivados del Ácido Okadaico en cultivos de <i>Prorocentrum belizeanum</i>.	
B. Paz, A.H. Daranas, P.G. Cruz, J.M. Franco, J.G. Napolitano, M. Norte y J.J. Fernández.	243
Estudio de ostreocinas en cultivos de <i>Ostreopsis ovata</i>.	
H.J. Domínguez, J.J. Fernández, M. Norte, J.M. Franco, P. Riobó, F. Gutiérrez y M.L. Souto.	247
Disminución del contenido en ácido domoico en vieiras (<i>Pecten maximus</i>) mediante un proceso fácilmente aplicable en la industria transformadora.	
J. Lago, I. Valverde, J.M. Vieites y A.G. Cabado.	253

Caracterización de la respuesta citotóxica de la pectenotoxina-2 (PTX-2) en dos modelos celulares humanos: células de neuroblastoma y células Caco-2.	
I. Valverde, J. Lago, J.M. Vieites y A. G. Cabado.	259
Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas.	
E. Cañete, A. Caillaud y J. Diogène.	271
Distribución celular del ácido okadaico en la glándula digestiva de <i>Mytilus galloprovincialis</i>.	
A. Escudeiro, H. Martín y J Blanco.	277
Distribución intracelular y ligamiento del ácido domoico en la vieira <i>Pecten maximus</i>.	
A. Mauriz y J. Blanco.	281
Ingeniería de Bioprocesos con dinoflagelados. Experiencias preliminares.	
F. García, J.J. Gallardo, A. Sánchez, M.C. Cerón, E.H. Belarbi y E. Molina.	287
Pre-validación de un método de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas.	
A. Villar-González, M.L. Rodríguez-Velasco, L.M. Botana.	295
Toxicidad de la dinoflagelada <i>Gambierdiscus</i> sp. aislada de las Islas Canarias.	
A. Caillaud, E. Cañete, S. Fraga, E. Mallat y J. Diogène.	303
Ácido Belizeánico, un nuevo derivado del ácido okadaico.	
A.H. Daranas, P.G. Cruz, M. Norte y J.J. Fernández.	311
Ácido 19-<i>epi</i>-Okadaico, un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A.	
P.G. Cruz, A.H. Daranas, M. Norte y J.J. Fernández.	315
Auto-asociación del ácido okadaico como vía de entrada a las células.	
A.H. Daranas, P.G. Cruz, A. Hernández Creus, M. Norte y J.J. Fernández.	319
Análisis de microcistinas. Últimos avances analíticos.	
C. Flores, J. Rivera y J. Caixach.	321
Aparición de mutantes resistentes a cobre en la cianobacteria tóxica <i>Microcystis aeruginosa</i>: implicaciones en el uso de cobre como alguicida.	
F. Marvá, M. Rouco, V. López Rodas y E. Costas.	325

Modulación de la dinámica de HABs por la turbulencia de pequeña escala

Elisa Berdalet y Marta Estrada

Institut de Ciències del Mar (CSIC). Passeig Marítim, 37-49.

E-08003 Barcelona, Catalunya, Spain

berdalet@icm.csic.es, marta@icm.csic.es

Resumen

Las especies fitoplanctónicas causantes de proliferaciones algales nocivas (PANs) tienen un tamaño cercano o menor a la escala de Kolmogorov. Ésta es la escala de tamaño aproximado de los remolinos más pequeños hasta los cuales se ha transmitido (sin prácticamente disipación) la energía mecánica turbulenta aportada en el medio acuático a mayor escala por el viento, mareas o intercambios de calor. Por debajo de la escala de Kolmogorov, la viscosidad del fluido compensa los gradientes de velocidad y la energía se disipa en forma de calor (p.e. [1] y referencias que se citan). A esta pequeña escala, alrededor de 1 - 0,2 mm, la viscosidad y el campo de velocidad del medio acuoso condicionan diversos aspectos biológicos de los organismos fitoplanctónicos. Pero al mismo tiempo, el tamaño, la forma y la motilidad celular, junto con las características del ciclo de vida, pueden modular la respuesta biológica a las propiedades físico-químicas del agua. En esta comunicación revisaremos los aspectos más significativos de la experimentación en el laboratorio dirigida a comprender las respuestas del fitoplancton a la turbulencia de pequeña escala, señalaremos gran parte de los resultados obtenidos y abordaremos las implicaciones de esta información en el contexto de las PANs.

La turbulencia de pequeña escala

La turbulencia, de carácter aleatorio y difusivo, es una propiedad del movimiento de un fluido, no del fluido en sí. En los océanos, los intercambios de calor, el viento y las mareas aportan energía cinética turbulenta a distintas escalas espacio-temporales [1 y referencias que se citan]. La energía de los grandes remolinos se transmite progresivamente a escalas cada vez menores, a modo de cascada, y (según se asume en general) sin pérdidas de energía. Sin embargo, cuando los remolinos alcanzan un tamaño determinado, en la llamada *escala de Kolmogorov*, la viscosidad molecular (ν) es suficientemente importante como para suavizar la velocidad del fluido. A esta escala, toda la energía turbulenta se convierte en calor y se disipa. La energía transferida en modo de cascada equivale a la disipada por la viscosidad y se expresa como la energía de disipación turbulenta, ϵ [L^2T^{-3}]. La escala de Kolmogorov refleja la relación entre ambas fuerzas antagónicas, la viscosa y la inercial: $\lambda_\nu = C(\nu^3/\epsilon)^{1/4}$. En el medio natural los valores de la escala de Kolmogorov son del orden de 1 mm. Por lo tanto, las fluctuaciones de velocidad se han suavizado por la

viscosidad en la escala de las células fitoplanctónicas (en su mayoría $< 200 \mu\text{m}$). Las microalgas percibirían gradientes lineares de velocidad (*shear*, según la expresión $du/dz = C_{sh}(\varepsilon/\nu)^{1/2} \text{ [T}^{-1}\text{]}$, donde du/dz es el gradiente de velocidad y C_{sh} es un factor de proporcionalidad) que variarían aleatoriamente en el tiempo. La fuerza de cizalla (*shear stress*, expresada como $\tau \approx \mu du/dz \text{ [MLT}^{-2}\text{]}$, donde $\mu = \rho\nu$ es la viscosidad dinámica) y la tasa de deformación ($\gamma \text{ [T}^{-1}\text{]}$, equivalente a $(\varepsilon/\nu)^{1/2}$, que representa la magnitud de la deformación debida a los gradientes de velocidad media) son otras características del flujo que pueden tener efectos directos sobre las microalgas.

Generación de la turbulencia en el laboratorio

El estudio de las interacciones entre los procesos físico-químicos y la biología del plancton a esta pequeña escala es, ciertamente, difícil. Actualmente, la experimentación en el laboratorio no es capaz de emular cualitativa ni cuantitativamente la turbulencia natural. Así, por ejemplo, la tasa de disipación de la energía turbulenta (ε) generada mediante un agitador orbital a 120 rpm (en promedio, $\sim 27 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) en un recipiente esférico con 3 litros de agua, superaría en un orden de magnitud los máximos niveles ($0,4 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) de disipación que se han estimado en la costa Mediterránea durante episodios esporádicos de fuertes tormentas que no duraron más de 2 días [2]. Sin embargo, este sistema permite obtener los volúmenes de muestra necesarios para el estudio de los diversos parámetros biológicos en estudios ecofisiológicos. Niveles de turbulencia más realistas pueden generarse mediante rejillas oscilando verticalmente en un recipiente cilíndrico [3]. Las principales limitaciones del sistema de rejillas son la sedimentación o la agregación de los organismos en la base de los recipientes y el menor volumen muestral. La Couette (un sistema de cilindros concéntricos que contienen líquido en el espacio libre entre ambos) ofrece la posibilidad de caracterizar hidrodinámicamente el flujo (laminar o turbulento) que se genera al girar uno de los cilindros (normalmente el exterior) mientras que el otro permanece fijo. Este sistema no acostumbra a tener más de 1 litro de volumen, y la sedimentación y problemas de muestreo, son de nuevo sus principales limitaciones. Lo expuesto indica que el investigador debe considerar las ventajas e inconvenientes de cada sistema experimental y ser prudente a la hora de situar adecuadamente los resultados empíricos en un contexto ecofisiológico.

Otro aspecto a destacar es la dificultad de comparar directamente los experimentos realizados mediante diferentes aproximaciones experimentales [4] y sin describir detalladamente el estado fisiológico de los organismos. Así, muchos de los resultados más negativos observados en dinoflagelados (inhibición total del crecimiento y mortalidad celular) se han obtenido en experimentos mediante el sistema de Couette (Tabla 1) bajo valores de ε mucho menores que los generados mediante agitador orbital, y teóricamente similares a los que ocurren en el océano [5,6]. Estos efectos contrastan con los más moderados obtenidos bajo las elevadas ε de la agitación orbital, si bien el distinto grado de inhibición del crecimiento y las alteraciones

Tabla 1. Estudios centrados en el efecto de la turbulencia de pequeña escala en diferentes especies fitoplanctónicas. Se incluye el tamaño de los organismos, el cual puede influir en la respuesta observada. Este valor es el indicado en cada estudio (aproximadamente, la longitud del eje longitudinal) o bien el que aparece en la guía taxonómica de [38] (se indica entre corchetes). Los valores de la tasa de disipación de la energía turbulenta (ϵ) son los citados en cada estudio o han sido calculados a partir de los datos que éste aportaba. Los efectos se refieren al crecimiento de la población (*sensu lato*) codificados según: no efecto (=), aumentado (>), disminuído (<) o inhibido (<<), y muerte celular (X). Cuando un estudio incluía otro aspecto biológico, se indica en la columna "Parámetro".

Especie						
Algas no dinoflagelados	Referencia	Tamaño (μm)	Sistema experimental	ϵ ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$)	Efecto	Parámetro
<i>Anabaena cylindrica</i>	[39]	[7]	Agitador		<	
<i>Anabaena spiroides</i>	[40]	n.a.			<	
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	[41]	[8-12 x 30-150]	Rueda de plancton	0,3	>	
<i>Brachiomonas submarina</i>	[42]	27.5	Rejilla oscilante	$10^{-3} - 10^{-6}$	<	incorporación ^{14}C
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	[43]	[4-20]	Burbujeo		</>	cadena
<i>Ditylum brightwellii</i>	[9]	[25-100 x 80-130]	Cilindro de Couette	0,02 – 0,2	>	incorporación de N
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	[44]	9	Agitador	≥ 2	=	
<i>Dunaliella viridis</i>	[45]	13	Burbujeo		>	
<i>Isochrysis galbana</i>	[44]	6	Agitador	≥ 2	=	
<i>I. galbana</i>	[46]	6	Rejilla oscilante	1	=	
<i>Olisthodiscus luteus</i>	[44]	15	Agitador	≥ 2	=	
<i>Phaeocystis globosa</i>	[47]	3-5	Rejilla oscilante	$10^{-4} - 10^{-6}$	</>	Colonias
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	[42]	20	Rejilla oscilante		</>	
<i>Scenedesmus</i> sp.	[48]	n.a.	Burbujeo		</>	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	[49]	16	Cilindro de Couette	12,7-3100	<	
<i>Skeletonema costatum</i>	[43]	n.a.	Burbujeo		</>	Cadenas
<i>S. costatum</i>	[41]	n.a.	Rueda de plancton	0.3	>	
<i>Spirulina</i>	[50]	[7]	Rueda de paletas		>	
<i>Stichococcus</i> sp.	[48]	n.a.	Burbujeo		</>	
<i>Thalassiosira</i> sp.	[44]	8	Agitador	≥ 2	>	
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	[44]	8	Agitador	≥ 2	>	

Dinoflagelados	Referencia	Tamaño (µm)	Sistema experimental	ε (cm ² ·s ⁻³)	Efecto	Parámetro
Blastodinales						
<i>Pfiesteria piscicida</i>	[51]	12-20	Cilindro de Couette	0,09	<	
Gonyaulacales						
<i>Alexandrium catenella</i>	[52]	30	Barra oscilante	10 ⁻⁴ , 1	=	Tamaño
<i>A. catenella</i>	[7]	30	Orbital	27	<	Quistes, Toxina
<i>A. catenella</i>	[7]	30	Rejilla oscilante	0,4	=	Quistes, Toxina
<i>Alexandrium fundyense</i>	[20]		Cilindro de Couette	0,1	<	Toxina
<i>A. fundyense</i>	[52]	30	Barra oscilante	1	>	Tamaño
<i>Alexandrium minutum</i>	[44]	17	Rejilla oscilante	1	=	
<i>A. minutum</i>	[53]	[30]	Cilindro de Couette	164	<	Motilidad
<i>A. minutum</i>	[19]	18	Agitador	2	<	Tamaño, DNA
<i>A. minutum</i>	[7]	18	Agitador	27	<	Quistes, Toxina
<i>A. minutum</i>	[7]	18	Rejilla oscilante	0,4	=	Quistes, Toxina
<i>Alexandrium tamarense</i>	[52]	30	Barra oscilante	10 ⁻⁴ , 1	=	Tamaño
<i>A. tamarense</i>	[8]	[30 – 35]	Agitador		<<	
<i>Ceratium fusus</i>	[52]	150-300	Barra oscilante	1	<	Tamaño
<i>Ceratium tripos CL1</i>	[52]	150-300	Barra oscilante	1	<<	Tamaño
<i>C. tripos CL3</i>	[52]	150-300	Barra oscilante	1	<<	Tamaño
<i>C. tripos</i>	[15]	200	Rejilla oscilante	0,05-1	<	
<i>Ceratocorys horrida</i>	[16]	[150 – 200]	Agitador	0,1-1	<	Morfología
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	[54]	[15 – 20]	Agitador		X	
<i>C. cohnii</i>	[54]	[15 – 20]	Agitador magnético o burbujeo		=	
<i>C. cohnii</i>	[55]	15 – 20	Agitador	0,1-≥1	<<	Ciclo celular
<i>Fragilidium subglobosum</i>	[15]	40 – 60	Rejilla oscilante	0,05-1	=/>	Ingestión
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	[56]	[30 – 35]	Cilindro de Couette	0,73	<<	Clorofila
<i>L. polyedrum</i>	[57]	35	Cilindro de Couette	0,18	<	
<i>L. polyedrum</i>	[57]	35	Agitador		<	
<i>L. polyedrum</i>	[58]	35	Cilindro de Couette	0,2, 1, 3,5	<, X	Ciclo celular
<i>L. polyedrum</i>	[58]	35	Agitador		<	
<i>L. polyedrum</i>	[52]	30	Barra oscilante	1	>	Tamaño
<i>L. polyedrum</i>	[37]	30	Barra oscilante	10	<	Tamaño, Cadenas

Dinoflagelados	Referencia	Tamaño (µm)	Sistema experimental	ε (cm ² ·s ⁻³)	Efecto	Parámetro
<i>L. polyedrum</i>	[5]	[30 – 35]	Cilindro de Couette	0,2	<<	Clorofila
<i>L. polyedrum</i>	[5]	[30 – 35]	Agitador	200	<<	
<i>L. polyedrum</i>	[59]	[30 – 35]	Cilindro de Couette	0,045	<<	Fotosíntesis
<i>Oxyrrhis marina</i>	[46]	16	Rejilla oscilante	1	<	Ingestión
<i>Pyrocystis fusiformis</i>	[52]	500	Barra oscilante	10 ⁻⁴ , 1	=	Tamaño
<i>Pyrocystis noctiluca</i>	[52]	[150 – 350]	Barra oscilante	1	<<	Tamaño
<i>Scrippsiella lachrymosa</i>	[22]	[10-17]	Agitador magnético		<	Enquista-miento
<i>S. trochoidea</i>	[44]	20	Agitador	2	<<, X	
Gymnodiniales						
<i>Akashiwo sanguinea</i>	[23]	36	Rejilla oscilante	1	X	
<i>A. sanguinea</i>	[23]	36	Agitador	2	<<	DNA, RNA, Morfología
<i>A. sanguinea</i>	[6]	[40 – 75]	Cilindro de Couette	0,011	<	Clorofila
<i>A. sanguinea</i>	[60]	35	Cilindro de Couette	4,6	<<	Morfología, migración
<i>Amphidinium carterae</i>	[61]	[10 – 15]	Agitador o Burbujeo		X	
<i>Gymnodinium catenatum</i>	[52]	60	Barra oscilante	1	>	Tamaño
<i>Gyrodinium sp.</i>	[52]	60	Barra oscilante	10 ⁻⁴ , 1	=	Tamaño
<i>Gyrodinium sp.</i>	[19]	10	Agitador	2	=	Tamaño, DNA
Peridinales						
<i>Heterocapsa triquetra</i>	[62]		Rueda de paletas	0,1	<	
<i>H. triquetra</i>	[55]	15 – 17	Agitador	0,1-≥1	<<	Ciclo celular
<i>H. triquetra</i>	[63]	18	Rejilla oscilante	0,05	>	
<i>Peridinium gatunense</i> (as <i>P.cinctum</i> f. <i>westii</i>)	[24]	50	Agitador		<	Mitosis
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	[44]	20	Agitador	>2	<<, X	
Prorocentrales						
<i>Prorocentrum micans</i>	[44]	18	Agitador	2	<	
<i>P. micans</i>	[60]	[30 – 50]	Cilindro de Couette		<<	Morfología, migración
<i>P. triestinum</i>	[44]	11	Agitador	>2	<<	
<i>P. triestinum</i>	[19]	13	Agitador	2	<	Tamaño, DNA

diversas, se han producido cuando la agitación persiste más de 4 días [7]. Con el agitador orbital, la desintegración celular se observó únicamente en los experimentos iniciales [8] en los que no se disponía de estimaciones de ϵ , las cuales serían probablemente muchísimo más altas que las utilizadas en experimentos posteriores por otros autores.

Efectos de la turbulencia en cultivos de fitoplancton

Hasta el momento, los estudios ecofisiológicos teóricos o en laboratorio indican que la turbulencia de pequeña escala puede interferir con la transferencia de moléculas hacia y desde el interior celular. El movimiento relativo entre el fluido y la célula (ya sea por el flujo turbulento o por la sedimentación o la natación de los organismos) en función del tamaño celular, puede modular o paliar el grado de limitación nutricional. Concretamente, en condiciones de limitación de nutrientes y bajo un régimen turbulento, las células mayores de 60 μm pueden ver incrementado el flujo de moléculas hasta un 50% en comparación a las células que se encontrasen inmersas en un fluido estacionario [9,10,11]. La turbulencia puede interferir también con la tasa de encuentro de depredadores y presas [12,13,14,15], y como consecuencia puede modificar las tasas de ingestión.

Entre las especies fitoplanctónicas estudiadas, el grupo de los dinoflagelados parece ser especialmente sensible, aunque la respuesta es específica y marcadamente influenciada por las condiciones experimentales (Tabla 1). Las alteraciones observadas incluyen modificaciones de la forma [16] y de la natación [17,18,19], incremento [20] o disminución del contenido celular de toxinas [7], inhibición del enquistamiento [7,21,22], deterioro mecánico de las células [5,8], aumento del DNA y del volumen celular, [19,23] menor tasa de crecimiento neto y de biomasa final de los cultivos [7,19,23], inhibición de la división celular [24] o inducción de bioluminiscencia [25,26]. A menudo los cambios observados revierten al cesar la turbulencia. En la Fig. 1 se ilustra la respuesta de *Alexandrium minutum* y *A. catenella* expuestos a agitación orbital (120 rpm, $\epsilon \sim 27 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) descrito en [7]. Cuando la exposición a la turbulencia se mantuvo durante un largo periodo (16 días), la tasa neta de duplicación disminuyó significativamente en *A. minutum* (de $0,25 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$ a $0,19 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$) y el número de células al final del experimento fue más bajo (ca. 55,4%) que en los cultivos controles en reposo (Fig. 1A). En *A. catenella*, la tasa neta de duplicación no se vio marcadamente modificada por la turbulencia aunque los cultivos entraron antes en la fase estacionaria y el número final de células fue significativamente menor (23%) que en los tratamientos quietos (Fig. 1B). Asimismo, la concentración de toxina GTX (del tipo PSP) presentó unos niveles celulares significativamente más bajos en los tratamientos con turbulencia (Figs. 1C y D). Estos tres parámetros no se vieron significativamente modificados por la agitación aplicada únicamente durante 4 días, ya fuera durante la fase exponencial o la estacionaria de los cultivos [7]. En cambio, la proporción de quistes de ecdisis disminuyó inmediatamente con la aplicación de la turbulencia y se recuperó también con

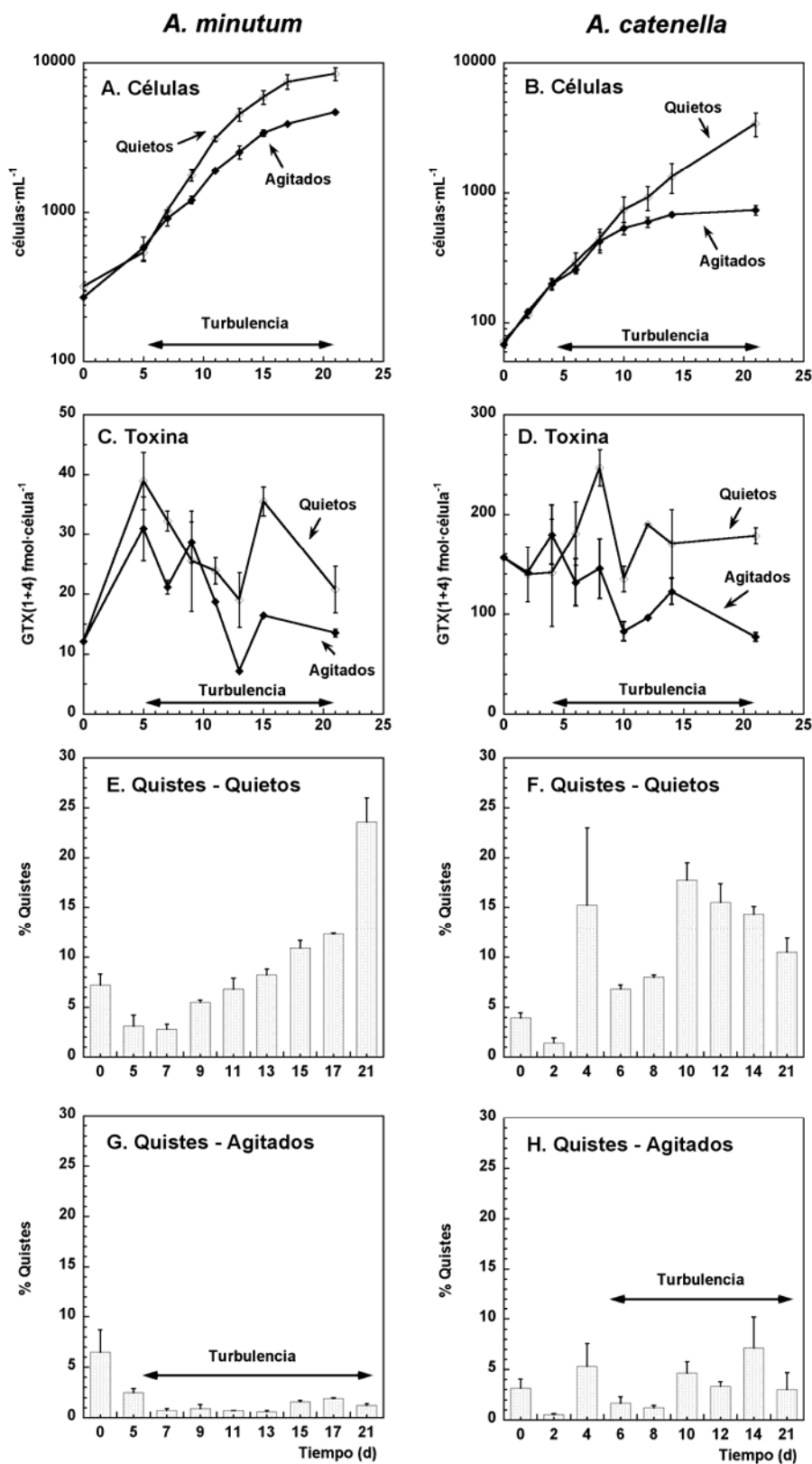


Figura 1. Respuestas a la turbulencia generada por un agitador orbital en cultivos de *Alexandrium minutum* y *A. catenella*. Modificado a partir de las Figuras 1 y 3 de [7].

rapidez al retornar al reposo. En las Figs. 1G y 1H se muestran los resultados de los tratamientos agitados durante 16 días, aunque esta respuesta se observó cuando la turbulencia se aplicó durante 4 días en la fase exponencial o en la estacionaria [7]. Sin embargo, la agitación generada por un sistema de rejillas oscilando verticalmente a unos $0,4 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$ [7].

Globalmente, el tipo de respuesta observada en los dinoflagelados apunta a una interferencia de la turbulencia de pequeña escala con la división celular y el ciclo de vida (quistes), aunque los mecanismos subyacentes implicados son desconocidos. Su investigación requiere la combinación de sofisticadas técnicas biológicas y de diseño experimental. Una de las preguntas abiertas es cuál es el motivo de la particular sensibilidad de este grupo de fitoplancton. Entre las hipótesis propuestas se baraja la posibilidad de que sea el resultado de la expansión evolutiva de este grupo durante el mesozoico, cuando los océanos podrían haber sido menos turbulentos que en períodos posteriores [27], que la turbulencia interfiera con el patrón de migración [8] o que altere el ensamblaje de los microtúbulos durante la dinomitosis [23,28]. Nuestro grupo está estudiando estas dos últimas hipótesis.

La turbulencia de pequeña escala en el contexto de las PANs

¿Cuál es la significación de estos estudios ecofisiológicos para la comprensión de la dinámica de las poblaciones microalgales y del caso particular de las proliferaciones nocivas?. Los estudios empíricos a muy pequeña escala están ayudando a revelar los mecanismos de adaptación celulares pero deben situarse con prudencia en el contexto de la dinámica de las PANs. En la naturaleza, las respuestas ecofisiológicas individuales se entrelazan con otros factores biológicos y ambientales y con los patrones de circulación del agua a distintas escalas espacio-temporales, lo cual modula conjuntamente la dinámica de la comunidad microplanctónica, y con ella la de las PANs. Está bien documentado que la estabilidad de la columna de agua y las condiciones de calma atmosférica parecen favorecer las proliferaciones algales (p.e. [24,29,30,31]), aunque la proliferación de dinoflageladas puede producirse en hábitats muy diversos que incluyen las zonas frontales (p.e. [32,33]). El principal reto actual es el seguimiento simultáneo de la variabilidad de las dinámicas biológica y física, con la resolución espacio-temporal apropiada. Los avances en la tecnología microelectrónica, óptica, acústica y en el registro instrumental automático pueden ser de gran utilidad. Recientemente, gracias a alguna de estas nuevas tecnologías se ha detectado que el plancton puede organizarse espacialmente en las llamadas "capas finas", de un grosor de $\sim 10 \text{ cm}$ a $\sim 3,5 \text{ m}$ (p.e. [34,35,36]). Esta distribución puede ser el resultado de un forzamiento por parte de la microestructura de velocidades de la columna de agua sobre los organismos y/o la manifestación de la sensibilidad del plancton a variaciones hidrodinámicas de muy pequeña escala. Un ejemplo de ello es la distribución vertical de *Alexandrium catenella*, concentrado en capas de menos de 2 m , coincidiendo con valores mínimos de turbulencia [37] en la

costa oeste de los EEUU. En nuestro proyecto TURECOTOX (CTM2006-13884-C02-00/MAR) estamos combinando estimaciones de la microestructura de la columna de agua y registros de corrientes mediante perfilador Doppler con el seguimiento de las comunidades fitoplanctónicas con una resolución a pequeña escala. Con ello, esperamos poder establecer relaciones empíricas entre la turbulencia del agua y la dinámica poblacional de las PANs en el Delta del Ebro y las Rías Baixas.

Agradecimientos

Nuestro trabajo y participación en la Reunión Ibérica del Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas ha sido financiada por el proyecto TURECOTOX (CTM2006-13884-C02-00/MAR) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- [1] Mann, K.H., J.R.N. Lazier. 1991. *Dynamics of marine ecosystems. Biological-physical interactions in the oceans*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 466 pp.
- [2] Guadayol, Ò., F. Peters. 2006. Analysis of wind events in a coastal area: a tool for assessing turbulence variability for studies on plankton. *Sci. Mar.* 70:9-20.
- [3] Peters, F., J.M. Redondo. 1997. Turbulence generation and measurement: application to studies on plankton. En: C. Marrasé, E. Saiz y J.M. Redondo (Eds.). *Lectures on plankton and turbulence*. *Sci. Mar.* 205-228.
- [4] Peters, F., C. Marrasé. 2000. Effects of turbulence on plankton: an overview of experimental evidence and some theoretical considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 205:291-306.
- [5] Thomas, W.H., C.H. Gibson. 1990. Quantified small-scale turbulence inhibits a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. *Deep-Sea Res.* 37:1583-1593.
- [6] Thomas, W.H., C.H. Gibson. 1992. Effects of quantified small-scale turbulence on the dinoflagellate, *Gymnodinium sanguineum (splendens)*: contrasts with *Gonyaulax (Lingulodinium) polyedra*, and the fishery implication. *Deep-Sea Res.* 39:1429-1437.
- [7] Bolli, L., G. Llaveria, E. Garcés, Ò. Guadayol, K. van Lenning, F. Peters, E. Berdalet. En Prensa. Modulation of ecdysal cyst and toxin dynamics of two *Alexandrium* (Dinophyceae) species under small-scale turbulence. *Biogeosciences*.
- [8] White, A.W. 1976. Growth inhibition caused by turbulence in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33:2598-2602.
- [9] Pasciak, W.J., J. Gavis. 1975. Transport limited nutrient uptake rates in *Ditylum brightwelli*. *Limnol. Oceanogr.* 20:604-617.
- [10] Karp-Boss, L., E. Boss, P.A. Jumars. 1996. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. 34:71-109.
- [11] Peters, F., L. Arin, C. Marrasé, E. Berdalet, M.M. Sala. 2006. Effects of small-scale turbulence on the growth of two diatoms of different size in a phosphorus-limited medium. *Mar. Sys.* 61:134-148.
- [12] Rothschild, B.J., T.R. Osborn. 1988. Small-scale turbulence and plankton contact rates. *J. Plankton Res.* 10:465-474.
- [13] Marrasé, C., J.H. Costello, T. Granata, J.R. Strickler. 1990. Grazing in a turbulent environment: Energy dissipation, encounter rates, and efficacy of feeding currents in *Centropages hamatus*. *Ecology*. 87:1653-1657.
- [14] Peters, F., T. Gross. 1994. Increased grazing rates of microplankton in response to small-scale turbulence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 115:299-307.

- [15] Havskum, H., P.J. Jansen, E. Berdalet. 2005. Effect of turbulence on sedimentation and net population growth of the dinoflagellate *Ceratium tripos* and interactions with its predator, *Fragilidium subglobosum*. *Limnol. Oceanogr.* 50:1543-1551.
- [16] Zirbel, M.J., F. Veron, M.I. Latz. 2000. The reversible effect of flow on the morphology of *Ceratocorys horrida* (Peridinales, Dinophyta). *J. Phycol.* 36:46-58.
- [17] Karp-Boss, L., P.A. Jumars. 1998. Motion of diatom chains in steady shear flow. *Limnol. Oceanogr.* 43:1767-1773.
- [18] Karp-Boss, L., E. Boss, P.A. Jumars. 2000. Motion of dinoflagellates in a simple shear flow. *Limnol. Oceanogr.* 45:1594-1602.
- [19] Berdalet, E., F. Peters, L. Koumandou, C. Roldán, Ò. Guadayol, M. Estrada. En prensa. Species-specific physiological response of dinoflagellates to quantified small-scale turbulence. *J. Phycol.* 43.
- [20] Juhl, A.R., V.L. Trainer, M.I. Latz. 2001. Effect of fluid shear and irradiance on population growth and cellular toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 46:758-764.
- [21] Anderson, D.M., N.L. Lindquist. 1985. Time-course measurements of phosphorus depletion and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* (Lebour). *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 86:1-13.
- [22] Smith, B.C., A. Persson. 2005. Synchronization of encystment of *Scrippsiella lachrymosa* (Dinophyta). *J. Applied Phycol.* 17:317-321.
- [23] Berdalet, E. 1992. Effects of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *J. Phycol.* 28:267-272.
- [24] Pollinger, U., E. Zemel. 1981. In situ and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division processes of *Peridinium cinctum* forma *westii* (Lemm.) Lefèvre. *Br. Phycol. J.* 16.
- [25] Latz, M.I., J. Rohr. 1999. Luminescent response of the red tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* to laminar and turbulent flow. *Limnol. Oceanogr.* 44:1423-1435.
- [26] Cussatlegrass, A.-N., P. Le Gal. 2004. Bioluminescence of the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca* induced in laminar and turbulent Couette flow. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 310:227-246.
- [27] Kennett, J.P. 1982. *Marine Geology*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 813 pp.
- [28] Karentz, D. 1987. Dinoflagellate cell cycles. En: H.D. Kumar (Ed.). *Phycotalk*. Print House, India Ltd. Maharashtra, India, India. 377-397.
- [29] Wyatt, T., J. Horwood. 1973. Model which generates red tides. *Nature*. 244:238-240.
- [30] Margalef, R., M. Estrada, D. Blasco. 1979. Functional morphology of organisms involved in red tides, as adapted to decaying turbulence. En: D.L. Taylor y H.H. Seliger (Eds.). *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier North Holland Inc., New York, USA. 89-94.
- [31] Berman, T., B. Shteiman. 1998. Phytoplankton development and turbulent mixing in Lake Kinneret (1992-1996). *J. Plank. Res.* 20:709-726.
- [32] Estrada, M., D. Blasco. 1979. Two phases of the phytoplankton community in the Baja California upwelling. *Limnol. Oceanogr.* 24:1065-1080.
- [33] Smayda, T.J., C.S. Reynolds. 2001. Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.* 23:447-461.
- [34] Donaghay, P.L., H.M. Rines, J.M. Sieburth. 1992. Simultaneous sampling of fine scale biological, chemical and physical structure. *Arch. Hydrobiol.* 36:97-108.
- [35] Cowles, T.J., R.A. Desiderio. 1993. Resolution of biological micro-structure through *in situ* fluorescence emission spectra. *Oceanography*. 6:105-111.
- [36] Cowles, T.J., R.A. Desiderio, M.E. Carr. 1998. Small-scale planktonic structure: persistence and trophic consequences. *Oceanography*. 11:4-9.
- [37] Sullivan, J.M., E. Swift, P.L. Donaghay, J.E.B. Rines. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae*. 2:183-199.
- [38] Tomas, C.R. 1997. *Identifying marine phytoplankton*. Florida Marine Research Institute, Academic Press, St. Petersburg, Florida, USA. 858 pp.

- [39] Fogg, G.E., Than-Thun. 1960. Interrelations of photosynthesis and assimilation of elementary nitrogen in a blue green alga. *Proc. R. Soc. London B*. 153:111-127.
- [40] Volk, S.L., H.K. Phinney. 1968. Mineral requirements for the growth of *Anabaena spiroides* in vitro. *Can. J. Bot.* 46:619-630.
- [41] Thomas, W.H., C.T. Tynan, C.H. Gibson. 1997. Turbulence-phytoplankton interrelationships. En: *Progress Phycological Research*. Biopress Ltd. 283-324.
- [42] Savidge, G. 1981. Studies of the effects of small-scale turbulence on phytoplankton. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 61:477-488.
- [43] Schöne, H. 1970. Untersuchungen zur ökologischen Bedeutung des Seegangs für das Plankton mit besonderer Berücksichtigung mariner Kieselalgen. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 55:595-677.
- [44] Berdalet, E., M. Estrada. 1993. Effects of turbulence on several phytoplankton species. En: T. Smayda, Y. Shimizu (Eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Developments in Marine Biology*. 5th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Rhode Island. USA. 737-740.
- [45] Aguilera, J., C. Jiménez, J.M. Rodríguez-Maroto, F.X. Niell. 1994. Influence of subsidiary energy on growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco: the role of extra energy in algal growth. *J. Applied Phycol.* 6:323-330.
- [46] Havskum, H. 2003. Effects of small-scale turbulence on interactions between the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina* and its prey, *Isochrysis* sp. *Ophelia*. 57:125-135.
- [47] Schapira, M., L. Seuront, V. Gentilhomme. 2006. Effects of small-scale turbulence on *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) growth and life cycle. *J. exp.mar. Biol. Ecol.* 335:27-38.
- [48] Bakus, G.J. 1973. Some effects of turbulence and light on competition between two species of phytoplankton. *Inv. Pesq.* 37:87-99.
- [49] Hondzo, M.M., A. Kapur, C.A. Lembi. 1998. The effect of small-scale fluid motion on the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Hydrobiologia*. 364:225-235.
- [50] Richmond, A., A. Voshak. 1978. Spirulina culture in Israel. *Arch. Hydrobiol.* 11:274-280.
- [51] Stoecker, D.K., A. Long, S.E. Suttles, L.P. Sanford. 2006. Effect of small-scale shear on grazing and growth of the dinoflagellate *Pfiesteria piscicida*. *Harmful Algae*. 5:407-418.
- [52] Sullivan, J.M., E. Swift. 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *J. Phycol.* 39:83-94.
- [53] Chen, D., K. Muda, K. Jones, J. Leftley, P. Stansby. 1998. Effect of shear on growth and motility of *Alexandrium minutum* Halim, a red-tide dinoflagellate. En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt. *Harmful Algae*. Xunta de Galicia e Intergovernmental Oceanographic Commission. Vigo, Spain. 352-355.
- [54] Tuttle, R.C., I. Loeblich, A. R. 1975. An optimal growth medium for the dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Phycologia*. 14:1-8.
- [55] Yeung, P.K.K., J.T.Y. Wong. 2003. Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G(1) phase in dinoflagellates. *Protoplasma*. 220:173-178.
- [56] Gibson, C.H., W.H. Thomas. 1995. Effects of turbulence intermittency on growth inhibition of a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *J. Geophys. Res.* 100:24841-24846.
- [57] Juhl, A.R., V. Velazquez, M.I. Latz. 2000. Effect of growth conditions on flow-induced inhibition of population growth of a red-tide dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.* 45:905-915.
- [58] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2002. Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *J. Phycol.* 38:683-694.
- [59] Thomas, W.H., M. Vernet, C.H. Gibson. 1995. Effects of small-scale turbulence on photosynthesis, pigmentation, cell division, and cell size in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 31:50-59.
- [60] Tynan, C.T. 1993. The effects of small-scale turbulence on dinoflagellates. Scripps Institution of Oceanography. University of California at San Diego. San Diego, Ca, USA. 227.

- [61] Galleron, C. 1976. Synchronization of the marine dinoflagellate *Amphidinium carteri* in dense cultures. *J. Phycol.* 12:69-73.
- [62] Dempsey, H.P. 1982. The effects of turbulence on three algae: *Skeletonema costatum*, *Gonyaulax tamarens*, *Heterocapsa triquetra*. Massachusetts Institute of Technology. Cambridge, Massachusetts, USA. 46 pp.
- [63] Havskum, H., P.J. Hansen. 2006. Net growth of the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* and pH: why turbulence matters. *Aquat. Microb. Ecol.* 42:55-62.

Microplancton tóxico y nocivo en las Rías Gallegas en los años 2003 a 2006

Yolanda Pazos y Ángeles Moroño

Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia
Peirao de Vilaxoán s/n, 36611. V
ilagarcía de Arousa. Pontevedra

Resumen

El dinoflagelado productor de toxinas paralizantes (PSP), *Gymnodinium catenatum*, desarrolló un intenso episodio tóxico en el año 2005, después de diez años de casi total ausencia en las aguas de la costa de Galicia. Este episodio se asoció con procesos de surgencia negativa (*downwelling*) y su inicio, con una corriente costera superficial, hacia el norte ($0,2\text{-}0,6\text{ m s}^{-1}$) paralela a la costa de Portugal. En 2006 se produjo una réplica con menores concentraciones celulares. El también productor de PSP, *Alexandrium minutum*, presentó proliferaciones en verano, en puntos geográficos muy concretos (Estuario de Baiona y Ría de Ares), relacionadas con estratificación halina y con resuspensión de quistes locales.

El dinoflagelado responsable de la mayor parte de los cierres en los polígonos de producción de mejillón de las Rías, por toxinas lipofílicas, *Dinophysis acuminata*, presentó estos años dos floraciones, una en primavera debida sobre todo, a crecimiento *in situ* y otra en otoño, en la que además hubo advección desde la parte externa de las Rías, a través del nivel de superficie, excepto en el año 2006 en el que sólo proliferó en otoño. *Dinophysis acuta* proliferó cada año, en Octubre. El inicio de sus episodios tóxicos coincide con surgencia negativa.

Las proliferaciones de diatomeas *Pseudo-nitzschia* spp., asociadas con acumulación de ácido domoico en mejillón cultivado en batea, se detectaron en momentos muy puntuales, máximo de una o dos semanas en los meses de Abril o Mayo (2004 y 2005) y Septiembre (2004 y 2006).

Se pudieron observar a simple vista en las rías gallegas, mareas rojas de *Lingulodinium polyedra* en la Ría de Ares-Betanzos en 2003, asociadas con la detección de yesotoxinas, roja también fue la que se observó en la zona interna de Muros en 2005, por *Myrionecta rubra* y roja anaranjada la de *Noctiluca scintillans* en Pontevedra, Muros, Arousa y Baldaio en 2006.

Se identificaron, por primera vez en la zona dos organismos, el dinoflagelado *Takayama helix*, que es muy posible que haya sido mal identificado en la zona, como *Gyrodinium pulchellum* y la cianobacteria productora de microcistinas, *Microcystis botrys*, que pudo haber sido malidentificada como *M. aeruginosa* y que produjo una marea verde, casi monoespecífica, en un área próxima a la desembocadura del río Umia, en Septiembre de 2006, cuando se tuvo que hacer un cierre de las zonas de producción de moluscos para protegerlos de un vertido químico tras el incendio de la planta química Brenntag.

Material y métodos

La Unidad de Oceanografía y Fitoplancton del Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Xunta de Galicia realiza el control oficial, mediante un seguimiento semanal intensivo en 57 estaciones (Fig. 1), del fitoplancton tóxico y/o nocivo y las condiciones oceanográficas, en las principales zonas de producción y puntos representativos desde el punto de vista hidrográfico en la costa de Galicia.

En 39 estaciones se realizan perfiles verticales con un CTD Sea-Bird 25. Se toma un testigo de la columna de agua mediante una manguera de tres tramos (0-5, 5-10 y 10-15 m.) y sobre estas muestras se realiza: la identificación y cuantificación en microscopio óptico invertido del microplancton en submuestras fijadas con lugol tras sedimentar 25 mL en cámaras Utermöhl y la determinación de la composición pigmentaria. Las estaciones costeras se muestrean con sensores portátiles.

Además, con cada muestra de moluscos que se recoge para los análisis de biotoxinas marinas, se toma una muestra de red de plancton que es evaluada cualitativamente y cuya información complementa a la de las estaciones oceanográficas en la elaboración de la información oceanográfica y de fitoplancton que se utiliza para el informe diario de Situación de Zonas de Producción de moluscos. En determinadas situaciones de episodios tóxicos, estos muestreos llegan a ser diarios y, también en ocasiones puntuales, se usan los datos de fitoplancton, para hacer cierres cautelares de los polígonos.

Resultados y discusión

Dinophysis acuminata y *D. acuta*

La concentración celular máxima detectada de *D. acuminata* fue de 9.120 cel L⁻¹, en la muestra de 5-10 metros de la estación P2 (Bueu) de la Ría de Pontevedra, el 04/04/2005. El recuento integrado (0-15 metros) más elevado correspondió a la estación L1 de la Ría de Ares, el 24/07/2006, con 6.080 cel L⁻¹.

Existe una muy buena concordancia entre los valores detectados de concentraciones celulares de *D. acuminata* y los cierres de los polígonos de producción de mejillón, por toxinas lipofílicas en las Rías de Vigo, Pontevedra, Arousa y Muros, así como en el estuario de Baiona. Sin embargo, en la Ría de Ares, en algunas ocasiones, se detectan concentraciones elevadas de *D. acuminata*, sin que se produzcan cierres de los polígonos y se detectan con frecuencia números altos de *D. sacculus* no asociados con detección de toxicidad lipofílicas. Las especies *D. acuminata*

y *D. sacculus* podrían presentar un solapamiento de caracteres morfológicos y estar siendo mal discernidas, o bien *D. acuminata* en la Ría de Ares, presenta un contenido en toxinas por células diferente al de las Rías Bajas. Esta Ría Alta presenta unas características hidrográficas y patrones de circulación muy diferente al de las Rías Baixas.

La repercusiones económicas y sociales de las proliferaciones de *D. acuminata* en Galicia, se deben no sólo a las elevadas concentraciones detectadas, sino a la alta persistencia de concentraciones que, aún siendo tan bajas como 120 cel L^{-1} en las muestras integrada en la columna de agua (0-15 m.), producen acumulación de toxinas lipofílicas en los moluscos por encima del límite legal y por lo tanto requieren un cierre de la zona de producción.

Existe una gran variabilidad geográfica en la persistencia de concentraciones significativas de *D. acuminata* en las Rías Gallegas (Fig. 1). Aparte de los elevados valores detectados en la Ría de Ares, que podrían estar relacionados con una diferente hidrografía y con la coexistencia de varias especies, los valores máximos de persistencia (15 semanas/año), ocurren en la zona de Bueu, en la Ría de Pontevedra y en la zona de Liméns, en la Ría de Vigo, casos muy nocivos por corresponder con zonas en las que existen polígonos de cultivo de mejillón en batea.

Se detectan también valores elevados de persistencia (10-15 semanas/año) en las estaciones de las bocas de Muros, Pontevedra y Vigo y en el Estuario de Baiona.

Los valores mínimos se detectan en las partes interiores de las Rías de Arousa y Vigo en las que hay zonas que no han estado afectadas, como promedio, ni una semana al año.

Es especialmente significativa la gradación de los valores de esta gráfica, en la parte interna de la Ría de Pontevedra. La circulación en dos celdas, que se constata durante los eventos oceanográficos de surgencia negativa, hace que la parte más interna de la Ría, afectada por los aportes fluviales que van hacia la parte externa de la ría, por superficie y se dirigen a la boca, en muchas ocasiones no se vea afectada por toxinas lipofílicas debidas a los *Dinophysis* que se han transportado durante las surgencias negativas, por superficie desde la parte externa y se acumulan en el frente que produce el Río Lérez. Esto explica las diferencias significativas en los cierres, por toxinas lipofílicas, de los polígonos de bateas Portonovo A, B y C y las mareas rojas que se detectan, con frecuencia, en Raxó.

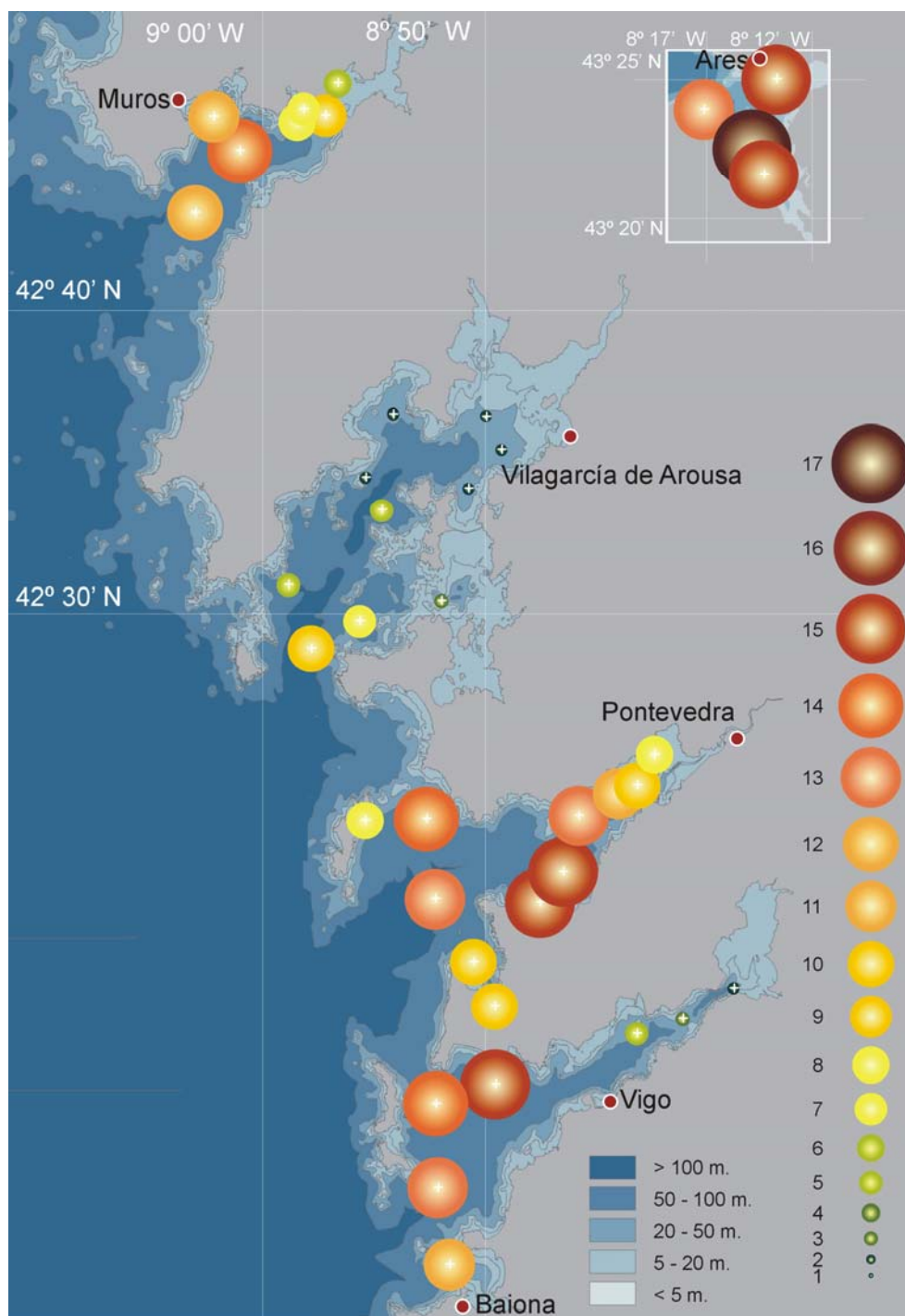


Figura 1. Persistencia de *Dinophysis acuminata* en las Rías Gallegas. Los símbolos son proporcionales al valor promedio (2003-2006), del número de semanas en las que se supera la concentración de 120 cel.L⁻¹ en las muestras integradas (0-15 m.).

Los dinoflagelados tecados *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* (Fig. 2) son las especies más frecuentes que producen acumulación de toxinas

lipofílicas aunque se detectan otras especies del mismo género como *D. caudata*, *D. rotundata*, *D. tripos* y hasta unas veinte diferentes y cuando forman proliferaciones no suelen ser monoespecíficas (Fig. 3) ni producir coloración visible a simple vista. Aunque de modo coloquial, cuando se produce cierre se le denomine también, por parte del sector productor, marea roja.

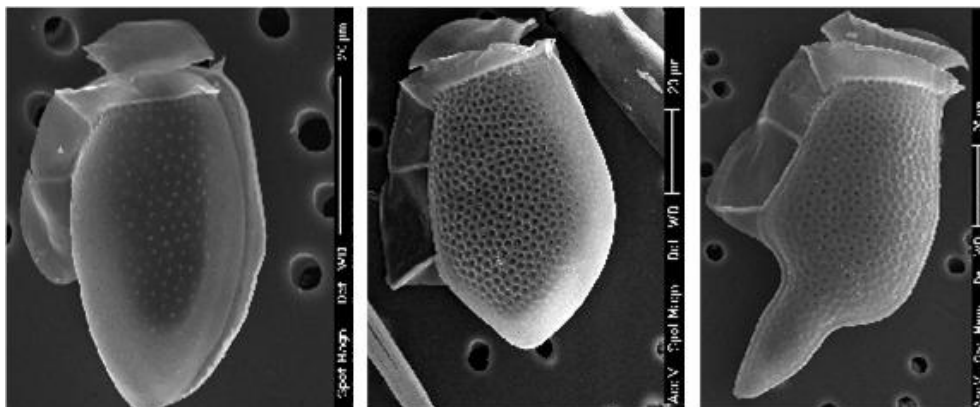


Figura 2.- Microfotografías de tres especies de *Dinophysis* en Microscopio Electrónico de Barrido. De izquierda a derecha *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Gallegas.

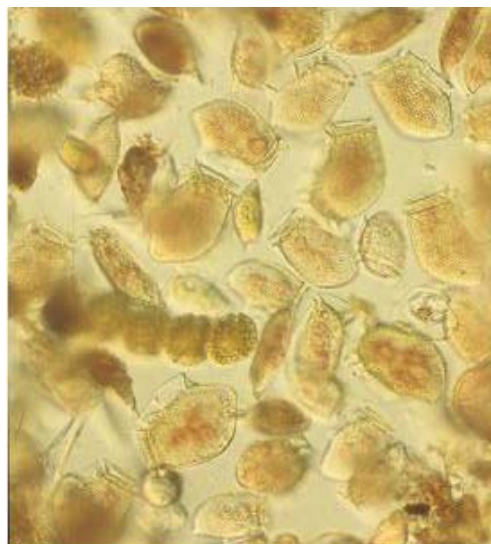


Figura 3.- Microfotografía en microscopio óptico, equipado con Nomarski de un arrastre de red (10 micras) durante una proliferación masiva de varias especies tóxicas en la Ría de Pontevedra, siendo dominante *Dinophysis acuta*.

D. acuminata se presentó todos los años en verano. Los máximos celulares se detectan en el nivel subsuperficial (5 metros) y, sobre todo durante el hundimiento de otoño de 2005 (Fig. 4), momentos durante los cuales se distribuyó en toda la columna de agua.

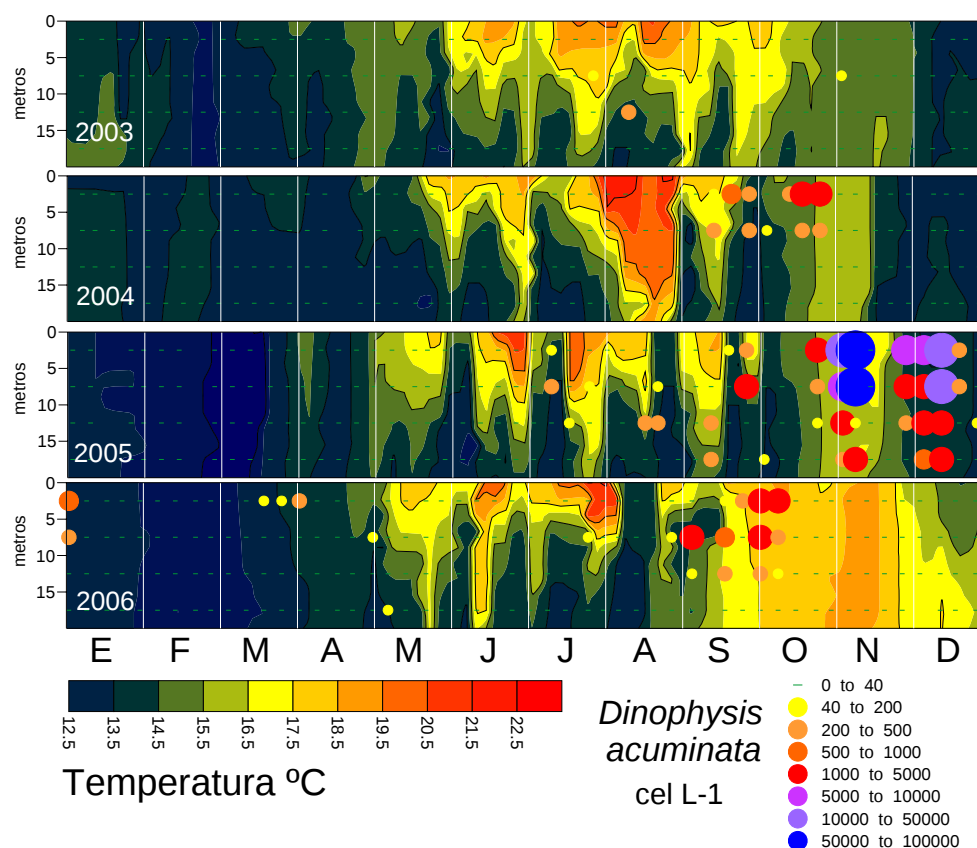


Figura 4.- Distribución vertical de la concentración de *Dinophysis acuminata* (cel L⁻¹) y temperatura (°C) en la estación de Bueu, Ría de Pontevedra en los años 2003 a 2006

D. acuta (Fig. 5) se detecta en las Rías en otoño, con un patrón inicial de Sur a Norte y desde la parte externa a la interna de las rías. Este patrón se asocia con hundimiento de agua superficial de origen oceánico en los años en los que los otoños son más cálidos. Esta especie aparece en muy bajas concentraciones el resto del año y muestra un patrón claro de distribución vertical descendente en la concentración celular en surgencia negativa.

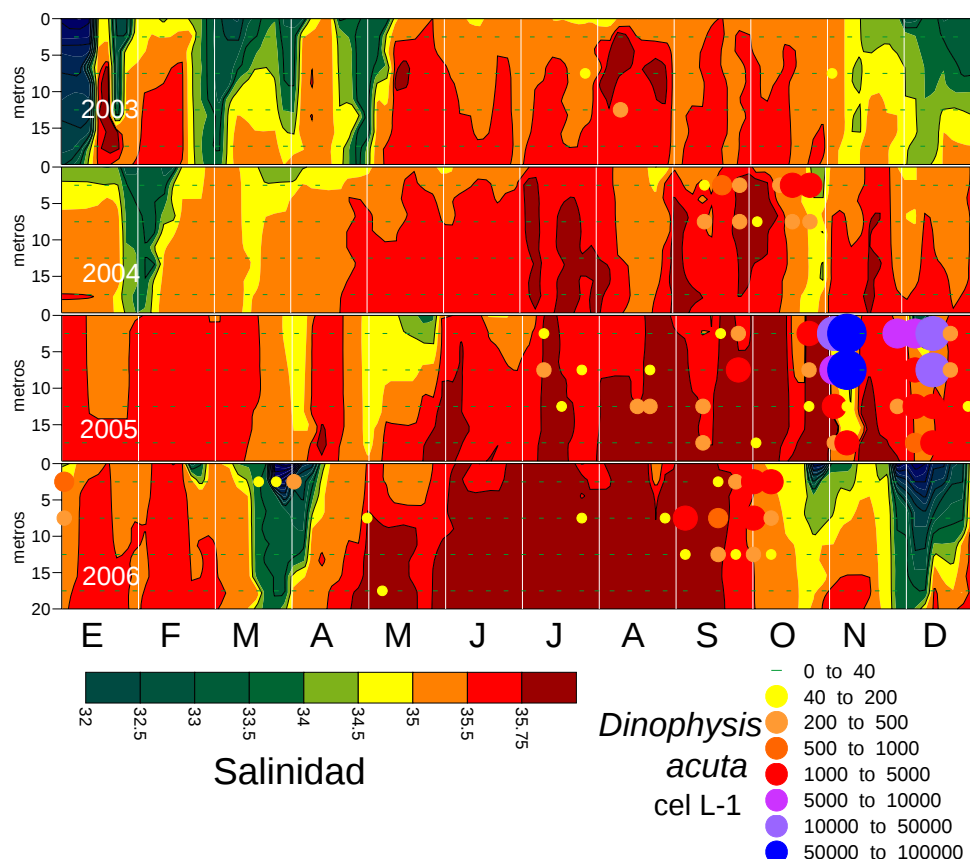
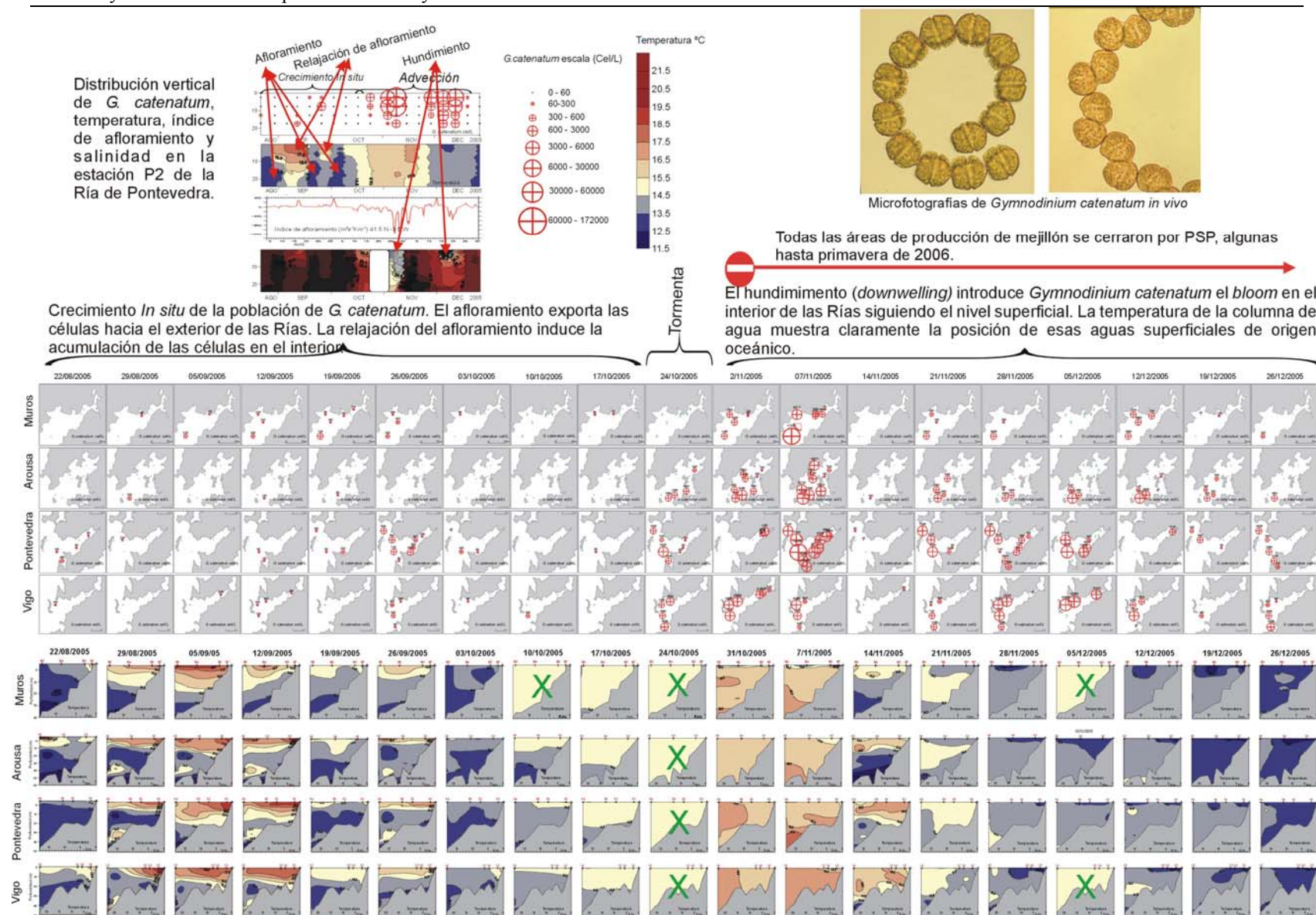


Figura 5. Distribución vertical de la concentración de *Dinophysis acuta* (cel L⁻¹) y salinidad en la estación de Bueu, Ría de Pontevedra en los años 2003 a 2006.

Gymnodinium catenatum

Tras diez años en los que *Gymnodinium catenatum* no desarrollaba un episodio tóxico, en el año 2005 se produjo una proliferación intensa y persistente que causó cierres prolongados en los polígonos de producción de mejillón y un fuerte impacto social y económico.

La cooperación que, desde hace años, existe entre los sistemas de monitorización de los episodios de microplancton tóxico gallego y portugués permitió, en el año 2005, una alerta temprana de una proliferación de *Gymnodinium catenatum* en las Rías Gallegas, un mes antes de que se produjera la acumulación de las toxinas paralizantes en los mejillones y otros organismos marinos destinados a consumo humano. Tras los intercambios de información de las detecciones del mes de Julio, los investigadores portugueses alertaron acerca de altas concentraciones en la plataforma de Lisboa en Septiembre y el progresivo incremento de concentraciones hacia el Norte desde ese momento. De las imágenes de satélite de temperatura superficial se infirió, en tiempo casi real, que estaba presente una corriente costera hacia el Norte durante este período.



El 24 de Octubre de 2004, se detectó un proceso oceanográfico de fuerte hundimiento o surgencia negativa (*downwelling*), valores $Iw < -1000 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1} \text{ Km}^{-1}$ y un agua superficial, de procedencia oceánica, más cálida ($16,5^\circ \text{C}$) y menos salina ($35,2 \text{ P.S.U.}$) (Fig. 6), fluyó por superficie, hacia el interior de las rías introduciendo una población desarrollada de *Gymnodinium catenatum* (máx $1,7 \times 10^5 \text{ cel L}^{-1}$). Datos de un *drifter* lagrangiano confirmaron la presencia de una corriente superficial costera hacia el norte, casi paralela a la costa de Portugal, en esas fechas, con una velocidad de $\approx 0,2 - 0,6 \text{ m s}^{-1}$, coherentes con los valores de concentraciones celulares de este organismo planctónico, que se iban detectando en las estaciones de Sur a Norte.

Esta especie de dinoflagelado desnudo, fotosintético, formador de cadenas y productor de toxinas paralizantes se detecta puntualmente, en bajas concentraciones (entre 10^2 y 10^3 cel L^{-1}) (Fig. 7), casi todos los años, en especial en Otoño. Solamente en determinados años, como en el año 2005 ha producido una proliferación significativa en el interior de las rías, tras un proceso oceanográfico de fuerte hundimiento y con un patrón de incremento temporal de concentración celular de sur a norte que no se detecta en otras especies de dinoflagelados. Las mayores concentraciones celulares se detectan, durante el proceso de hundimiento, en el nivel superficial.

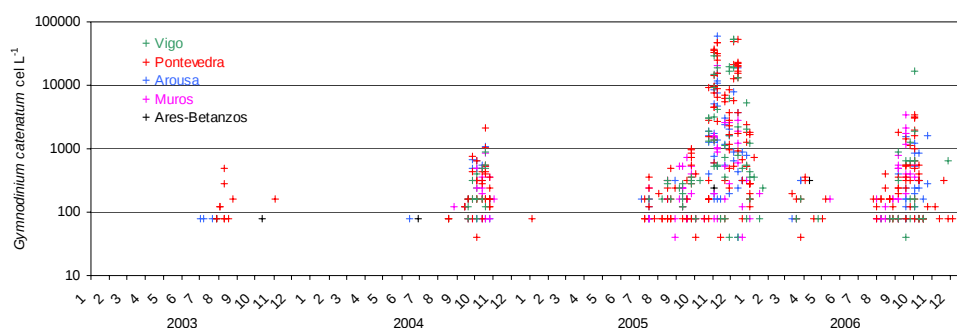


Figura 7. Evolución temporal de *Gymnodinium catenatum* en las 57 estaciones oceanográficas en Galicia durante los años 2003-2006.

Alexandrium minutum

Este dinoflagelado tecado de pequeño tamaño (Fig. 8), asociado con toxinas paralizantes, presenta en Galicia, una ecología completamente diferente al otro productor de PSP, *G. catenatum*.

Alexandrium minutum es una especie residente en zonas muy localizadas de las Rías de Ares, Ensenada de Baiona, Ensenada de Camariñas y de Miño que, sólo en muy contadas ocasiones se detecta en alguna estación de la zona media de la Ría de Pontevedra.

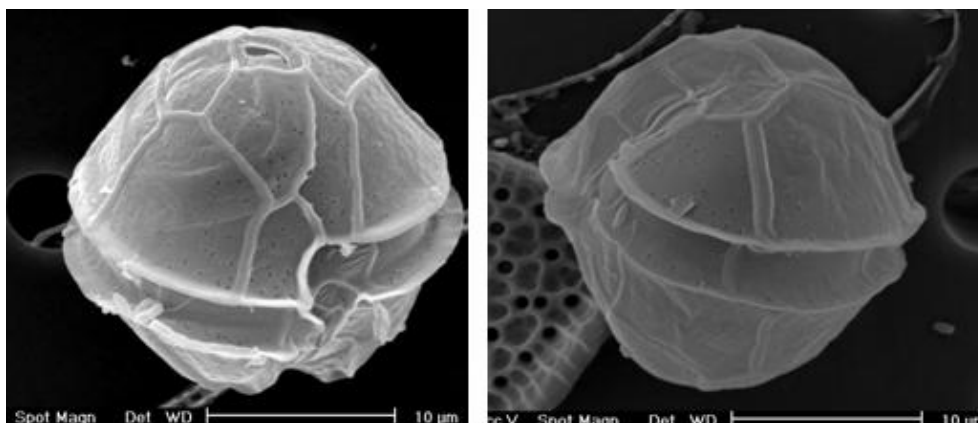


Figura 8. Microfotografías SEM de *Alexandrium minutum* de la Ría de Ares

En el muestreo semanal de las 57 estaciones que ha realizado INTECMAR en los años 2003-2006 se ha desarrollado *A. minutum* (Fig. 9) en la Ensenada de Baiona (Fig. 1) y en las cuatro estaciones de Ares llamadas L1, L2, L3 y L4 siendo la L3 la más interna y más afectada por *A. minutum*. Valores significativos de concentraciones celulares para esta especie ocurren durante el verano.

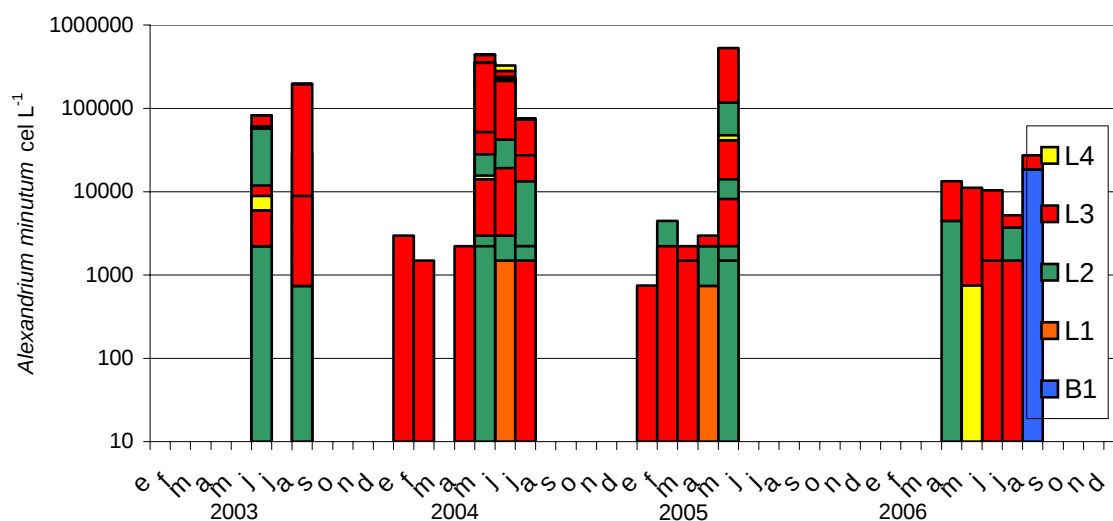


Figura 9. Concentraciones celulares de *Alexandrium minutum* detectadas en las Rías Baixas Gallegas. Estaciones L1 a L4 Ría de Ares. Estación B1, Estuario de Baiona.

Pseudo-nitzschia spp.

El género de diatomeas *Pseudo-nitzschia* incluye especies productoras de ácido domoico y especies que no lo producen. La observación al microscopio óptico de muestras no tratadas no permite la identificación de las diferentes especies (Fig. 10). Aunque presenten un aspecto similar pueden coexistir varias especies. Los caracteres morfológicos que se usan para diferenciar las especies incluyen el número de poroides, de estrías e interestriás que son observables en el microscopio electrónico de transmisión (Fig. 11). El tratamiento previo a la observación en microscopio de transmisión es laborioso y lento y no resulta operativo para un sistema de monitorización de salud pública en el que el factor tiempo es primordial.



Figura 10.- Microfotografía en microscopio óptico de una proliferación de especies de diatomeas de la Ría de Arousa, en las que dominan las del género *Pseudo-nitzschia*.

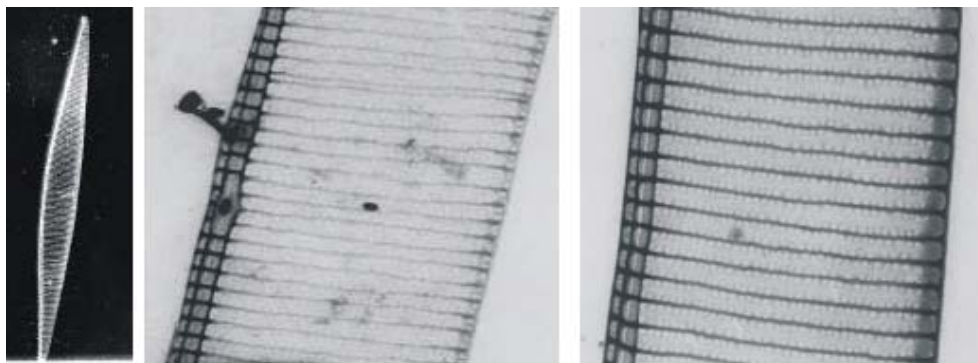


Figura 11.- Microfotografías, en microscopio de transmisión, de un frústulo completo de una célula de *Pseudo-nitzschia* y detalle de la zona central en vista valvar con detalle de la presencia y ausencia del pseudo-nodulo central que permite diferenciar la especie *P. fraudulenta* (foto central), que no es tóxica de la *P. australis* (derecha), que si lo es. Todas ellas son de la Ría de Arousa.

Las proliferaciones de diatomeas *Pseudo-nitzschia* spp., asociadas con acumulación de ácido domoico en mejillón cultivado en batea, se detectaron en momentos muy puntuales, máximo de una o dos semanas en los meses de Abril o Mayo (2004 y 2005) y Septiembre (2004 y 2006).

Lingulodinium polyedrum

A mediados-finales de verano de 2003, se observó una marea de color rojo oscuro (Fig. 12), debida al dinoflagelados tecado *Lingulodinium polyedra* en la parte interna de la Ría de Ares. Se detectaron elevadas concentraciones celulares en todas las estaciones oceanográficas de esa ría, con un máximo de $1,4 \cdot 10^6$ cel L^{-1} en L1 el 01/09/03 (Fig.13).

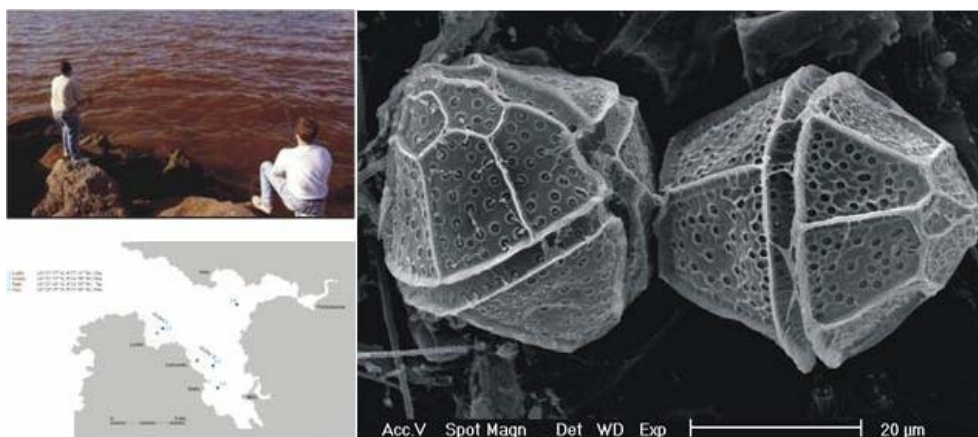


Figura 12. Fotografía de la marea roja que fue publicada en prensa el 26/08/2003 sobre una marea roja en la Ría de Ares-Betanzos, Mapa de estaciones y microfotografía SEM de *Lingulodinium polyedra* de la Ría de Ares

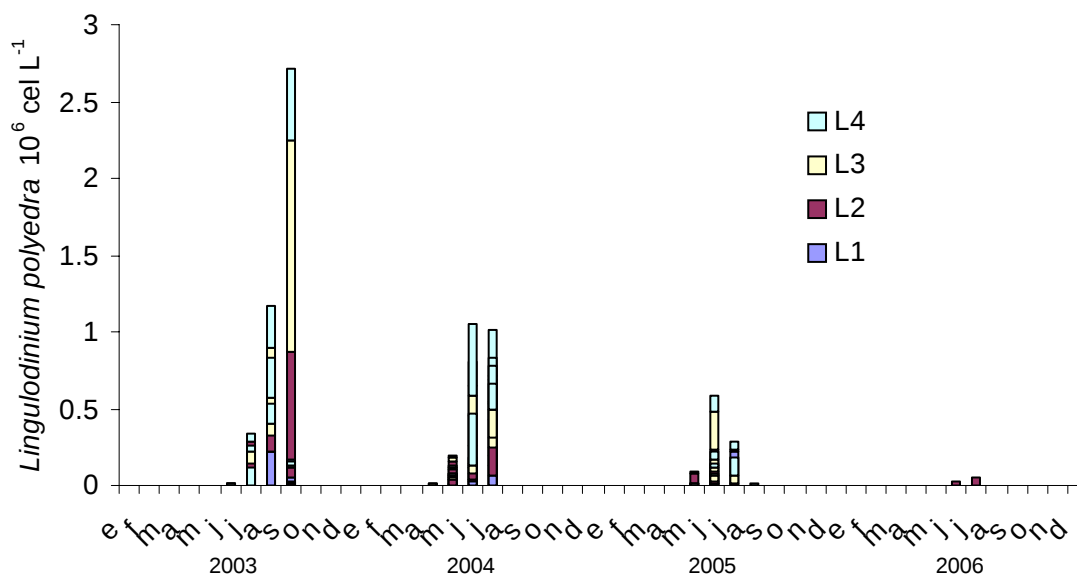


Figura 13. Evolución interanual de *Lingulodinium polyedra* en la Ría de Ares

Se trata de una especie residente en esta Ría que prolifera casi todos los años en el verano. Este hecho fue citado en publicaciones antiguas de la Ría de Vigo. No ocurren en los últimos años, proliferaciones de *Gonyaulax*, con frecuencia en las Rías Baixas

En el resto de las estaciones oceanográficas de Galicia, a excepción de Ares, se han detectado células de un modo esporádico (máx. 200 cel L⁻¹). Una cooperación entre el departamento de biotoxinas de INTECMAR y el IEO de Vigo permitió detectar, por primera vez en Galicia, la presencia de yesotoxinas en mejillón cultivado en las bateas Sada A y Sada B durante esta marea roja.

Noctiluca scintillans

Este dinoflagelado heterótrofo forma, casi todos los años, mareas rojas de color anaranjado, a finales de verano en las Rías Baixas Gallegas (Fig.14). Aunque es considerado como no tóxico ni nocivo, en el año 2003 fue posible observar su predación sobre las especies potencialmente tóxicas como *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *Pseudo-nitzschia* spp. (Fig.15) y se discutió su posible actuación como vector de toxinas en un trabajo que se realizó en cooperación con el IEO de Vigo. Las mareas rojas, de color rojo anaranjado, que se pudieron ver desde la playa de Sanxenxo (en la última semana de Agosto) y en Baldaio (23 de Julio) del año 2006 causaron un gran impacto nocivo al turismo en estas zonas. Se detectó una concentración máxima de 6,0 10⁵ cel L⁻¹ en la estación de O Freixo (M3) el 6 de Junio de 2006.



Figura 14. Marea Roja de *Noctiluca scintillans* detectada en Sanxenxo, Ría de Pontevedra, en Agosto de 2006.

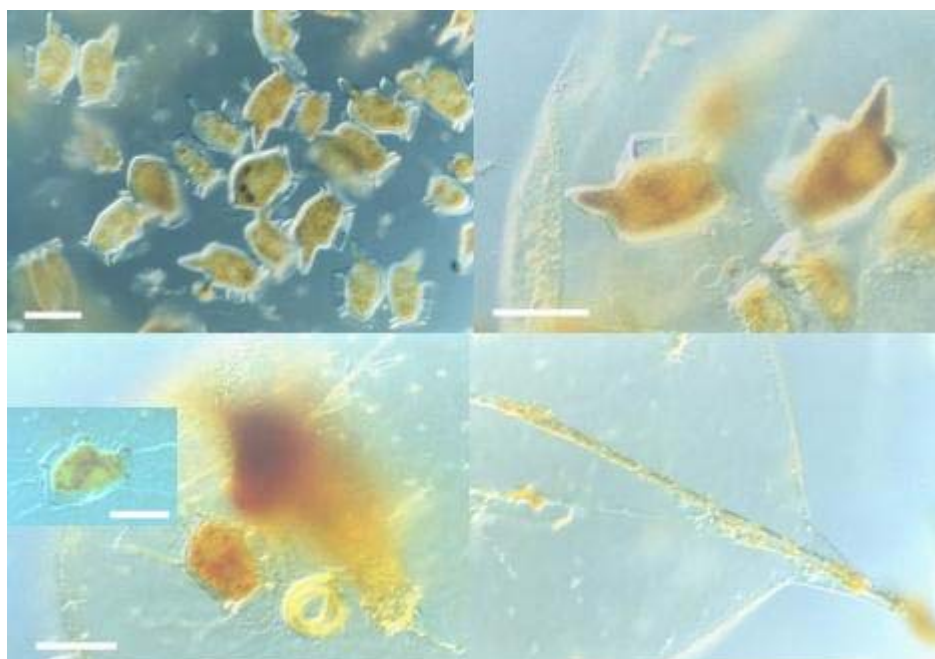


Figura 15. Vacuolas digestivas de *Noctiluca scintillans* conteniendo especies potencialmente tóxicas como *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *Pseudo-nitzschia* spp.

Otras especies de microplancton de red, potencialmente tóxico o nocivo, que se han detectado en las muestras pero que no se ha constatado que hayan producido mareas rojas ni efectos tóxicos o nocivos en las Rías Gallegas en estos cuatro años incluyen, las silicoflageladas como *Dictyocha speculum* y *D. octonaria*, otras flageladas como *Heterosigma akashiwo* y *Phaeocystis globosa* y dinoflagelados como *Karenia* spp., *Karlodinium*

spp., *Prorocentrum minimum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Prorocentrum lima*, *Glenodinium foliaceum*, *Protoceratium reticulatum*.

La cianobacteria productora de microcistinas, *Microcystis botrys* (Fig. 16), que pudo haber sido malidentificada como *M. aeruginosa* y que produjo una marea verde, casi monoespecífica, en un área próxima a la desembocadura del río Umia, en Septiembre de 2006, cuando se ha tenido que hacer un cierre de las zonas de producción de moluscos para protegerlos de un vertido químico tras el incendio de la planta química Brenntag.

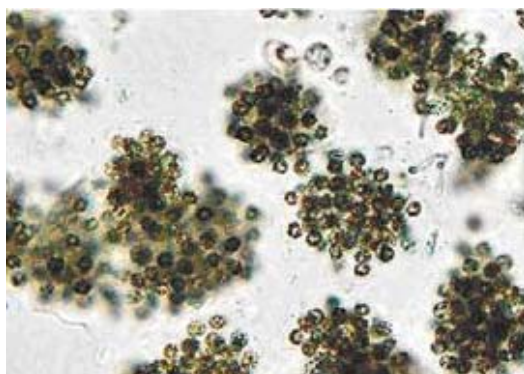


Figura 16. Colonias de *Microcystis botrys*.

Por último, se identificó, por primera vez en la zona, el dinoflagelado *Takayama helix* (Fig. 17), que es muy posible que haya sido malidentificado en la zona, como *Gyrodinium pulchellum*.

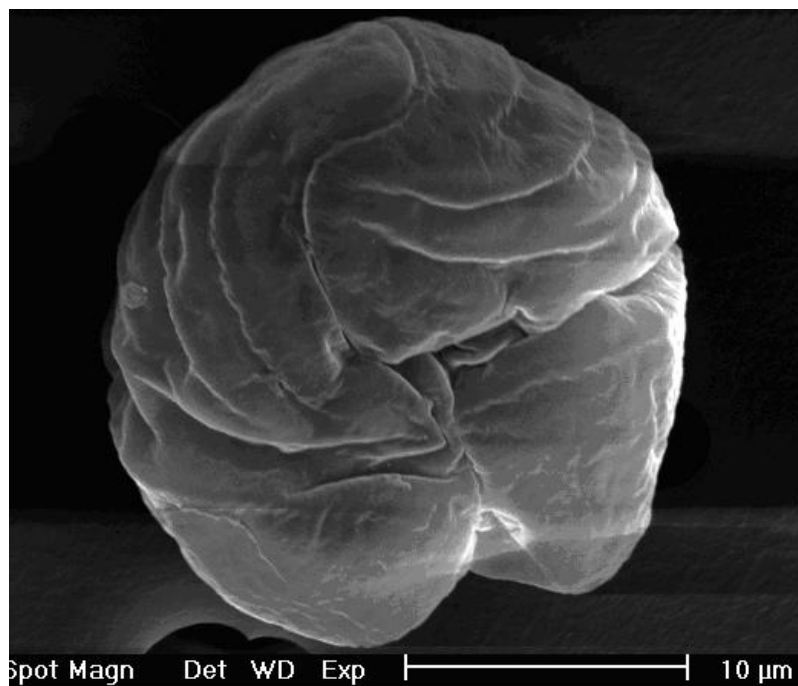


Figura 17. Microfotografía de microscopio electrónico de barrido, de *Takayama helix*, de la Ría de Vigo.

Agradecimientos

A Celia Díaz y Fernanda Franco por la asistencia técnica, a F. Amoedo, P. García, I. Lemos y S. Roura en especial por los recuentos celulares, a Ó. Torrado por los muestreos en Ares. A J. M. Cabanas y J. Triñanes por los datos del índice de afloramiento y de drifters, a N. Lundholm y S. Méndez, por su ayuda con la microscopía electrónica, a Ángeles Longa por la fotografía de la marea roja de *Noctiluca scintillans*, a J. Mouriño por la gestión de la base de datos, a L. Abal y A. Gómez por su ayuda con las gráficas, a la tripulación y a A. Castro y Romero, patrones de los B/O J. Naváz y Lura. A B. Reguera y T. Moita por las puestas en común sobre la ecología de *Dinophysis* spp. y *G. catenatum*, respectivamente. A Carmelo Thomas y Marli Bergesch por la confirmación de la identificación de *T. helix* y *M. botris* respectivamente. A J. Gilabert por su ayuda. Este trabajo fue financiado en su totalidad por la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia.

Evolución del Fitoplancton tóxico en las costas andaluzas durante el periodo 2003-2006

D. Jaén¹, L. Mamán¹, R. Fernández¹, I. Márquez²

(1) Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros

Ctra. Punta Umbria-Cartaya km.12, 21459 Huelva

(2) Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Pesca, Junta de Andalucía,
C/ Tabladilla, s/n 41013 Sevilla

Resumen

En el presente estudio se describen las principales floraciones tóxicas de los últimos cuatro años y los parámetros oceanográficos que las acompañan.

Las especies que con mayor frecuencia desencadenan episodios tóxicos en el litoral andaluz siguen siendo los dinoflagelados *Dinophysis acuminata* y *Gymnodinium catenatum*, así como algunas especies del género *Pseudo-nitzschia*.

Como es habitual, *Dinophysis acuminata* desarrolla en la costa atlántica (Huelva) proliferaciones recurrentes en primavera y en verano asociadas a la presencia de toxicidad en el molusco. En el litoral mediterráneo, las concentraciones de esta especie son normalmente muy inferiores a las del litoral atlántico y no muestran un claro patrón estacional, pero es relevante por su magnitud un episodio ocurrido en Agosto de 2003 en la costa oriental de Málaga, el mayor en los últimos cuatro años, que causó intoxicaciones a un colectivo de más de 20 personas por consumir mejillón de roca, según informaron las autoridades sanitarias de la zona.

El dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* es la especie de mayor incidencia en la costa mediterránea; destaca por un lado su alta frecuencia de aparición durante el año 2003 y su ausencia en el año 2005.

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* se observan durante todo el periodo de estudio, si bien la presencia de ácido domoico en moluscos se ha visto asociada únicamente a proliferaciones de *Pseudo-nitzschia australis*.

Otra especie de interés por sus efectos nocivos (producción de mucílago) es el dinoflagelado *Gonyaulax hyalina*, cuyas mayores proliferaciones se detectan en el Mediterráneo.

Introducción

El seguimiento del desarrollo y distribución de las microalgas tóxicas se constituye como labor fundamental para el control de aquellos recursos que al utilizarlas como parte de su alimentación supongan un riesgo para el consumo humano.

La importancia socioeconómica de un determinado recurso pesquero lleva aparejado entre otros factores una intensificación espacial y temporal

de los controles analíticos, de ahí que los datos que forman parte de este estudio vengan condicionados por este hecho.

La franja atlántica de Andalucía, y más concretamente la provincia de Huelva se ve afectada principalmente por proliferaciones anuales de *Dinophysis acuminata* que son responsables de la mayor parte de los cierres de zonas por niveles altos de toxina en el molusco. La mayor parte de estas floraciones presentan máximos de concentración por debajo de las 5.000 cels L⁻¹, si bien se observa que concentraciones un orden de magnitud inferiores son susceptibles de ocasionar toxicidad asociada al molusco. Otras especies productoras de toxinas lipofílicas como *Dinophysis acuta* o *Dinophysis caudata* muestran en el caso de la primera floraciones esporádicas de intensidad moderada y en la última presencias anuales prolongadas.

La costa mediterránea, desde Cádiz hasta Almería, se ve afectada por floraciones de especies que no muestran siempre un claro patrón estacional, es el caso de *Gymnodinium catenatum* (principal especie productora de toxinas tipo PSP) que muestra años con un alto índice de aparición, mientras que en otros su presencia es prácticamente nula. Entre las especies productoras de toxina amnésica aparece *Pseudo-nitzschia australis* como protagonista principal en la totalidad de eventos tóxicos.

Material y métodos

Los datos presentados proceden del programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias en las zonas de producción de moluscos bivalvos, gasterópodos y equinodermos marinos que se viene desarrollando en la comunidad autónoma desde 1994. Dicho programa está enfocado inicialmente hacia los recursos naturales establece en el litoral andaluz en 44 zonas de producción (Fig. 1) con representación de todas las provincias costeras. El descenso de la abundancia de ciertos bancos naturales de moluscos ha ocasionado que en la actualidad se realice el seguimiento periódico de 41 zonas de producción, 29 de ellas con una frecuencia de muestreo semanal, 7 quincenal y 5 mensual.

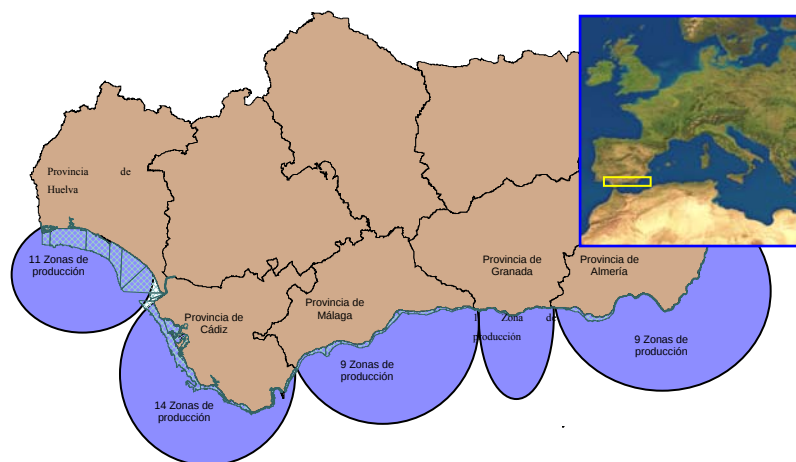


Figura 1. Distribución de zonas de producción en el litoral andaluz.

Cada punto de muestreo lleva asociado dos muestras, una para análisis cualitativo, tomada mediante arrastre vertical con manga de 20 micras de luz de malla y otra para análisis cuantitativo recogida mediante sistema de mangueras compuesto de tramos de 5 metros [1]. La muestra cualitativa se vuelve a concentrar en el laboratorio para su observación en placa con microscopio invertido. Para la cuantificación se utilizan cámaras combinadas [2] de distintos volúmenes según aproximación de la densidad celular de la muestra.

Se establece una red de 15 estaciones fijas en las que se realizan perfiles en profundidad de temperatura, salinidad y clorofila mediante perfilador SeaBird SBE 19.

Resultados

Dinophysis acuminata [3,4,5,6]

En la franja Atlántica está presente en las muestras durante la práctica totalidad del periodo de estudio. Experimenta proliferaciones recurrentes en primavera y verano (Fig. 2), si bien se observa algún desarrollo aislado a principios o final de año. En esta área las proliferaciones tienen lugar en las zonas de mar abierto, caracterizadas por formar parte de una plataforma costera extensa que favorece los procesos de mezcla. El desarrollo temporal de estas floraciones es mayor que el observado en la zona mediterránea. Las concentraciones más altas tienen lugar en primavera coincidiendo con aumentos de la temperatura del agua hasta alcanzar los 15-16 °C. Los niveles se mantienen regularmente altos hasta bien iniciado el verano, observándose una gran correlación con los episodios de toxicidad que se detectan en moluscos. El máximo de esta especie se registra en la zona denominada Isla Canela con 8.473 cel L⁻¹ en 2003. El invierno más cálido de este periodo coincide con los niveles más altos de esta especie fuera de su época habitual de aparición.

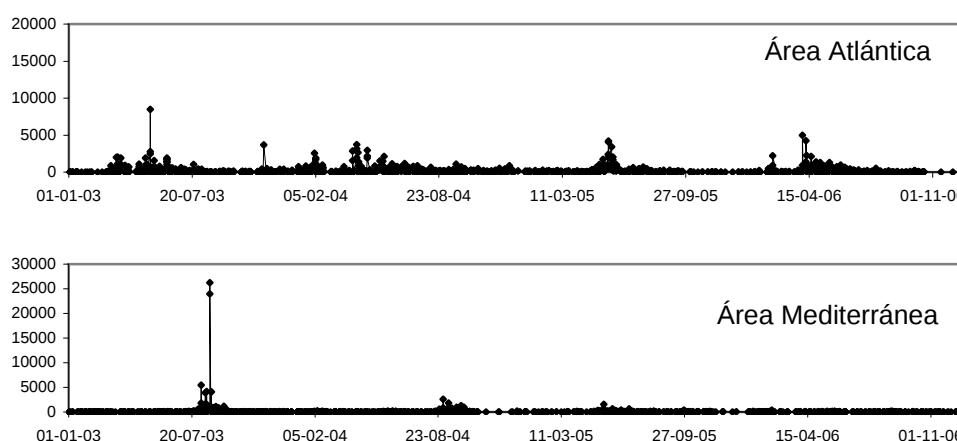


Figura. 2. Evolución de *Dinophysis acuminata* (cel L⁻¹) en la áreas atlántica y mediterránea durante el periodo 2003-2006.

En la zona mediterránea, si bien observamos una frecuencia de aparición en el periodo bastante alta, las concentraciones medias son bastante inferiores a las encontradas en la franja atlántica. Las proliferaciones, de menor desarrollo temporal que en la zona Atlántica, no muestran un patrón anual de comportamiento (Fig. 2). Se desarrollan a finales de verano de 2003 y 2004 así como en Mayo-Junio de 2005 y en 2006 no se produce ninguna floración. Son de destacar los máximos puntuales alcanzados durante el evento de 2003 con 26.260 y 23.980 cel L⁻¹ en la parte oriental de Málaga que suponen el máximo de todo el periodo y que fueron la causa de intoxicaciones por consumir mejillón de roca procedente de una zona próxima a un camping.

Dinophysis caudata [3,4,5,6]

Muestra una alta frecuencia de aparición a lo largo del periodo y en toda la costa andaluza. Entre primavera y otoño realiza floraciones de intensidad moderada en la costa de Huelva (Fig. 3) con valores máximos que suelen coincidir con el principio de verano (máx. del periodo 2.442 cel L⁻¹ en 2004). En la franja mediterránea (Fig. 4) las proliferaciones coinciden estacionalmente con las anteriores aunque los niveles alcanzados son significativamente inferiores (máx. del periodo 760 cel L⁻¹ en 2006).

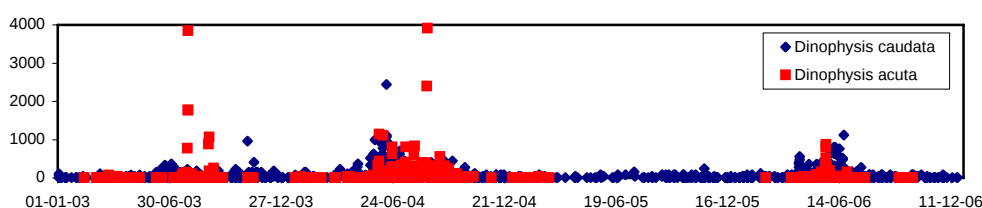


Figura. 3.- Evolución de *Dinophysis caudata* y *Dinophysis acuta* en el área atlántica.

Dinophysis acuta [3,4,5,6]

Está presente en la franja atlántica (Fig. 3) durante gran parte de los años 2003, 2004 y 2006 y sus proliferaciones alcanzan los niveles más altos durante los meses de verano. Destaca el año 2004 por su desarrollo durante todo el verano con un máximo inusual de 3.920 cel L⁻¹. El desarrollo de esta especie solapa en parte con las floraciones de *Dinophysis caudata* y *Dinophysis acuminata*, reflejando este aspecto la toxicidad observada en los moluscos. Esta especie, al igual que *Dinophysis caudata*, muestra los valores de concentración más altos a temperaturas superiores que *Dinophysis acuminata*. En el área mediterránea (Fig. 4), si bien se observa una mayor frecuencia de aparición que en la zona atlántica, sus niveles son más bajos, registrando una única proliferación a finales de verano de 2004 que llega a 3.080 cel L⁻¹. Esta floración converge, a diferencia de la zona atlántica, en sólo un mes.

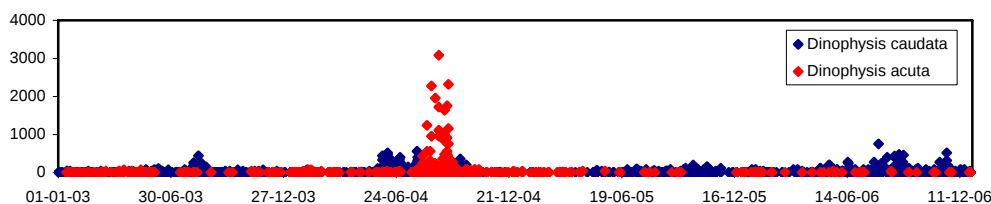


Figura. 4.- Evolución de *Dinophysis caudata* y *Dinophysis acuta* en el área mediterránea.

Gymnodinium catenatum [5,6,7]

Desencadena floraciones que afectan casi exclusivamente a la zona mediterránea, ya que en la zona atlántica sólo se observan presencias puntuales a finales de 2003. La franja comprendida entre la bahía de Algeciras y las zonas más occidentales de Almería presenta los niveles celulares más altos de esta especie (Fig. 5).

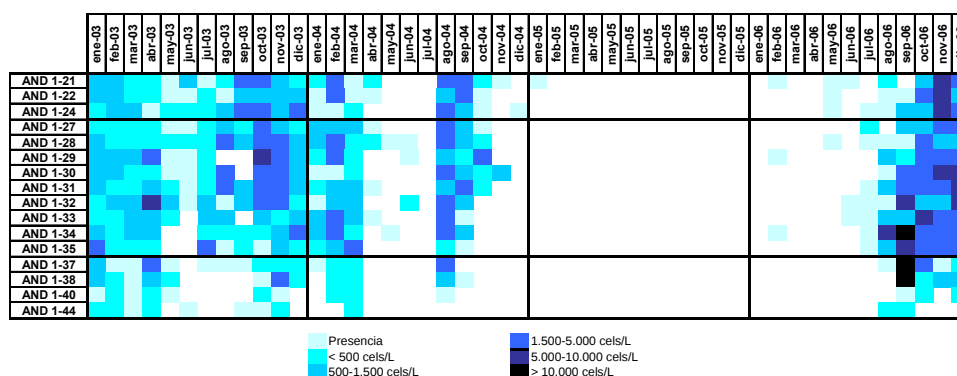


Fig. 5.- Evolución espacio-temporal de *Gymnodinium catenatum* (máximos mensuales) en el área mediterránea.

El año 2003 comienza con niveles altos que prácticamente se mantienen durante el resto del año, a excepción de algunas discontinuidades en ciertas zonas de Málaga y en Almería. La proliferación más destacada de este año tiene lugar en el litoral de Cádiz y Málaga (máx. en la zona Marbella I con 6.697 cel L⁻¹ en otoño). El año 2004 comienza con niveles considerables (sobre todo en Cádiz y Málaga) que se extienden hasta Marzo; tras un periodo de presencias discontinuas surge en Agosto en la práctica totalidad del litoral mediterráneo con niveles superiores a las 1500 cel L⁻¹. Desde Octubre (salvo datos puntuales en 2004 y dos presencias en 2005) desaparece de nuestras zonas de control hasta principios de 2006, lo que supone la ausencia más prolongada que se ha registrado desde el inicio del programa de seguimiento. A finales del verano de 2006 tiene lugar, de forma generalizada, la principal proliferación de los años de estudio.

Destacan por sus valores más altos las zonas orientales de Málaga y occidentales de Almería, donde se superan las 10.000 cel L⁻¹ (máx. en Playa de la Juana con 15.520 cel L⁻¹).

Pseudo-nitzschia spp [8]

En cuanto a las especies del género *Pseudo-nitzschia* están presentes en las muestras de todo el litoral durante todo el año, con múltiples pulsos de crecimiento fundamentalmente en primavera y verano. En la franja atlántica, a finales de Julio de 2003 (Fig. 6) su desarrollo deja evidencia en los niveles de toxina detectados en el molusco, siendo la especie mayoritaria de este episodio *Pseudo-nitzschia australis*. Al inicio de la primavera de 2004 y 2005 aumenta la concentración de estas especies con presencia de *Pseudo-nitzschia australis*, que vuelve a relacionarse con presencia de toxina amnésica en los moluscos. En ocasiones se observan concentraciones cercanas al millón de células por litro aunque sin toxicidad asociada al molusco. Las concentraciones más bajas de este periodo se registran en otoño-invierno.

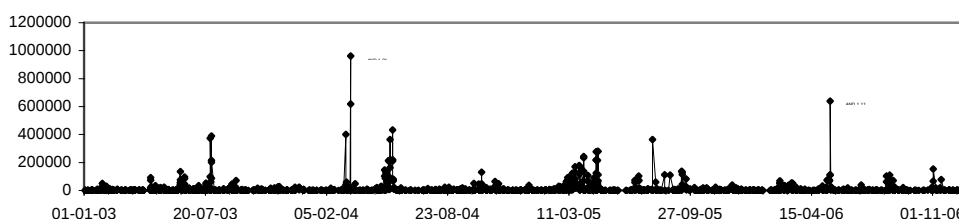


Figura. 6.- Evolución de *Pseudo-nitzschia* spp en el área atlántica.

En el área mediterránea (Fig. 7) la situación es muy similar, con presencia durante todo el año distribuyéndose los máximos en primavera, verano y otoño. Se observan principalmente dos episodios tóxicos ligados ambos a presencia de *Pseudo-nitzschia australis* y que tienen lugar en primavera de 2005 y 2006. En ambos eventos el porcentaje de *P. australis* llega a ser hasta del 100%.

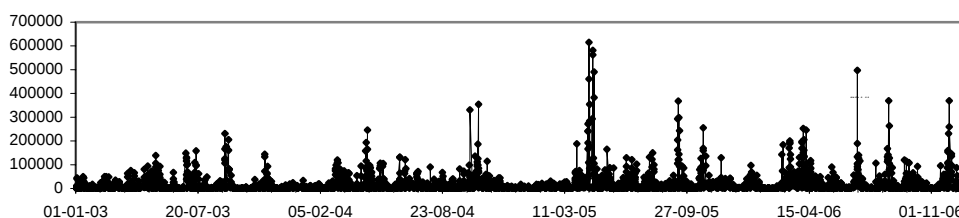


Figura. 7.- Evolución de *Pseudo-nitzschia* spp en el área mediterránea.

Gonyaulax cf. hyalina [9]

Esta especie, relacionada con producción de mucílago, se ve asociada por primera vez en nuestro litoral a la presencia de “maleza” (nombre con el que comúnmente se denomina a los agregados mucilaginosos) en 2002. A excepción de alguna presencia puntual en la zona atlántica, su distribución es fundamentalmente mediterránea (Fig. 8). Durante el año 2003 se observan niveles muy bajos hasta que en otoño de 2004 desarrolla la principal proliferación del periodo alcanzando 14.640 cel L⁻¹ en Noviembre en la costa de Almería (San Miguel de Cabo de Gata). Este episodio genera mucílago que se observa en todo el litoral mediterráneo y en ocasiones dificulta la actividad pesquera. En el otoño de 2005 vuelve a proliferar (máx. de 7.980 cel L⁻¹), también durante el mes de Noviembre y de nuevo en la provincia de Almería, no teniendo constancia en esta ocasión de la presencia de acúmulos. En 2006 su presencia es reducida y sus concentraciones muy bajas.

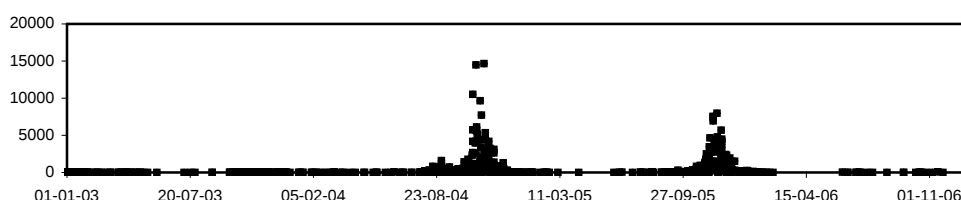


Figura. 8.- Evolución de *Gonyaulax cf. hyalina* en el área mediterránea.

Lingulodinium polyedrum [4,5]

Este dinoflagelado productor de yessotoxinas prolifera a menudo en la costa de Huelva (Fig. 9). La primera tuvo lugar en 2004 con un máximo a finales de verano de 323.106 cel L⁻¹ suponiendo el valor más alto de estos años. Durante 2005 y 2006 los máximos se sitúan a principios de verano con niveles celulares significativamente menores (máximos de 49.948 cel L⁻¹ y 141.440 cel L⁻¹ respectivamente).

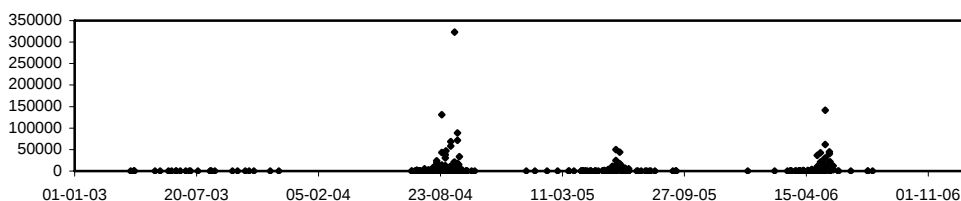


Figura. 9.- Evolución de *Lingulodinium polyedrum* en el área atlántica.

Otras especies tóxicas o potencialmente tóxicas pueden llegar a observarse, algunas de ellas durante largos periodos con niveles muy bajos, sin ocasionar proliferaciones de interés. No obstante, en ocasiones se

advierten registros significativos, como el que ocurrió en una muestra de Agosto de 2005 procedente de Almería en la que se llegaron a determinar 2.120 cel L⁻¹ de *Prorocentrum lima*, 4.200 cel L⁻¹ de *Coolia monotis*, 2.800 cel L⁻¹ de *Prorocentrum emarginatum* y 880 cel L⁻¹ de *Ostreopsis* spp.

Phaeocystis globosa presenta los niveles más altos en los meses de primavera y verano, con un máximo en la provincia de Huelva de 21.583 colonias L⁻¹.

Referencias

- [1] Lindahl, O. 1986. A dividable hose for phytoplankton sampling. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES) C.M.*, 1986/L:26, Annex III.
- [2] Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton metodik. *Mitt. In. Ver. Limnol.* No. 9, pp. 1-38.
- [3] Larsen, J., Moestrup O. 1992. Potentially Toxic Phytoplankton 2. Genus *Dinophysis* (Dinophyceae). *ICES Identification Leaflets for Plankton*. 1992.
- [4] Balech, E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.* nº. 1, Madrid.
- [5] Tomas, C.R. 1997. *Identifying marine phytoplankton*. Florida Marine Research Institute, Academic Press, St. Petersburg, Florida, USA. 858 pp.
- [6] Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D., Cembella (Eds). 1995. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33 UNESCO.
- [7] Bravo, I., B. Reguera, A. Martínez, S. Fraga. 1999. First report of *Gymnodinium catenatum* Graham on the Spanish Mediterranean coast. En: E. Graneli *et al.* (Eds). *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier Science Publishing. 449-452.
- [8] Lundholm, S.J., Moestrup N.Ø., J. Larsen. 1999. *ICES Identification Leaflets for Plankton*.
- [9] MacKenzie, L. 2002. Mass accumulation of mucilage caused by dinoflagellate polysaccharide exudates in Tasman Bay, New Zeland. *Harmful algae*. 1: 69-83.
- [10] Balech, E. 1995. *The Genus Alexandrium Halim (Dinoflagellata)*. Published by Sherkin Island Marine Station.
- [11] Sournia, A. (Ed). 1986. Atlas du phytoplankton marin. Volume 1, Centre National de la Recherche Scientifique. París.
- [12] Ricard, M. (Ed). 1987. Atlas du phytoplankton marin. Volume 2. Centre National de la Recherche Scientifique. París.

Resultados del programa de seguimiento de fitoplancton tóxico y biotoxinas en las zonas de producción de bivalvos de Cataluña: años 2003-2006 y primer trimestre del 2007

Margarita Fernández^{1,3}, Maximino Delgado^{1,3}, Magda Vila^{2,3},
Nagore Sampedro^{2,3}, Jordi Camp^{2,3}, Dolores Furones^{1,3}, Jorge Diogène^{1,3}

(1) IRTA, Carretera del Poblenou s/n, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain.

margarita.fernandez@irta.es

(2) Institut de Ciències del Mar, Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49,
E-08003 Barcelona, Spain.

(3) Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura,
Generalitat de Catalunya.

Resumen

En el período que va desde Enero del 2003 hasta finales de Marzo del 2007 se han producido un total de 28 cierres administrativos de zonas de producción de bivalvos. De estos, 27 han sido por toxicidad diarreica (DSP) o presencia de ácido okadaico (OA) y sólo 1 por toxicidad paralizante (PSP). No ha habido ninguna detección de toxicidad amnésica (ASP) en bivalvos. La mayor parte de los cierres, 20, se han producido en las bahías del delta del Ebro. Las posibles especies de microalgas implicadas han sido *Dinophysis sacculus*, *D. caudata*, *Protoceratium reticulatum* y *Alexandrium minutum*. En relación a los casos de ictiotoxicidad, únicamente se registró un episodio en el año 2003 debido a una proliferación de *Karlodinium* spp que ocurrió a finales de la primavera.

Introducción

El programa de seguimiento de fitoplancton tóxico y biotoxinas en las 23 zonas de producción de bivalvos de Cataluña que realiza el IRTA por encargo de la Dirección General de Pesca sigue una frecuencia semanal en las bahías del delta del Ebro que son las principales zonas de producción de Cataluña y semestral para el resto de las zonas en aguas abiertas (Fig 1). Además se realizan muestreos especiales a lo largo del litoral cuando se recibe un aviso de alerta por parte de la Agencia Catalana del Agua (ACA). ACA en convenio con el ICM realiza el programa de vigilancia de fitoplancton tóxico y nocivo en la costa catalana en algunos puertos de Cataluña como medida de detección anticipada de proliferaciones de fitoplancton en las aguas litorales [1].

Material y métodos

Las muestras para la identificación y recuento de fitoplancton se recogen en 5 estaciones en cada bahía (Fig. 2). En los años 2003, 2004 y 2005 se recogía muestra de superficie en todas las estaciones además de muestra de fondo y muestra integrada en la estación central de cada bahía. Desde el año 2006 y para adaptarnos a la nueva legislación europea [2] se recogen muestras integradas en todas las estaciones además de muestra de

superficie y muestra de fondo en la estación central de cada bahía. Se dejan sedimentar 50 ml de muestra durante 24 horas y se realiza el recuento en microscopio invertido.

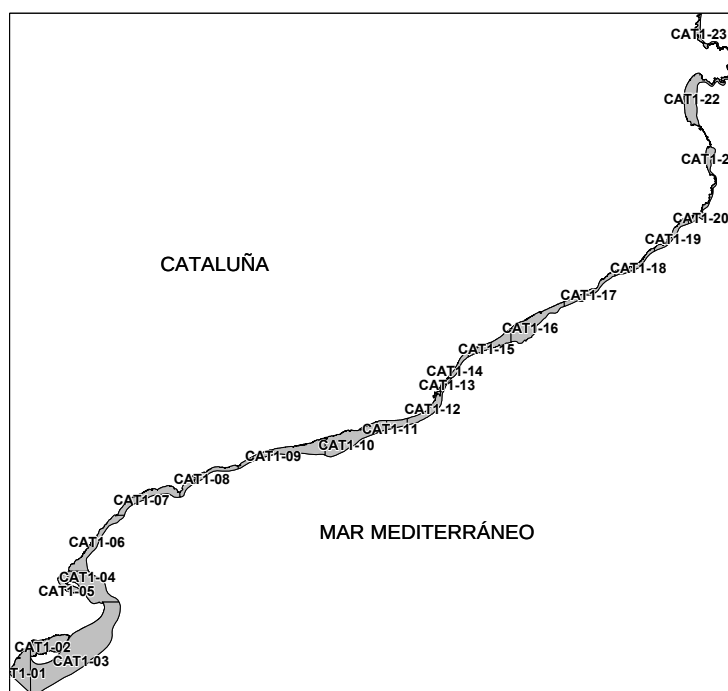


Figura 1. Situación de las 23 zonas de producción de bivalvos de Cataluña.

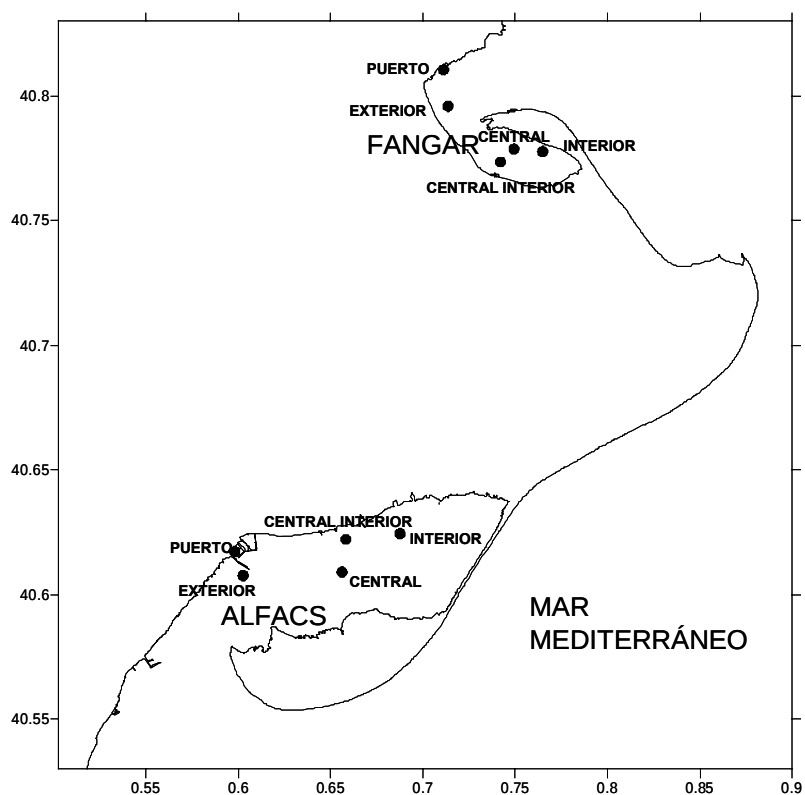


Figura 2. Situación de las 5 estaciones muestreadas en Alfacs y Fangar, las dos bahías del delta del Ebro.

En el caso de las muestras para el análisis de biotoxinas en bivalvos se utiliza el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) como especie centinela en las bahías del delta del Ebro y en situaciones de cierre o de alerta también se analiza el ostión/ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) y la almeja (*Tapes semidecussatus* y *Tapes decussatus*). En aguas abiertas las especies analizadas son las de los bancos naturales de coquina (*Donax trunculus*) y de almejón (*Callista chione*) aunque también se recoge mejillón de roca en las zonas en que está presente. Se utiliza bioensayo de ratón para las toxinas paralizantes (AOAC) y las diarreicas (Yasumoto 1978) y HPLC-UV para las amnésicas.

Resultados

En el período de tiempo desde el 1 de Enero del 2003 hasta el 31 de Marzo del 2007 hubo un total de 28 cierres de los que 10 fueron en la bahía de Alfacs y 10 en la bahía del Fangar, 5 fueron en aguas exteriores del delta del Ebro y 3 en otras zonas de la costa catalana. Sólo uno de los cierres fue debido a toxicidad tipo PSP y ocurrió en zona de aguas abiertas en Vilanova, el resto fueron por toxicidad tipo DSP (Tabla 1). La zona que acumuló más días de cierre fue la bahía de Alfacs con un total de 286 días mientras que la bahía de Fangar estuvo cerrada durante 93 días. La zona de Alcanar acumuló un número elevado de días de cierre (149), en parte debido a la dificultad de conseguir muestra para ser analizada y proceder a la consiguiente apertura.

Las principales especies de microalgas tóxicas coincidentes con estos cierres fueron *Alexandrium minutum*, *Dinophysis sacculus*, *D. caudata* y *Protoceratium reticulatum*.

ZONA	AÑO	Tipo de toxicidad	Cierres en el año	Fechas: inicio → final	Días de cierre	Especies relacionadas
CATI-01 (ALCANAR)	2005	DSP	2	27-06-05 → 06-07-05	9	ND
				14-07-05 → 26-09-05	74	<i>P. reticulatum</i>
	2006	DSP	1	20-07-06 → 22-09-06	64	<i>P. reticulatum</i>
	2007	DSP	1	29-03-07 → *31-03-07	2	ND
					149	
CATI-02 (ALFACS)	2003	DSP	1	02-05-03 → 04-06-03	33	<i>D. sacculus</i> y <i>P. reticulatum</i>
	2005	DSP	4	31-12-04 → 27-01-05	27	<i>D. sacculus</i>
				09-02-05 → 03-03-05	22	ND
				14-07-05 → 22-08-05	39	<i>P. reticulatum</i>
				12-12-05 → 23-12-05	11	ND
	2006	DSP	3	27-04-06 → 04-05-06	7	<i>D. sacculus</i>
				12-07-06 → 01-08-06	20	<i>D. caudata</i> y <i>P. reticulatum</i>
	2007	DSP	2	09-11-06 → 18-12-06	39	<i>D. caudata</i>
				21-12-06 → 29-01-07	39	<i>D. sacculus</i>
				31-01-07 → 21-03-07	49	<i>D. sacculus</i> y <i>P. reticulatum</i>
					286	

CAT1-03 (COSTA SUR DEL DELTA)						
	2005	DSP	1	27-06-05 → 06-07-05	9	ND
					9	
CAT1-05 (FANGAR)						
	2003	DSP	2	06-08-03 → 14-08-03 06-10-03 → 10-10-03	8 4	<i>D. caudata</i> ND
	2004	DSP	3	13-08-04 → 23-08-04	10	ND
				02-9-04 → 13-09-04	11	ND
				11-11-04 → 22-11-04	11	ND
	2006	DSP	1	21-07-06 → 28-07-06	7	<i>P. reticulatum</i>
	2007	DSP	4	05-01-07 → 15-01-07	10	ND
16-02-07 → 05-03-07				17	<i>P. reticulatum</i>	
08-03-07 → 21-03-07				13	ND	
29-03-07 → **31-03-07				2	ND	
				93		
CAT1-09 (VILANOVA)						
	2003	PSP	1	02-05-03 → 29-05-03	27	<i>A. minutum</i>
	2005	DSP	1	04-08-05 → 29-08-05	25	<i>D. sacculus</i>
					52	
CAT1-17 (CALELLA)						
	2007	DSP	1	16-02-07 → 05-03-07	17	ND
					17	

Tabla 1. Cierres en las zonas de producción de Cataluña durante los años 2003-2006 y primer trimestre del año 2007. En los episodios en que no ha habido detección de microalgas en densidades que pudieran justificar éstos se ha señalado como ND (no detectada). Para el cálculo de los días de cierre se utilizó como fecha límite el 31-03-07, sin embargo en ese día había dos cierres no concluidos señalados con asteriscos que finalizaron en las fechas *30-04-07 y **12-04-07 respectivamente.

Bahía de Alfacs: Durante el período 2003-2006 y primer trimestre del 2007 no hubo ningún cierre por toxicidad PSP en la bahía de Alfacs pero sí que se detectó presencia de toxinas paralizantes por debajo del nivel legislado: 66 µg STX eq./100 g en el año 2004 y 44 µg STX eq./100 g en el año 2007, y se relacionó con el dinoflagelado *A. minutum*. Las densidades celulares superaron el nivel de alerta todos los años durante el primer semestre del año (Fig. 3).

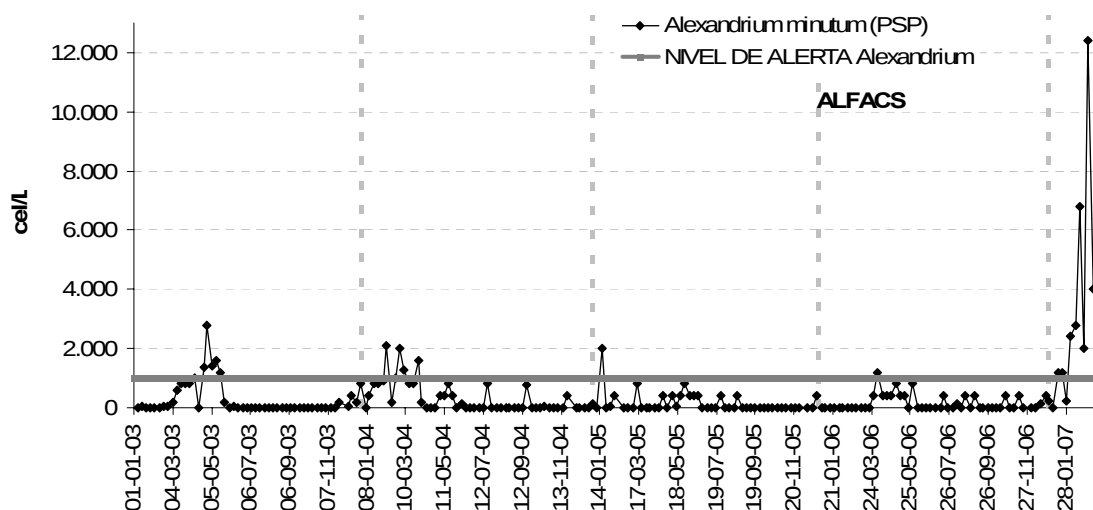


Figura 3. Densidades celulares de *Alexandrium minutum* en la bahía de Alfacs en células por litro durante los años 2003-2006 y primer trimestre del 2007. El nivel de alerta para esta especie es de 1.000 células por litro.

Las densidades celulares de *D. sacculus* + *D. caudata* superaron en alguna ocasión todos los años el nivel de alerta establecido en 500 cel L⁻¹ para estas especies. (Fig. 4). Las densidades máximas se alcanzaron en distintas épocas del año (invierno, primavera y verano), con un máximo de 15 10³ cel L⁻¹ en Mayo de 2003. En el 72% de las semanas hubo presencia de microalgas del género *Dinophysis*. *Dinophysis sacculus* fué la especie dominante de este género en el 60% de las semanas en que este género estuvo presente.

Las densidades máximas de *P. reticulatum* se alcanzaron de Marzo a Julio, con un máximo de 5 10³ cel L⁻¹ en Mayo de 2003.

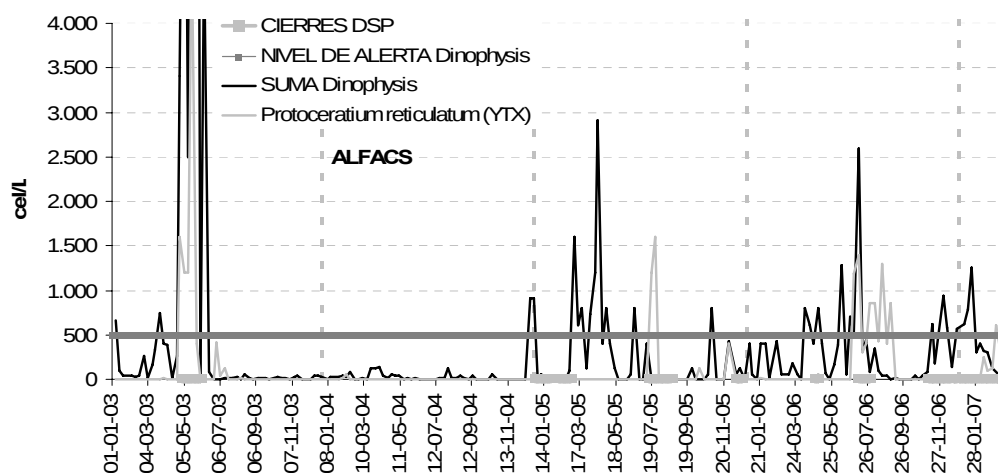


Figura 4: Densidades celulares de la suma de *D. sacculus* y *D. caudata* en color negro y de *Protoceratium reticulatum* en color gris. El nivel de alerta para *D. caudata* y *D. sacculus* es de 500 células por litro.

Las densidades celulares de *Pseudo-nitzschia* spp. en la bahía de Alfacs superaron en 14 ocasiones durante el periodo muestreado el nivel de alerta establecido en 2 10⁵ cel L⁻¹ para este género. Aunque se registraron concentraciones por encima del nivel de alerta a lo largo de todo el año, se observó un patrón estacional con concentraciones máximas en primavera y otoño de 2003 y 2004, y otoño-invierno de 2005 y 2006 (Fig. 5).

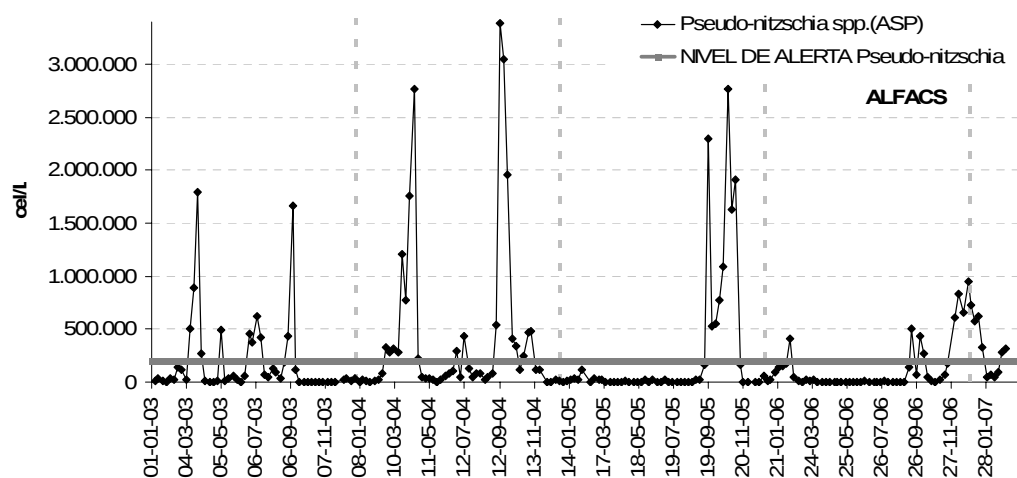


Figura 5: Densidades celulares de *Pseudo-nitzschia* spp. en la bahía de Alfacs. Nivel de alerta: 2 10⁵ células por litro.

En la primavera-verano del 2003 se observaron mortalidades de peces y bivalvos en la bahía de Alfacs coincidiendo con una proliferación de *Karlodinium* spp. que superó una densidad de $1 \cdot 10^6$ células por litro. En los años posteriores *Karlodinium* spp. estuvo presente en menores densidades (Fig. 6), con un máximo detectado de $6 \cdot 10^4$ células por litro el año 2005.

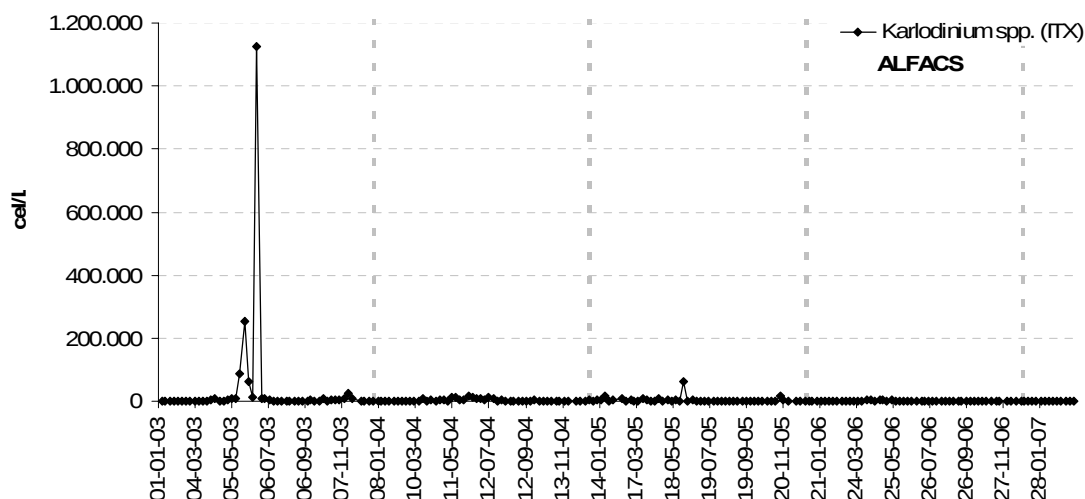


Figura 6. Densidades celulares de *Karlodinium* spp en la bahía de Alfacs.

Bahía del Fangar: Las densidades celulares de *A. minutum* en la bahía del Fangar (Figura 7) superaron el nivel de alerta en Septiembre del 2004 ($1,2 \cdot 10^3$ cel L^{-1}), Agosto del 2005 ($2,3 \cdot 10^3$ cel L^{-1}) y Abril y Mayo del 2006 ($3,2 \cdot 10^3$ cel L^{-1}). Se detectó toxicidad paralizante en concentraciones inferiores al límite legislado que fueron de $45,4 \mu g$ STX eq./100 g en el año 2003 y de $37 \mu g$ STX eq./100 g en el año 2005.

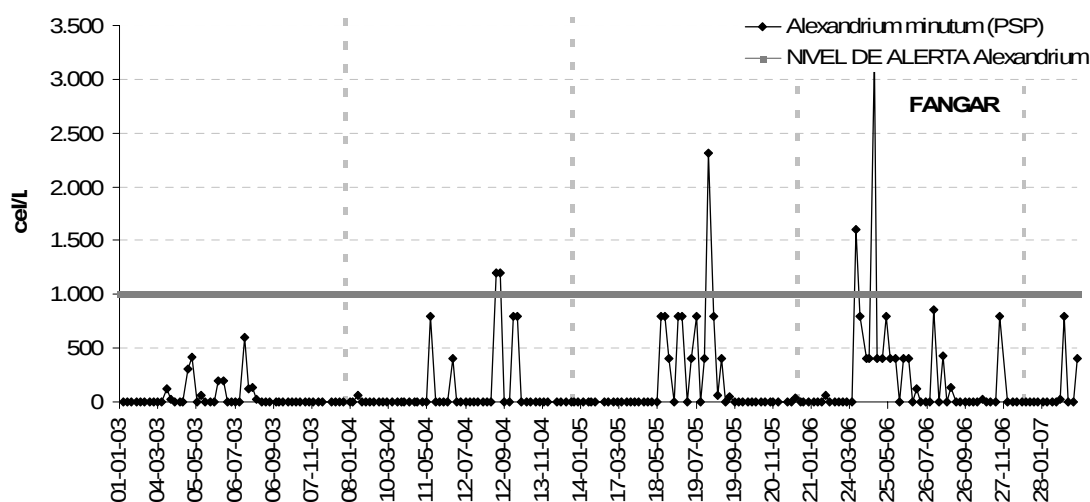


Figura 7. Densidades celulares de *Alexandrium minutum* en la bahía del Fangar. Nivel de alerta: 1.000 células por litro.

En la bahía del Fangar las densidades celulares de *D. caudata* + *D. sacculus* superaron el nivel de alerta en Agosto del 2003, Junio del 2004 y

Junio y Noviembre del 2006. Las densidades celulares de *P. reticulatum* superaron el nivel de alerta en Julio y Agosto del 2006 (Fig. 8).

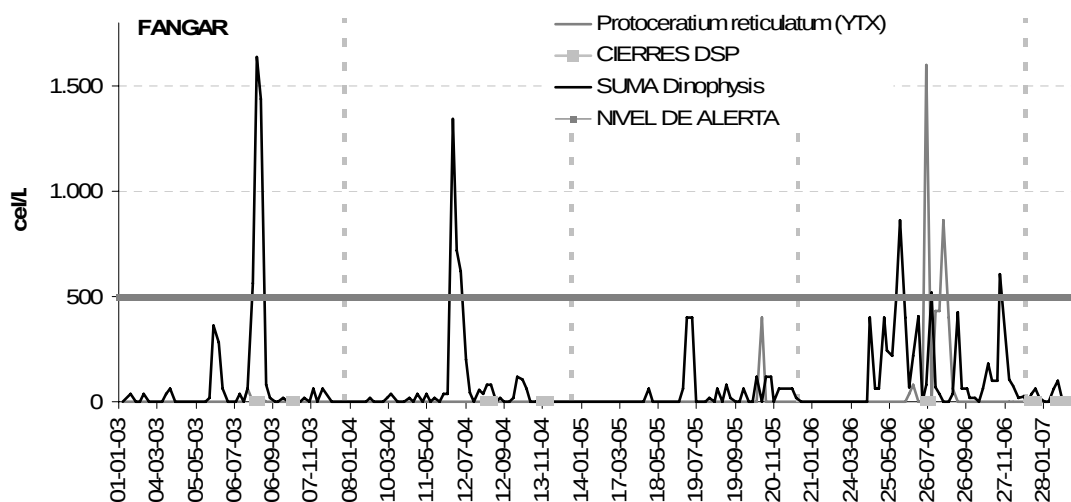


Figura 8. Densidades celulares de la suma de *Dinophysis saccus* y *D. caudata* en color negro y de *Protoceratium reticulatum* en color gris. Nivel de alerta para *D. caudata* y *saccus*: 500 células por litro. Para la especie *P. reticulatum* no se han establecido niveles de alerta.

Las densidades celulares de *Pseudo-nitzschia* spp. en la bahía del Fangar superaron el nivel de alerta con máximos en Marzo del 2003, Abril del 2004, Agosto del 2005, y Noviembre del 2006 (Fig. 9). En ninguna de las muestras se detectó presencia de toxicidad de tipo amnésico (ASP).

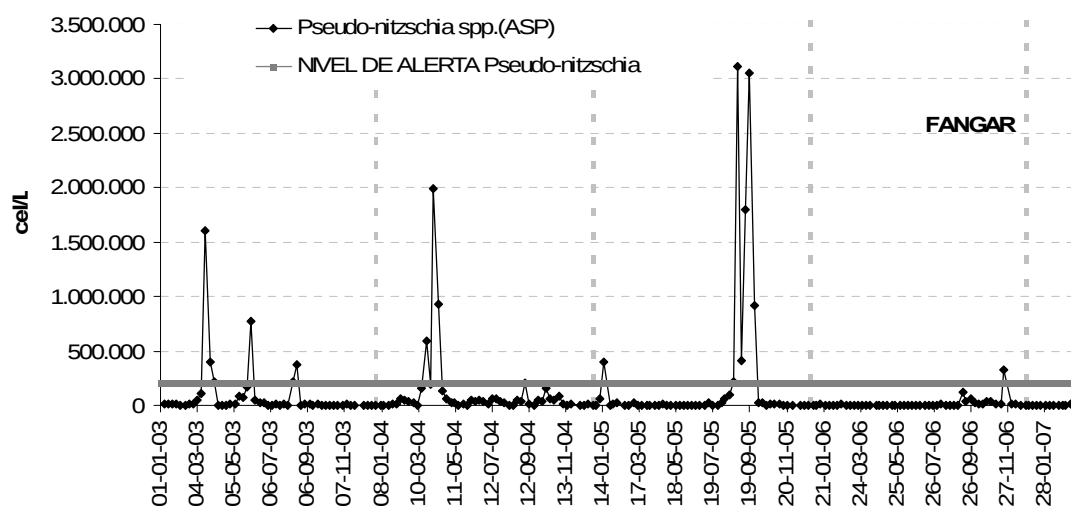


Figura 9. Densidades celulares de *Pseudo-nitzschia* spp. en la bahía del Fangar. Nivel de alerta: 200.000 células por litro.

Zonas en aguas abiertas: En la zona de Alcanar y en la costa sur del delta del Ebro se detectaron resultados positivos de DSP coincidiendo en algunos casos con situaciones de presencia de toxicidad tipo DSP también en las aguas interiores de la bahía de Alfacs y presencia de *P. reticulatum* y *D. sacculus* tanto en aguas exteriores como interiores. En la zona de Vilanova (CAT1-09) tras una alerta por niveles elevados de *A. minutum* en el interior del puerto ($1 \cdot 10^6$ cel L^{-1}) en Abril del 2003, se recogieron muestras de agua en aguas exteriores en las que se detectó también presencia de *A. minutum* por encima del nivel de alerta de $1 \cdot 10^3$ cel L^{-1} ($2,5 \cdot 10^4$ cel L^{-1}). En muestras de coquina de la zona se obtuvieron resultados positivos de PSP con una cuantificación de 269 $\mu gSTX_{equiv.}/100g$ y 185 $\mu g/100g$. En esta misma zona también se detectó toxicidad tipo DSP tras una alerta por *D. sacculus* en el 2005. En la zona de Calella (CAT1-17) se detectó un resultado positivo de DSP en uno de los muestreos rutinarios durante el primer trimestre del 2007 sin haber detectado ninguna microalga como origen de este resultado positivo.

Discusión y Conclusiones

La mayor parte de los cierres ocurrieron en las zonas de producción del delta del Ebro, principalmente en las 2 bahías que, al mismo tiempo, representan la mayor parte de la producción de moluscos de la costa catalana.

La bahía de Alfacs ha tenido 10 cierres durante el periodo de 2003-2006 y primer trimestre del 2007, todos ellos por resultados positivos de toxicidad tipo DSP. Como en años anteriores estos cierres estuvieron relacionados con la presencia de *D. sacculus*, *D. caudata* productores entre otros de la toxina diarréica ácido okadaico y derivados, y *P. reticulatum* productor de yessotoxinas [3]. La frecuente presencia de *P. reticulatum* tiene gran importancia para la gestión de los episodios DSP [4]. De estos 10 cierres por DSP, 2 de ellos no pueden ser explicados por presencia de especies de microalgas productoras de estas toxinas. Los episodios de DSP no correlacionados con presencia de microalgas productoras de este tipo de toxicidad podrían deberse a la inmersión de producto de otras zonas, entre otras causas posibles. Las elevadas temperaturas registradas durante los veranos de los años 2003 y 2006 causaron una elevada mortalidad de los bivalvos cultivados por lo que fue necesaria la importación de semilla de mejillón por parte de los productores. Esta puede ser una explicación de la detección de DSP sin presencia, en el agua, de microalgas responsables de este tipo de toxicidad.

En la bahía de Alfacs se produjo un episodio de mortalidad de fauna marina en Mayo-Junio del año 2003 relacionado con una proliferación de *Karlodinium* spp. anteriormente referido en esta bahía como *Gyrodinium corsicum* [5]. Desde el año 2003 se ha producido un cambio en las proliferaciones de *Karlodinium* spp. que hasta el año 2000 proliferaba durante el invierno. Se ha demostrado que se trata de una proliferación de dos especies (*Karlodinium armiger* + *K. veneticum*), ecológicamente distintas, mezcladas [6].

La bahía del Fangar había tenido, desde el inicio del programa de seguimiento en el año 1989, hasta el año 2003, un único cierre por detección de toxicidad en bivalvos a parte de los cierres preventivos. El primer incidente en esta bahía fue debido a un desarrollo importante de *A. catenella* en Noviembre del 2001 [3]. Durante los años 2004-2006 y primer trimestre del 2007 se han producido un total de 10 cierres en esta bahía y todos debidos a toxicidad tipo DSP, 7 de ellos no están relacionados con la presencia, en densidades por encima del nivel de alerta, de microalgas productoras de este tipo de toxicidad.

A pesar de las elevadas densidades de *Pseudo-nitzschia* spp. no se ha detectado toxicidad amnésica (ASP) en ninguna de las muestras de bivalvos analizadas hasta la actualidad. Los niveles de alerta para *Pseudo-nitzschia* spp. que se han fijado en 2×10^5 cel L⁻¹ se basan en referencias de niveles de alerta citadas en la bibliografía en otros países [7]. Estos niveles son superados frecuentemente en la costa catalana, lo que implica la emisión de mensajes de alerta sin aparentemente la existencia de un riesgo al no haberse detectado ningún episodio de ASP hasta el momento.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración al laboratorio de Anfaco y al Laboratorio del Departamento de Salud Pública de Tarragona por los análisis y bioensayos de toxinas. También agradecemos a todo el equipo técnico del IRTA por su apoyo.

Referencias

- [1] Vila, M., J. Camp, E. Garcés, M. Masó, M. Delgado. 2001. High Resolution Spatio-temporal Detection of Potentially Harmful Dinoflagellates in Confined Waters of the NW Mediterranean *Journal of Plankton Research*. 23:497-514.
- [2] REGLAMENTO (CE) No 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de Abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano L 226 83-127.
- [3] Diogène, J., B. Paz, M. Fernández, E. Mallat, E. Cañete, A. Caillaud, L. Elandaloussi, P. de la Iglesia, A.G. Cabado, J. Lago, J. Vieites, J. Franco. 2008. Evidencia de Yessotoxinas en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) de la Bahía de Alfacs, Delta del Ebro. En Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.:215-221.
- [4] Delgado, M., M. Fernández, J. Diogène, D. Furones. 2003. Seguimiento del fitoplancton tóxico en las bahías del Delta del Ebro en los años 2001-2002. *Actas de la VIII Reunión Iberica sobre fitoplancton tóxic y biotoxinas*. La Laguna 3-5- Noviembre 2003. pp.:159-166.
- [5] Delgado, M., J.V. Fernández, E. Garcés, E. Matamoros, J. Camp. 1995. Proliferación de un dinoflagelado del género *Gyrodinium* en la Bahía de Alfacs (Delta del Ebro) asociado a la mortandad de peces. *Actas del Vº Congreso Nacional de Acuicultura*. Sant Carles de la Ràpita 10-13 Mayo. pp.:700-704.
- [6] Garcés, E., M. Fernandez, A. Penna, K. van Lenning, A. Gutiérrez, J. Camp, M. Zapata. 2006. Characterization of NW Mediterranean *Karlodinium* spp. (Dinophyceae) strains using morphological, molecular, chemical, and physiological methodologies. *Journal of Phycology*. 42 :1096–1112.

- [7] Anderson, D.M., P. Andersen, V.M. Bricelj, J.J. Cullen, J.E. Rensel. 2001. *Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters*, APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris.

Seguimiento y plan de vigilancia de fitoplancton tóxico en las costas de Águilas (Murcia) en verano de 2006

Javier Gilabert ¹, Elisa Gómez ², Antonio Hernández ¹, M^a José Herrera ²,
Javier Tudela ², M^a José García ² y Carolina Gutiérrez ²

(1) Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Politécnica de
Cartagena (UPCT), Alfonso XIII, 44 30203-Cartagena

(2) Servicio de Sanidad Ambiental. Consejería de Sanidad. Comunidad Autónoma de
Murcia. Ronda Levante 11, 30008-Murcia

Resumen

En verano de 2006 se produjo el primer caso epidémico de afección respiratoria en la Región de Murcia con síntomas similares a los producidos por brevetoxinas. Más de 50 personas necesitaron atención hospitalaria. Los análisis realizados por el Laboratorio de Sanidad Ambiental de la Comunidad Autónoma presentaron resultados negativos para todos los agentes químicos analizados. Los recuentos de fitoplancton, en cambio, mostraron densidades elevadas de *Karenia* sp. y, en menor densidad, de *Chattonella* sp. En este trabajo se presentan los resultados del seguimiento de las densidades de fitoplancton potencialmente tóxico realizados en las zonas de baño afectadas por este evento. Se identificaron 5 especies tóxicas en la zona. Se estableció una escalas de riesgo tentativo, en función de las especies encontradas y su densidad, como ayuda a las medidas de gestión por parte del Departamento de Salud Pública de la Consejería de Sanidad Región de Murcia. Se discuten algunas posibles causas por las que estas especies pueden proliferar en la zona sometida a estudio y algunos posibles medios de transmisión como ingestión y transporte por aerosoles de las toxinas.

Introducción

Durante el fin de semana del 8 al 9 de Julio de 2006 se detectó un caso epidémico de afección respiratoria que afectó a más de 50 personas que tuvieron que ser atendidas en el Hospital General de Lorca. La característica común era la presencia en las playas de Calarreona, La Carolina y La Higuerica de Águilas y La Palmera y Los terreros de Almería. Los síntomas epidemiológicos presentados fueron: infección de faringe, espasmos bronquiales, carraspera, disfonía, eccema en la piel y eritema. Los análisis químicos del agua realizados por la consejería de sanidad dieron resultado negativo no encontrando ninguna sustancia química causante de este evento. Ante la sospecha de encontrarse frente a un caso de proliferación de microalgas tóxicas se tomaron muestras el día 12 de Junio y se realizó un análisis del fitoplancton de las aguas de dichas playas al día siguiente. En él se identificaron dos especies de microalgas potencialmente tóxicas – *Karenia* sp. y *Chattonella* sp. con densidades de 18.840 y 2.080 células por litro respectivamente –, ambas productoras de brevetoxinas. A la vista de estos resultados se inició un plan de vigilancia de las playas de la zona

diseñado para proporcionar una herramienta en la que basar la toma de decisiones por parte del Departamento de Salud Pública de la Consejería de Sanidad. Semanalmente se presentaba un informe con los resultados de las muestras analizadas: caracterización general de las especies encontradas y densidad de las especies potencialmente tóxicas.

Material y métodos

Zona de estudio. La Fig. 1 muestra la zona de estudio y las playas donde se tomaron las muestras: 1 - Calarreona, 2 - La Higuerica y 3 - La Carolina.

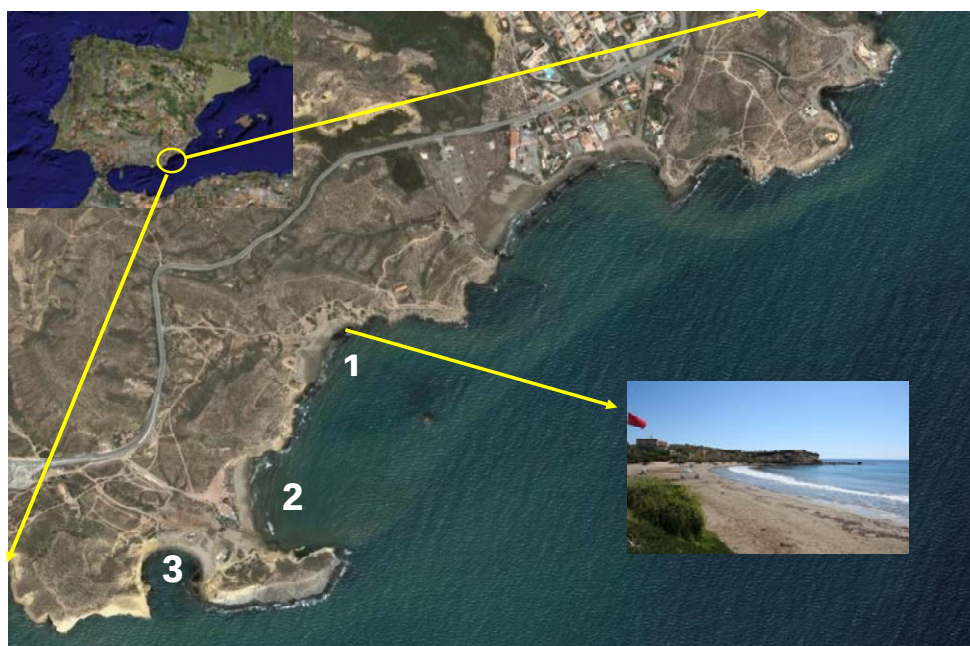


Figura 1. Zona y estaciones de muestreo. La fotografía inferior derecha muestra las condiciones usuales de la playa en verano.

Toma de muestras. Se tomaron muestras de 1 L con botes herméticos de polietileno en las playas de Calarreona, La Higuerica y La Carolina de Águilas (Murcia) sobre una columna de agua de 1,5 m de profundidad aproximadamente y directamente con el bote por el muestreador. Para diferenciar las células epibentónicas de las que se encontraban en la columna de agua se tomaron muestras tanto en la capa subsuperficial (25 cm por debajo de la superficie del agua) como en la profunda (a 25 cm del sedimento) en la zona de baño. Como el tiempo de duplicación de las poblaciones puede estimarse entre 3 y 6 días se consideró una frecuencia de muestreo semanal de Julio a Septiembre. De esta forma cuando se detectara un aumento de la población podría incrementarse la frecuencia de muestreo a tres días para seguir con mayor resolución la fase de crecimiento de la proliferación. Las muestras eran mantenidas en oscuridad y temperatura ambiente y enviadas por mensajero al laboratorio donde se recogían a la

mañana siguiente cuando se procedía a su análisis. A la llegada al laboratorio las muestras eran fraccionadas en 3 alícuotas. A la primera se le añadía una solución de nitrógeno, fósforo y vitaminas hasta alcanzar la concentración del medio de cultivo f/2. Otra alícuota se utilizó para la determinación taxonómica y recuento y la tercera se mantuvo como control hasta finalizar el recuento utilizándose posteriormente para el aislamiento de las células para su cultivo.

Recuento y análisis en el laboratorio. Una vez sedimentadas las muestras en cámara de Uthermöl de 100 mL se observaron al microscopio invertido (Leica IML) para su identificación taxonómica. El objeto del recuento era determinar la densidad de especies potencialmente tóxicas. También se recontaron las especies dominantes, aunque no fueran tóxicas, para disponer de una información adicional que permitiera la caracterización de la muestra en su conjunto. La extensión del recuento se realizó en función de la densidad celular encontrada para cada muestra. En primer lugar se realizaba un recorrido general por la placa de sedimentación con el objetivo 20x para identificar las especies dominantes de mayor tamaño. Seguidamente se recontaban las especies no tóxicas recontando varias diagonales, generalmente 4, equivalentes a un 10 % del volumen de la muestra sedimentada. Seguidamente se recontaban las especies tóxicas presentes en la mitad de la placa (50%), o en la placa entera (100%) si el número recontado en media placa no alcanzaba los 300 ejemplares. Con este método de recuento se aseguraba que las especies tóxicas estuvieran bien representadas. Los individuos utilizados para la determinación taxonómica fueron fotografiados con el sistema de fotografía digital incorporado en el microscopio con objetivo seco de 63x.

Las muestras se recontaron *in vivo*, pues el efecto de la fijación estropea y hace irreconocibles muchos de los dinoflagelados pequeños (se probaron diferentes métodos con varios fijadores). Para ello se colocaban las cámaras sedimentadas en frigorífico a 4°C durante 2 horas, tiempo en el que este tipo de células paraba su motilidad.

Resultados y discusión

Caracterización general de la muestra. Las muestras observadas estuvieron caracterizadas por la presencia mayoritaria de diferentes tipos de diatomeas con densidades relativamente bajas. Hacia el final del periodo aparecieron algunas células del género *Pseudonitzschia* sin determinar las especies de que se trataba. Las diatomeas dominantes fueron de los géneros *Odontella*, *Thalassionema*, *Coscinodiscus*, *Amphiprora*, *Navicula* y *Nitzschia* con presencia de otras diatomeas bentónicas. La evolución de estas diatomeas a lo largo del tiempo en las muestras de superficie se muestra en la Fig. 2.

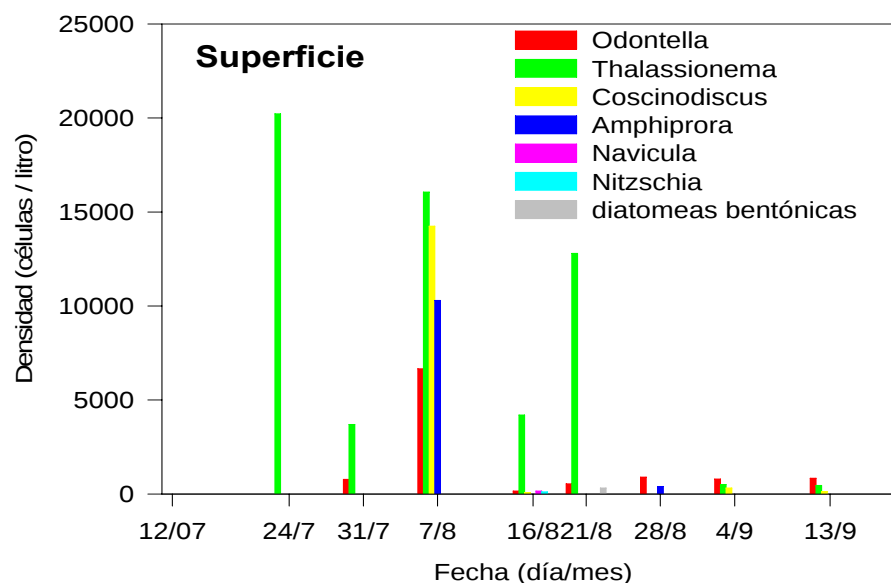


Figura 2. Evolución temporal de la densidad de diatomeas no tóxicas en las muestras de superficie.

En ella se aprecia que al principio del periodo de muestreo las diatomeas numéricamente dominantes pertenecían al género *Thalassionema* siendo sustituidas hacia el final por las del género *Odontella*. Se aprecia una disminución en la densidad de diatomeas a partir del 21 de Agosto coincidente con el aumento de células del género *Ostreopsis* como más adelante se explicará. La Fig. 3 muestra la evolución de las principales diatomeas en las muestras de fondo.

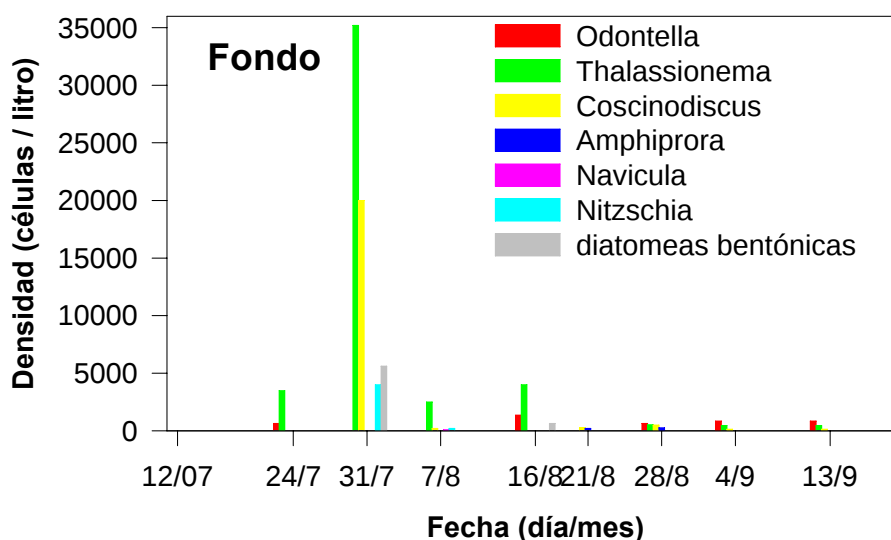


Figura 3. Evolución temporal de la densidad de diatomeas no tóxicas en las muestras de fondo.

Especies potencialmente tóxicas. Las células potencialmente tóxicas encontradas a nivel de superficie fueron básicamente de tres tipos: 1) las del “tipo *Karenia*”, 2) las pertenecientes al género *Chattonella* y 3) las del género *Ostreopsis*. Al final del periodo de muestreo aparecieron también células del género *Prorocentrum* y en mucha menor densidad *Gymnodinium* (Fig. 4).

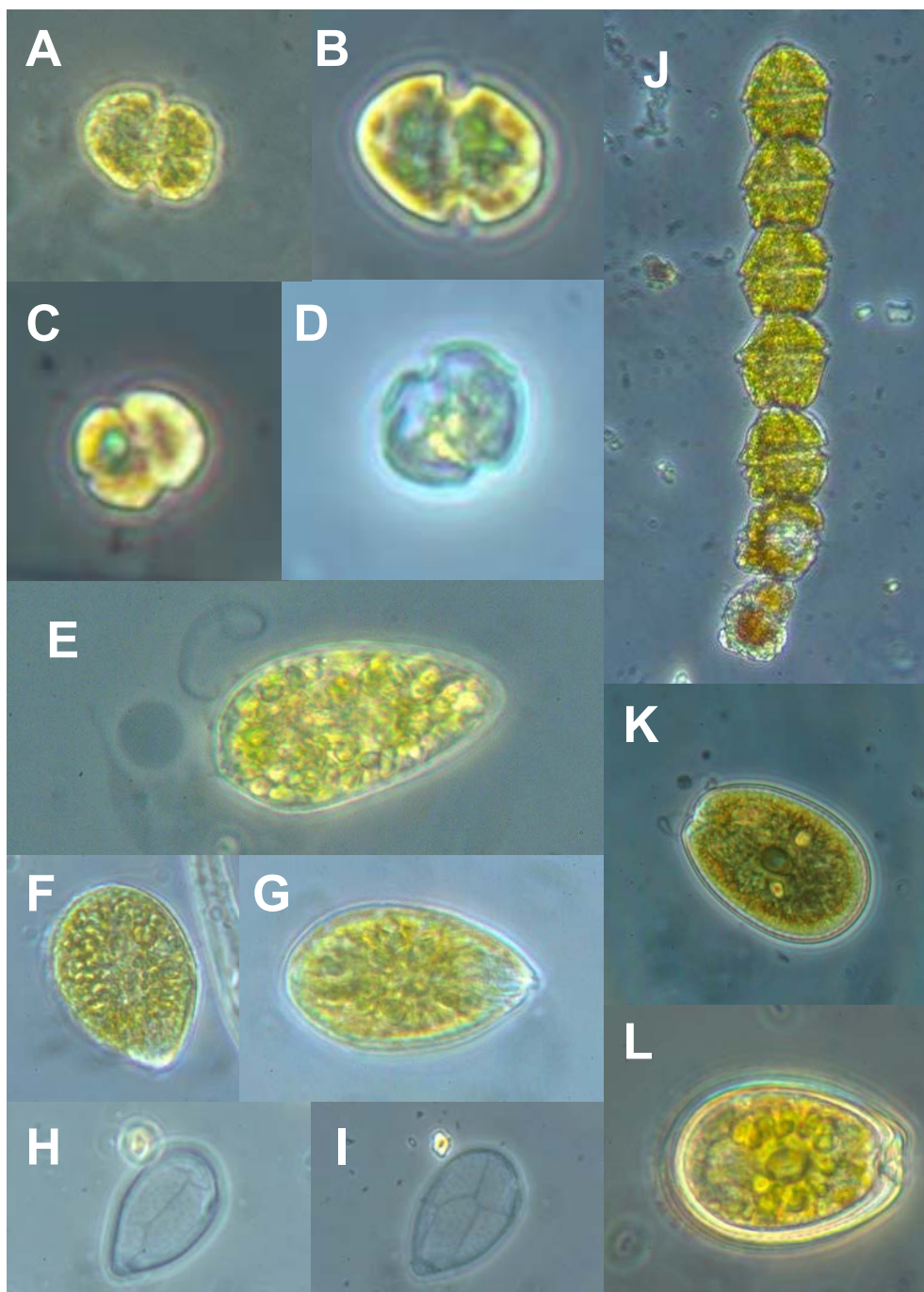


Figura 4. Imágenes al microscopio invertido de las especies potencialmente tóxicas encontradas: del tipo *Karenia* (A,B,C y D), *Chattonella* (E), *Ostreopsis* cf *ovata* (F), *Ostreopsis* cf *siamensis* (G), epiteca (H) e hipoteca (I) de placas de *Ostreopsis* sp., *Gymnodinium catenatum* (J) y *Prorocentrum lima* (K y L).

Al no haberse realizado análisis pigmentarios con HPLC ni microscopía electrónica, aquí se denomina células del “tipo *Karenia*” a aquellas dinoflageladas de pequeño tamaño sin armadura que, no habiendo sido identificadas a nivel de especie, se asimilan a este género por sus características morfológicas visuales al microscopio óptico. Este grupo puede comprender especies de los géneros *Karenia*, *Katodinium* y *Karlodinium*. Entre las características morfológicas básicas consideradas para la asignación de las células a este grupo se ha considerado el que se trate de células sin armadura y que el cingulo no muestre - o lo haga muy ligeramente (menos de 1/5 de la longitud de la célula) - desplazamiento vertical. La segunda especie potencialmente tóxica encontrada pertenecía al género *Chattonella*, probablemente de la especie *C. marina*. Se apreciaron, además, dos especies del género *Ostreopsis*, probablemente *Ostreopsis ovata* (Fukuyo, 1981) y *Ostreopsis siamensis* (Schmidt, 1902). La evolución temporal de la densidad de los tres tipos de células potencialmente tóxicas encontradas en superficie se presenta en la Fig. 5. En ella se aprecia que tras la proliferación inicial de *Karenia* y *Chattonella*, la primera disminuye para mantenerse relativamente estable a lo largo del tiempo con una densidad relativamente baja. *Chattonella*, en cambio, disminuye para aumentar seguidamente y volver a disminuir a continuación para luego desaparecer. Al tiempo que desapareció *Chattonella* apareció *Ostreopsis* aumentando progresivamente hasta alcanzar su valor máximo de 1.460 células por litro el día 13 de Septiembre disminuyendo seguidamente con rapidez.

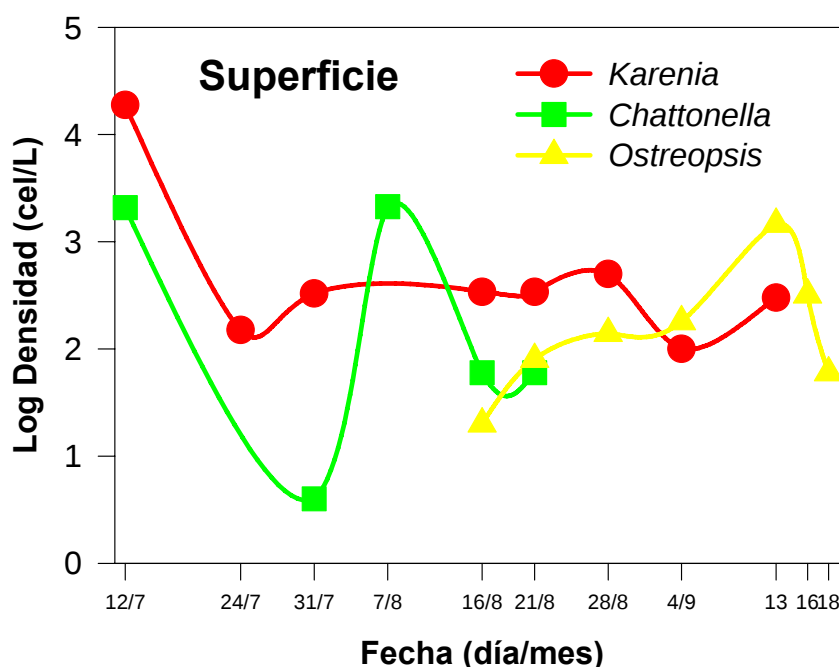


Figura 5. Evolución temporal de los tres tipos de células tóxicas presentes en superficie.

La Fig. 6 muestra la evolución temporal en las muestras de fondo. La densidad de *Ostreopsis* se mantuvo en torno a las 1.000 cel L⁻¹ los días 28 de Agosto y 13 de Septiembre (1.020 y 1.080 cel L⁻¹ respectivamente) pero también aparecieron células de *Prorocentrum lima*.

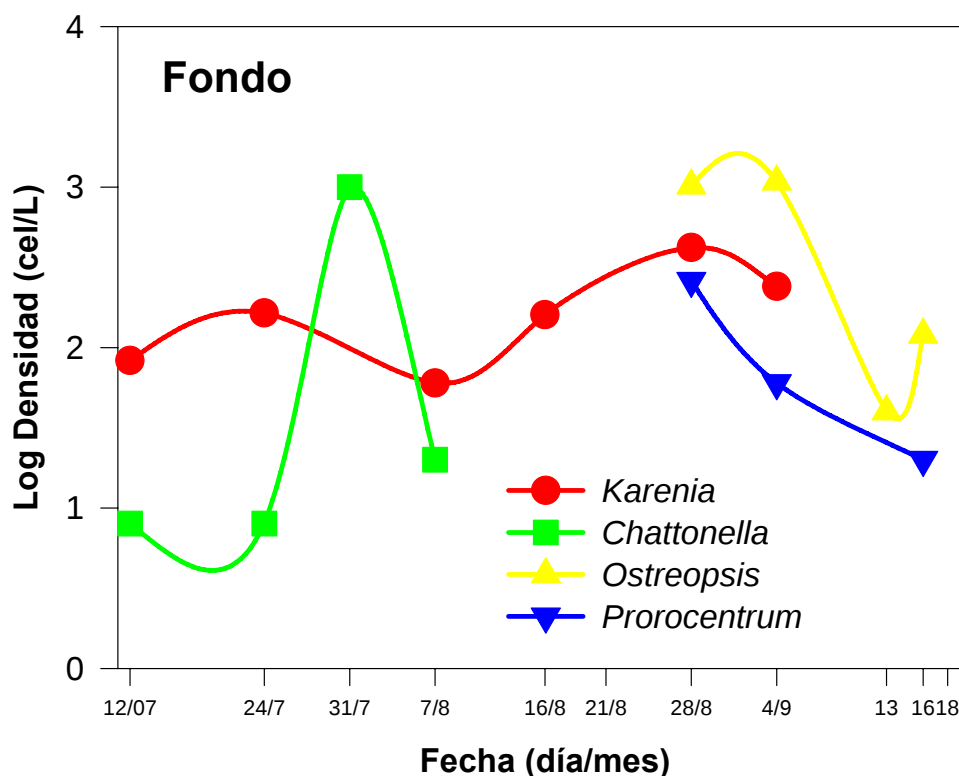


Figura 6. Evolución temporal de los tres tipos de células tóxicas presentes en superficie.

El pico de *Ostreopsis* encontrado el 4 de Septiembre tanto en superficie (1.460 cel L⁻¹) como en fondo (1.080 cel L⁻¹) provocó la decisión del cierre de la playa al baño como medida preventiva por parte de la Consejería de Sanidad dados los antecedentes acaecidos previamente en playas cercanas de la provincia de Almería con esta especie. Con el fin de comprobar la persistencia de las células de *Ostreopsis* se tomaron muestras de superficie y fondo el día 16 de Septiembre en tres puntos de la playa de Calarreona (en sus extremos y en el centro) y en las playas adyacentes de La Higuerica y La Carolina. La densidad observada en todas las estaciones de muestreo fue muy inferior, del orden de 4,5 veces por debajo de la densidad máxima recontada, con densidades oscilando entre 40 y 320 cel L⁻¹. Estos valores indicaron que la densidad celular de *Ostreopsis* no prosiguió en su aumento descartándose la posibilidad de formación de una proliferación tóxica y por tanto se pudo abrir la playa de nuevo al baño.

Las muestras tomadas el 16 de Septiembre mostraron además la presencia de otras especies tóxicas como *Gymnodinium catenatum* y *Prorocentrum lima*.

Gymnodinium catenatum (Graham) se encontró en una densidad de 640 cel L⁻¹ en el extremo sur de la playa de Calarreona en superficie junto con otras especies de dinoflagelados no identificados como tóxicos. Las muestras presentaron una densidad relativamente baja de diatomeas. *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975) apareció con un pico el 28 de Agosto que posteriormente fue disminuyendo paulatinamente.

Escala de riesgo propuesta. Con los resultados obtenidos en los recuentos, y para facilitar un criterio tentativo para la toma de decisiones por parte de la Consejería de Sanidad, se elaboró una escala de riesgo en función de la densidad de células potencialmente tóxicas encontradas. El recuento celular no determina directamente la toxicidad en el agua, pero ésta está relacionada con la densidad celular pudiéndose establecer una escala en función de la misma. Esta relación se tiene bien descrita en zonas de proliferaciones recurrentes de células de *Dinophysis*, pero no se han establecido criterios claros para células productoras de brevetoxinas. De acuerdo con algunas estimaciones previas (Camp, com. pers., http://focosi.immunesisig.org/chemicalcauses_alveo_lata.html) se adoptó el siguiente criterio para establecer una escala de riesgo:

Sin Riesgo – No se encuentran especies tóxicas

Muy Bajo – Se encuentran especies tóxicas con densidades inferiores a 10³ cel L⁻¹

Bajo – Se encuentran especies tóxicas con densidades entre 10³ y 10⁴ cel L⁻¹

Alto – Se encuentran especies tóxicas con densidades entre 10⁴ y 10⁵ cel L⁻¹

Muy Alto – Se encuentran especies tóxicas con densidades superiores a 10⁵ cel L⁻¹

No obstante, cuando se encontraron ejemplares de *Ostreopsis* (productora de palitoxinas) los niveles de densidad para cada rango de la escala se establecieron en un orden de magnitud por debajo de los establecidos para las células productoras de brevetoxinas.

La Fig. 7 muestra la evolución del factor de riesgo propuesto tanto en las muestras de superficie como de fondo.

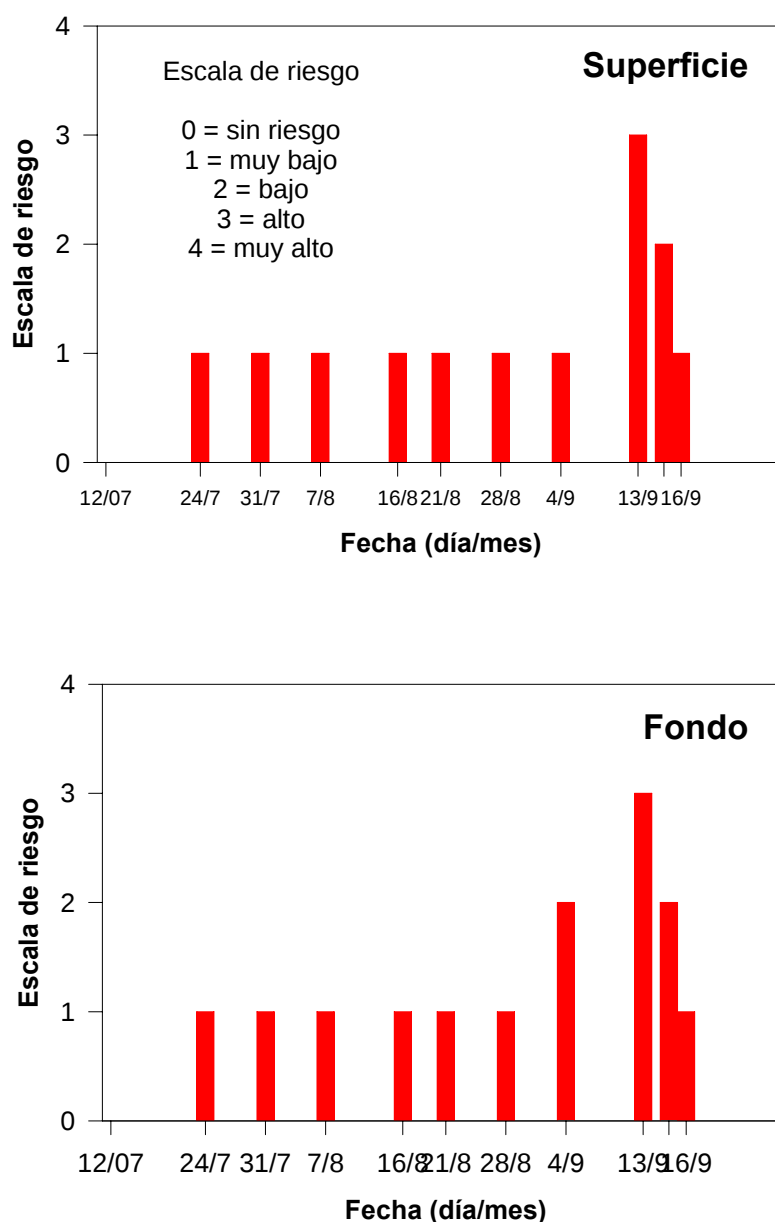


Figura 7. Evolución temporal del factor de riesgo encontrado en las muestras de superficie y de fondo.

Entre los elementos a considerar en el análisis de las proliferaciones de fitoplancton tóxico hay que tener en cuenta variables tanto ambientales como biológicas y ecológicas de las especies en cuestión. Entre las variables ambientales se pueden distinguir, entre otras: 1) variables físicas como la temperatura y turbulencia del agua, pero también el tipo de fondo; 2) químicas como la salinidad, la concentración de diferentes elementos y compuestos disueltos en el agua tales como macro y micro nutrientes y materia orgánica disuelta; 3) biológicas como el ciclo vital de las especies

involucradas y mecanismos alimentarios y 4) variables ecológicas como la estrategia adaptativa de cada especie, los mecanismos de competición por los recursos y la dificultad en la predación – mecanismo de control de arriba hacia abajo (*top-down*) de la red trófica -. Cada una de las variables y mecanismos de control operan a diferentes escalas con interacciones no lineales produciendo una dinámica de difícil predicción.

Temperatura. La temperatura es un parámetro que incide directamente sobre la tasa de crecimiento de las microalgas existiendo un amplio rango de temperatura óptima para las diferentes especies de microalgas. La mayoría de especies potencialmente tóxicas encontradas son de origen tropical o aguas cálidas con temperaturas óptimas para el crecimiento mayor que las de otras especies de nuestra zona. La hipótesis de que uno de los factores causantes del incremento de este fenómeno sea la tendencia al incremento de la temperatura atribuido a variaciones climáticas merece atención. Hay que tener en cuenta que durante el verano de 2006 se registraron temperaturas mucho más altas de las registradas en años anteriores en las costas de Murcia (del orden de 28°C a cuatro millas de la costa en la zona de San Pedro del Pinatar en Junio).

Turbulencia. La turbulencia es otro factor físico determinante en las proliferaciones de fitoplancton tóxico [1]. Desde los trabajos de Margalef se ha establecido una relación entre la turbulencia y la estrategia adaptativa de las especies tóxicas que proliferan. Zonas de bajo hidrodinamismo son óptimas para el crecimiento de estas células. Su capacidad natatoria les permite situarse a la altura de la columna de agua que ofrece condiciones más favorables para el crecimiento ajustando así su metabolismo a las condiciones de luz y nutrientes más favorables.

Tipo de sustrato. Muchas de las especies que proliferan tienen capacidad de formar cistes que se acumulan en el sedimento. Los fondos de arena parecen un habitat adecuado para los cistes al proporcionar un ambiente de refugio entre las partículas del suelo. Al mismo tiempo, algunas especies tóxicas son bentónicas o epibentónicas (p.e. *Ostreopsis*) viviendo sobre este tipo de sustrato.

Las playas afectadas parecen reunir una serie de condiciones favorables para este tipo de eventos. De un lado el verano de 2006 fue, por lo general, algo más caluroso que años anteriores. El hecho de que la *temperatura* del agua en zonas de mar abierto haya sido extremadamente alta pudiera haber sido uno de los factores detonantes, pero definitivamente no el único. Las playas afectadas tienen forma de bahías semicerradas resguardadas y por tanto con bajo hidrodinamismo (Fig. 1). Las playas de Calarreona, La Higuera y La Carolina tienen dimensiones parecidas (200 x 40 m aproximadamente) y poseen condiciones de baño de aguas tranquilas y oleajes moderados. La orientación de la playa de Calarreona la hace disponer de aguas más tranquilas que las otras dos. Las tres playas están compuestas de fondo de arena, lo cual implica un *tipo de fondo* adecuado para la sedimentación de cistes, siendo el tipo de sustrato en el que microalgas tóxicas bentónicas - como las del género *Ostreopsis* - pueden

desarrollarse. No se dispone de valores medidos *in situ* de la concentración de nutrientes - otro de los factores decisivos en el establecimiento de las proliferaciones -. La presencia de al menos 5 especies tóxicas productoras de tres tipos diferentes de toxinas, junto con la presencia de diatomeas sugiere el aporte de algún tipo de nutrientes (existe una agricultura intensiva en la zona interior y una rambla cercana). No obstante, las aguas son limpias y no se puede hablar de un proceso de eutrofización en la zona. No obstante, las condiciones de baja turbulencia en épocas de calmas y ausencia de mareas sugieren también que los nutrientes aportados a la zona pudieran permanecer un tiempo relativamente elevado, suficiente para la asimilación por las microalgas de forma competitiva. En la actualidad existen evidencias de la importancia que tienen los vertidos agrícolas en la inducción de proliferaciones de fitoplancton tóxico [2].

La aparición de *Ostreopsis* en la zona implica un riesgo adicional por los antecedentes de esta especie en el Mediterráneo. En la zona limítrofe de la provincia de Almería, en las playas de El Calón y Pozo del Esparto más de 100 personas fueron atendidas en centros de salud debido a afecciones respiratorias el torno al 14 de Agosto de 2006 [3]. Se analizaron muestras el día 28 del mismo mes encontrándose una densidad de 1.200 células por litro de *Ostreopsis* spp. El hecho de que estas especies hayan alcanzado niveles similares en las playas de Águilas y que se haya detectado su presencia en playas más amplias con una mayor población turística como la playa de Poniente, indica la importancia de los sistemas de vigilancia en todas las zonas susceptibles en la zona.

En cuanto al modo de transmisión de las toxinas no se ha podido identificar un mecanismo claro. No obstante se baraja la hipótesis de transmisión por aerosoles al haberse observado familias enteras afectadas en las que algunos de sus miembros no se bañaron y personal de servicio en los chiringuitos de la playa que sin haberse bañado también resultaron afectados.

Agradecimientos

Queremos agradecer a Jordi Camp y Esther Garcés sus comentarios y disponibilidad sobre la identificación taxonómica de pequeños dinoflagelados y los criterios tentativos en la elaboración de las escalas de riesgo en aguas de recreo.

Bibliografía

- [1] Berdalet, E y M. Estrada. 2008. Modulación de la dinámica de HABs por la turbulencia de pequeña escala. En Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.:1-12.
- [2] Beman, J.M., K.R. Arrigo, P.A. Matson. 2005. Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434:211-214.
- [3] Barroso, P., P. Rueda, T. Parrón, P. Marín y J.Guillén. Brote con clínica respiratoria en la provincia de Almería por posible exposición a microalgas. En Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.:59-60.

Brote con clínica respiratoria en la provincia de Almería por posible exposición a microalgas

P. Barroso García¹, P. Rueda de la Puerta¹, T. Parrón Carreño²,
P. Marín Martínez² y J. Guillén Enriquez³

(1) *Unidad de Salud Pública. Área de Gestión Sanitaria Norte de Almería.*

(2) *Servicio de Salud. Delegación Provincial de Salud (Almería)*

(3) *Dirección General de Salud Pública. Consejería de Salud de la Junta de Andalucía.*

Introducción

El día 5 de Agosto a las 12 horas, el 061 comunicó una alerta que había sido notificada por un usuario. Desde el día anterior un grupo de personas presentaba clínica de irritación de vías respiratorias, en algunos casos fiebre y malestar general. Todos tenían en común veranear en Pozo del Esparto (barriada de Cuevas del Almanzora). Las actuaciones se iniciaron en el momento de la notificación de la alerta. Los objetivos planteados fueron describir la alerta comunicada, determinar agente causal y realizar medidas de prevención y control oportunas.

Métodos

Estudio descriptivo. Se diseñó un cuestionario, con variables de persona, lugar, tiempo y exposición ambiental. La hipótesis planteada fue que el responsable del brote era algún tipo de exposición ambiental, llevándose a cabo un estudio de casos-controles para verificar dicha hipótesis. Para el análisis de la información se dividió la barriada en tres zonas. Al realizar la encuesta se solicitó a los afectados que valoraran subjetivamente, en una escala de menor a mayor gravedad (1 a 3), el cuadro clínico. Los datos se analizaron con SPSS y Programa Epiinfo. Se calcularon *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza al 95% para relacionar la gravedad del cuadro por zonas, y como medida de asociación por tipo de exposición. Se utilizó test de Chi-cuadrado y corrección de Yates. Se calcularon tasas de ataque. Se realizaron investigaciones ambientales: datos meteorológicos, fitosanitarios, movimientos de tierras de obras próximas, contaminación atmosférica, tierra de reposición de la playa. Se tomaron muestras de agua del mar.

Como fuentes de información se utilizaron las encuestas epidemiológicas, registros de pacientes en centros sanitarios, informes de las inspecciones e investigaciones ambientales.

Resultados

Se realizaron 83 entrevistas, 57 casos y 26 controles. Se estimó una tasa de ataque del 69% (84% en la zona 1). El 59,6% de los afectados encuestados fueron mujeres y el 40,4% hombres. Sus edades oscilaron entre 4 y 91, con una media de 43, mediana de 45 y desviación estándar de 21,3. Los síntomas más frecuentes fueron estornudos en un 87,7%; un 80% de los

de la Zona 1 presentaron fiebre. Un 50,9% de los afectados consideraron haber tenido un cuadro grado 3 (76,9% de la Zona 1). Los afectados de la Zona 1 presentaron mayor riesgo de padecer cuadro grado 3 que los de la Zona 3 (OR 46,7; 4,5-1.171). El cuadro tuvo una duración media de 3,9 y una mediana de 3. El día con mayor número de casos fue el 4 de Agosto. Las personas que indicaron haber realizado más actividad fuera de la vivienda tuvieron mayor riesgo de enfermar que las que indicaron más actividad dentro (OR 12,25; IC 1,13-310,54). No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a estancia en la playa y baño en la playa. Las tasas de ataque para los que vivían en primera línea de playa fue de 0,74; para los que realizaban actividad habitual fuera de la casa 0,75; para los que se bañaron 0,72 y para los que habían estado en la playa 0,70. En los análisis de agua de mar del día 28 de Agosto se detectaron niveles potencialmente tóxicos de los dinoflagelados del género *Ostreopsis*.

Conclusiones

Se trata de un brote con clínica irritativa de vías respiratorias, que ha afectado en distinto grado, según las zonas de localización de la vivienda, a los habitantes de una barriada de la costa almeriense. Al encontrarse niveles tóxicos de microalgas *Ostreopsis* en agua del mar y teniendo en cuenta los datos de la investigación epidemiológica, parece que lo más probable es que el cuadro haya sido producido por la presencia de estas microalgas, que hayan podido actuar como aerosol.

Presencia de especies tóxicas de fitoplancton en la evaluación del estado ecológico de las masas de agua costeras de las Islas Baleares

Margarita Puigserver, Nuria Monerris y Gabriel Moyà

Dept. Biología (Ecología), Univ. Illes Balears,
Ctra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma (Mallorca).
margapuigserver@hotmail.com

Resumen

Los resultados que se presentan forman parte de un estudio sobre el fitoplancton de todo el litoral balear, destinado a la evaluación del estado ecológico de las masas de aguas costeras en el marco de la implantación de la Directiva Marco del Agua en las Baleares. En una primera fase se ha pretendido tener una referencia de la composición de las comunidades fitoplanctónicas en diferentes momentos del ciclo anual, para ello se realizaron muestreos estacionales, de los cuales presentamos los resultados que hasta el momento están elaborados y que corresponden a verano de 2005 y primavera de 2006. Se incide en la presencia de especies tóxicas como uno de los indicadores del estado ecológico de una masa de agua, y en su papel cualitativo y cuantitativo dentro de la comunidad. Se identificaron 26 taxones potencialmente tóxicos o formadores de blooms. Destacan las abundancias de las diatomeas *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima*, con máximos de 65.000 y 58.000 cel L⁻¹, y los dinoflagelados *Alexandrium* spp., con máximos de 17.000 y 5.000 cel L⁻¹, en los respectivos muestreos. En la mayoría de casos la comunidad está dominada por haptofitas de los géneros *Phaeocystis* y *Chrysochromulina* y otras especies ultraflageladas.

Introducción

La Directiva Marco del Agua [1] en su Anexo V establece que uno de los Indicadores biológicos de calidad para la clasificación del Estado Ecológico de las aguas costeras es la composición, abundancia y biomasa del fitoplancton. En este contexto de implementación de la DMA en las Islas Baleares se sitúa el presente trabajo, en el cual se presentan los primeros resultados de un amplio estudio que abarca todas las aguas costeras del Archipiélago Balear, muestreadas en una primera fase en cuatro ocasiones durante el período comprendido entre los veranos de 2005 y 2006.

Hasta el momento los estudios del fitoplancton en las Baleares se habían restringido a áreas muy localizadas, principalmente bahías y puertos, así encontramos estudios relativos a toda la comunidad fitoplanctónica [2,3] y otros centrados en especies nocivas o tóxicas [4,5,6].

Material y métodos

Las muestras se han recogido estacionalmente en 64 puntos, distribuidos en 31 masas de agua delimitadas según criterios de la DMA y

basados en el tipo de costa (Fig. 1). Las muestras se recogieron estacionalmente entre verano de 2005 y verano de 2006. Se recogían muestras a 1 y 15 m de profundidad utilizando una botella Niskin. Las muestras eran fijadas con unas gotas de Lugol acético [7] y almacenadas para su posterior estudio. La identificación y recuento del fitoplancton se realizó por la técnica de Utermöhl [8] usando columnas de sedimentación de 50 o 100 mL.

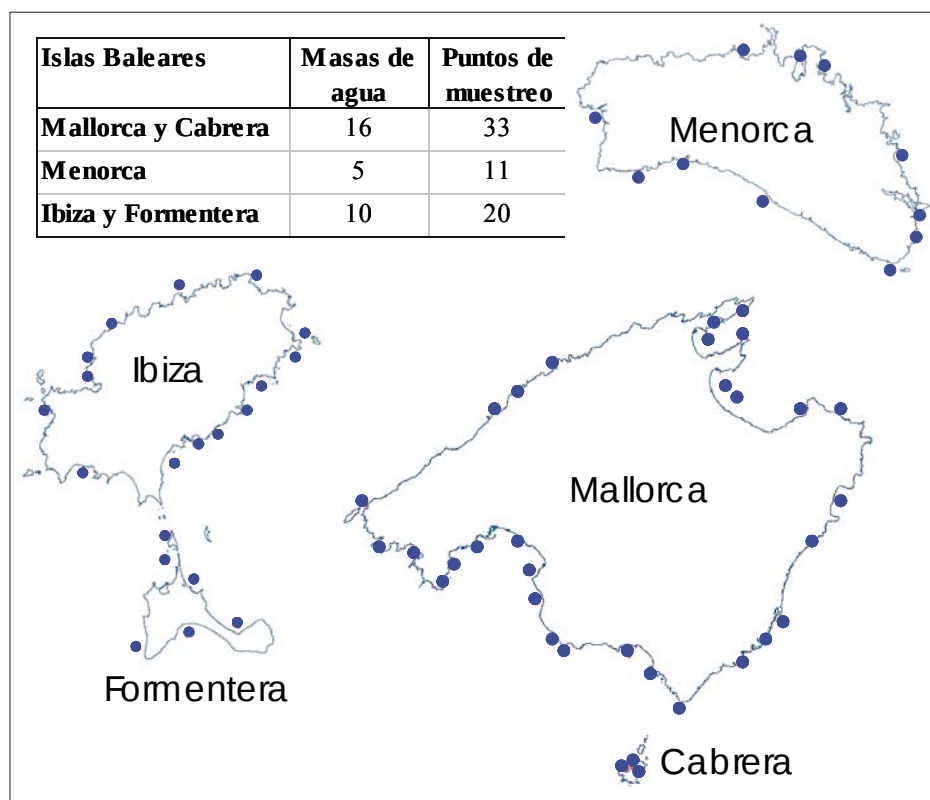


Figura 1. Mapa de localización de las estaciones de muestreo.

Resultados

Se han identificado 213 taxones a nivel de especie o género, entre los cuales 26 son considerados potencialmente tóxicos, según la lista de referencia de la IOC, o formadoras de proliferaciones (Tabla 1). La mayor parte de ellas han aparecido en ambos muestreos.

Las concentraciones totales fitoplanctónicas han oscilado entre 139-2.561 cel mL⁻¹ en verano y 127-4.075 cel mL⁻¹ en primavera. Un 77% de las muestras de verano y un 67% de las primavera no superaron las 1.000 cel mL⁻¹. La comunidad estaba principalmente dominada por haptofitas de los géneros *Phaeocystis* y *Chrysochromulina* y otras especies ultraflageladas (inferiores a 5 µm).

Las máximas concentraciones del verano se han observado en la isla de Mallorca, superando las 2.000 cel mL⁻¹ en la Bahía de Palma y cala Marmacen (Andratx), y superando las 1.500 cel mL⁻¹ en el puerto de Sóller

y Portocolom (Fig. 2). En el caso de la Bahía de Palma, junto con las haptofitas y otras ultraflageladas, abundaron diatomeas del género *Chaetoceros*. Se observó también la presencia de las especies potencialmente nocivas como *Akashiwo sanguinea*, *Dinophysis caudata*, *Katodinium glaucum*, *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima* y pequeñas Gymnodiniales no identificadas. En Portocolom las principales especies acompañantes fueron Gymnodiniales. En cala Marmacen y puerto de Sóller, la comunidad estaba claramente dominada por ultraflageladas, con mínima presencia de especies potencialmente nocivas.

	Verano 2005	Primavera 2006
Akashiwo sanguinea*	X	X
<i>Alexandrium minutum</i>	X	X
<i>Alexandrium</i> sp.	X	X
<i>Amphidinium carterae</i>	X	X
<i>Dinophysis</i> cf. <i>acuminata</i>	X	
<i>D. acuta</i>	X	X
<i>D. caudata</i>	X	X
<i>D. mitra</i>		X
<i>D. cf. norvegica</i>	X	X
D. rotundata	X	X
<i>D. sacculus</i>		X
<i>D. tripos</i>		X
Gymnodiniales N.I.*	X	X
Karenia papilionacea	X	X
<i>Karenia</i> sp.	X	X
Katodinium glaucum*	X	X
Lingulodinium polyedrum*	X	
<i>Ostreopsis siamensis</i>	X	X
<i>Prorocentrum balticum</i>	X	X
<i>P. minimum</i>	X	X
P. lima		X
P. rathymum	X	X
<i>Takayama pulchella*</i>	X	X
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	X	X
<i>Heterosigma akashiwo</i>	X	X
<i>Phaeocystis</i> sp.	X	X

Tabla 1. Aparición de especies tóxicas, según la lista de referencia de la IOC, y otras formadoras de proliferaciones (*).

Las máximas concentraciones en primavera se han detectado en las costas Norte de las tres islas mayores (Fig. 2), superando las 3.000 cel mL⁻¹ en cala Deià (Mallorca), Fornells (Menorca) y St. Antoni (Ibiza). La comunidad estaba claramente dominada por ultraflageladas y con poca presencia de especies potencialmente nocivas. Tan sólo cabe destacar el caso de Fornells donde, además de detectarse las concentraciones totales más altas, se ha observado la presencia de *Akashiwo sanguinea*, *D. rotundata*, *Gonyaulax polygramma*, *Karenia* sp. y pequeños Gymnodiniales en bajas concentraciones.

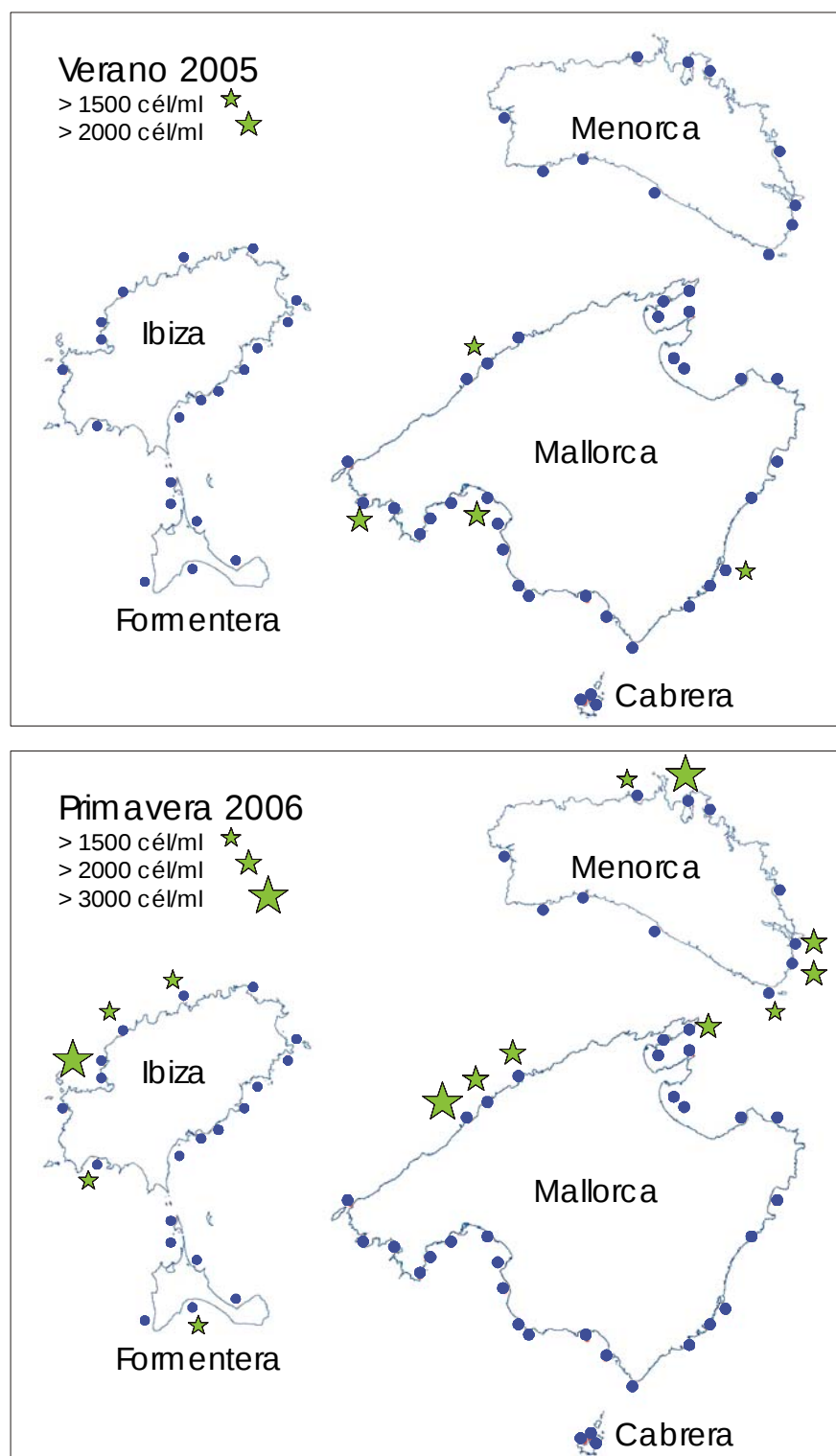


Figura 2. Máximas concentraciones fitoplanctónicas totales.

Las especies tóxicas más abundantes han sido las diatomeas *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima*, con máximos de 65.000 y 58.000 cel L⁻¹, y los dinoflagelados *Alexandrium* spp., con máximos de 17.000 y 5.000 cel L⁻¹ en los respectivos muestreos. Aunque con concentraciones menores, los

crecimientos de estas especies se detectaron en un mayor número de muestras en el muestreo de primavera. También fueron abundantes *Karenia* spp., con un máximo de 16.000 cel L⁻¹, *Prorocentrum balticum* y *P. minimum*, con máximas abundancias de 8.000 cel L⁻¹ para cada una de las dos especies.

Las máximas concentraciones de *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima* se han detectado en las bahías de Palma y Alcudia, y en zonas próximas al suroeste de Mallorca (Fig. 3). En cuanto a *Alexandrium*, tratándose principalmente de *A. minutum*, su presencia se ha observado en zonas dispersas de todo el archipiélago, con máximas abundancias en zonas portuarias del Este y Norte de Mallorca y al Oeste de Formentera (Fig. 3). Se han observado crecimientos de *Prorocentrum balticum* dispersos en la isla de Mallorca y numerosas muestras con *P. minimum* al sur de Mallorca y sureste de Ibiza y Formentera (Fig. 3). Finalmente, cabe destacar un máximo de *Karenia* sp. detectado en Formentera.

Discusión

La mayor parte de las muestras presentan concentraciones fitoplanctónicas totales inferiores a 1.000 cel mL⁻¹, propias de zonas neríticas mediterráneas [9,10], indicando un bajo nivel trófico de estas aguas. En los casos en que las concentraciones celulares superan estos valores se indica un mayor grado trófico, aunque al tratarse de resultados parciales, no podemos asegurar que este sea el carácter general de estas aguas o bien se trate de crecimientos fitoplanctónicos limitados en el tiempo.

Cabe destacar que las zonas donde se han detectado las máximas concentraciones no han coincidido en los dos muestreos y que las abundancias celulares han sido en general más altas en primavera. Estas máximas concentraciones de primavera en las costas norte de las islas posiblemente puedan asociarse a fenómenos de afloramientos relacionados con el sistema de corrientes marinas [11]. Mientras que, las máximas concentraciones detectadas en verano se han localizado en zonas con importante influencia antrópica de tipo turístico.

La utilización del fitoplancton como indicador ecológico no puede limitarse al estudio cuantitativo sino que debe incluir también un análisis cualitativo de las especies o grupos funcionales que componen la comunidad. En este estudio, la comunidad ha estado mayormente dominada por ultraflagelados, entre los que abundan las haptofitas y concretamente el género *Phaeocystis*. Aunque este género puede formar grandes proliferaciones con producción de espumas [12] y está incluido en la lista de referencia de algas tóxicas del IOC, en nuestra área de estudio suele dominar en aguas oligotróficas con influencia oceánica [3] y asociamos sus proliferaciones a factores no antrópicos.

En la mayor parte de casos, las máximas abundancias totales no han coincidido con altas concentraciones de otras especies tóxicas con diferente estrategia, como *Pseudonitzschia* y *Alexandrium*, cuyas proliferaciones documentadas en el litoral Balear parecen estar más condicionadas por factores antrópicos [5,13].

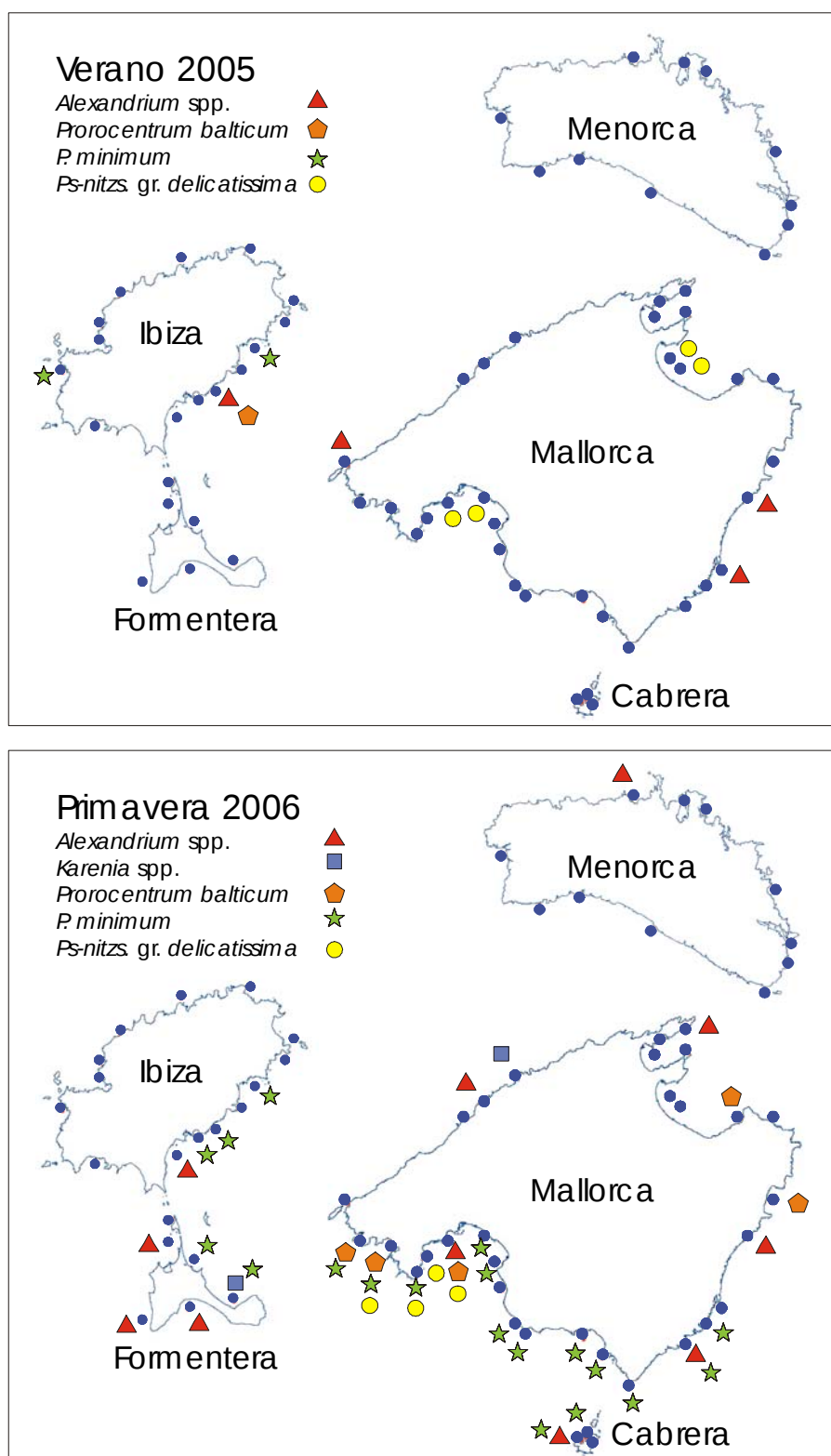


Figura 3. Máximas concentraciones de especies tóxicas.

Los resultados disponibles hasta el momento son parciales y pueden no reflejar el estado ecológico general de las aguas. La coincidencia de crecimientos conjuntos de ciertas especies y sus relaciones con las características ambientales, junto con futuros resultados de otros momentos del ciclo anual, podrán confirmar o rebatir las hipótesis aquí planteadas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado por un Convenio de Colaboración entre el Instituto Balear del Agua del Govern de les Illes Balears y la Universitat de les Illes Balears, para el *Estudio de implementación de la DMA en Baleares*, nuestro agradecimiento al Sr. Alfredo Barón y al Sr. Fernando Orozco que han hecho posible esta colaboración. La recogida de muestras fue realizada por personal de los Servicios Científicotécnicos de la UIB, nuestro agradecimiento a todas las personas implicadas y en especial al Dr. Josep Pablo y al director Dr. Sebastián Albertí.

Referencias

- [1] Directiva Marco Europea del Agua 2000. DIRECTIVA 2000/60/C DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 23 de Octubre de 2000. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 22.12.200, L327/1-72.
- [2] Vives, F. (dir.) 1992. *Las medusas de las Islas Baleares (Ecosistema y Escifomedusas de la Bahía de Alcudia)*. Informe final CSIC, IEO, UIB, GB, COPOT Dir. Gen. Medi Ambient, Palma de Mallorca. 280pp.
- [3] Puigserver, M. 2003. *Aspectes ecològics i taxonòmics del fitoplàncton a zones costaneres de la Mediterrània*, Tesis Doctoral Univ. Illes Balears. 235pp.
- [4] Forteza, V., G. Quetglas, M. Delgado, M.I. Reyero, C. Fraga, J.M. Franco, E. Cacho. 1998. Toxic *Alexandrium minutum* bloom in Palma de Mallorca harbour (Balearic Islands, Western Mediterranean). En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt (eds.) *Harmful Algae* Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 160-162.
- [5] Puigserver, M., G. Moyà, J.M. Valencia. 2001. Seguiment del fitoplàncton tòxic a zones de recollida de marisc de les Balears durant els anys 1999 y 2000. En: G.X. Pons (Ed.) *III Jornades del Medi Ambient de les Illes Balears. Ponències i resums*. SHNB. Palma de Mallorca. 183-184.
- [6] Basterretxea, G., E. Garcés, A. Jordi, M. Masó, J. Tintoré. 2005 Breeze conditions as a favoring mechanism of *Alexandrium taylori* blooms at a Mediterranean beach. *Est. Coast. Shelf Sci.* 62:1-12.
- [7] Throndsen, J. 1978. Preservation and storage. En: A. Sournia (ed.) *Phytoplankton manual*, Monographs on Oceanographic Methodology nº 6. UNESCO, Paris. 69-74.
- [8] Margalef, R. 1974. Counting. En: R.A. Vollenweider (ed.) *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 7-14.
- [9] Estrada, M., F. Vives, M. Alcaraz. 1989. Vida y producción en el mar abierto. En: R. Margalef (Ed.) *El Mediterráneo Occidental*. Omega. Barcelona. 150-199.
- [10] Zaghloul, F.A., Y. Halim. 1992. Long-term eutrophication in a semi-closed bay: the Eastern Harbour of Alexandria. En: R.A. Vollenweider, R. Marchetti y R. Viavini (Eds.) *Marine coastal eutrophication*. Elsevier. Amsterdam. 727-735.
- [11] Granata, T.C., M. Estrada, U. Zika, C. Mery. 2004. Evidence for enhanced primary production resulting from relative vorticity induced upwelling in the Catalan Current. *Sci. Mar.* 68(Suppl.1):113-119.

- [12] Green, J.C., B.S.C. Leadbeater (Eds.) 1994 *The haptophyte algae*. The Systematics Association Special Volume nº 51. Clarendon Press. Oxford. 446pp.
- [13] Puigserver, M., G. Moyà, G. Ramon. 1999. Proliferació de l'espècie tòxica *Alexandrium minutum* Halim en el Port de Palma (Mallorca, març 1999), relació amb les característiques del medi. *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears*. 42:47-53.

***Gymnodinium chlorophorum* causante de proliferaciones de altas biomásas en aguas recreativas de las Islas Baleares (veranos 2004-2006)**

Hassina Illoul^{1,2}, Mercedes Masó², Albert Reñé², Silvia Anglès²

(1) Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral
(ISMAL, Argel, Argelia).

(2) Institut de Ciències del Mar (CMIMA, CSIC, Barcelona, España).

Resumen

Diversas playas del archipiélago Balear sufren discoloraciones asociadas a las proliferaciones del dinoflagelado *Alexandrium taylori*. El fenómeno es recurrente y conocido por la población y administración locales. Los resultados del presente trabajo muestran por primera vez la presencia, en la cuenca Calatano-Balear, de *Gymnodinium chlorophorum*, un dinoflagelado gymnodial productor de proliferaciones de altas biomásas y discoloraciones desde el año 82 en las costa francesas del Atlántico. La concentración máxima ($12 \cdot 10^6$ células L⁻¹) fue registrada en Eivissa, el verano de su primera detección (2004). Durante los veranos 2005 y 2006, el fenómeno parece recurrente, ampliándose a varias playas. La especie puede provocar proliferaciones monoespecíficas y mantenerse durante un mes con concentraciones superiores a 10^5 células L⁻¹.

Introducción

El incremento de las proliferaciones algales nocivas (PAN) a escala mundial, y en concreto en el Mediterráneo, como consecuencia de las actividades humanas en la zona litoral es cada vez más evidente. El grupo de microalgas que causa más problemas son los dinoflagelados, que dan lugar a proliferaciones recurrentes, persistentes, con fuertes repercusiones sociales, económicas y sanitarias que, además, parecen hallarse en proceso de expansión. Esta posible expansión está estrechamente relacionada a la explotación del medio litoral [1]. Las proliferaciones algales han pasado de ser un fenómeno ocasional (en muchos casos impredecible) a ser fenómenos recurrentes.

Desde los años 80, en diversas playas del litoral Mediterráneo, durante los meses de verano, se producen discoloraciones recurrentes asociadas a las proliferaciones del dinoflagelado *Alexandrium taylori* [2,3]. En el litoral Balear también es conocido el fenómeno desde hace décadas y recientemente se han descrito los mecanismos de acoplamiento fisco-biológicos que permiten a esta especie producir proliferaciones de mas de un mes de duración en las playas Mediterráneas [4]. La proliferación puede ser casi monoespecífica en determinados veranos y playas, pero en muchas ocasiones *A. taylori* evoluciona paralelamente a una especie gymnodinial [5], esta especie está actualmente en fase de identificación (N. Sampedro,

comunicación personal). Los resultados del muestreo de aguas recreativas en relación a proliferaciones algales nocivas realizado en el marco del convenio de colaboración con la Conselleria del Govern Balear, han puesto de manifiesto que diversas especies de gymnodiales aparecen con frecuencia en concentraciones relativamente altas y pueden ser las causantes de discoloraciones. Entre ellas se ha identificado *Gymnodinium chlorophorum*. Esta especie es la primera vez que se identifica esta especie en el Mediterráneo Noroccidental. Ha sido asociada a la formación de proliferaciones de alta biomasa que producen discoloraciones de color verde y problemas asociados en la bahía de Vilaine (costas francesas, Atlántico) [6] (<http://www.ifremer.fr>), donde se ha detectado desde 1982. También ha provocado problemas en Noruega [7]. En el Mediterráneo, hasta hace muy poco sólo había sido descrita en el Adriático, donde provocó una discoloración en el verano de 1984 [8]. Recientemente (verano 2003) se ha descrito una proliferación de $2 \cdot 10^6$ células L^{-1} en las costas de Argel (Illoul *et al.*, en preparación).

Métodos

Con el objetivo de caracterizar y determinar el número de playas afectadas por proliferaciones algales nocivas y las especies causantes se realizó un muestreo extensivo (60-80 playas) en aguas recreativas en Mallorca, Menorca y Eivissa durante los veranos 2004, 2005 y 2006 (Fig. 1). El muestreo extensivo fue realizado desde tierra o desde una embarcación neumática, en un intervalo de entre 3 y 4 días. Se intenta siempre muestrear la peor situación posible, es decir la más favorable al crecimiento de dinoflagelados, por lo tanto el muestreo se realizó después de días de tiempo estable y en la zona más confinada de la playa, ya que el objetivo principal es la detección de especies de microalgas nocivas. Debido a que muchas de las microalgas (dinoflagelados) realizan migraciones verticales asociadas a la radiación solar y por tanto presentan las mayores concentraciones celulares durante las horas de máxima insolación en superficie, la toma de muestras se realiza entre las 11:30 y las 17:00 horas. De esta forma se obtiene una imagen casi sinóptica de la distribución de especies potencialmente nocivas en la época más favorable para su ocurrencia.

En el verano del 2005 ocurrió un evento de mortandad de juveniles de peces en la playa Racó d'en Pellicer, situada en el municipio de Calvia en Mallorca. Esta playa no se muestreaba en el muestreo extensivo. Se recogieron muestras a posteriori que mostraron una proliferación de una gymnodinial que se identificó como *Gymnodinium chlorophorum*. En el verano del 2006, se estableció una serie temporal en esta playa con el objetivo de seguir la comunidad de microalgas (muestreo cada 15 días durante los meses de verano).

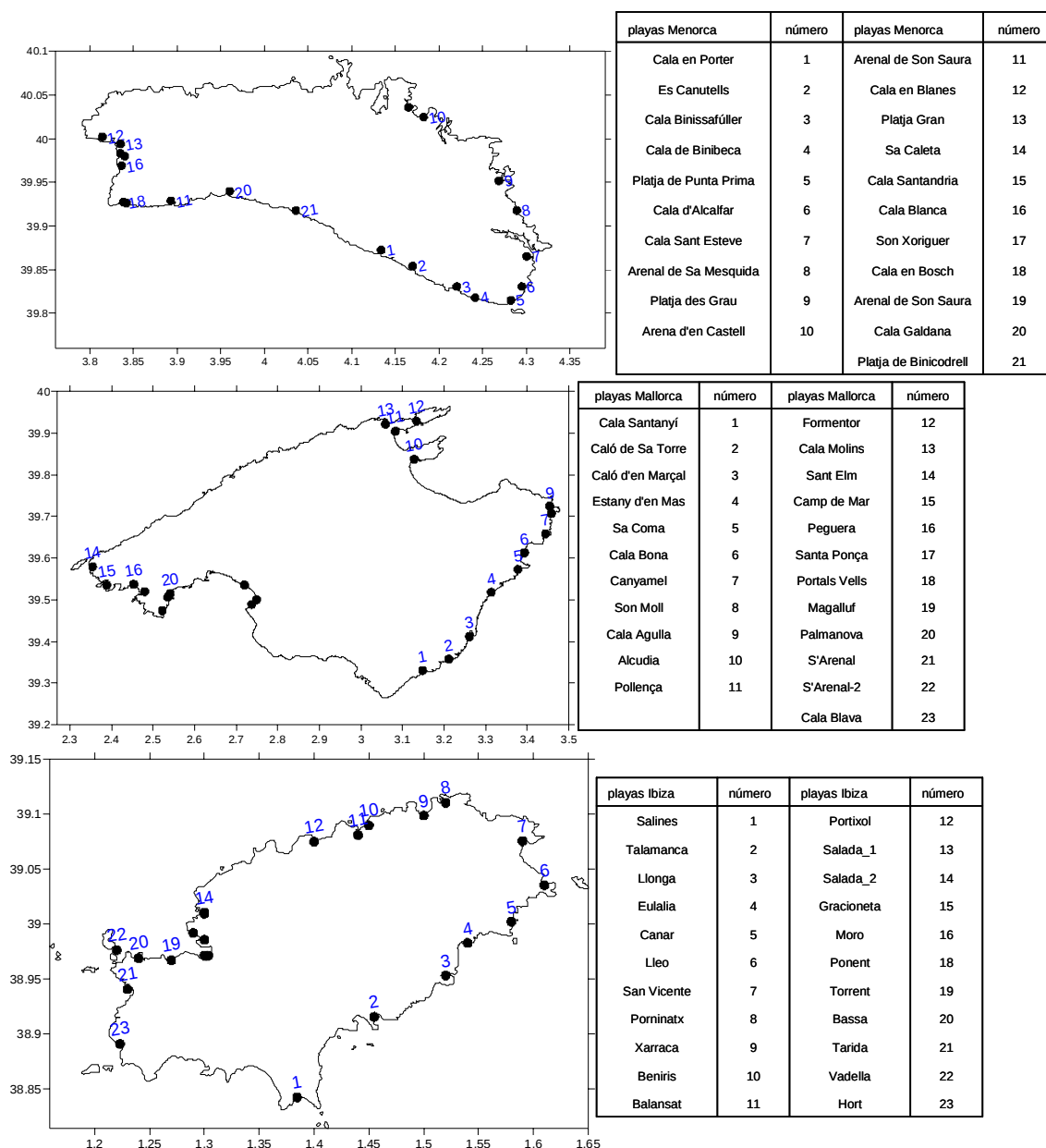


Figura 1. Puntos del muestreo extensivo en las playas de Menorca, Mallorca y Eivissa.

La metodología del muestreo extensivo y la serie temporal es la misma. Se recogen muestras de agua superficial (150 mL) que se fijan inmediatamente con Lugol. En el laboratorio, se sedimenta un alícuota de 50 mL durante 24 horas en cámaras combinadas. El recuento del fitoplancton se realizó mediante la técnica Utermöhl utilizando un microscopio invertido Nikon diaphot 200 en campo claro. La preparación del material para la microscopia electrónica de barrido se realizó mediante fijación de la muestra en glutaraldehído, deshidratación en serie alcohólica, punto crítico, metalización con oro-paladio. Las muestras se analizaron mediante un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3500N VPSem.

Resultados y discusión

Las células de *Gymnodinium chlorophorum* (10-20 m) presentan en la parte apical un acrobase en forma de herradura (Fig. 2b). Se nota también la presencia de mucocistos (Fig. 2c). En la zona del cíngulo, las vesículas del amphiesma presentan una forma pentagonal (Fig. 2d). Las características morfológicas de *G. chlorophorum* observadas en el presente trabajo coinciden con las descripciones de Honsell y Talarico [8] y Hansen y Moestrup [9]. Un reciente trabajo [10] transfiere *Gymnodinium chlorophorum* al género *Lepidodinium* basándose en análisis de genética y pigmentos. Sin embargo, los mismos autores dicen que es una situación aún no resuelta, por este motivo mantenemos en este trabajo el nombre *Gymnodinium chlorophorum*.

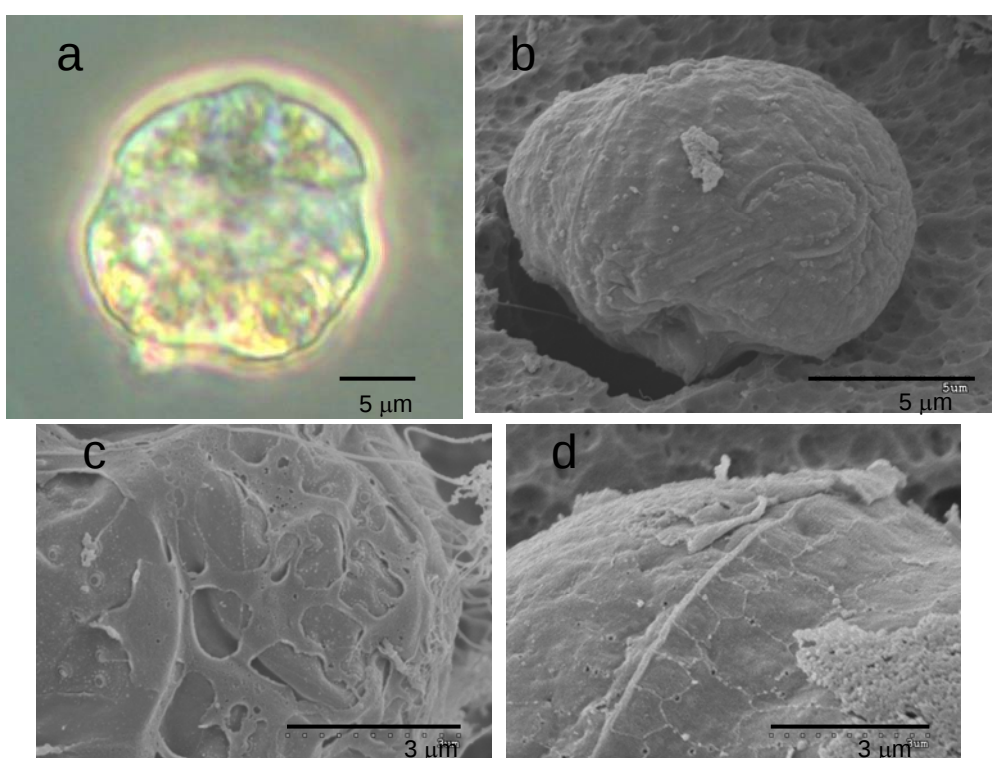


Figura 2. *Gymnodinium chlorophorum*, microscopia óptica (a), microscopia electrónica de barrido (b, c, d).

En la Tabla 1 se presentan las concentraciones de *Gymnodinium chlorophorum* en Eivissa, Mallorca y Menorca. En cala Gracioneta (Eivissa) en el verano del 2004 se produjo la primera proliferación de *G. chlorophorum* detectada con la concentración más alta ($12 \cdot 10^6$ células L^{-1}). En el verano del 2006 se detecta de nuevo una proliferación de esta especie en la isla, en este caso en cala Torrent. En Mallorca la distribución de la especie está bastante restringida igual que en el caso de Eivissa, sin embargo en cala Santanyi se repite una proliferación de esta especie en el verano del 2004 y el del 2006, lo que parece indicar, a pesar de que la serie temporal es muy corta, que el fenómeno es recurrente. En Sta. Ponça también se han

detectado concentraciones altas de esta especie en el verano del 2005, además de *G.chlorophorum* también hay concentraciones relativamente altas de *A.taylori* y *Gymnodinium sp1* lo que indica una comunidad mezclada de dinoflagelados, que puede ser la causante de discoloraciones. En Menorca se ha dado una incidencia mayor de esta especie que en las otras islas, especialmente en el verano del 2006 donde se detectó una distribución amplia con un 59 % de las playas muestreadas.

playas MENORCA	2004	2005	2006	máximo
Cala d'Alcalfar	0	658.596	2.541.651	2.541.651
Platja de Punta Prima	160	800	0	800
Cala Binissafüller	0	0	18.684	18.684
Es Canutells	0	2.719.320	1.789.995	2.719.320
Cala en Porter	331.200	43.200	39.444	331.200
Platja de Binicodrell	0	0	1.480	1.480
Cala en Blanes	415.667	38.220	1.160	415.667
Arenal de Son Saura	0	0	680	680
Cala en Bosch	0	0	200	200
Son Xoriguer	0	0	480	480
Cala Blanca	0	38.400	47.748	47.748
Cala Santandria	0	0	40	40
Sa Caleta	0	0	2.422	2.422
Arenal de Son Saura	0	0	520	520
Cala Morell	0	0	400	400
Binimel·la	0	0	160	160
Fornells-Es Pla	0	0	0	0
Cala Tirant	0	0	560	560
playas MALLORCA	2004	2005	2006	máximo
Cala Santanyí	125.600	0	213.160	213.160
Cala Agulla	0	0	3.560	3.560
Santa Ponça	0	855.257	0	855.257
Portals Vells	0	160	0	160
Palmanova	0	240	0	240
Portocolom I	0	0	80	80
Cala Mondragó	0	1.820	0	1.820
playas EIVISSA	2004	2005	2006	máximo
Gracioneta	12.499.998	0	0	12.499.998
Salada_2	0	12.800	0	12.800
Torrent	0	72.000	1.886.524	1.886.524
Salines	0	0	160	160
Talamanca	0	0	1.600	1.600
Lleo	0	0	120	120

Tabla 1. Concentraciones (células L⁻¹) de *G. chlorophorum* en las playas de Menorca, Mallorca y Eivissa durante los veranos 2004, 2005 y 2006.

La serie temporal realizada en la playa Racó d'en Pellicer mostró proliferaciones casi monoespecíficas de *G. chlorophorum* (entre 40 y 80% del total de dinoflagelados) (Fig. 3). Esto indica que esta especie es además, de *A. taylori*, capaz de producir y mantener una proliferación durante más de un mes en playas Mediterráneas.

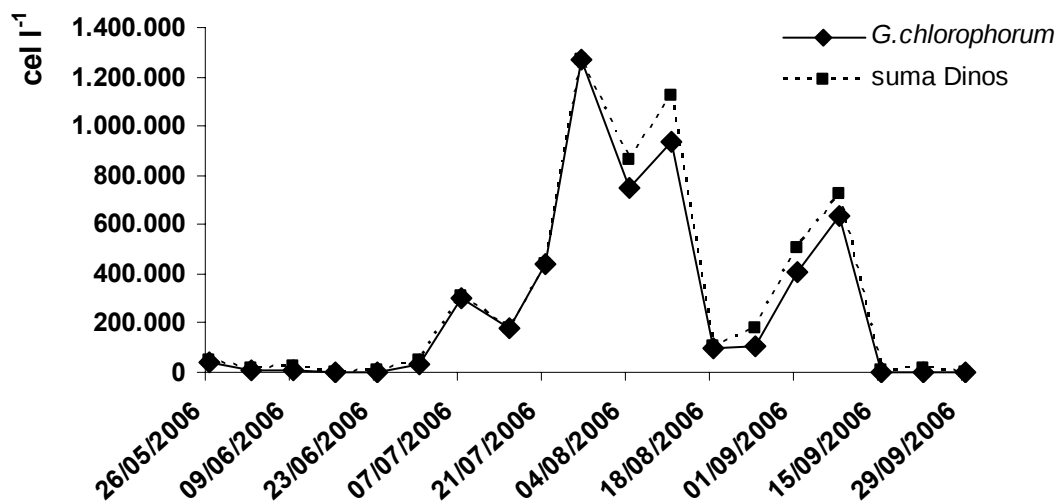


Figura 3: Serie temporal en la playa Racó d'en Pellicer (verano 2006).

Conclusiones

Se ha identificado y detectado una proliferación de *Gymnodinium chlorophorum* en el Mediterráneo Noroccidental, concretamente en aguas recreativas de las islas Baleares. Se han detectado concentraciones superiores a 10^5 células L^{-1} en los tres veranos muestreados en diversas playas del litoral Balear. En algunas ocasiones aparece junto a las otras dos especies descritas en el área como formadoras de proliferaciones de altas biomásas, *A. taylori* y *Gymnodinium sp.1* [12]. La distribución de esta especie parece más restringida en relación a las otras dos especies, sin embargo se ha detectado en las tres islas y, aunque la serie es corta, parece que las proliferaciones de esta especie están aumentando. Los resultados de la serie temporal realizada en Racó d'en Pellicer muestran que esta especie es también capaz de producir y mantener proliferaciones de altas biomásas durante 1 mes.

La incidencia de proliferaciones de altas biomásas asociada a gymnodiniales esta aumentando en el Mediterráneo. Los resultados del muestreo extensivo durante tres veranos consecutivos en aguas recreativas del litoral Balear indican una amplia distribución de este grupo que engloba varias especies, además de las dos especies mencionadas, se han detectado al menos 6 especies más. Son necesarios estudios dedicados a este grupo y su potencial nocividad. La especie identificada en este trabajo, *Gymnodinium chlorophorum* no es una especie tóxica pero ha producido anoxias en situación de proliferación (<http://www.ifremer.fr>).

Agradecimientos

Al Convenio para la evaluación y monitorización de la calidad de aguas costeras de las Islas Baleares (2004-2006) por la concesión de una beca predoctoral a Hassina Illoul. Agradecimiento a J-M Fortuño (microscopia electrónica CMIMA, Barcelona).

Referencias

- [1] Masó, M., E. Garcés. 2006. Harmful Algal Blooms: problematics and conditions that induce them. *Marine pollution Bulletin*. 53:620-630.
- [2] Garcés, E., M. Masó, J. Camp. 1999. A recurrent and localized dinoflagellate bloom in a Mediterranean beach. *Journal of Plankton Research*. 21:2373-2391.
- [3] Giacobbe, M.G., A. Penna, E. Gangemi, M. Maso, E. Garces, S. Fraga, I. Bravo, F. Azzaro, N. Penna. 2007. Recurrent high-biomass blooms of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae), a HAB species expanding in the Mediterranean. *Hydrobiologia*. 580:125-133.
- [4] Basterretxea, G., E. Garcés, A. Jordi, M. Masó, J. Tintoré. 2004. Breeze conditions as a favoring mechanism of *Alexandrium taylori* blooms at a Mediterranean beach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 62:1-12.
- [5] Garcés, E., M. Vila, M. Masó, N. Sampedro, M.G. Giacobbe, A. Penna. 2005. Taxon-specific analysis of growth and mortality rates on harmful dinoflagellate during bloom conditions estimated by the dilution technique. *Mar Ecol Prog Ser*. 301:67-68.
- [6] Sournia, A., C. Belin, C. Billard, M. Catherine, E. Erard-Le Denn, J. Fresnel, P. Lassus, A. Pastoureaud, R. Soulard. 1992. The repetitive and expanding occurrence of a green, bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coasts of France. *Cryptogamie, Algol*. 13:1-13.
- [7] Jong, F. de, G. C. Cadée, K.-J. Hesse, J. Van Beusekom. 1999. Phytoplankton. Wadden Sea quality status report. 9:124-127.
- [8] Honsell, G., L. Talarico. 2004. *Gymnodinium chlorophorum* (Dinophyceae) in the Adriatic Sea: electron microscopical observations. *Botanica Marina*. 47:152-166.
- [9] Hansen, G., Ø. Moestrup. 2005. Flagellar apparatus and nuclear chambers of the green dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. *Phycol. Res*. 53:169-81.
- [10] Hansen, G., L. Botes, M. de Salas. 2007. Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycological Research*. 55:25-41.

Fitoplancton potencialmente tóxico en la costa Sur de Murcia (SO Mar Mediterráneo)

Nieves Bouza y Marina Aboal

*Laboratorio de Algología. Departamento de Botánica. Facultad de Biología.
Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. E-30100- Murcia. España.*

Resumen

Dentro del marco de un estudio de caracterización de las comunidades fitoplanctónicas del tramo del litoral murciano comprendido entre Calnegre y Mazarrón, se hizo un seguimiento más detallado de las especies algales potencialmente nocivas y tóxicas. Se realizaron muestreos a tres profundidades con periodicidad mensual en una estación y estacional en tres localidades situadas a 2,5 Km de costa. Se identificaron un total de 28 especies potencialmente tóxicas o nocivas entre dinoflagelados (*Dinophyceae*), diatomeas (*Bacillariophyceae*), haptoficeas (*Haptophyceae*) y silicoflagelados (*Dictyochophyceae*). Las densidades celulares de los diferentes grupos taxonómicos nunca fueron muy elevadas y alcanzaron sus valores máximos en primavera y verano. Las especies del género *Pseudonitzschia* alcanzaron un desarrollo importante (73 cel mL^{-1}) en verano. Se citan por primera vez para el litoral murciano *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum*.

Introducción

Estudios recientes parecen presagiar que las proliferaciones de algas nocivas (PAN), a corto plazo, se producirán cada vez con mayor frecuencia y comprometerán cada vez mayores áreas costeras del planeta [1,2]. Dentro de este marco el Mar Mediterráneo puede ser uno de los principales afectados debido al cuestionable desarrollo sostenible ambiental de sus costas y al escaso rango de marea que presenta [3,4].

El litoral de Murcia se caracteriza por la gran riqueza, variedad y singularidad de su flora y fauna marinas, así como por la fragilidad de los diferentes ecosistemas que lo forman. Esto último está agravado por la fuerte presión que soporta como consecuencia de los muchos y diversos intereses que confluyen sobre él: crecimiento turístico desmedido, desarrollo industrial desordenado, sobreexplotación de recursos, vertidos incontrolados y el desarrollo de nuevas actividades económicas en el litoral, como son los polígonos acuícolas y las plantas desaladoras.

Las PAN pueden producir impactos económicos negativos muy importantes en los cultivos marinos (moluscos y peces) y por extensión en la salud humana y en otras actividades económicas vinculadas al medio marino y de gran relevancia en el litoral murciano en los últimos años, como son el turismo y la desalación de agua de mar. En relación al turismo, decir que determinadas toxinas (brevetoxinas) pueden presentar múltiples rutas de entrada en el hombre: oral –a través de la comida y bebida de productos del

mar infectados, inhalación- a través de los aerosoles que forman - y dérmica- a través del contacto con el agua, por lo que pueden llegar a afectar a los bañistas y a los residentes de las zonas de playa afectadas. En relación a la desalinización resaltar que el agua de mar utilizada por las plantas desalinizadoras para generar agua potable puede presentar toxinas si éstas han sido liberadas al medio por las microalgas. De este modo entran en la cadena alimentaría pudiendo ocasionar serios problemas en el hombre si no se toman las precauciones oportunas.

En el año 2006 se detectó la primera proliferación de algas tóxicas en el litoral de Murcia afectando a los bañistas de varias playas del término municipal de Águilas [5]. Esto pone en evidencia la vulnerabilidad del ecosistema del litoral murciano a este tipo de eventos y plantea la importancia y la necesidad de una ampliación del plan de monitoreo y control del fitoplancton ya existente, que incluya las zonas de playas y las zonas de plantas de desalación, además de los puertos, instalaciones acuícolas y el Mar Menor de la Comunidad Autónoma de Murcia [6].

En el Mar Mediterráneo occidental existen diversos estudios sobre proliferaciones de algas tóxicas y nocivas en la costa catalana y valenciana [3,7, 8,9,10], en la costa andaluza [11,12] y en la costa italiana y africana [13,14 y referencias incluidas] a consecuencia del elevado grado de recurrencia que han tenido en los últimos años las proliferaciones de estos organismos.

No se conocen datos previos de fitoplancton para el litoral de la Región de Murcia a excepción del trabajo de Ros y Miracle [15], centrado en el estudio de la variación estacional del fitoplancton en el Mar Menor y su relación con un punto próximo en el Mar Mediterráneo.

El objetivo de este trabajo ha sido conocer la diversidad del fitoplancton tóxico en el litoral de Murcia y utilizarla como indicador de la calidad ambiental en la instalación de una plataforma de desalación.

Material y métodos

Área de estudio. El área de estudio está comprendida entre Mazarrón y Calnegre situada en la Región de Murcia y en la cuenca occidental del Mar Mediterráneo. Esta zona presenta un clima cálido, seco, propio del SE peninsular. La zona de estudio recibe aportes de numerosas ramblas (Ramonete, Villalba y Moreras), de gran entidad en lo que se refiere al sistema de drenaje al que están asociadas y la influencia en el medio marino receptor, aunque en los últimos años su aportación esta siendo menor como resultado de la escasez de recursos hídricos en la zona. El oleaje en la zona presenta direcciones SO, SE, E y en menor grado S. El área también está afectada por corrientes costeras superficiales, corrientes de deriva y en menor medida por la corriente general del Mediterráneo, todas de baja intensidad. Como consecuencia las características ecológicas del litoral de Murcia están fuertemente delimitadas por su situación geográfica, sus características fisiográficas, geológicas y climáticas, quedando enmarcadas

dentro de la provincia biogeográfica atlanto-mediterránea [16] (Fig. 1).

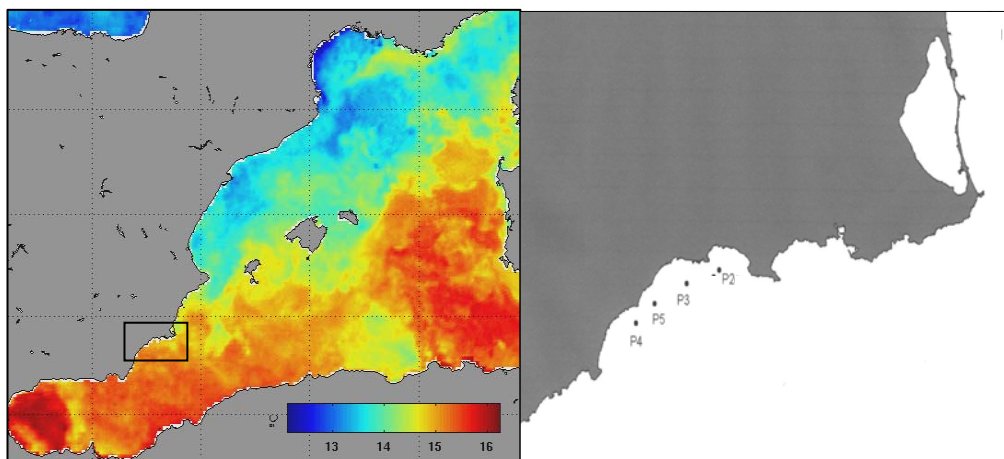


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo. P2: Mazarrón 2, P3: Mazarrón 1, P4: Percheles, P5: Calnegre. Imagen de satélite tomada por el IMEDEA-CSIC-UIB.

Muestreo de campo. Se realizaron dos tipos de muestreos: intensivos y extensivos. El muestreo intensivo se realizó mensualmente en la estación P2 (Mazarrón 2) y el muestreo extensivo se llevo a cabo estacionalmente en los puntos P2, P3 (Mazarrón 1), P4 (Calnegre) y P5 (Percheles) (Tabla 1).

Estación	Localización	Latitud (°N)	Longitud (°E)	Distancia (Km)	Batimetría (m)
P2	Mazarrón 2	37°32'55''	4°46'7''	2,3	54
P3	Mazarrón 1	37°32'0.3''	4°42'4''	3,1	58
P4	Calnegre	37°29'15''	4°35'49''	2,3	61
P5	Percheles	37°30'37''	4°38'6''	2,8	61

Tabla 1. Tabla de muestreo, se indican las estaciones del muestreo intensivo y extensivo, las coordenadas geográficas, la distancia a costa (Km) y la profundidad máxima (m).

Para los análisis cualitativos y cuantitativos de la comunidad fitoplanctónica potencialmente tóxica o nociva se tomaron muestras a tres profundidades (5, 25, 40 m) con una botella oceanográfica tipo Niskin (KC Denmark) de 5 L. Las submuestras de 1 L fueron mantenidas a 4 °C en oscuridad hasta su llegada al laboratorio donde fueron procesadas de forma adecuada para su análisis.

Análisis de muestras. Para el análisis cualitativo del fitoplancton fue necesario concentrar las muestras de agua de mar mediante filtración con bomba de vacío utilizando filtros de microfibra de vidrio (Ref: FV.-V. Albet) o de membrana de polycarbonato (Ref: DTTP04700. Nucleopore). Después de la filtración, las muestras de agua se fijaron con formaldehído y glutaraldehído dependiendo del estudio de microscopía óptica o electrónica a realizar.

La identificación taxonómica se realizó con un microscopio óptico (OLYMPUS BH) equipado con contraste de fases, un microscopio óptico con epifluorescencia (OLYMPUS BX50) y un microscopio electrónico de barrido (JEOL2100). En la determinación taxonómica y preparación de muestras se utilizaron diversos trabajos [2,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29].

Para el análisis cuantitativo se fijaron 500 mL de muestra con lugol para su posterior análisis con el método de Utermöhl [30] en un microscopio invertido (NIKON DIAPHOT).

Para poder verificar las observaciones propias y poder contrastarlas con las de otros grupos, se han elaborado diferentes colecciones de referencia incluidas en el Herbario de la Universidad de Murcia (Herbario-MUB).

Resultados y discusión

Se han identificado 28 especies de algas potencialmente nocivas y tóxicas en el área de estudio. El mayor número de especies pertenece a la división *Dinophyceae* (15), seguida de *Bacillariophyceae* con 11 especies y *Haptophyceae* y *Dictyochophyceae* con 1 especie (Fig. 2). La Tabla 2 muestra las especies identificadas durante el año 2006 clasificadas de acuerdo a los problemas ambientales y de salud que ocasionan. Para las especies más abundantes, se indica la concentración máxima alcanzada en la estación, la profundidad y el día de muestreo. La Plancha 1 muestra fotografías de microscopía electrónica de barrido de algunas especies potencialmente tóxicas o nocivas.

Las especies tóxicas que presentaron densidades celulares más elevadas fueron *Pseudonitzschia* spp. y *Gymnodinium* spp. *Pseudonitzschia* spp. estuvo presente en los recuentos durante la mayor parte del año, concretamente desde Marzo hasta Septiembre alcanzando el valor máximo de 73 cel mL⁻¹ en Julio en la estación P2 a 40 m. *Gymnodinium* spp. estuvo presente entre Julio y Octubre y alcanzó el valor máximo de 22 cel mL⁻¹ en Septiembre en la estación P2 a 40 m de profundidad. En el recuento de *Gymnodinium* spp. se incluyen las especies *Gymnodinium catenatum* y *G. impudicum*. Estas dos especies son primeras citas para el litoral murciano teniendo en cuenta los trabajos de Ros y Miracle [15] y Gómez [31].

Las especies nocivas que alcanzaron los valores más altos fueron *Leptocylindrus* spp. y *Skeletonema pseudocostatum*. Dentro del género *Leptocylindrus* se identificaron tres especies: *L. danicus*, *L. minimus* y *L. mediterraneus*. *Leptocylindrus* spp. estuvo presente desde Marzo hasta Septiembre y su densidad máxima (36 cel mL^{-1}) fue en Abril en la estación P2 a 25 m de profundidad. La especie *Skeletonema pseudocostatum* estuvo presente el mes de Marzo y desde Mayo a Julio y alcanzó el valor máximo de 60 cel mL^{-1} en Julio en la estación P4 a 40 m en profundidad.

Las densidades máximas observadas de las especies algales potencialmente nocivas y tóxicas descritas en ningún caso estuvieron asociadas a eventos de toxicidad en el área de estudio y son inferiores a las descritas para episodios tóxicos y nocivos [3,8,13]. Sin embargo, teniendo en cuenta que las muestras se tomaron en una zona bastante alejada de la línea de costa, 2,5 Km, y dado el gran número de especies potencialmente tóxicas o nocivas reconocidas, se recomienda mantener y ampliar el programa de monitoreo y control periódico de fitoplancton tóxico y nocivo a las zonas de playas e instalaciones de desalación de la Región.

Los valores máximos de densidad encontrados en profundidad están relacionados con la existencia de una capa subsuperficial de clorofila, entre 30 y 50 m, desde Mayo a Septiembre durante el periodo de estudio. La formación de esta capa de clorofila en profundidad es muy característica del Mar Mediterráneo, dado su carácter oligotrófico, y puede estar asociado a un incremento de biomasa fitoplanctónica o a un incremento en el contenido de clorofila por célula, debido a la aclimatación de las células fitoplanctónicas a la baja irradiación, a una mayor disponibilidad de nutrientes y a la baja turbulencia encontrada en profundidad [32,33].

El pasado año en Águilas, al sur en la Región de Murcia, se detectaron los primeros casos de afecciones respiratorias probablemente asociados a proliferaciones algales tóxicas o nocivas, lo que supone una llamada de atención para tratar de prevenir riesgos similares en el futuro [5]. La creciente presión sobre el cinturón costero ocasionado por el desarrollo urbanístico, puertos deportivos, plantas de desalación unida al aumento de temperatura (cambio climático), al efecto del viento y de las precipitaciones, puede desencadenar problemas graves de toxicidad. Hay que tener en cuenta que las microalgas pueden liberar al medio las toxinas y éstas pueden estar presentes en el agua captada para la desalación, ocasionando serios problemas en el producto final. Los cambios en el medio pueden producirse de manera rápida y sólo un control amplio e intensivo del mismo puede facilitar las medidas correctoras pertinentes. Por lo que se recomienda, hacer monitoreo periódico del fitoplancton y realizar análisis de las toxinas del agua, en el momento en que se detecten concentraciones elevadas de las especies de fitoplancton tóxicas.

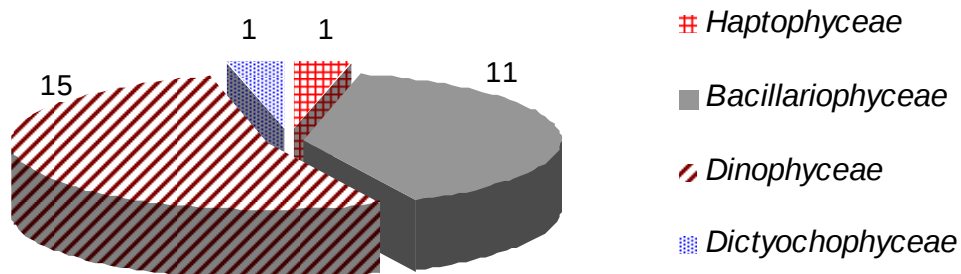
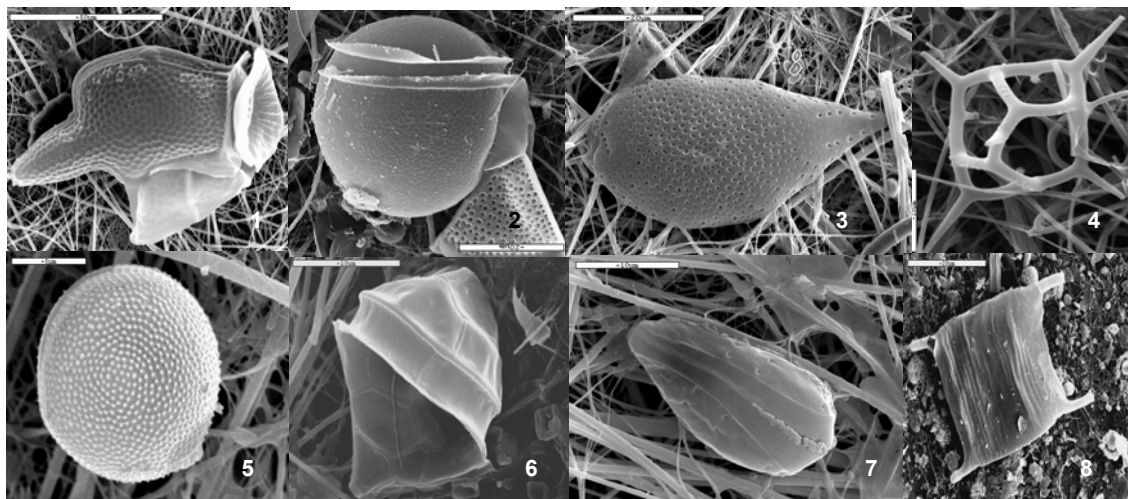


Figura 2. Biodiversidad de especies tóxicas y nocivas.



Plancha 1. Fotografías de microscopía electrónica de barrido. 1. *Dinophysis caudata*, 2. *Dinophysis rotundata*, 3. *Prorocentrum micans*, 4. *Dictyocha fibula*, 5. *Prorocentrum balticum*, 6. *Scrippsiella* cf. *trochoidea*, 7. *Prorocentrum triestinum*, 8. *Eucampia zodiacus*.

ESPECIE	GRUPO TAXONÓMICO	Conc. máxima (cel/mL)	Estación de muestreo	Prof. de muestreo (m)	Fecha de muestreo
Especies potencialmente tóxicas para el hombre					
Toxina paralítica del marisco (PSP)					
<i>Gymnodinium catenatum</i> Graham	<i>Dinophyceae</i>	**	P2	40	06.09.06
Toxina diarreica del marisco (DSP)					
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Dinophysis rotundata</i> Claparède et Lachmann	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
Toxina amnésica del marisco (ASP)					
<i>Pseudonitzschia</i> spp.	<i>Bacillariophyceae</i>	73	P2	40	18.07.06
Palitoxinas (PLTX) del pescado					
<i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> Fukuyo	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
Especies potencialmente letales para peces					
<i>Ceratium fusus</i> (Ehrenberg) Dujardin	<i>Dinophyceae</i>	0,2	P3	40	18.07.06
<i>Ceratium furca</i> (Ehrenberg) Claparède & Lachmann	<i>Dinophyceae</i>	*			
<i>Noctiluca scintillans</i> (Macartney) Kofoed & Swezy	<i>Dinophyceae</i>	0,1	P4	40	06.07.06
<i>Dictyocha fibula</i> Ehrenberg	<i>Dictyochophyceae</i>	0,1	P2	25	08.03.06
<i>Prorocentrum balticum</i> (Lohmann) Loeblich	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
Otras especies formadoras de blooms (mucílago, coloraciones)					
<i>Amphora</i> cf. <i>coffeaformis</i> (Agardh) Kützing	<i>Bacillariophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Ceratulina</i> cf. <i>pelagica</i> (Cleve) Hendey	<i>Bacillariophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Chaetoceros convolutus</i> Castracane	<i>Bacillariophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Chaetoceros socialis</i> Lauder	<i>Bacillariophyceae</i>	8	P4	25	01.03.06
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann et Lewin	<i>Bacillariophyceae</i>	0,2	P4	40	06.07.06
<i>Eucampia zodiacus</i> Syvertsen	<i>Bacillariophyceae</i>	0,1	P2	40	28.03.06
<i>Guinardia delicatula</i> (Cleve) Hasle	<i>Bacillariophyceae</i>	0,1	P2	40	21.06.06
<i>Gymnodinium impudicum</i> (Fraga & Bravo) Hansen & Moestrup	<i>Dinophyceae</i>	**	P2	40	06.09.06
<i>Gonyaulax polygramma</i> Stein	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Gonyaulax</i> cf. <i>spinifera</i> (Claparède & Lachmann) Diesing	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Heterocapsa</i> sp.	<i>Dinophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Leptocylindrus</i> spp.	<i>Bacillariophyceae</i>	36	P2	25	11.04.06
<i>Phaeocystis</i> sp.	<i>Prymnesiophyceae</i>	*	*	*	*
<i>Skeletonema pseudocostatum</i> (Medlin) Zingone et Sarno	<i>Bacillariophyceae</i>	60	P4	40	06.07.06
<i>Scrippsiella</i> cf. <i>trochoidea</i> (Stein) Loeblich	<i>Dinophyceae</i>	0,1	P2	40	21.06.06
<i>Thalassiosira mediterranea</i> (Schröder) Hasle	<i>Bacillariophyceae</i>	*	*	*	*

Tabla 2. Tabla de especies potencialmente tóxicas o nocivas en la zona de estudio.

*: especies presentes sólo en el análisis cualitativo. **: especies cuantificadas como *Gymnodinium* spp. Se indica la concentración máxima celular (cel/mL) para la estación, la profundidad y el día de muestreo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la empresa M. Torres a través del proyecto: Análisis del control físico-químico y biológico del proceso de desalación por ósmosis inversa y energía eólica en plataformas flotantes. Agradecemos a Santiago Fraga la ayuda prestada en la identificación de *Gymnodinium* spp.

Referencias

- [1] FAO. 2004. *Biotoxinas marinas*. Food and Nutrition Papers, 80 pp.
- [2] Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson, A. D. Cembella. 2003. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO Publishing. France. 793 pp.
- [3] Vila, M., M. Masó. 2005. Phytoplankton functional groups and harmful algal species in anthropogenically impacted waters of the NW Mediterranean Sea. *Scientia Marina*. 69:31-45.
- [4] Vila, M., G. Giacobbe, M. Masó, E. Gangemi, A. Penna, N. Sampedro, F. Azzaro, J. Camp, L. Galluzzi. 2005. A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean coastal areas. *Harmful Algae*. 4:673-695.
- [5] Gilabert J., E. Gómez, A. Hernández, M.J. Herrera, J. Tudela, M.J. García y C. Gutiérrez. 2008. Seguimiento y plan de vigilancia de fitoplancton tóxico en las costas de Águilas (Murcia) en verano de 2006. En: Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.:47-57.
- [6] Gilabert, J. 2003. Presentación de un programa de investigación y monitorización de HABs en la Comunidad Autónoma de Murcia. VIII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. La Laguna. Islas Canarias.
- [7] Garcés, E., M. Delgado, M. Masó, J. Camp. 1999. In situ growth rate and distribution of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium corsicum* Paulmier in an estuarine embayment (Alfacs Bay, NW Mediterranean Sea). *Journal of Plankton Research*. 21:1977-1991.
- [8] Vila, M., J. Camp, E. Garcés, M. Masó, M. Delgado. 2001a. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 23:497-514.
- [9] Vila, M., M. Delgado, J. Camp. 2001b. First detection of widespread toxic events caused by *Alexandrium catenella* in the Mediterranean Sea. En: Hallegraeff, G., S. Blackburn, C. Bolch, R. Lewis (Eds.) *Proceedings of the International Conference on Harmful Algal Blooms 2000*. 8-11. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Paris.
- [10] Gomis, C., J. Alcober, A. Bernabeu. 1996. Seguimiento de las poblaciones fitoplanctónicas en las bateas mejilloneras del Puerto de Valencia. 1991-1994. En: Matamoros, E., M. Delgado (Eds.) *IV Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*. St. Carles de la Ràpita (Tarragona). Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. 29-38.
- [11] Fernández, R., L. Mamán, D. Jaén, I. Márquez. 2004. Control y seguimiento del fitoplancton tóxico en las costas andaluzas durante los años 2001 y 2002. En: Norte, M., J.J. Fernández (Eds.). *VIII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*. La Laguna. Islas Canarias.
- [12] Jaén, D., L. Mamán, R. Fernández, I. Márquez. 2008. Evolución del fitoplancton tóxico en Andalucía en el periodo 2003-2006. En: Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.: 29-36.
- [13] HANA List (2007) HANA Taxonomic Reference List of Toxic Algae. HANA-IOC Network on Harmful Algae in North Africa. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

- [14] Zingone, A., R. Siano, D. D'Alelio, D. Sarno. 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae*. 5:321-337.
- [15] Ros, M., M. R. Miracle. 1984. Variación estacional del fitoplancton del Mar Menor y su relación con la de un punto próximo en el Mediterráneo. *Limnética*. 1:32-42.
- [16] Ballester, R. 1998. *El litoral sumergido de la Región de Murcia*. Cartografía bionómica y valores ambientales. Conserjería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia.
- [17] Balech, E. 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publicaciones Especiales del Instituto Español de Oceanografía*. N.1. Madrid, España. 219 pp.
- [18] Horner, R. A. 2002. *A taxonomic guide to some common marine phytoplankton*. Biopress Limited. England. 195 pp.
- [19] Delgado, M., J.M. Fortuño. 1991. Atlas de Fitoplancton del Mar Mediterráneo. *Scientia Marina*. 55(Supl. 1):1-133.
- [20] IOC List. 2002. IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- [21] Matsuoka, K., Y. Fukuyo. 2000. *Guía técnica para el estudio de quistes de dinoflagelados actuales*. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC.
- [22] Ojeda, A. 2005. *Dinoflagelados de Canarias: estudio taxonómico y ecológico*. Instituto de Estudios Canarios. 301 pp.
- [23] Sournia, A. 1986. *Atlas du phytoplankton marin. Vol I. Cyanophycees, Dictyochophycees, Dinophycees, Raphidophycees*. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 219 pp.
- [24] Ricard, M. 1987. *Atlas du phytoplankton marin. vol II. Diatomophycées*. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 297 pp.
- [25] Rines, J.E.B., P.E. Hargraves. 1988. The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) Flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A. *Bibliotheca Phycologica* 79, 196 pp.
- [26] Round, F. E., R. M. Crawford, D. G. Mann. 1990. *The diatoms. Biology and Morphology of genera*. Cambridge University Press. Cambridge. 747 pp.
- [27] Semina, H. J. 2003. SEM studied diatoms of different regions of the world oceans. En: *Iconographia Diatomologica Vol. 10*. A.R.G. Gantner Verlag K.G. Ruggell, Liechtenstein. 363 pp.
- [28] Tomas, C. R. 1997. *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press. San Diego. 858 pp.
- [29] Witkowski, A., H. Lange-Bertalot, D. Metzeltin. 2000. Diatom Flora of Marine Coasts I. En: *Iconographia Diatomologica Vol. 7*. A.R.G. Gantner Verlag K.G.. Ruggell, Liechtenstein. 925 pp.
- [30] Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9:1-38.
- [31] Gómez, F. 2003. Checklist of Mediterranean Free-living dinoflagellates. *Botánica Marina*. 46:215-242.
- [32] Estrada, M., C. Marrasé, M. Latasa, E. Berdalet, M. Delgado, T. Riera. 1993. Variability of deep chlorophyll maximum in the Northwestern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*. 92:289-300.
- [33] Ramírez, T., D. Cortés, J.M. Mercado, M. Vargas-Yañez, M. Sebastián, E. Liger. 2005. Seasonal dynamics of inorganic nutrients and phytoplankton biomass in the NW Alborán Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 65:654-670.

Fitoplancton potencialmente tóxico o nocivo en las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental)

Carolina Assadi ^{1,2}, Vicente Tasso ^{1,2} y Manuel García Carrascosa ¹

(1) Laboratorio de Biología Marina. Departamento de Zoología. Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot (Valencia)

(2) OceanSnell - Consultoría Ambiental Marina. CEEI-Valencia, Parque Tecnológico, Avda. Benjamín Franklin 12, 46980 Paterna (Valencia).

carolina.assadi@oceansnell.com

Resumen

Durante el periodo Enero 2005-Enero 2006 se llevó a cabo un estudio de la calidad de las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental) que incluyó un seguimiento de especies fitoplanctónicas. Como resultado de este estudio se detectaron un total de 16 especies potencialmente tóxicas o nocivas en las aguas intraportuarias, 4 diatomeas (*Pseudo-nitzschia* cf *calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. pungens* y *Skeletonema tropicum*) y 12 dinoflagelados (*Alexandrium* cf *tamarense*, *A. affine*, *A. minutum*, *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. rapa*, *D. rotundata*, *D. sacculus*, *Lingulodinium polyedrum* y *Protoceratium reticulatum*). Esta lista incluye especies causantes de proliferaciones nocivas, ASP, DSP, PSP y yesotoxinas, así como 4 especies consideradas no-indígenas del Mediterráneo (*Skeletonema tropicum*, *Alexandrium insuetum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Protoceratium reticulatum*).

Introducción

El seguimiento del fitoplancton potencialmente tóxico o nocivo de un gran puerto como es el caso del Puerto de Valencia, tiene especial interés puesto que se trata de un ecosistema modificado, caracterizado por un elevado tiempo de residencia de la masa de agua, bajo hidrodinamismo y elevados niveles de nutrientes. Asimismo, su conexión con puertos de todo el mundo a través del tráfico marítimo, constituye una importante vía de entrada de especies no-indígenas (NIS) o exóticas a través de las aguas de lastre de los buques.

Mediante este trabajo se pretende dar una visión general de las especies de fitoplancton potencialmente tóxico o nocivo presente en las aguas del Puerto de Valencia durante el periodo estudiado, indicando en cada caso los datos más relevantes.

Material y métodos

Durante el periodo Enero 2005-Enero 2006 se llevó a cabo un programa de seguimiento de la calidad de las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental) (Fig. 1A). Se obtuvieron datos mensuales de las distintas variables hidrológicas así como muestras de fitoplancton en 7 estaciones de muestreo (Fig. 1B).



Figura 1. A) Localización del Puerto de Valencia; B) Distribución de las estaciones de muestreo.

Las muestras cuantitativas de fitoplancton se obtuvieron mediante botella hidrográfica tipo Niskin y las muestras cualitativas mediante el filtrado con bomba de 150 L de agua con una red de 20 μm de luz de malla. Las muestras se fijaron inmediatamente con una solución al 20% de formaldehído tamponado con hexametilentetramina [1]. Los recuentos se realizaron con el microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 siguiendo la metodología de Andersen y Thronsdon (2003) [2], con la excepción de algunas especies raras que sólo se encontraron en las muestras concentradas. Para la identificación de las especies del género *Pseudo-nitzschia* se llevó a cabo una limpieza ácida de sus frústulos [3]. Para la identificación de determinadas especies se utilizó el microscopio electrónico de barrido Hitachi S4100.

Resultados

En la Tabla 1 se detallan las especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas o nocivas encontradas en las aguas del Puerto de Valencia incluyendo su máxima concentración celular y su estacionalidad. Esta tabla contiene especies cuya toxicidad ha sido probada, así como especies que han causado proliferaciones en el área de estudio.

Discusión

Diatomeas potencialmente tóxicas o nocivas. Se han encontrado tres especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de ácido domoico [4] en las aguas del Puerto de Valencia: *P. pungens*, *P. fraudulenta* y *P. cf calliantha*. Las abundancias máximas fueron similares y la estacionalidad variable de forma que durante todo el año se registraron especies del género en las muestras. Hay que destacar que las tres especies alcanzaron concentraciones mayores en el exterior del recinto portuario, alcanzando *P. pungens* 49.532 células L^{-1} . En el caso de *P. fraudulenta* y *P. cf calliantha* las abundancias fueron de 23.912 y 27.450 células L^{-1} , respectivamente.

Especies	Toxinas	Impactos	Máxima concentración celular (células/l)	Estacionalidad			
				Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Bacillariophyceae							
<i>Pseudo-nitzschia</i> cf <i>calliantha</i> Lundholm, Moestrup et Hasle	DA[4]	ASP	7.337 Oct-05				
<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>fraudulenta</i> (Cleve) Hasle	DA [4]	ASP	9.168 Mar-05				
<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>pungens</i> (Grunow ex Cleve) Hasle	DA [4]	ASP	8.906 Jul-05				
<i>Skeletonema</i> <i>tropicum</i> Cleve	-	Discoloración	3´59 x 10 ⁶ Oct-05				
Dinophyceae							
<i>Alexandrium</i> cf <i>tamarense</i> (Whedon & Kofoid) E. Balech		PSP [4]	244 May-05				
<i>Alexandrium</i> <i>affine</i> (H. Inoue & Y. Fukuyo) E. Balech	STX, NSTX [5]	PSP	44.632 Oct-05				
<i>A. minutum</i> Halim	GTX, NSTX [4] [6]	PSP, ictiotóxico	122 Ene-05				
<i>Dinophysis</i> <i>acuminata</i> Claparède et Lachmann	OA [4]	DSP	488 Abr-05				
<i>D. acuta</i> Ehrenberg	OA, DTX-1, DTX-2 [4]	DSP	244 Abr-05				
<i>D. caudata</i> Saville-Kent	OA, PTX-2 [4]	DSP	366 Sep-05				
<i>D. fortii</i> Pavillard	OA, DTX-1, PTX-2 [4]	DSP	122 Ago-05				
<i>D. rapa</i> (Stein) Balech	OA [4]	DSP	122 Sep-05				
<i>D. rotundata</i> Claparède et Lachmann	DTX-1 [4]	DSP	122 Jul-05				
<i>D. sacculus</i> Stein	OA [4]	DSP	122 Jun-05				
<i>Lingulodinium</i> <i>polyedrum</i> (Stein) Dodge	YTX [6]		1.098 Jul-05				
<i>Prorocentrum</i> <i>reticulatum</i> (Claparède et Lachmann) Bütschli	YTX [4]		4.636 May-05				

Tabla 1: Lista de especies potencialmente tóxicas o nocivas del Puerto de Valencia.

Abreviaturas: DA: ácido domoico; GTX: gonyautoxina; NSTX: neosaxitoxina; OA: ácido ocaico; DTX-1/-2: dinofisistoxina-1/-2; PTX-2: pectenotoxina-2; YTX: yesotoxina; STX: saxitoxina; ASP: intoxicación amnésica por consumo de marisco; DSP: intoxicación diarreica por consumo de marisco; PSP: intoxicación paralizante por consumo de marisco.

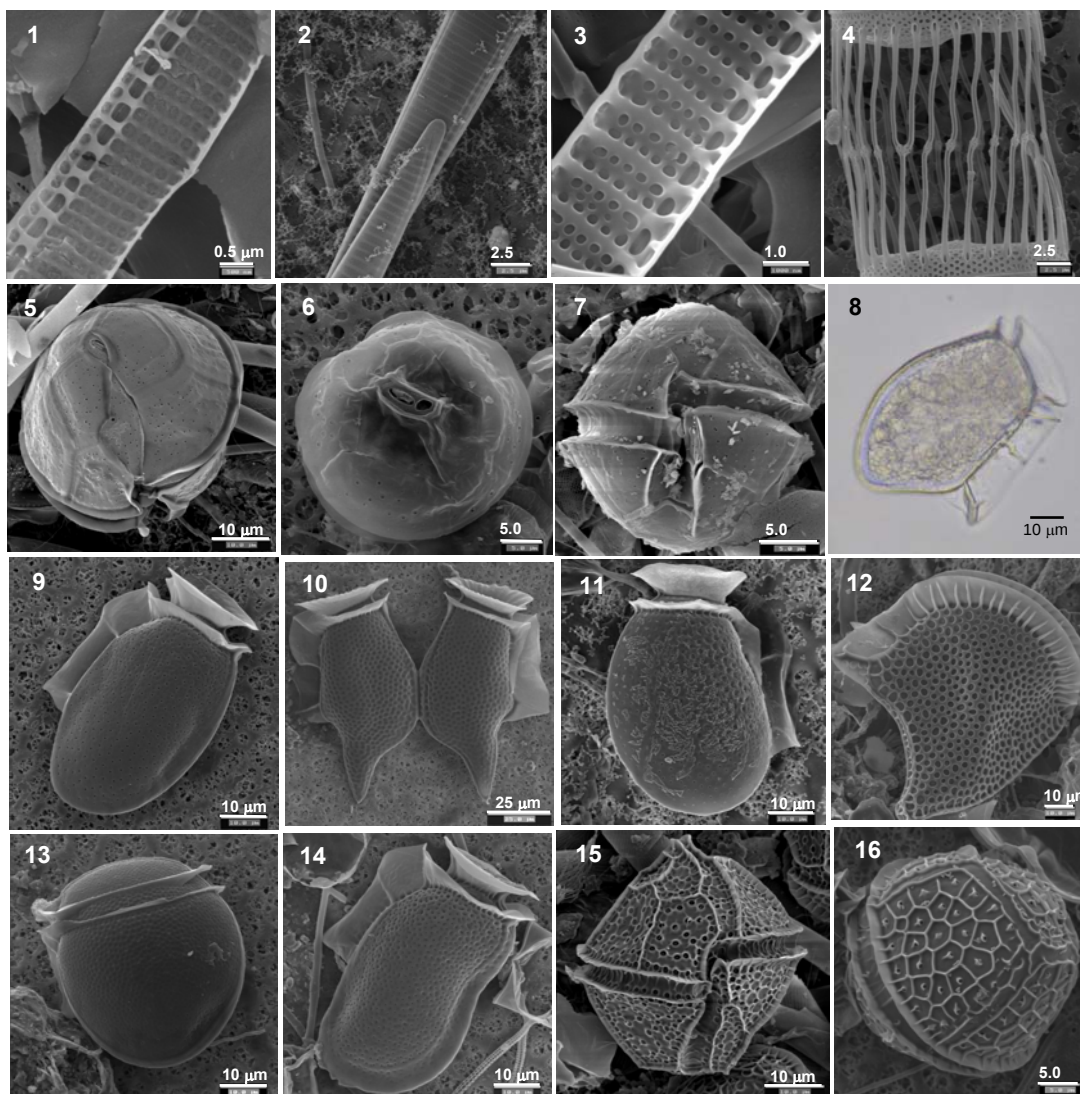


Figura 2. Micrografías al SEM (excepto *Dinophysis acuminata*) de las especies potencialmente tóxicas o nocivas detectadas en el Puerto de Valencia: 1) *Pseudo-nitzschia* cf. *calliantha*; 2) *P. fraudulenta*; 3) *P. pungens*; 4) *Skeletonema tropicum*; 5) *Alexandrium* cf. *tamarense*; 6) *A. affine*; 7) *A. minutum*; 8) *Dinophysis acuta*; 9) *D. acuminata*; 10) *D. caudata*; 11) *D. fortii*; 12) *D. rapa*; 13) *D. rotundata*; 14) *D. sacculus*; 15) *Lingulodinium polyedrum*; 16) *Protoceratium reticulatum*.

En Octubre de 2005, *Skeletonema tropicum* causó la única proliferación con abundancias del orden de 10^6 células L^{-1} . Esta proliferación se extendió por todo el recinto portuario, no produciéndose en el exterior. La mayor concentración ($3,59 \times 10^6$ células L^{-1}) se registró en la

zona más confinada donde se produjo un descenso en los niveles de oxígeno disuelto ($5,38 \text{ mg L}^{-1}$). Esta especie de afinidades tropicales y subtropicales tiene especial interés puesto probablemente se introdujo en el Mediterráneo a través de las aguas de lastre de los buques [7].

Dinoflagelados potencialmente tóxicos o nocivos. Se han identificados 3 especies del género *Alexandrium* potencialmente tóxicas causantes de PSP: *A. cf tamarense*, *A. affine*, *A. minutum*. También se detectó *A. insuetum*, especie del género sin antecedentes de toxicidad. La abundancia fue muy baja en todos los casos salvo para *A. affine* que alcanzó concentraciones elevadas, del orden de 10^4 células L^{-1} , en todo el recinto portuario durante los meses de Septiembre y Octubre.

El género *Dinophysis* está representado por 7 especies causantes de DSP: *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. rapa*, *D. rotundata* y *D. sacculus*. En general destacan por sus bajas concentraciones (> 500 células L^{-1}) y porque su presencia se centra en los meses primaverales y estivales.

Respecto a las especies productoras de yesotoxinas, se ha identificado *Lingulodinium polyedrum* y *Protocetarium reticulatum*. En ambos casos sus máximas abundancias (1.098 y 4.636 células L^{-1} , respectivamente) se han registrado en el interior de puerto y durante los meses primaverales.

Especies exóticas o no-indígenas. De las especies encontradas en el Puerto de Valencia, 4 son consideradas como especies no-indígenas del Mediterráneo por diversos autores [7,8]: *Skeletonema tropicum*, *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Alexandrium insuetum*. Las dos primeras son consideradas como ya establecidas en el Mediterráneo a diferencia de las dos últimas que por sus escasas citas se consideran como no establecidas [8]. Sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar que estas especies son realmente no-indígenas del Mediterráneo.

Agradecimientos

Este estudio se ha sido efectuado dentro del convenio de colaboración entre el Área de Medio Ambiente de la Autoridad Portuaria de Valencia y el Laboratorio de Biología Marina de la Universidad de Valencia. Los autores agradecen la colaboración y la ayuda prestada por el patrón y la tripulación del barco "Puerto V.S.G", así como a todos los participantes de las distintas campañas llevadas a cabo en el puerto. También agradecen a la Dra. Nina Lundholm y al Dr. Jacob Larsen sus lecciones de taxonomía.

Referencias

- [1] Throndsen, J. 1978. Preservation and storage. En: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. UNESCO. Paris. 69–74.
- [2] Andersen, P., J. Throndsen. 2003. Estimating cell numbers. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Paris. 99–129.
- [3] Lundholm, N., N. Daugbjerg, Ø. Moestrup. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *Eur. J. Phycol.* 37:115–34.
- [4] Moestrup, Ø., G.A. Codd, M. Elbrächter, M.A. Faust, S. Fraga, Y. Fukuyo, G. Cronberg, Y. Halim, F.J.R. Taylor, A. Zingone. 2004. *IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, <http://ioc.unesco.org/hab/data4/taxlist.htm>.
- [5] Nguyen-Ngoc, L. 2004. An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese waters. *Harmful Algae*. 3:117-129.
- [6] Zingone, A., R. Siano, D. D'Alelio, D. Sarno. 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae*. 5: 321-337.
- [7] Zingone, A., P. Licandro, D. Sarno. 2003. Revising paradigms and myths of phytoplankton ecology using biological time series. En: Briand, F. (Ed.), *Mediterranean Biological Time Series*. CIESM Workshop Monographs no. 22. Monaco. 109-114.
- [8] Zenetos, A., M.E. Çinar, M.A. Pancucci-Papadopoulou, J.G. Harmelin, G. Furnari, F. Andaloro, N. Bellou, N. Streftaris, H. Zibrowius. 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species. *Med. Mar. Sci.* 6/2:63-118.

Proliferación de *Skeletonema tropicum* Cleve (Bacillariophyceae) en el Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental)

Carolina Assadi^{1,2}, Vicente Tasso^{1,2} y Manuel García Carrascosa¹

(1) Laboratorio de Biología Marina. Departamento de Zoología.

Universidad de Valencia. C/ Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot (Valencia)

(2) OceanSnell - Consultoría Ambiental Marina. CEEI-Valencia, Parque Tecnológico,
Avda. Benjamín Franklin 12, 46980 Paterna (Valencia)

carolina.assadi@oceansnell.com

Resumen

En el año 2005 se llevó a cabo un programa de seguimiento de la calidad de las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental) en el que se tomaron datos mensuales de las distintas variables hidrológicas así como muestras de fitoplancton. Uno de los datos más destacados de esta campaña fue la proliferación de *Skeletonema tropicum*, una diatomea sin antecedentes de proliferación e introducida recientemente en el Mediterráneo a través de las aguas de lastre de los buques. Alcanzó una concentración máxima de $3,59 \times 10^6$ células L⁻¹ durante el mes de Octubre y provocó un descenso de los niveles de oxígeno en la zona más confinada del recinto portuario. Este aumento puntual de biomasa fitoplanctónica se produjo en condiciones de inestabilidad en la columna de agua, elevada concentración de nutrientes y elevado grado de confinamiento.

Introducción

Skeletonema tropicum Cleve es una diatomea nerítica de afinidades tropicales y subtropicales, con una distribución que no supera los 30° Norte en el Atlántico Occidental [1]. La razón de esta distribución se debe a su incapacidad de crecer a temperaturas inferiores a los 13 °C, estando su temperatura óptima de crecimiento entre los 19-30 °C [2]. Otra posible causa de esta distribución tan limitada es que probablemente ha sido confundida en las identificaciones al microscopio óptico y asignada a la especie más común *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve o a otras especies del género incluidas las 6 nuevas especies recientemente descritas por Zingone *et al.*, (2005) [3], Sarno *et al.*, (2005) [4] y Sarno *et al.*, (2007) [5], ya que el microscopio electrónico se ha convertido en una herramienta clave para la diferenciación de las especies del género.

En general los datos de distribución y ecología de esta especie son escasos. En 2002 fue detectada por primera vez en el Mediterráneo en aguas costeras del Golfo de Nápoles [6], y a una latitud superior a los 40° Norte. El agua de lastre de los buques parece ser la causa más probable de su introducción en el Mediterráneo, y el aumento generalizado de las temperaturas de estas aguas el principal factor para su establecimiento [6].

Material y métodos

Durante el periodo Enero 2005-Enero 2006 se llevó a cabo un programa de seguimiento de la calidad de las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental) (Fig. 1A) en el cual se tomaron datos mensuales de las distintas variables hidrológicas, así como muestras de fitoplancton en 7 estaciones de muestreo (Fig. 1B).



Figura 1. A) Localización del Puerto de Valencia; B) Distribución de las estaciones de muestreo.

Para la caracterización hidrológica de la columna de agua se obtuvieron perfiles de STD y oxígeno disuelto mediante sonda CTD AML-12 plus y electrodo de Clarke WTW TA 197-Oxi respectivamente. Las muestras de agua se obtuvieron mediante botella hidrográfica tipo Niskin y se destinaron al análisis de nutrientes, clorofilas y fitoplancton. Para los nutrientes se ha seguido la metodología descrita por Grasshoff *et al.*, (1999) [7]. Las clorofilas se han determinado mediante espectrofotometría siguiendo un protocolo estandarizado [8] y aplicando las ecuaciones tricromáticas de Jeffrey y Humprey [9] y sus respectivas correcciones para feopigmentos. Las muestras de fitoplancton fueron fijadas con una solución al 20% de formaldehído tamponado con hexametilentetramina [10] y la concentración de las muestras se llevó a cabo mediante cámaras de sedimentación durante 48 horas. Los recuentos e identificaciones se realizaron con el microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 y siguiendo la metodología de Andersen y Thronsen (2003) [11]. Para la determinación de ciertas especies se recurrió al microscopio electrónico de barrido Hitachi S4100. La determinación de *S. tropicum* se realizó a partir de la iconografía y descripción aportada por Sarno *et al* (2005) [4].

Resultados

Un aspecto destacado de la campaña de muestreo Enero 2005-Enero 2006 fue la proliferación de *Skeletonema tropicum* registrada en Octubre de 2005 en el interior del Puerto de Valencia. En la Fig. 2 se detallan las características morfológicas distintivas de esta especie.

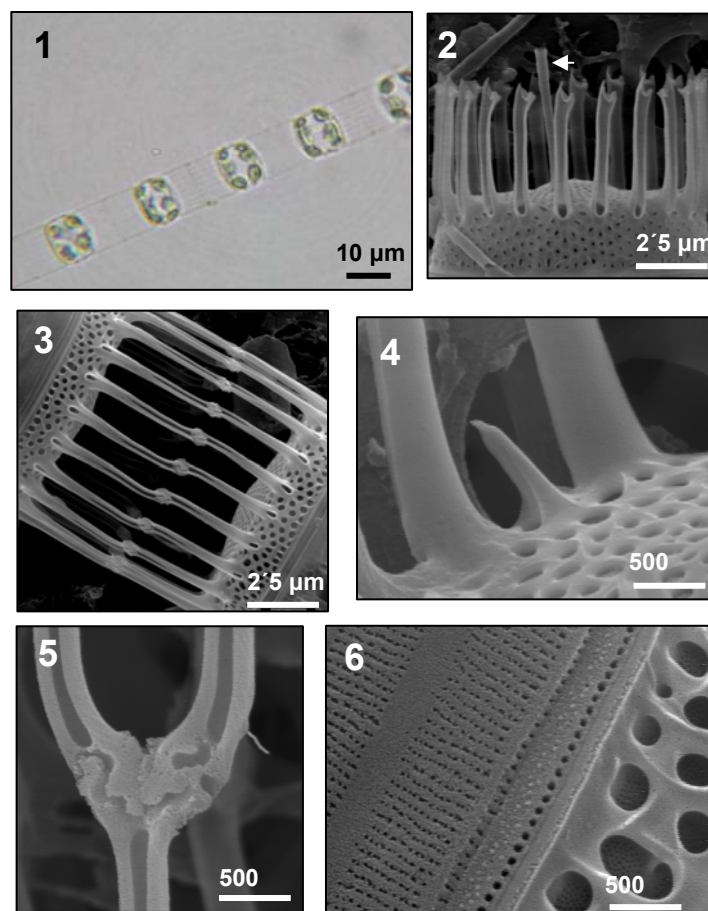


Figura 2. Micrografías de *Skeletonema tropicum* al SEM y al microscopio óptico. 1) Colonia con numerosos cloroplastos observada al microscopio óptico. 2) Procesos de las fultopórtulas terminales (TFPPs) totalmente abiertas y con la punta en forma de gancho. (→) Proceso de la rimopórtula terminal (TRP) en posición subcéntrica, con forma de trompeta y más larga que los TFPP. 3) Procesos de las fultopórtulas intercalares (IFPP) parcialmente abiertas con un orificio alargado en su base. Uniones 1:1 y de tipo zig-zag. 4) Procesos de las rimopórtulas intercalares (IRPP) muy cortos y situados ligeramente dentro del anillo de los IFPP. 5) Las uniones 1:2 son posibles aunque menos frecuentes. 6) Banda cingular con filas de poros.

Los datos de los recuentos de las muestras fitoplanctónicas de Octubre de 2005 muestran una concentración máxima de *Skeletonema tropicum* de $3,59 \times 10^6$ células L^{-1} en el interior del puerto (Estación 1) y una disminución gradual hacia el exterior de recinto (Estación 0) donde se registró la concentración mínima (3.667 células L^{-1}) (Fig. 3).

La comunidad fitoplanctónica asociada estuvo dominada por diatomeas entre las que destacaron por su abundancia *Asterionellopsis glacialis*, *Thalassiosira* sp., *Bacteriastrum delicatulum* y *Chaetoceros* spp.

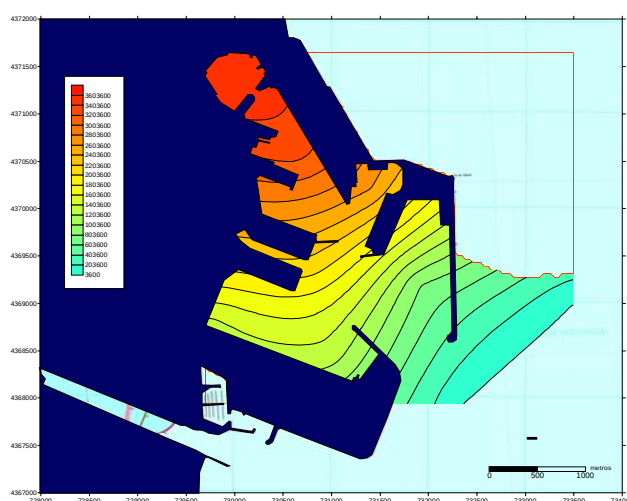


Figura 3. Concentración (células L⁻¹) de *S. tropicum* durante Octubre de 2005 en el Puerto de Valencia.

Los parámetros hidrológicos de la columna de agua en el momento de la floración muestra unos valores medios de temperatura y salinidad de 21,22 °C y 37,83 P.S.U. respectivamente, y una estructura homogénea en la columna de agua salvo en la dársena de graneles (Estación 3) donde se detectó un marcado descenso de la salinidad en los primeros metros. Las concentraciones de nutrientes fueron especialmente altas en Septiembre de 2005, mes previo al episodio (Fig. 4). Durante la floración la concentración de nutrientes descendió drásticamente y los valores medios de clorofila *a* y oxígeno disuelto fueron de 3,84 mg m⁻³ y 7,22 mg L⁻¹ respectivamente. A nivel de fondo en la dársena más confinada (Estación 1) se registró el mínimo de oxígeno disuelto con 5,38 mg L⁻¹.

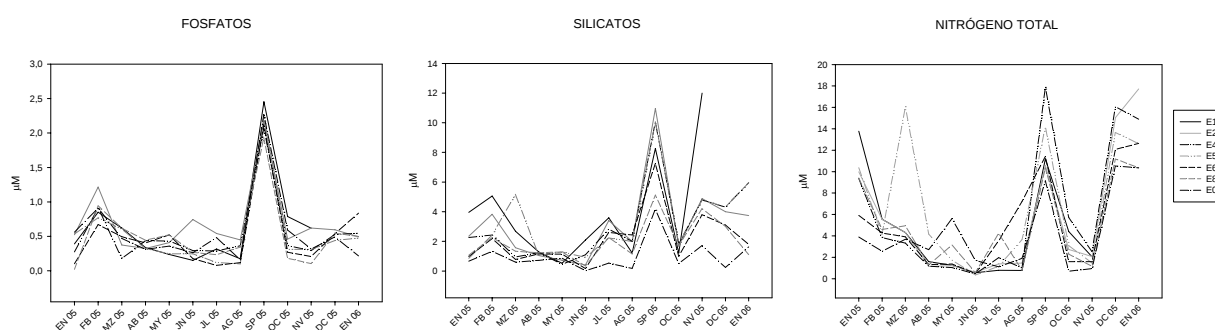


Figura 4. Evolución de la concentración de nutrientes (µM) durante el periodo Enero 2005-Enero 2006 en el Puerto de Valencia.

Discusión

La identificación de *Skeletonema tropicum* en las aguas del interior y exterior del Puerto de Valencia confirma la presencia de esta especie en las costas más occidentales del Mediterráneo. Por otro lado constituye la primera referencia de proliferación registrada para esta especie y caracterizada en el interior de un recinto portuario.

Los datos hidrológicos y de los recuentos indican que no sólo la temperatura y salinidad adecuadas son determinantes para el crecimiento de esta diatomea, sino que la inestabilidad en la columna de agua, una elevada concentración de nutrientes y un alto grado de confinamiento pueden jugar un papel determinante en un episodio de estas características. Su proliferación en Otoño, al igual que lo que sucede en el Golfo de Nápoles y Mar Tirreno [4], indica un comportamiento estacional. Además la elevada concentración de esta especie en el interior del recinto portuario y su escasez en el exterior podrían apoyar la teoría de Zingone [6] de su posible introducción en el Mediterráneo a través de las aguas de lastre de los buques.

Agradecimientos

Este estudio se ha sido efectuado dentro del convenio de colaboración entre el Área de Medio Ambiente de la Autoridad Portuaria de Valencia y el Laboratorio de Biología Marina de la Universidad de Valencia. Los autores agradecen la colaboración y la ayuda prestada por el patrón y la tripulación del barco "Puerto V.S.G", así como a todos los participantes en las distintas campañas llevadas a cabo en el puerto. También agradecen su colaboración a la Dra. Adriana Zingone por confirmar la identificación taxonómica.

Referencias

- [1] ICES. 2006. Working Group on Introductions and Transfers of Marine Organisms (WGITMO), 16–17 March 2006. Oostende. Belgium. ICES CM 2006/ACME:05. 334 pp.
- [2] Hulburt, E. M., R.R.L. Guillard. 1968. The relationship of the distribution of the diatom *Skeletonema tropicum* to temperature. *Ecology*. 49:337–9.
- [3] Zingone, A., I. Percopo, P.A. Sims, D. Sarno. 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). I. A reexamination of the type material of *S. costatum* with the description of *S. grevillei* sp. nov. *J. Phycol.* 41:140–150.
- [4] Sarno, D., W.H.C.F. Kooistra, L.K. Medlin, I. Percopo, A. Zingone. 2005. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae): II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species, with the description of four new species *J. Phycol.* 41: 151-176.
- [5] Sarno, D., W.H.C.F. Kooistra, S. Balzano, P.E. Hargraves, A. Zingone. 2007. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae): III. Phylogenetic position and morphological variability of *Skeletonema costatum* and *Skeletonema grevillei*, with the description of *Skeletonema ardens* sp. nov. *J. Phycol.* 43:156-170.
- [6] Zingone, A., P. Licandro, D. Sarno. 2003. Revising paradigms and myths of phytoplankton ecology using biological time series. En: Briand, F. (Ed.). *Mediterranean Biological Time Series*. CIESM Workshop Monographs no. 22, Monaco. 109–114.

- [7] Grasshoff, K., M. Kremling, M. Ehrhardt. 1999. *Methods of Seawater Analysis*, 3rd edn. Wiley-VCH, Weinheim. 599 pp.
- [8] Parsons, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli. 1984. *A manual of chemical and biological methods for sea water analysis*. Oxford. Pergamon Press. 173 pp.
- [9] Jeffrey, S. and W. Humphrey. 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.
- [10] Throndsen, J. 1978. Preservation and storage. En: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris. 69-74.
- [11] Andersen, P. and J. Throndsen. 2003. Estimating cell numbers. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Paris. 99-129.

Seguimiento del fitoplancton en el estuario del río Nervión. Identificación de especies potencialmente tóxicas

Emma Orive, Aitor Laza y Sergio Seoane

*Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencia y Tecnología,
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Campus de Leioa, Bizkaia*

Introducción

En los estuarios y costa del Cantábrico oriental (comunidades de Cantabria y País Vasco) se está llevando a cabo un seguimiento de la composición específica y abundancia del fitoplancton, que se enmarca en el contexto de la Directiva Marco Europea del Agua (2000/60/CE). Superpuesto a este seguimiento, se está realizando un estudio sobre la evolución de la calidad del agua del estuario del río Nervión, el más extenso de Vizcaya, que ha experimentado en los últimos años un considerable receso de la contaminación que soportaba, tanto de origen industrial, como doméstico. En este trabajo presentamos una relación de las especies potencialmente tóxicas identificadas en el estuario entre 1999 y 2006, con detalles sobre su distribución y abundancia. En este periodo, se han observado crecimientos masivos de especies que sin ser tóxicas han resultado nocivas por provocar hipoxia en los tramos de menor renovación del estuario, los más interiores [1,2]. Además, se han identificado varias especies, todas ellas marinas, consideradas como tóxicas en la bibliografía, entre las que destacan los dinoflagelados y en menor medida las haptofitas, las rafiðoficeas y las diatomeas.

Material y Métodos

Desde 1999 se toman muestras superficiales en 8 estaciones permanentes del estuario del río Nervión que abarcan todo el gradiente salino del estuario. Durante los dos primeros años, el muestreo fue mensual, incluyendo los meses de invierno, pero posteriormente se centró en el periodo de mayor crecimiento del fitoplancton en el estuario, que se extiende desde Marzo hasta Septiembre.

La identificación y cuantificación del fitoplancton se realiza por varios procedimientos. Se utilizan muestras fijadas con glutaraldehído (1% concentración final) para la identificación y recuento según Utermöhl y para evaluar el porcentaje de autótrofos y heterótrofos una vez teñida la muestra con DAPI. Para profundizar en la identificación, se observan las muestras en vivo y se realizan cultivos de los que se aíslan especies para su posterior estudio morfológico y, en casos de especies de taxonomía dudosa, pigmentario y genético.

Resultados y Discusión

El mayor número de algas potencialmente tóxicas corresponde a los dinoflagelados, con unas 20 especies (Tabla 1). Entre las haptofitas

presentes en el estuario sólo 4 se han considerado potencialmente tóxicas. Se han identificado también 4 rafidoficeas, si bien la correspondiente al género *Chatonella*, *C. cf. verruculosa*, corresponde en la actualidad al grupo de las dictiocoficeas [3]. La identificación de algunas especies, como los dinoflagelados del género *Karlodinium*, las haptofitas *Chrysochromulina brevifilum*, *Pleurochrysis roscoffensis* y *Prymnesium parvum* y las rafidoficeas, se ha realizado a partir de los cultivos de muestras naturales. Las diatomeas del género *Pseudonitzschia* están siendo objeto de un estudio más detallado al microscopio electrónico.

Las diatomeas del género *Pseudonitzschia* junto con la rafidoficea *Heterosigma akashiwo* y los dinoflagelados del tipo *Pfiesteria* han sido las algas potencialmente tóxicas más abundantes en el estuario. Las demás han aparecido siempre en cantidades bajas. El crecimiento de *Pseudonitzschia* parece más dependiente de los nutrientes que de la temperatura, por lo que aparece tanto en primavera como en verano, siempre que haya influencia fluvial. *Heterosigma akashiwo*, que puede alcanzar en el estuario densidades del orden de 10^8 células L^{-1} , sólo se ha encontrado en verano, con temperaturas generalmente superiores a 20 °C. En el caso de los dinoflagelados tipo *Pfiesteria*, se ha observado que su densidad aumenta tras crecimientos masivos de criptofitas, presentando por tanto un comportamiento parecido al de *P. piscicida* en los estuarios atlánticos de Norteamérica [4]. La mayoría de especies identificadas son de origen marino, adentrándose en el estuario con la marea, aunque algunas de ellas crecen bien en agua salobre a partir de 5 P.S.U. [1].

DIATOMEAS <i>Pseudo-nitzschia spp.</i> DINOFLAGELADOS <i>Akashiwo sanguinea</i> <i>Amphidinium cf. carterae</i> <i>Alexandrium minutum</i> <i>Cochlodinium sp.</i> <i>Dinophysis acuminata</i> <i>Dinophysis acuta</i> <i>Dinophysis caudata</i> <i>Dinophysis cf. ovum</i> <i>Dinophysis fortii</i>	DINOFLAGELADOS <i>Dinophysis rotundata</i> <i>Karenia cf. mikimotoi</i> <i>Karenia papilionacea</i> <i>Karlodinium sp.</i> <i>Karlodinium decipiens</i> <i>Karlodinium veneficum</i> <i>Lingulodinium polyedrum</i> tipo Pfiesteria <i>Prorocentrum emarginatum</i> <i>Prorocentrum lima</i> <i>Prorocentrum minimum</i> <i>Protoceratium reticulatum</i>	HAPTOFITAS <i>Chrysochromulina brevifilum</i> <i>Pleurochrysis roscoffensis</i> <i>Prymnesium parvum</i> <i>Phaeocystis globosa</i> RAFIDOFICEAS <i>Chatonella globosa</i> <i>Chatonella cf. verruculosa</i> <i>Heterosigma akashiwo</i> <i>Fibrocapsa japonica</i>
---	---	--

Tabla 1. Especies potencialmente tóxicas presentes en el estuario del río Nervión.

Referencias

- [1] Orive, E., J. Franco, I. de Madariaga, M. Revilla. 2004. Bacterioplankton and phytoplankton communities. En: Borja A y M. Collins (Eds). *Oceanography and Marine Environment of The Basque Country*. Elsevier Oceanographic series. 70: 367-393.

- [2] Seoane, S., A. Laza, I. Urrutxurtu, E. Orive. 2005. Phytoplankton assemblages and their dominant pigments in the Nervion River estuary. *Hydrobiologia*. 549:1-13.
- [3] Hosoi-Tanabe, S., I. Otake, Y. Sako. 2006. Phylogenetic analysis of noxious red tide flagellates *Chatonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, and *C. verruculosa* (Raphidophyceae) based on the rRNA gene family. *Fisheries Science*. 72:1200-1208.
- [4] Burkholder, J.M. y H.B. Glasgow. 1997. *Pfiesteria piscicida* and other Pfiesteria-like dinoflagellates: Behavior, impacts, and environmental controls. *Limnol. Oceanogr.* 42:1052-1075.

Proliferación masiva de cianobacterias en el embalse de Ullibarri-Gamboa

Laura Muro¹, Salomé Ortiz de Landaluce¹, Nuria Cifuentes¹,
Araceli Vara¹ y Eduardo Costas²

(1) Aguas Municipales de Vitoria S.A. (AMVISA)

ETAP de Araka, N-240 Km 6,3 01012 Vitoria-Gasteiz

(2) Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense Madrid.
Avda Puerta del Hierro s.n. 28040 Madrid

Resumen

Se realizó un estudio de microalgas totales, cianobacterias y cianotoxinas en el agua que AMVISA capta desde el embalse de Ullibarri-Gamboa durante el año 2004. Se observó un gran proliferación (*bloom*) de cianobacterias durante los meses de Noviembre y Diciembre, principalmente debida a *Gomphosphaeria* sp.. Como consecuencia se detectaron microcistinas, a concentraciones inferiores al máximo permitido por la legislación. Al mismo tiempo se realizaron muestreos en la estación de tratamiento de aguas potables (ETAP) para estimar la reducción de microalgas totales, cianobacterias y microcistinas conseguida con los tratamientos efectuados.

Introducción

Aguas Municipales de Vitoria (AMVISA), como empresa pública gestora del abastecimiento de la ciudad, tiene la responsabilidad de distribuir agua potable exenta de riesgos sanitarios. Para conseguir este objetivo, además de llevar a cabo todos los controles establecidos en la reglamentación vigente [1], comenzamos a estudiar en nuestras captaciones la presencia de microalgas totales, cianobacterias y cianotoxinas.

Desde el año 2000 el Área de Tratamiento y Calidad de AMVISA y el grupo de Control Veterinario de Microorganismos (COVEMI) de la UCM han desarrollado un programa de análisis, recuentos e intercalibraciones que ha permitido obtener importantes series de datos muy fiables sobre microalgas totales, cianobacterias y microcistinas en el sistema de captaciones (embalse Ullibarri-Gamboa y río Zadorra). Estas series de datos destacan por su elevada calidad (con valores de repetibilidad, reproducibilidad y precisión muy elevados a partir del año 2002).

En este trabajo se resume la evolución de cianobacterias y cianotoxinas durante el año 2004, por ser el año en que se detectó la mayor concentración de microcistinas. Teniendo en cuenta que Ullibarri-Gamboa es uno de los embalses de abastecimiento de más calidad de agua de España (y con menores concentraciones de cianotoxinas), estamos posiblemente ante un fenómeno preocupante que generará problemas en numerosos embalses de abastecimiento españoles.

Material y Métodos

Muestreo

Agua del Embalse de Ullibarri. El embalse de Ullibarri-Gamboa tiene capacidad de 147 Hm³, profundidad media de 13 m y profundidad máxima de 30 m. Su principal tributario es el río Zadorra. Posee una cuenca vertiente de 27.000 Ha y de escorrentía de 5.310 Ha. Los suelos son de arcilla, caliza, margas y un entorno dedicado a agricultura y pastizales.

La toma de muestras esta situada en la tubería que trae agua desde este embalse a la ETAP de Araca. Hay que tener en cuenta que esta agua procede del bombeo a unos 17 metros de profundidad media respecto la lámina de agua, en la zona cercana a la presa. La frecuencia de muestreo establecida es mensual, pasando a quincenal, semanal o cada 3 días, según la cantidad de microalgas y cianobacterias encontradas.

Agua en la planta de Araka. El tratamiento efectuado en la ETAP de ARAKA es el siguiente: 1) dosificación previa de productos (posibilidad de ozonización, posibilidad de añadir carbón activo en polvo, adición de cloro, adición de policloruro de aluminio, posibilidad de añadir sosa); 2) decantación en tres decantadores tipo Pulsador; 3) filtración por seis filtros de arena sílice de 0,85 m de altura y 1 mm de talla efectiva y 4) dosificación final de reactivos (posibilidad de ozonización, posibilidad de adición de sosa, fluoración con ácido hexafluorosilícico y cloración).

Se toman muestras de agua en la ETAP tras la filtración. La frecuencia del muestreo en este punto se ha realizado de forma esporádica, según los resultados encontrados en el agua del embalse de Ullibarri.

Recuento de microalgas y cianobacterias

Los recuentos se realizaron mediante las técnicas habituales (filtración por malla, cámara Neubauer), utilizado un microscopio NIKON TE-2000 U.

Periódicamente se realizaron intercalibraciones taxonómicas con expertos externos, presentando la identificación y recuento una elevada precisión.

Análisis de microcistina

En las determinaciones de rutina se utilizó un sistema comercial de detección y cuantificación de ELISA (EnvirogardTM), realizándose intercalibraciones con expertos externos.

Resultados

Se realizaron recuentos de fitoplancton en un total de 30 muestras procedentes el embalse de Ullibarri, 16 de ellas entre Noviembre y Diciembre, con el objeto de estudiar la evolución de la proliferación de cianobacterias detectado en esas fechas.

En la Tabla 1 aparece un resumen de los recuentos por grupos realizados a lo largo del año, así como los valores de microcistinas encontrados.

RECuentos de FITOPLANCTON (CEL-COL/L) AGUA PRETRATADA DE ULLIBARRI AÑO 2004								Micro cistina (ppb)
	CIANO- FICEAS	CLORO- FICEAS	CRISO- FICEAS	DIATO- MEAS	DINO- FLAG	EUGLE- NAS	TOTAL	
26/01/2004	65	330	0	1.345	0	3	1.743	
12/02/2004	110	190	0	2.420	0	0	2.720	
11/03/2004	50	100	0	1.775	0	0	1.925	
01/04/2004	89	37	0	1.178	0	5	1.309	
20/04/2004	42	93	0	628	0	2	765	
25/05/2004	25	422	0	91	0	37	574	
09/06/2004	205	45	10	5	5	15	285	
22/06/2004	3.480	200	95	85	330	110	4.300	
14/07/2004	2.867	172	0	0	75	38	3.152	
03/08/2004	4.835	145	125	20	540	75	5.740	
25/08/2004	970	160	0	370	60	190	1.750	
21/09/2004	11.975	743	0	758	8	495	13.978	
25/10/2004	18.250	915	0	2.765	75	410	22.415	0,02
16/11/2004	59.164	640	0	1.270	90	60	61.224	
18/11/2004	39.200	1.100	0	28.600	0	100	69.000	
19/11/2004	41.000	700	0	88.000	0	200	129.800	
22/11/2004	27.550	1.117	0	206.830	0	217	235.714	
25/11/2004	62.189	650	0	60.630	0	50	123.519	0,33
26/11/2004	44.818	400	0	23.921	0	0	69.139	
29/11/2004	39.820	1.000	0	18.683	0	50	59.552	
30/11/2004	30.735	575	0	6.900	0	200	38.410	0,07
01/12/2004	33.400	825	0	12.075	0	200	46.500	
03/12/2004	31.100	2.100	0	23.550	0	0	56.750	
07/12/2004	14.300	1.000	0	32.894	25	125	48.344	
09/12/2004	11.225	850	0	55.898	25	125	68.123	0,28
13/12/2004	10.825							0,01
16/12/2004	14.000	450	0	4.750	0	50	19.250	0
21/12/2004	18.600	500	0	4.600	0	0	23.700	
27/12/2004	5.850	575	0	20.300	0	150	26.875	
30/12/2004	3.550	200	0	7.750	0	0	11.500	
Promedio							39.588	

Tabla 1: Recuento de fitoplancton en Ullibarri. Año 2004.

Los resultados (Tabla 1) indican que en los primeros meses del año 2004 (de Enero a Mayo) el grupo taxonómico más abundante encontrado en las aguas del embalse de abastecimiento Ullibarri fueron las diatomeas. La cantidad de cianobacterias detectadas durante estos meses fue muy baja.

En el mes de Junio se registró un aumento en las poblaciones de fitoplancton, aumentaron tanto las cianobacterias como el total de

microalgas. Durante el periodo de Junio a Agosto las cianobacterias se convirtieron en el grupo más abundante.

En este periodo también aumentaron, en menor medida, las clorofíceas, los dinoflagelados y las euglenofíceas.

Sin embargo el aumento más significativo de cianobacterias se registró entre los meses de Septiembre y Noviembre.

Se registró un incremento de 970 cel-col L⁻¹ en Agosto a 11.975 cel-col L⁻¹ en Septiembre, a 18.250 cel-col L⁻¹ en Octubre y a 59.164 cel-col L⁻¹ a mediados de Noviembre.

El genero más abundante al comienzo de este aumento de cianofíceas fue *Chroococcus* spp., acompañado en menor medida por *Gomphosphaeria* spp.

En el mes de Noviembre, el género *Gomphosphaeria* spp. fue el más abundante, siendo responsable de los recuentos crecientes de cianobacterias hasta alcanzar un máximo de 62.189 cel-col L⁻¹ registrado el día 25 de Noviembre. A partir de esta fecha la concentración de cianobacterias disminuyó de forma progresiva, terminando el año con una concentración de 3.550 cel-col L⁻¹.

En cuanto al recuento total de fitoplancton observamos, entre los meses de Septiembre y Noviembre, un aumento progresivo de 1.750 cel-col L⁻¹ en Agosto a 13.978 cel-col L⁻¹ en Septiembre, a 22.415 cel-col L⁻¹ en Octubre, a 61.224 cel-col L⁻¹ a mediados de Noviembre y a 235.714 cel-col L⁻¹ el 22 de Noviembre.

Este incremento se debió, además de por el número de cianobacterias, por la proliferación de diatomeas que pasaron de 370 cel-col L⁻¹ en Agosto a 206.830 cel-col L⁻¹ el 22 de Noviembre, disminuyendo después a 6.900 cel L⁻¹ el 30 de Noviembre.

Durante el mes de Diciembre volvió a aumentar la concentración de diatomeas hasta alcanzar 55.898 cel-col L⁻¹ el día 9 de ese mes. El último recuento del año, el día 30 de Diciembre, reveló una disminución en la concentración de diatomeas (7.750 cel L⁻¹).

Por tanto, la máxima concentración de cianobacterias y fitoplancton total se registró en el mes de Noviembre tal y como se muestra en la Fig. 1.

La concentración máxima de microcistina se detectó el día 25 de Noviembre y fue de 0,33 ppb. Si bien esta concentración representa un tercio de la concentración considerada peligrosa por la OMS, ha sido la máxima detectada en el agua procedente del embalse de Ullívarri desde que comenzamos este estudio (año 2000) hasta la fecha (Marzo 2007).

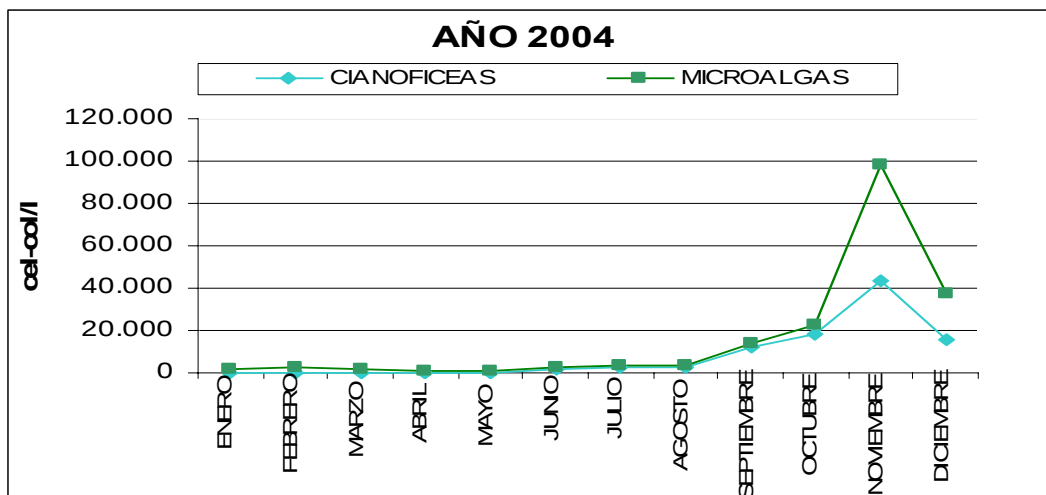


Figura 1. Ciclo anual de cianobacterias y fitoplancton total en el embalse de Ullibbarri.

En función de los resultados que se iban obteniendo realizamos modificaciones en el tratamiento del agua de abastecimiento.

El día 30 de Noviembre se detuvo el proceso de la precloración, con objeto de no destruir las cianobacterias y por tanto no liberar microcistina al agua. El día 3 de Diciembre se volvió a aplicar precloración, pues el equipo de postcloración no conseguía dosificar lo suficiente para obtener el cloro residual libre necesario en la salida de agua a la red de abastecimiento.

El día 1 de Diciembre se puso en marcha la dosificación de carbón activo en cabecera con el fin de retener la toxina disuelta y evitar que sobrepasara el sistema de filtración. La dosificación se mantuvo hasta el día 17 Diciembre.

Se realizaron análisis de microcistina en 3 muestras de agua recogidas tras los tratamientos de coagulación y filtración, encontrándose siempre valores por debajo de 0,05 ppb.

En la Tabla 2 exponemos los resultados de los recuentos de fitoplancton: 1) de las muestras de agua del embalse de Ullibbarri; 2) después de la dosificación de reactivos, decantación y filtración llevado a cabo en la ETAP de Araca y 3) el % de reducción de fitoplancton detectado en la ETAP, antes de la dosificación final de reactivos.

Conclusiones

En las primeras muestras de agua captada del embalse de Ullibbarri-Gamboa se observa la presencia de cianobacterias. La cantidad de estos microorganismos se mantuvo dentro de unos límites estables hasta el mes de Septiembre, en el que tuvo lugar un fenómeno de crecimiento masivo. La máxima concentración de cianobacterias se alcanzó en el mes de Noviembre.

	RECUEENTOS DE FITOPLANCTON (CEL- COL/L). ULLIBARRI			RECUEENTOS DE FITOPLANCTON (CEL-COL/L). AGUA FILTRADA			RETENCIÓN DE FITOPLANCTÓN POR FILTRACIÓN (%) DETECTADO EN LA ETAP		
	CIANO- FICEAS	DIATO- MEAS	TOTAL	CIANO- FICEAS	DIATO- MEAS	TOTAL	CIANO- FICEAS	DIATO- MEAS	RETEN- CIÓN TOTAL
26/01/2004	65	1.345	1.743	19	4	54	70,77	99,70	96,90
18/11/2004	39.200	28.600	69.000	3.850	5	3.935	90,18	99,98	94,30
22/11/2004	27.550	206.830	235.714	2.040	75	2.185	92,60	99,96	99,07
25/11/2004	62.189	60.630	123.519	2.350	50	2.450	96,22	99,92	98,02
01/12/2004	33.400	12.075	46.500	4.545	40	4.750	86,39	99,67	89,78
03/12/2004	31.100	23.550	56.750	4.820	10	5.120	84,50	99,96	90,98
07/12/2004	14.300	32.894	48.344	885	5	975	93,81	99,98	97,98
09/12/2004	11.225	55.898	68.123	1.030	10	1.105	90,82	99,98	98,38
16/12/2004	14.000	4.750	19.250	1.560	0	1.580	88,86	100,00	91,79
21/12/2004	18.600	4.600	23.700	1.080	0	1.100	94,19	100,00	95,36
27/12/2004	5.850	20.300	26.875	470	15	500	91,97	99,93	98,14
Promedio							89,12	99,92	95,52

Tabla 2. Eficiencia del sistema de tratamiento de la ETAP de Araka

Durante este muestreo realizado en 2004, las cianobacterias identificadas fueron especies que producían una concentración baja de toxina, de manera que en ningún caso se detectaron concentraciones superiores a 0,33 ppb.

Si las cianobacterias del género *Gomphosphaeria* que produjo la proliferación hubiesen sido productoras de altas concentraciones de toxina se podría haber alcanzado unos niveles críticos de toxicidad en agua. Por tanto, se considera adecuado establecer una vigilancia periódica y una escala de niveles de alerta, así como un protocolo de actuaciones adecuado a los resultados que se han obtenido.

Tras la detección del aumento de las cianobacterias potencialmente tóxicas, se realizó un tratamiento preventivo que consistió en reducir el tratamiento de cloración en cabecera para no romper las células de cianobacterias y de este modo evitar la liberación de más toxinas. Además se dosificó carbón activo en polvo a la entrada en la ETAP. El carbón activo en polvo no tiene efecto en la disminución de microalgas, pero si lo tiene en la eliminación de toxinas.

Se procuró eliminar las cianobacterias al máximo mediante procesos de coagulación y filtración sobre arena de sílice. Del estudio del tratamiento de coagulación-floculación y filtración efectuado en la ETAP de Araca, se puede concluir que con estos procesos, llegamos a eliminar un 95% del fitoplancton total presente. Por otro lado, observamos que la eficacia en la eliminación de microalgas es distinta según la especie de que se trate, siendo desde casi un 100% para diatomeas, hasta casi un 90% para las cianobacterias responsables del evento tóxico.

Los tratamientos de coagulación-floculación y filtración, junto con la reducción de cloración en cabecera y la aplicación de carbón activo, resultan eficaces para reducir significativamente la carga de microalgas totales y cianobacterias potencialmente peligrosas en episodios de proliferación masiva. También son eficaces en la reducción de la carga de toxina en el agua, puesto que la concentración máxima detectada en el agua tratada fue de 0,05 ppb.

Dada la repercusión sobre la salud pública que puede tener un crecimiento masivo de cianobacterias de especies y cepas hiperproductoras de toxinas, se considera conveniente hacer un estudio más completo de la eliminación tanto de cianobacterias como de microcistina con los distintos tratamientos que se pueden aplicar en la estación de tratamiento de agua potable.

Agradecimientos

Agradecer a Francisco Javier del Río, Jefe del Área de Tratamiento y Control de Calidad de AMVISA, por ser el que puso las inquietudes y consiguió los medios para trabajar en este mundo de las microalgas del embalse.

Agradecer a todo el grupo de trabajo del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid el apoyo y asesoramiento prestado durante todos estos años.

Referencias

- [1] Real Decreto 140/2003 de 7 de Febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

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

Nieves Perdigones, Mónica Rouco, Fernando Marvá,
Eduardo Costas y Victoria López-Rodas

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

Resumen

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

Introducción

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

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

Material y métodos

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

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

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

Resultados

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

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

Discusión

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

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

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

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

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

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

Conclusiones

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

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

Agradecimientos

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

Referencias

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

Desarrollo de sondas para la detección de *Pseudo-nitzschia delicatissima* en la costa Catalana, España: estudios preliminares

Laurence M. Elandaloussi^{1,3}, Roger A. Venail^{1,3},
Sonia Quijano-Scheggia^{2,3}, Margarita Fernández-Tejedor^{1,3},
Esther Garcés^{1,2,3}, Jordi Camp^{2,3}, Jorge Diogene^{1,3} y Karl Andree^{1,3}

(1) IRTA-Centre d'Aqüicultura, Crta. Poble Nou, Km 5.5,
43540-Sant Carles de la Ràpita, Spain

(2) Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, CMIMA,
Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, E08003 Barcelona, Spain

(3) CRA, Centre de Referència en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya, Spain

Resumen

Este trabajo recoge los actuales avances sobre el desarrollo de sondas moleculares para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y PCR en tiempo real como métodos de detección de *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

Introducción

Dentro del género *Pseudo-nitzschia* de diatomeas se encuentran algunas especies asociadas a la producción de ácido domoico, toxina responsable del envenenamiento amnésico por mariscos (ASP). Aunque algunas especies pertenecientes a este género tales como *P. pungens*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. delicatissima* y *P. calliantha* ya han sido detectadas a lo largo de la costa catalana y aunque sean productoras potenciales de ácido domoico, hasta la fecha no ha habido presencia ni de envenenamiento amnésico por mariscos ni de toxinas amnésicas en moluscos en esta zona.

La identificación de este género puede realizarse por medio de la microscopía óptica normal, sin embargo, la discriminación entre las especies a menudo requiere la observación de caracteres morfológicos por medio de la microscopia electrónica. Debido a esto, se han desarrollado algunos métodos alternativos de identificación, como es el caso de los métodos moleculares que constituyen valiosas herramientas para la rápida identificación de algas potencialmente tóxicas. De hecho, ya se recurre a sondas especie-específicas para la identificación de algunas especies de *Pseudo-nitzschia* en norte América [1].

Un primer paso en el desarrollo de las herramientas moleculares para la identificación de una especie diana supone diferenciar las regiones conservadas de las múltiples secuencias variables del ADN, lo cual requiere el conocimiento de la diversidad molecular de una especie en particular dentro de la misma zona geográfica. Por lo tanto las sondas desarrolladas para las especies de *Pseudo-nitzschia* norte americanas [1] pueden no tener un buen resultado con las especies locales en Europa.

La detección específica del fitoplancton puede realizarse utilizando métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o la técnica de hibridación *in situ*. Obtener las secuencias diana óptimas para los oligonucleótidos es un paso necesario en ensayos de detección especie-específicos ADN/ADN o ARN/ADN. En este trabajo se presentan nuestros resultados preliminares en el desarrollo de oligonucleótidos para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la PCR en tiempo real como métodos alternativos de detección de *Pseudo-nitzschia*.

Métodos

Cultivos. Células de *P. delicatissima* fueron aisladas a partir de muestras de campo provenientes del Delta del Ebro, España, durante el invierno 2005-2006. Los cultivos se mantuvieron a 16° C con un fotoperiodo de 12:12 (L:D) en medio f/2 con silicatos [2].

Microscopía. Las células de *Pseudo-nitzschia* aisladas fueron preparadas [3] y examinadas morfológicamente utilizando un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-3500N). Para la microscopía electrónica de transmisión, algunas gotas del material libre de materia orgánica fueron depositadas sobre filtros de policarbonato, recubiertas con oro-paladio y observadas con un microscopio Hitachi H800.

Extracción ADN, clonaje y secuenciación. Las extracciones de ADN fueron realizadas utilizando un DNeasy® Plant Kit de Qiagen y las regiones ITS1, 5.8S y ITS2 fueron amplificadas por PCR utilizando los cebadores MicroSSU (5'-TGAACCTGCGGAAGGATC-3') y Dino E (5'-CCKST TCAYTCGCCRTTAC- 3'). Los amplicones resultantes fueron clonados y secuenciados.

Análisis de las secuencias. Las secuencias de *Pseudo-nitzschia* depositadas en el GenBank y aquellas obtenidas en este estudio fueron utilizadas para los análisis. Las secuencias fueron alineadas empleando los programas BioEdit y ClustalW.

Sondas. Las sondas de oligonucleótidos fueron diseñadas analizando los alineamientos de las secuencias de *Pseudo-nitzschia* para que reconocieran las regiones de ARN especie-específicas de *P. delicatissima* (Pdel1, PdelRa2 y PdelRa3).

Técnica de hibridación "Whole-cell Hybridisation". Las sondas UniC (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') [4], Pdel1 (5'-CCAACGAAA CCAAGCAAAG-3') [5] y UniR (5'- CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') fueron marcadas en la extremidad 5' con fluoresceína para ser utilizadas en ensayos FISH [1]. Los cultivos clonales de *P. delicatissima* fueron hibridados con las sondas Pdel1, UniC (control positivo) y UniR (control negativo) y observados mediante microscopía de epifluorescencia.

PCR en tiempo real. Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa PrimerExpress. La PCR en tiempo real fue realizada en una Real-Time PCR system 7300 (Applied Biosystem). La optimización del ensayo fue realizada utilizando un plásmido ADN que contenía la región ITS1-

5.8S-ITS2 del ADNr como molde. Una matriz de pruebas cruzadas utilizando todos los cebadores especie-específicos con todos los clones de ADNr fue realizada a intervalos de 2° C desde 60° C hasta 70°C con el fin de eliminar cualquier reacción no específica entre cebadores y clones de ADNr de las especies no diana (datos no presentados). La especificidad de PdelRa2 y PdelRa3 fue probada en ensayos con la PCR en tiempo real utilizando plásmidos que contenían las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de varias especies de fitoplancton y con ADN genómico extraído de las cepas *P. delicatissima*.

Resultados

Cuatro cultivos clonales no axénicos de *Pseudo-nitzschia delicatissima* aisladas del Delta del Ebro, llamadas clones A4, D3, Ra2 y Ra3 fueron utilizadas en este estudio (Tabla 1). Basándose en la microscopía electrónica [6] estas cepas fueron identificadas como *P. delicatissima* [5]. La amplificación de la región ITS por medio de la PCR generó una secuencia inequívoca con una longitud promedio de 879 nucleótidos. La identificación de las especies fue apoyada por el análisis de estas secuencias.

Especie (cepa)	Fecha de aislamiento	Origen	Número de acceso GenBank
<i>P. delicatissima</i> (A4)	23/02/06	Bahía de Alfacs, delta del Ebro	DQ530625
<i>P. delicatissima</i> (D3)	20/02/06	Bahía de Fangar, delta del Ebro	DQ530622
<i>P. delicatissima</i> (Ra2)	29/03/05	Puerto de Sant Carles de la Ràpita	DQ990362
<i>P. delicatissima</i> (Ra3)	29/03/05	Puerto de Sant Carles de la Ràpita	DQ990363

Tabla 1. Fecha de aislamiento, origen y accession number de las cepas utilizadas en este estudio.

Las regiones más convenientes para diseñar sondas/cebadores fueron identificadas a partir de los alineamientos obtenidos utilizando los programas CrustalW y BioEdit con las secuencias depositadas en el GenBank y aquellas obtenidas en este estudio. Dentro de estas regiones seleccionadas, no se pudo encontrar una región conservada en las múltiples secuencias variables de *P. delicatissima* (Fig.1).

Los análisis de las secuencias de 879 pb revelaron una gran similitud entre los clones de *P. delicatissima* A4, D3 y Ra2 (>99 %). La secuencia del clon Ra3 presentó una mayor divergencia con respecto a aquellas de los clones Ra2, A4 y D3 (81-82% de similitud) (Tabla 2).

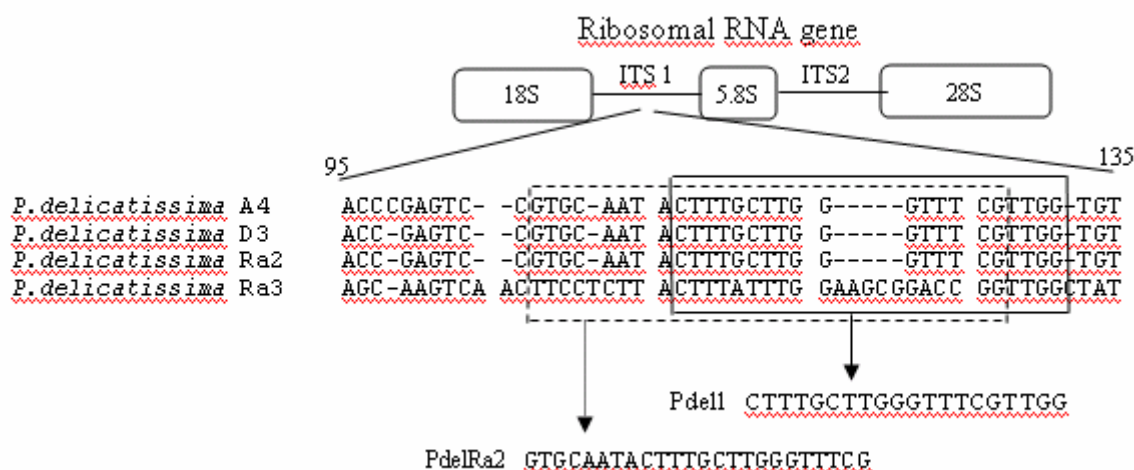


Figura 1. Posición y secuencias de las sondas de oligonucleótidos específicas para *P. delicatissima*.

	D3	Ra2	Ra3
A4	0,9986979	0,9973958	0,8218054
D3		0,9986962	0,8206331
Ra2			0,8194607

Tabla 2. Similitud entre las cepas de *P. delicatissima* (Identities).

Se desarrollaron sondas especie-específicas para la identificación de *P. delicatissima* del Delta del Ebro, dos entre ellas dirigidas a tres clones y una dirigida específicamente a Ra3. Los resultados preliminares con el clon *P. delicatissima* A4 mostraron una hibridación con la sonda Pdel1. Sin embargo, las pruebas positivas con FISH no revelaron señales de fluorescencia ni altas ni homogéneas. Adicionalmente, no se observó ningún marcaje al utilizar el clon *P. delicatissima* D3 con esta sonda. Ningún marcaje fluorescente pudo ser observado al exponer los clones de *P. delicatissima* a las sondas negativas, mientras que la sonda positiva marcó las células. Las imágenes de las pruebas realizadas con FISH con el clon A4 están presentadas en la Fig. 2.

Por otra parte, la PCR en tiempo real utilizando los cebadores PdelRa2 y PdelRa3 mostró una hibridación con sus respectivas secuencias diana utilizando un plásmido ADN como molde (Fig. 3). Resultados similares se obtuvieron al utilizar el cebador PdelRa2 con ADN genómico de *P. delicatissima* o con una mezcla de plásmidos ADN que contenían secuencias ADNr de varias especies de *Pseudo-nitzschia* (*P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. multistriata*, *P. pungens*, clon *P. delicatissima* Ra3) y *Protoceratium reticulatum*, que cuando se utilizó un plásmido ADN conteniendo secuencias ADNr de *P. delicatissima* como molde.

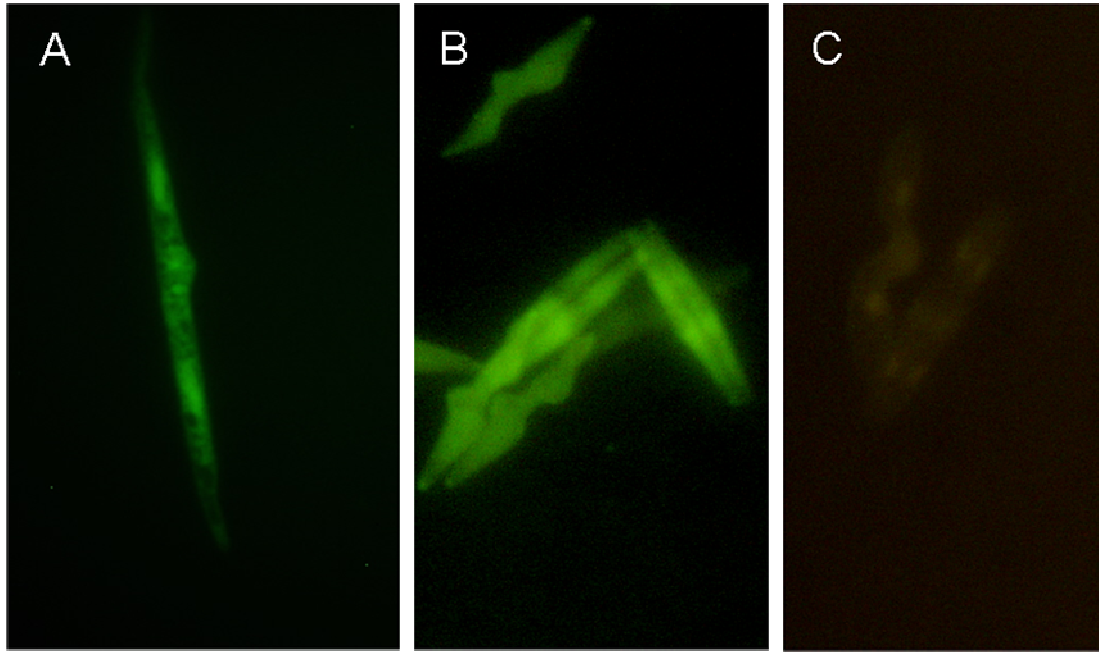


Figura 2. Imágenes de FISH de las pruebas de hibridación del clon *P. delicatissima* A4 con la sonda Pdel1 (A) *P. delicatissima*-específica, la sonda universal UniC (B) como control positivo y la sonda UniR (C) como control negativo.

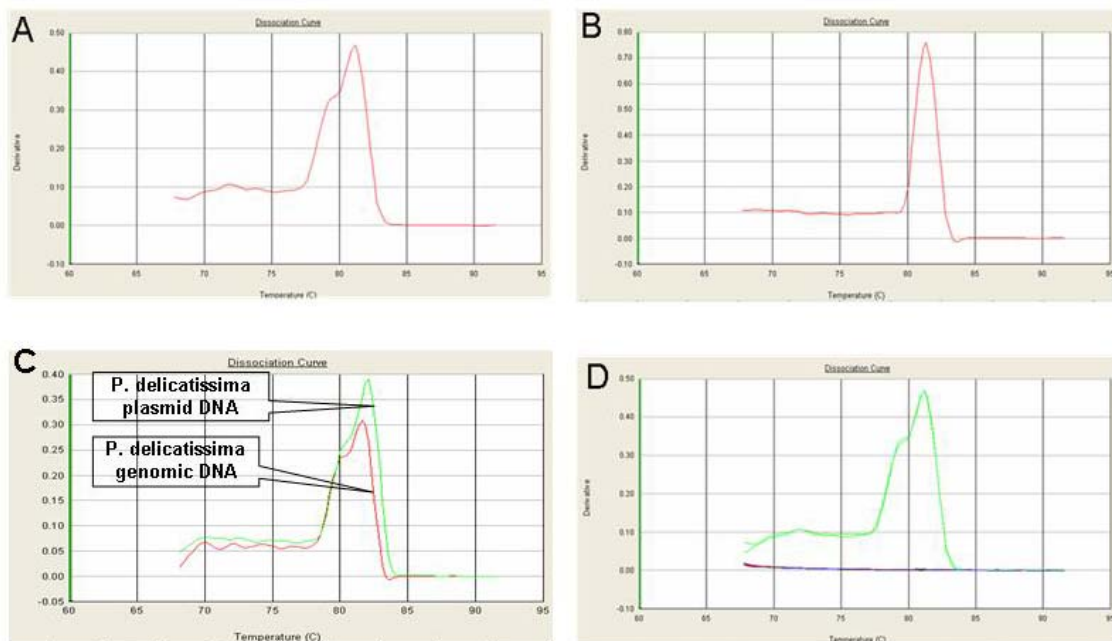


Figura 3. PCR en tiempo real. Curvas de disociación obtenidas utilizando (A): el cebador PdelRa2 con un plásmido ADN conteniendo secuencias ADN_r del clon *P. delicatissima* Ra2; (B): Plásmido de ADN conteniendo secuencias ADN_r del clon de la cepa Ra3 amplificado usando el cebador específico para Ra3; el cebador PdelRa2 con (C): ADN genómico del clon *P. delicatissima* Ra2 y el plásmido correspondiente; (D): una mezcla de plásmidos conteniendo secuencias ADN_r de 23 cepas pertenecientes a 6 especies.

Discusión

Sondas especie-específicas dirigidas a *P. delicatissima* desarrolladas en Norte America [1] presentan diferencias de al menos una base con las secuencias LSU de las cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas en el delta del Ebro (datos no presentados). Debido a esto, se diseñaron los oligonucleótidos Pdel1, PdelRa2 y PdelRa3 específicos de los clones aislados en la costa catalana. De las cuatro secuencias obtenidas a partir de los clones aislados provenientes del Delta del Ebro, una entre ellas (clon Ra3) presentó una gran divergencia con respecto a las demás. Ninguna región conveniente en la región ITS de *P. delicatissima* pudo encontrarse para el desarrollo de un oligonucleótido específico para los cuatro clones. Sin embargo, se diseñaron dos oligonucleótidos dirigidos a los clones *P. delicatissima* A4, D3 y Ra3 y otra dirigida al clon Ra3. Los oligonucleótidos PdelRa2 y PdelRa3 mostraron ser específicas de las secuencias diana en las pruebas de PCR en tiempo real al utilizar una mezcla de plásmidos ADN conteniendo las secuencias de varias especies de *Pseudo-nitzschia* y aquellas de otras especies de fitoplancton como molde. El siguiente paso será utilizar estas dos sondas en combinación para la detección de todas las variantes de *P. delicatissima* utilizando ADN extraído de muestras de campo.

La señal débil observada en la hibridación *in situ* de la sonda Pdel1 con el clon A4 puede indicar que esta sonda tiene problemas para acceder a su secuencia diana o que las células contienen una cantidad de ARNr muy bajo. El contenido del ARNr de nuestros cultivos de *Pseudo-nitzschia* parece ser relativamente bajo haciendo difícil su detección con marcaje fluorescente. De hecho, una leve disminución de la cantidad del ARNr en las células de diferentes cultivos conlleva a un marcaje restringido lo cual podría explicar la ausencia de marcaje observado en algunas de las cepas cuando son marcadas con su sonda específica. No se puede negar que la afinidad de unión entre las sondas y las secuencias diana sea débil. La hibridación *in situ* requiere un emparejamiento de bases estable entre la sonda de oligonucleótidos y la secuencia diana de ARN. En el momento de diseñar los oligonucleótidos anti-sentido (oligómeros) que se unirán con alta afinidad, es conveniente considerar la estructura de la hebra del ARN diana. El incremento de la energía requerida para romper los enlaces intramoleculares de la estructura secundaria reduce la eficiencia de la unión de la sonda. Sin embargo, la optimización de la eficiencia de unión de las sondas y/o de la permeabilidad de la membrana celular puede conseguirse al alterarse las condiciones de hibridación. Adicionalmente, la selección de las sondas basándose en criterios termodinámicos para obtener una alta afinidad con la secuencia diana puede ser útil al reducir el largo proceso de probar varias sondas para una hibridación eficiente con el ARN [7,8].

En conclusión, el protocolo para la hibridación *in situ* aún necesita ser optimizado en términos de eficiencia de la unión de la sonda, además, estas sondas moleculares deben ser probadas con un mayor número de especies de *Pseudo-nitzschia* tanto de cultivos como de muestras de campo e igualmente con especies de microalgas no relacionadas para determinar las

reacciones cruzadas. La secuenciación de clones adicionales de *Pseudo-nitzschia* provenientes de aguas catalanas se esta llevando a cabo actualmente para obtener la diversidad molecular y desarrollar oligonucleótidos específicos para la detección de una variedad mas amplia de especies de *Pseudo-nitzschia*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA-2005-00109-00-00, INIA. El trabajo de E. Garcés está financiado por el contrato Ramon y Cajal del Ministerio de Educación y Ciencia. Sonia Quijano está financiada por una Beca PROMEP, México.

Referencias

- [1] Scholin, C.A., K.R. Buck, T. Britschgi, G. Cangelosi, F.P. Chavez. 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich formats. *Phycologia*. 35:190-197.
- [2] Guillard, R.R.L. Culture methods. 1995. En: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.). *Manual of harmful microalgae*. IOC Manuals and Guides. No. 33, UNESCO. Paris. 45-62.
- [3] Lundholm, N., G.R Hasle, G.A. Fryxell, P.E. Hargraves. 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia lineata*. *Phycologia*. 41:480-97.
- [4] Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel, M.L. Sogin. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding proteins. *Gene*. 71: 491-499.
- [5] Elandoussi, L.M., R. Venail, S. Quijano-Scheggia, M. Fernández-Tejedor, E. Mallat, J. Diogene, E. Garcés, J. Camp, K. Andree. 2006. Molecular tools for the identification of *Pseudo-nitzschia calliantha* and *P. delicatissima* in the Ebre Delta, Spain. In press in "Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae". Copenhagen. Denmark.
- [6] Lundholm, N., O. Moestrup, Y. Kotaki, K. Hoef-Emden, C. Scholin, P. Miller. 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analysis. *Journal of Phycology*, 42: 464-481.
- [7] Mathews, D.H., M.D. Disney, J.L. Childs, S.J. Schroeder, M. Zuker, D.H. Turner. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 101:7287-7292.
- [8] Matveeva, O.V., D.H. Mathews, A.D. Tsodikov, S.A. Shabalina, R.F. Gesteland, J.F. Atkins, S.M. Freier. 2003. Thermodynamic criteria for high hit rate antisense oligonucleotide design. *Nucleic Acids Research*. 31:4989-4994.

Identificación y localización de bacterias asociadas al dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum* mediante TSA-FISH

Lucía Palacios e Irma Marín

*Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias.
Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Cantoblanco, Madrid.*

Resumen

En los ecosistemas acuáticos se observan de manera frecuente interacciones entre bacterias y algas en general y más concretamente microalgas, como los dinoflagelados. Se ha postulado que esta relación alga-bacteria es de tipo simbiote, dado que ambos organismos co-existen y en muchos casos la asociación se mantiene durante largos periodos de tiempo, por lo que se sugiere que las bacterias asociadas a dinoflagelados podrían tener un importante papel como reguladores del crecimiento de las algas, producir sustancias con propiedades alguicidas o incluso toxinas o precursores de las mismas. La identificación y localización de grupos bacterianos específicos asociados a dinoflagelados es esencial para el conocimiento de este tipo de interacciones y el entendimiento de la dinámica de las floraciones algales nocivas (FAN). En este trabajo hemos investigado la asociación entre bacterias y diferentes clones de *A. minutum*, productores de Envenenamiento Paralizante por Marisco (Paralytic Shellfish Poisoning o PSP) por medio de la técnica TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification Fluorescent *In Situ* Hybridization) en combinación con técnicas de microscopía confocal. La localización de bacterias asociadas a las células de dinoflagelado se ha llevado a cabo mediante el uso combinado de calcofluor y yoduro de propidio, dos fluorocromos con diferente espectro de emisión que tiñen específicamente la teca y el DNA del alga respectivamente mediante su unión a la celulosa o al DNA en cada caso, e hibridación mediante TSA-FISH con sondas grupo-específicas para el dominio *Bacteria* marcadas con HRP (Horseradish Peroxidase) y amplificadas mediante residuos de tiramida marcadas con Alexa Fluor 488.

Introducción

Las interacciones alga-bacteria se observan de manera frecuente en los ecosistemas acuáticos. La idea de que las bacterias asociadas a dinoflagelados (DAB) puedan jugar un papel relacionado con los procesos de establecimiento y finalización de las floraciones algales nocivas (FAN) ha sido sugerida en diversos trabajos con anterioridad [11,8,13,2,17,9,14,18]. En los últimos años se ha producido un interés creciente en las DABs debido a su posible implicación en la producción de toxina [8,13,19,23]. La primera evidencia de bacterias asociadas a células de dinoflagelados fue sugerida en 1962 por Silva [24]. Desde entonces hasta

ahora se han publicado numerosos artículos que apoyan o refutan dichas teorías [7,8,4]. La relación entre los dinoflagelados y sus bacterias asociadas se ha postulado de manera generalizada como simbiótica dado que ambos organismo coexisten y esta relación se mantiene a lo largo del tiempo [1], formando un sistema dinámico que Werner denominó *ficosfera* [26,5,7]. La identificación, localización y cuantificación de grupos bacterianos específicos asociados al fitoplancton es de importancia primordial para la evaluación de las asociaciones alga-bacteria en los ecosistemas marinos. Hasta la fecha las técnicas utilizadas para determinar la asociación física entre bacterias y fitoplancton, eran destructivas, poco precisas y no proporcionaban información simultánea sobre la identificación y localización de las bacterias asociadas a dinoflagelados [10,23,15,22,19]. Sin embargo, la hibridación *in situ* utilizando sondas específicas para el 16S rRNA [1,2,6,21], combinada con un método de detección preciso como la microscopía confocal (CLSM) [4,8], puede ser utilizada para la obtención de ambos tipos de información. En este estudio se ha adaptado la técnica de TSA-FISH descrita en trabajos previos [6,21,25,16] con el fin de llevar a cabo la identificación y localización simultánea de bacterias asociadas al dinoflagelado tóxico tecado *Alexandrium minutum* mediante CLSM usando sondas específicas para el 16S rRNA bacteriano.

Para la realización de este estudio se utilizó el clon AL10C del dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum* procedente de Estartit, Cataluña (España) (proporcionado por S. Fraga). Los cultivos de dinoflagelados fueron crecidos en medio L1 [12] preparado con agua marina artificial (Tropic Marin, Germany) con fotoperiodo 16:8 h luz-oscuridad y un nivel de irradiación de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 20°C . Las células de *A. minutum* AL10C fueron recogidas al comienzo de la fase estacionaria (10 días) y fijadas con formaldehído (Merck) a una concentración final del 4% durante 12 h a 4°C e inmovilizadas en membranas de $8 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y 25 mm. de diámetro (Whatman International Ltd.,).

Posteriormente las células fueron sometidas a un tratamiento de eliminación de los pigmentos fotosintéticos y de permeabilización de la teca [20] para permitir una mejor penetración de la sonda marcada con HRP.

Las sondas oligonucleotídicas listadas en la tabla 1 fueron compradas a Biomers.net (Biomers.net, Germany) y marcadas con Horseradish Peroxidase (HRP) tal como está descrito previamente [3,4,25].

Sonda	Secuencia (5'-3')	%FA ^a	Especificidad	(situación en el rRNA)	Referencia
EUB338	GCTGCCTCCC GTAGGAGT	50%	<i>Bacteria</i>	16S (338-355)	3
CFB319a	TGGTCCGTGT CTCAGTAC	50%	CFB*	16S (319-336)	6

^aFormamida (FA) concentración utilizada en el buffer de hibridación

**Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CFB)

Tabla 1. Sondas oligonucleotídicas utilizadas.

La hibridación *in situ* y amplificación de la señal fluorescente (Tyramide Signal Amplification-Fluorescence *in situ* hybridization; TSA-FISH) fue llevada a cabo mediante la adaptación del método previamente descrito por Amann et al., 1992 [3] y Biegala et al., 2002 [6]. La reacción de TSA se llevó a cabo utilizando Tyramide Signal Amplification Kit (Invitrogen) con residuos de tiramida marcados con el fluoróforo Alexa Fluor 488, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La teca y DNA de los dinoflagelados se tiñeron durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad con 15 µl de una mezcla compuesta por 100 µg mL⁻¹ de calcofluor (Sigma Chemical) y 1.5 µM de yoduro de propidio (Invitrogen), lavados, secados, montados con el protector de fluorescencia ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) y cubiertas con un cubreobjetos. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron en un Confocal Espectral Microscope Leica TCS SP2, utilizando los láseres adecuados para la excitación de cada uno de los fluoróforos (Tabla 2) y las imágenes fueron obtenidas con los objetivos 40X y 63X. Las micrografías se tomaron con Leica DFC 350 FX (3.3 Mpixel; 12 bits).

Fluorocromo	Longitud de onda (nm)	
	Excitación	Emisión
Alexa Fluor 488	488	519 (verde)
Calcofluor	380	470 (azul)
DAPI	350	470 (azul)
Ioduro de Propidio	535	617 (rojo)

Tabla 2. Fluorocromos utilizados

Los dinoflagelados poseen una fuerte autofluorescencia que hace imposible la detección de sus bacterias asociadas mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) al enmascarse la señal emitida por las sondas utilizadas en la hibridación. El uso de un sistema de amplificación de la señal fluorescente (TSA) combinado con FISH permite una mejor identificación y localización de las bacterias asociadas a dinoflagelados en comparación con los resultados observados en otros trabajos previamente publicados [6,1,21] (Fig. 1).

Las sondas oligonucleotídicas utilizadas fueron para el Dominio *Bacteria* (EUB338) y específica para *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CFB319a).

Los resultados obtenidos indican de manera inequívoca la presencia de bacterias en el interior de las células de *A. minutum*. El uso combinado de fluorocromos adecuados permite la visualización simultánea de la teca, el núcleo y la señal de hibridación de las células asociadas al dinoflagelado pudiéndose distinguir entre bacterias localizadas en el exterior o en el interior de las células del microalga mediante CSLM permitiendo una localización precisa de las bacterias respecto a las células algales.

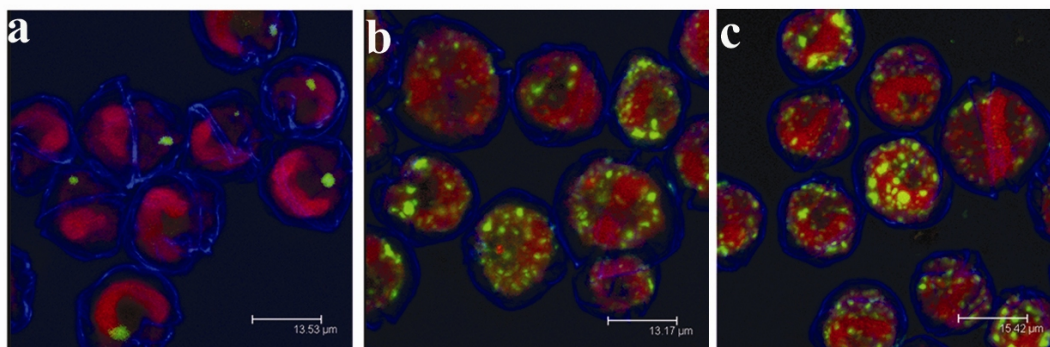


Figura 1. Imágenes CLSM de TSA-FISH de células de *A. minutum*. a) hibridación sin sonda (control negativo); b) con sonda CFB319; c) con sonda EUB338. Las tecas del dinoflagelado fueron teñidas con calcofluor, (azul), el núcleo fue teñido con ioduro de propidio (rojo) y las sondas con Alexa Fluor 488 (verde).

Bibliografía

- [1] Alverca, E., I.C. Biegala, G.M. Kennaway, J. Lewis, S. Franca. 2002. *In situ* identification and localization of bacteria associated with *Gyrodinium instriatum* (Gymnodiales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy. *Eur. J. Phycol.* 37:523-530.
- [2] Amaro, A.M., M.S. Fuentes, S.R. Ogalde, J.A. Venegas, B.J. Suárez-Isla. 2005. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:191-200.
- [3] Amann, R.L., B. Zarda, D.A. Stahl, K.-H. Schöifer. 1992. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3007-11.
- [4] Baker, T.R., G.J. Doucette, C.L. Powell, G.L. Boyer, F.G. Plumley. 2003. GTX4 imposters: characterization of fluorescence compounds synthesized by *Pseudoalteromonas stutzeri* SF/P and *Pseudomonas/Alteromonas* PTB-1, symbionts of saxitoxin-producing *Alexandrium* spp. *Toxicon*. 41:339-347.
- [5] Bell, W.H., R. Mitchell. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Bio. Bull.* 143:265-277.
- [6] Biegala, I., G. Kennaway, E. Alverca, J. Lennon, D. Vault, N. Simon. 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. Using Tyramide Signal Amplification-Fluorescence *in situ* Hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.* 38:404-411.
- [7] Doucette, G.J., C.G. Trick. 1995. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium minutum*. En: Lassus, P., G. Arzul, E. Erad-le Denn, P. Gentien, C. Marcaillou-le-Baut (Eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier. Paris. 33-38.
- [8] Doucette G.J., C.L. Powell. 1998. Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates? En: Reguera B., J. Blanco, M.L. Fernández, T. Wyatt (Eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Santiago de Compostela, Spain. pp.: 406-409.
- [9] Doucette G.J., E.R. McGovern, J.A. Babinchak. 1999. Alguicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae), I. Bacterial isolation and characterisation of killing activity. *J. Phycol.* 35:1447-1454.
- [10] Franca, S., S. Viegas, V. Mascarenhas, L. Pinto, G.J. Doucette. 1995. Prokaryotes in association with a toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture. En: Lassus, P., G. Arzul, E. Erad, P. Gentien, C. Marcaillou (Eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier. Paris. 41-51.
- [11] Furuki, M., M. Kobayashi. 1991. Interactions between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide- EMECS'90. *Mar. Pollut. Bull.* 23:189-193.

- [12] Guillard, R. R. L., P. E. Hargraves. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*. 32:234-6.
- [13] Hold G. L., E.A. Smith, T.H. Birkbeck, S. Gallacher. 2001a. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamerense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36:223-234.
- [14] Kim, M.C., I. Yoshinaga, I. Imai, K. Nagasaki, S. Itakura, Y. Ishida. 1998. A close relationship between alguicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (*Rapidophyceae*) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:25-32.
- [15] Lafay, B., R. Ruimy, C. Rauch de Traubenberg, V. Breittmayer, M.J. Gauthier, R. Christien. 1995. *Roseobacter alguicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Int. J. Syst. Bact.*, 45:290-296.
- [16] Lewis, J., G. Kennaway, S. Franca, E. Alverca. 2001. Bacteria-dinoflagellate interactions: investigative microscopy of *Alexandrium* spp. (Gonyaulacales, dinophyceae). *Phycologia*. 40:280-5.
- [17] Lovejoy, C., J.P. Bowman, G.M. Hallegraeff. 1998. Alguicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class Proteobacteria, Gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodinium* and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2806-2813.
- [18] Mayali, X., F. Azam. 2004. Alguicidal bacteria in the sea and their impact on algal bloom. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:139-144.
- [19] Palacios, L., D. Arahal, B. Reguera, I. Marin. 2006. *Hoeflea alexandrii* sp. Nov., isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* AL1V. *J. Syst. and Evol. Microbiol.* 56:1991-1995.
- [20] Palacios, L., I. Marin. A TSA-FISH improved protocol for the localization and identification of the bacteria associated with the dinoflagellate *Alexandrium minutum* (*Dinophyceae*). *Appl. Environ. Microbiol.* En revisión.
- [21] Pernthaler, A., J. Pernthaler, R. Amann. 2002. Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 68:3094-3101.
- [22] Riemann L., G.F. Steward, F. Azam. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:318-326.
- [23] Rausch de Traubenberg C., M.-L. Geraud, M.O. Soyer-Gobillard, D. Emdadi. 1995. The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. *Eur. J. Protistol.* 31:318-326.
- [24] Silva, E.S. 1962. Some observations on marine dinoflagellate cultures. I. *Prorocentrum micans* Ehr. and *Gymnodinium spinifera* (Clap. and Lach.) dies., *Gonyaulax tamarensis* Leb., and *Peridinium trochoideum* (Stein) Lemm. *Notas e Estudos do Inst. Biol. Mar.* 26:1-21.
- [25] Tujula, N.A., C. Holmstöm, M. Mußmann, R. Amann, S. Kjelleberg, G.R. Crocetti. 2006. A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *J. Microbiol. Methods.* 65:604-607.
- [26] Werner, D. 1992. In symbiosis of plants and microbes. Chapman and Hall. London. pp.:1-2.

Modelo mecanístico para el crecimiento de dinoflagelados tóxicos. Caso de *Protoceratium reticulatum*.

Francisco García*, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, M^a Carmen Cerón,
El Hassan Belarbi y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

* fgarcia@ual.es; Tel. 950015303

Resumen

En este trabajo se presenta un modelo mecanístico para el crecimiento de dinoflagelados. El modelo puede explicar respuestas velocidad de fotosíntesis *versus* irradiancia bajo limitación simultánea del crecimiento por nitratos, fosfatos, CO₂ e irradiancia. El dinoflagelado modelo fue *Protoceratium reticulatum*, productor de yessotoxinas. Las células fueron cultivadas en T-Flask a diferentes irradiancias. El modelo simuló las siguientes variables de respuesta: concentración celular, biovolumen de la suspensión celular, concentración de macronutrientes e irradiancia promedio en el interior del cultivo.

Introducción

La importancia biotecnológica de los dinoflagelados tóxicos marinos ha sido recientemente revisada [1]. Las biotoxinas que producen estas microalgas tienen dos extraordinarios campos de aplicación: (i) en seguridad alimentaria como estándares de referencia para el desarrollo y utilización de técnicas de detección de toxicidad en alimentos procedentes del mar; y (ii) en la elaboración de nuevos fármacos con diferentes actividades. Sin embargo, el desarrollo de estas áreas de aplicación está notablemente ralentizado debido a la dificultad de obtener cantidades suficientes de éstas toxinas para llevar a cabo amplios estudios. El origen de esta dificultad parece residir en los serios obstáculos que plantea el cultivo masivo de estos microorganismos.

Muchas de las especies de interés son fotoautotróficas. Por tanto, el cultivo de éstas debe desarrollarse en fotobiorreactores. El desarrollo exitoso de uno de estos sistemas de cultivo depende, en buena medida, de la obtención de un modelo de crecimiento robusto que simule las principales respuestas fotosintéticas de las células (P) bajo diferentes regímenes de iluminación (I) [2,3].

La mayoría de los modelos P-I carecen de aplicabilidad general porque tienen una base principalmente empírica, no considerando los mecanismos básicos que subyacen en la fotosíntesis. Las constantes cinéticas de tales modelos apenas tienen significado biológico. Frecuentemente, estos modelos no tienen en cuenta fenómenos fotoadaptativos que podrían modificar notablemente las respuestas P-I

proporcionando valores diferentes de los parámetros cinéticos. La mayoría de las respuestas que pueden simular estos modelos son de estado estacionario, obviando por tanto la influencia del tiempo cuando las condiciones medioambientales cambian con éste (ej. cultivos discontinuos, ciclos luz-oscuridad, irradiancia variable, limitación por nutrientes, etc.).

Alguno de estos problemas fueron resueltos por nuestro grupo mediante un modelo mecanístico aplicable a microorganismos fotosintéticos, y en particular a microalgas [4]. El modelo que se presenta rescata los fundamentos de aquél, adaptándolo para que interprete las respuestas más comúnmente observadas en los laboratorios donde se cultivan dinoflagelados. De esta forma, se convierte en una herramienta para el diseño de fotobiorreactores dedicados al cultivo de dinoflagelados pero también para interpretar la productividad primaria de estos microorganismos en aguas naturales.

Materiales y métodos

La especie de dinoflagelado utilizada ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. *P. Reticulatum* es productor de yessotoxinas [5-7]. Los experimentos se desarrollaron en modo discontinuo y por duplicado en T-flask (75 cm²; 3.1 cm de anchura), con medio L1, a 18 °C y ciclo luz-oscuridad 12:12. Los T-flask se iluminaron frontalmente mediante tubos fluorescentes de luz fría (30 W). El rango de irradiancias incidentes ensayado fue 13.6–300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El diámetro celular promedio fue determinado por citometría de flujo (citómetro Coulter Epics XL-MCL) utilizando bolas de látex de tamaños comprendidos entre 5 y 30 μm . Se analizaron los macronutrientes principales: nitratos mediante HPLC y fosfatos mediante espectrofotometría. El contenido en pigmentos y de YTXs [5] se determinó por HPLC de fluorescencia.

Resultados y discusión

En las Figs. 1 y 2 se ha representado la variación con el tiempo de la concentración celular y del biovolumen de la población de células a las diferentes irradiancias ensayadas. En principio, las cinéticas son típicas de cultivos fotolimitados. La irradiancia media de saturación pareció estar en torno a 180 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sin embargo, las medidas de concentración de nitratos y fosfatos durante el tiempo de cultivo, así como las estimaciones de disponibilidad de CO₂ disuelto, nos permitió corroborar que a partir del 4º-5º día los cultivos más iluminados podrían estar limitados por estos nutrientes. Un modelo mecanístico basado en estas observaciones simuló los resultados obtenidos.

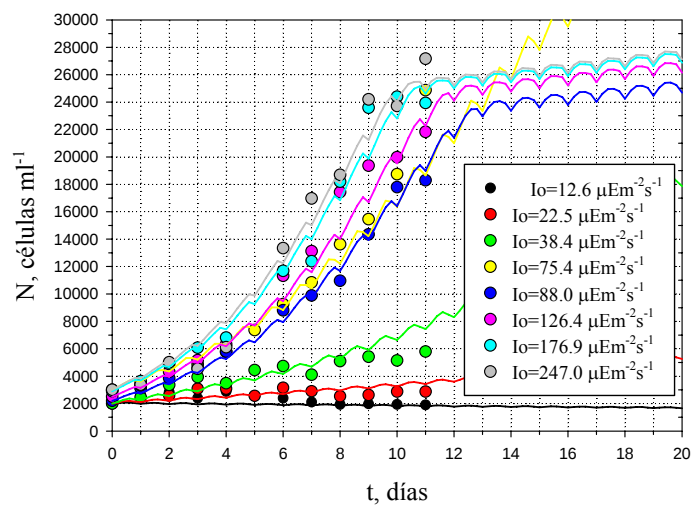


Figura 1. Variación de la concentración de células con el tiempo de cultivo en función de la irradiancia ensayada.

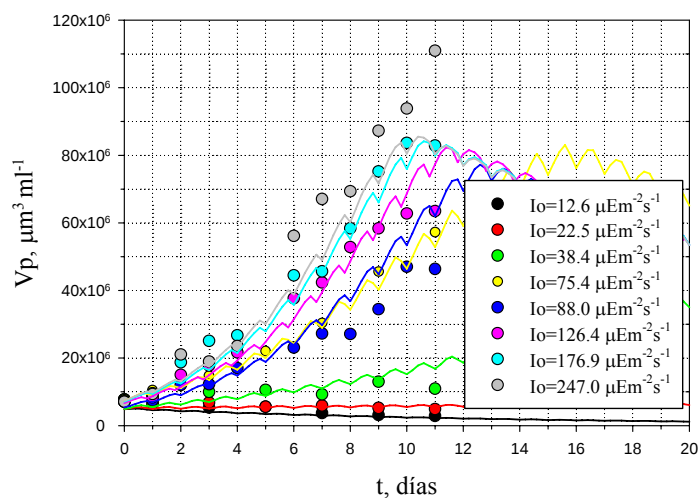


Figura 2. Variación del biovolumen de la población de células con el tiempo de cultivo en función de la irradiancia ensayada.

Las ecuaciones básicas del modelo se describen a continuación:

$$I_m(I_0, t) = \frac{\int_0^L I_0 \cdot \exp(-l \cdot N(t) \cdot K_A(t)) \cdot dl}{L}$$

$$\frac{dx^*}{dt} = k_a \cdot \left[I_m(I_0, t) \cdot (1 - x^*) - \frac{\alpha \cdot x^*}{\kappa + x^*} \right]$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \left[\mu_{mN} \cdot \frac{x^*}{\kappa + x^*} \cdot \frac{[NO_3^-]}{K_N + [NO_3^-]} \cdot \frac{[PO_4^{-3}]}{K_P + [PO_4^{-3}]} \cdot \frac{[CO_2]}{K_C + [CO_2]} - M_N(t) \right] \cdot N(t)$$

$$\frac{dV_p(t)}{dt} = \left[\mu_{mV} \cdot \frac{x^*}{\kappa + x^*} \cdot \frac{[NO_3^-]}{K_N + [NO_3^-]} \cdot \frac{[PO_4^{-3}]}{K_P + [PO_4^{-3}]} \cdot \frac{[CO_2]}{K_C + [CO_2]} - M_V(t) \right] \cdot V_p(t)$$

$$\underbrace{\frac{d[NO_3^-]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE NITRATOS EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[-Y_N \cdot \left(\frac{dN(t)}{dt} \right) \right]}_{\text{CONSUMO DE NITRATOS POR LAS CELULAS}} + \underbrace{\left[Y_N \cdot M_N(t) \cdot N(t) \cdot f \right]}_{\text{LIBERACION DE NITRATOS AL MEDIO POR LISIS CELULAR}}$$

$$\underbrace{\frac{d[PO_4^{-3}]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE FOSFATOS EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[-Y_P \cdot \left(\frac{dN(t)}{dt} \right) \right]}_{\text{CONSUMO DE FOSFATOS POR LAS CELULAS}} + \underbrace{\left[Y_P \cdot M_N(t) \cdot N(t) \cdot f \right]}_{\text{LIBERACION DE FOSFATOS AL MEDIO POR LISIS CELULAR}}$$

$$\underbrace{\frac{d[CO_2]}{dt}}_{\text{ACUMULACION DE CO}_2 \text{ EN EL MEDIO}} = \underbrace{\left[E \cdot k_l a \cdot (S_{CO_2} - [CO_2]) \right]}_{\text{TRANSPORTE DE CO}_2 \text{ DESDE LA INTERFASE AL MEDIO}} - \underbrace{\left[Y_C \cdot \frac{dN(t)}{dt} + m_c \cdot N(t) \right]}_{\text{CONSUMO DE CO}_2 \text{ POR LAS CELULAS}}$$

donde:

- E , factor de aceleración del transporte de CO_2 debido a reacciones químicas del CO_2 en la suspensión celular.
- f , fracción de nitrógeno y fósforo liberada al medio por lisis celular en forma de nitratos y fosfatos respecto del nitrógeno y fósforo total de la célula.
- I_0 , irradiancia fotosintéticamente activa medida en la superficie del cultivo.
- I_m , irradiancia fotosintéticamente activa promediada en el interior del cultivo.
- K_A , coeficiente de extinción de la suspensión.
- k_a , coeficiente de absorción de irradiancia por mol de PSUs.
- K_C , constante de saturación para el carbono.
- K_N , constante de saturación para el nitrato.
- $k_l a$, coeficiente volumétrico de transferencia de CO_2 a través de la superficie libre del cultivo.
- K_P , constante de saturación para el fosfato.
- l , camino óptico recorrido por el haz luminoso en el interior del cultivo.

L ,	espesor del cultivo.
m_C ,	velocidad específica de consumo carbón inorgánico del $\text{CO}_2(\text{aq.})$ para el mantenimiento celular.
$M_N(t)$	velocidad específica de muerte celular.
M_V ,	velocidad específica de disminución de biovolumen de la población.
N ,	concentración celular.
PSU	unidad fotosintética de la célula.
S_{CO_2} ,	solubilidad del CO_2 en agua de mar a la temperatura de cultivo.
t ,	tiempo de cultivo.
V_p ,	biovolumen de la concentración celular.
x^* ,	fracción de PSUs activados en la célula.
Y_C ,	coeficiente de requerimiento de carbón inorgánico del $\text{CO}_2(\text{aq.})$.
Y_N ,	coeficiente de requerimiento de nitrógeno procedente del nitrato.
Y_p ,	coeficiente de requerimiento de fósforo procedente del fosfato.

Letras griegas

α ,	constante cinética cuya inversa representa la pendiente de la curva P-I.
κ ,	fracción de PSUs activados a la que la velocidad de fotosíntesis es la mitad de su valor máximo.
μ_{mN} ,	velocidad específica máxima de crecimiento expresada en base a número de células.
μ_{mV} ,	velocidad específica máxima de crecimiento expresada en base a biovolumen de la población.

Los trazos continuos de las Figs. 1 y 2 representan los valores estimados con el modelo. Como se aprecia, éste simula las variables de respuesta medidas de manera satisfactoria. El modelo también logra explicar respuestas fotosíntesis-irradiancia bajo diferentes condiciones de cultivo: iluminación intermitente (ciclos luz-oscuridad), iluminación continua, iluminación diurna solar, limitación simultánea del crecimiento por nutrientes, fotoaclimatación, condiciones iniciales del inóculo, entre otras. Esta cualidad lo hace idóneo para su empleo en el diseño de fotobiorreactores y en la simulación de HABs.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

Referencias

- [1] Camacho, F.G., J.J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol Adv.* 25:176-94.
- [2] Camacho, F.G., C. Gómez, F.A. Fernández, J.F. Sevilla, E.M. Grima. 1999. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass culture. *Enzymol. Microb. Technol.* 24:164-172.
- [3] Fernández, J.F., F.G. Camacho, J.A.S. Pérez, J.F. Sevilla, E.M. Grima. 1997. A model for Light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioeng.* 55:701-714.
- [4] Rubio, F.C., F.G. Camacho, J.F. Sevilla, Y. Chisti, E.M. Grima. 2003. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 81:459-473.
- [5] Paz, B., J.A. Vázquez, P. Riobó, J.M. Franco. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar Environ Res.* 62:286-300.
- [6] Rodríguez, J.J.G., M.C.C. Garcia, F.G. Camacho, A.S. Miron, E.H. Belarbi, E.M. Grima. 2007. New Culture Approaches for Yessotoxin Production from the Dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Biotechnol. Prog.* 23:339-350.
- [7] Souto, M.L., J.J. Fernández, J.M. Franco, B. Paz, L.V. Gil, M. Norte. 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *J. Nat. Prod.* 68:420-422.

Estudio de la influencia del contenido de macronutrientes del medio en el crecimiento del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*

Asterio Sánchez*, Juan J. Gallardo, M^a Carmen Cerón,
Hassan El Belarbi, Francisco García y Emilio Molina
Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería
* asmiron@ual.es, Tel. 950014025

Resumen

Las necesidades metabólicas de las especies a cultivar tienen una gran importancia a la hora de programar el modo de cultivo para optimizar la productividad de los productos de interés. En este trabajo se presentan dos series de experimentos en los que se realiza un estudio de la influencia de la concentración de dos macronutrientes (nitrato y fosfato) en las principales variables de respuesta del cultivo del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*.

Introducción

En los últimos años existe un gran interés por las toxinas producidas por ciertas especies de dinoflagelados tóxicos, ya que estas pueden utilizarse como estándares de referencia en las técnicas analíticas cualitativas y cuantitativas de alimentos marinos y posibles nuevos fármacos. El interés biotecnológico por estos microorganismos puede ser consultado en una revisión reciente [1]. Basándose en las expectativas despertadas por estos productos parece evidente la necesidad del desarrollo de la tecnología necesaria para la producción a media-gran escala de dichos compuestos. En este desarrollo se hace necesario abordar el problema de una manera conjunta mediante la optimización de las condiciones de cultivo, el estudio de las principales variables fisiológicas y la influencia de estas en la productividad de las toxinas de interés. El diseño de un sistema de cultivo óptimo se hace imprescindible pero no lo es menos el conocimiento de las necesidades metabólicas de la especie en cuestión para conseguir un proceso de producción adecuado.

Se sabe que las proliferaciones naturales de dinoflagelados en las costas se desarrollan usualmente en condiciones de altas concentraciones de NO_3^- . El consumo de nitrato puede verse afectado por la cantidad de luz disponible [2]. Las células pueden liberar de nuevo al medio ciertas cantidades de NO_3^- no utilizadas en su metabolismo para poder consumir eficientemente el exceso de energía producida, ya que en caso contrario se produciría daño en el aparato fotosintético.

En un trabajo reciente [3] se ha mostrado cómo la concentración celular y la velocidad de crecimiento de *P. reticulatum* aumentó al enriquecer el medio de cultivo base (L1) en nitratos y fosfatos. Teniendo en

cuenta estos datos previos, la productividad celular podría verse influenciada por la disponibilidad en el medio de dichos macronutrientes. De hecho, estudios anteriores de asimilación a corto plazo de estos nutrientes con *Gymnodinium catenatum* [4] han mostrado que el consumo de los mismos depende de la concentración disponible y que la velocidad de crecimiento es proporcional a la cuota celular de nitrógeno y fósforo. Otros autores puntualizan que los datos de consumo celular de cualquier nutriente resulta ambiguo si no se aportan datos de volumen o radio celular [5].

Parece, pues, imprescindible, para el desarrollo de un proceso de producción a mediana-gran escala, determinar las necesidades celulares de N y P para poder realizar la optimización de las condiciones de cultivo de dinoflagelados.

Método de cultivo

En este trabajo se realiza un estudio de la posible influencia de las concentraciones disponibles de nitratos y fosfatos sobre las principales variables celulares: concentración, velocidad de crecimiento, viabilidad y volumen celular. Para ello partiendo de la concentración del medio L1 se realizó una serie de experimentos variando la concentración de fosfato desde la concentración de dicho medio hasta 10 veces dicha concentración manteniendo constante la concentración de nitrato correspondiente a la formulación básica. En otra serie de experimentos se varió la concentración de nitrato en el medio desde la original hasta 10 veces dicho valor manteniendo la concentración de fosfato óptima de la primera serie.

Se realizaron medidas diarias de concentración celular, concentración de nitrato y fosfato, diámetro celular promedio, viabilidad y actividad esterasa y auto-fluorescencia. Cada día se repuso la cantidad de nitrato y fosfato consumida hasta el momento de su medida. El contenido en toxinas se cuantificó al final de los ensayos. La especie cultivada fue *P. reticulatum* (GG1AM), amablemente cedida por el Dr. Franco del Instituto Oceanográfico de Vigo. Los cultivos se realizaron en frascos erlenmeyer estáticos y por duplicado bajo ciclo luz-oscuridad 12:12.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en la primera serie de experimentos mostraron, como cabía esperar [4], un consumo de fosfato tanto mayor cuanto mayor fue la concentración en el medio (Figura 1) y un descenso en dicho consumo con la edad del cultivo. No se observó influencia en la viabilidad celular hasta concentraciones superiores a 6 veces la concentración de la formulación del medio L1 (Figura 2), valor a partir del cual ocurrió una disminución casi lineal con la concentración mostrando cierta toxicidad por dicho nutriente (Figura 1). Hasta dicha concentración de fosfato la concentración celular y la velocidad de crecimiento aumentaron con el contenido en fosfato del medio mostrándose, por tanto, dicha concentración como óptima para el crecimiento celular. La velocidad

específica de crecimiento calculada a partir del volumen celular fue, en todos los casos, superior a la calculada a partir de la concentración celular y muy superior a las máximas referenciadas para esta especie.

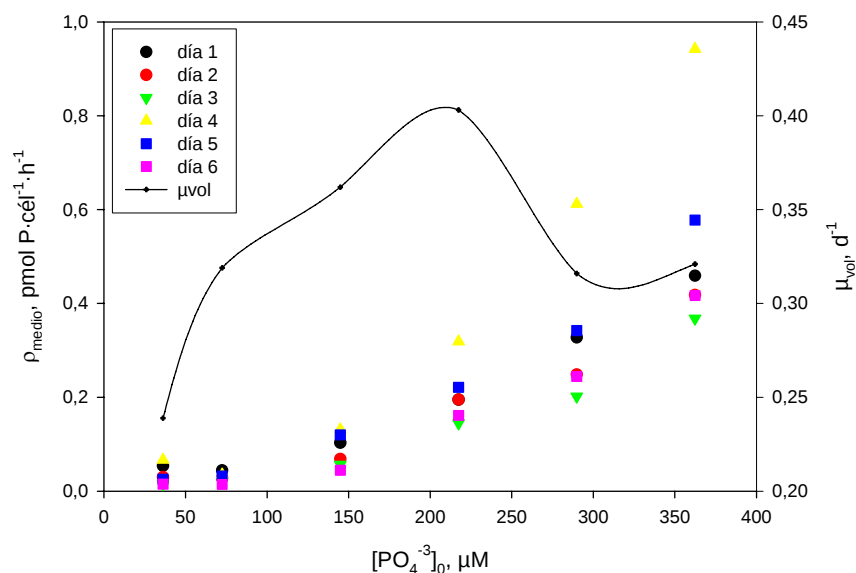


Figura 1. Velocidad de consumo de fosfato y velocidad específica de crecimiento máxima en función del biovolumen generado frente a la concentración de fosfato utilizada en el medio.

El volumen celular creció de forma continuada con la edad del cultivo demostrando que la generación de biomasa es bastante superior a la generación de células y que los datos de crecimiento parece más adecuado expresarlos como biovolumen generado en lugar de células generadas.

El consumo de nitrato mostró una evolución prácticamente independiente a la concentración de fosfato utilizada y sólo disminuyendo ligeramente a altas concentraciones de fosfato, posiblemente debido a la toxicidad celular mostrada por este nutriente. Aumentó ligeramente durante la fase exponencial temprana y disminuyó al final del cultivo. Evolución que indicaría que las células han de generar una cantidad de proteínas y/o enzimas relativamente alta para adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo y, una vez adaptadas, las necesidades de nitrógeno no serían tan altas.

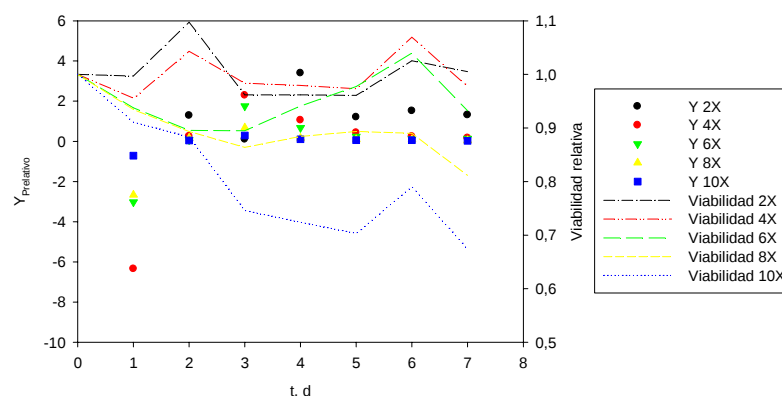


Figura 2. Viabilidad y rendimiento celular relativos respecto al control (medio L1) para el primer experimento.

En la Fig. 3 se puede observar que, aparentemente, la cantidad de fosfato disponible no tiene influencia en el contenido celular de toxina, ya que en todas las concentraciones utilizadas no se observan diferencias significativas con el correspondiente al inóculo al inicio del experimento.

El ion fosfato, como se ha observado con otras especies [6], incrementa el crecimiento celular pero en esta especie parece no influir en las rutas de producción de yessotoxinas, incluso a concentraciones inhibitorias o tóxicas para el crecimiento. Sin embargo, como la productividad de toxina es proporcional a la concentración celular al utilizar una concentración de fosfato 6 veces superior a la concentración de L1 se maximizaría la productividad de toxinas.

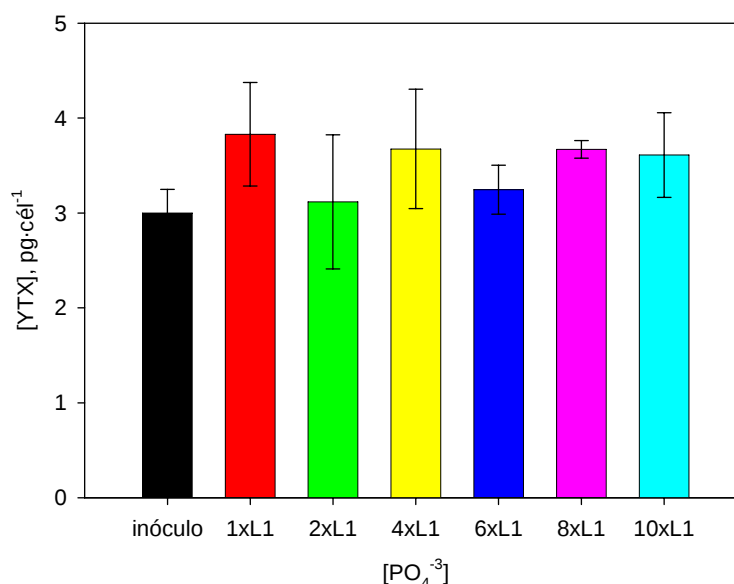


Figura 3. Concentración celular de yessotoxinas frente a la concentración de fosfato en el medio para el primer experimento.

Para la segunda serie de experimentos se utilizó la concentración de fosfato óptima (6 veces la correspondiente al medio L1). No se apreció diferencia en la velocidad específica de crecimiento ni en la viabilidad celular con la concentración de nitrato utilizada. Sólo a partir de las concentraciones 4 veces superiores a las correspondientes al medio L1 se apreció la aparición de fase estacionaria a partir del sexto día, mientras que para las concentraciones original y dos veces superior no aparece esta fase estacionaria. Este comportamiento indicaría que a partir del sexto día hay algún otro nutriente que está limitando el crecimiento como el CO_2 o algún micronutriente. Se observó un consumo de fosfato independiente de la concentración de nitrato utilizada pero que disminuyó de una forma continuada con el tiempo, como ocurriera en el ensayo anterior.

El consumo de nitrato no sigue una tendencia generalizada ni con la concentración ni con el tiempo. Como ya se observó en un trabajo anterior [3] hay cierta liberación de nitrato al medio lo que hace que haya días de velocidad de consumo (Fig. 4) y rendimiento celular negativo. Sí se observa un consumo importante durante la fase lag, que duró dos días, y tanto más cuanto mayor fue la concentración disponible, cierta liberación durante la fase exponencial pura, un consumo reducido durante la fase lineal y liberación en la fase estacionaria. Estos fenómenos se vieron tanto más acusados cuanto mayor fue la concentración de nitrato ensayada (Fig. 4).

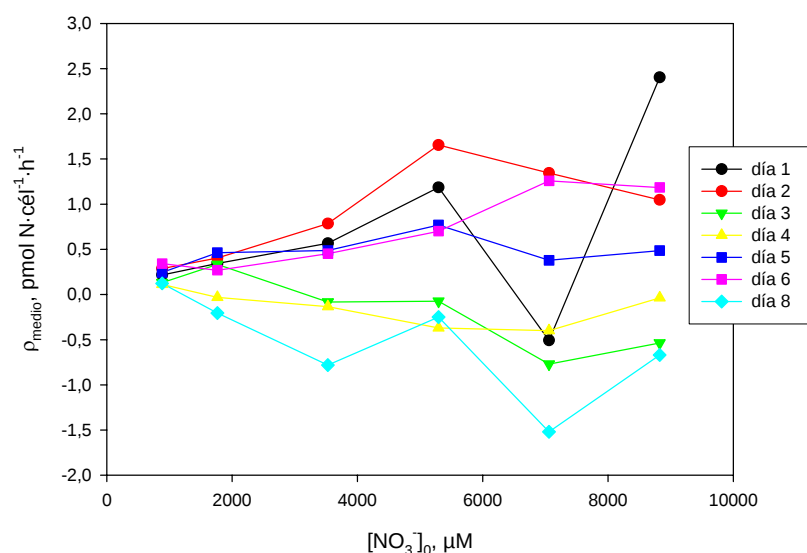


Figura 4. Velocidad específica de consumo de nitrato en función del tiempo frente a la concentración inicial en el medio.

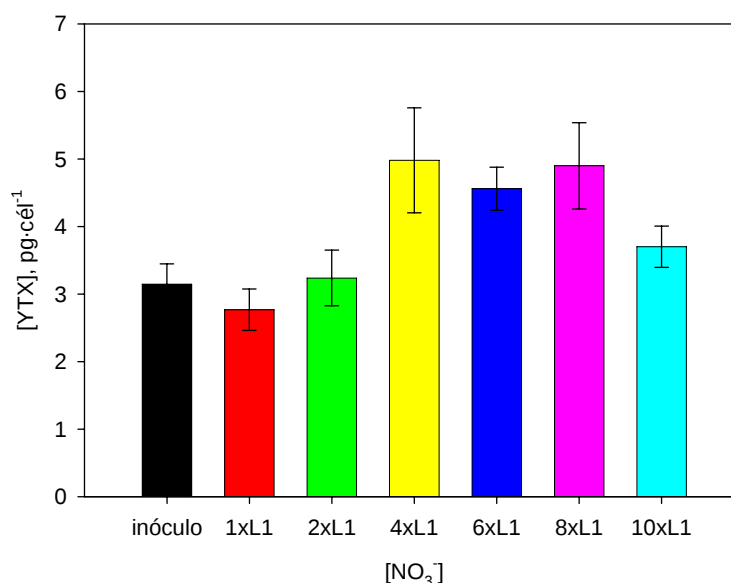


Figura 5. Concentración celular de yessotoxinas frente a la concentración de nitrato utilizada en el segundo experimento.

En la Fig. 5 se puede apreciar que hay cierta estimulación en la producción de toxinas a partir de concentraciones de nitrato 4 veces superiores al cultivo control (L1). La disponibilidad de nitrato a partir de la concentración correspondiente al medio L1 no parece influir sobre la producción celular pero a altas concentraciones estimula la producción de toxinas, a pesar de que estas moléculas no contienen nitrógeno. Quizás la entrada en fase estacionaria a altas concentraciones de nitrato por limitación de otro nutriente pueda estimular las rutas metabólicas de producción de toxinas.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

Bibliografía

- [1] Camacho, F.G., J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*. 25:176-194.

- [2] Lomas, M.W., P.M. Glibert. 1999. Interactions between NH_4^+ and NO_3^- uptake and assimilation: Comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures. *Mar. Biol.* 133:541-551.
- [3] Gallardo Rodríguez, J.J., M.C. Cerón García, F. García Camacho, A. Sánchez Mirón, E.H. Belarbi, E. Molina Grima. 2007. New culture approaches for yessotoxin production from the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Biotechnol. Progr.* 23:339-350.
- [4] Yamamoto, T., Y. Kataoka, S.J. Oh. 2004. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science.* 70:108-115.
- [5] Lomas, M.W., P.M. Gilbert. 2000. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology.* 36:903-913.
- [6] Wang, D. Z., D. P. H. Hsieh. 2002. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture. *Marine Pollution Bulletin.* 45:286-289.

Daño celular por fuerzas de corte en cultivos de dinoflagelados tóxicos

Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, M^a Carmen Cerón,
El Hassan Belarbi, Francisco García* y Emilio Molina
Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería
*fgarcia@ual.es; Tel. 950015303

Resumen

La sensibilidad celular a las fuerzas de corte es el principal obstáculo para el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos con fines comerciales. En el presente trabajo se propone un protocolo para determinar umbrales de daño por fuerzas de corte asociadas a turbulencia continua e intermitente en cultivos de dinoflagelados tóxicos. El dinoflagelado modelo ha sido *Protoceratium reticulatum*. Esta especie ha resultado ser extraordinariamente frágil, mucho más que otras líneas celulares que hasta ahora eran considerados los más sensibles a fuerzas de corte, como los eritrocitos.

Introducción

Los dinoflagelados tóxicos, además de ser fuente de toxinas para la elaboración de estándares, producen metabolitos bioactivos únicos con actividades diversas, desde antibióticos hasta moléculas con fuerte actividad anticancerígena. Por éstas, y otras razones, han atraído la atención de un gran número de investigadores en diferentes campos [1].

Los avances en investigaciones médicas, farmacológicas y en el desarrollo de métodos analíticos fiables requieren de la provisión de toxinas puras en cantidad y calidad suficiente. Sin embargo, sólo unas pocas están disponibles comercialmente, con precios muy elevados y calidad desigual.

Los intentos de cultivar masivamente dinoflagelados en biorreactores convencionales para satisfacer el notable aumento de la demanda de biotoxinas no han tenido demasiado éxito, entre otras razones, por la alta sensibilidad de éstos a las fuerzas de corte [2-6]. Todas las especies estudiadas son extremadamente sensibles a la agitación, aunque no comparten un mismo umbral de daño [5]. Otros efectos relacionados con el daño celular por fuerzas de corte son alteraciones del ciclo celular y producción de peróxidos.

Estudios previos han revelado que el nivel de daño parece depender de la esfuerzo cortante promedio, de la duración del periodo agitado y del momento del día en el que se introduce dicha agitación [7-9]. Sin embargo, dichos estudios se diseñaron con fines medioambientales y no ingenieriles. Para salvar esta distancia, en este trabajo se ha elaborado un protocolo de cultivo que nos permite valorar las posibilidades de una cepa para ser

cultivada masivamente. A través de la alteración de factores tales como estrés de corte, tiempos de ciclo de exposición a la turbulencia y fracción de tiempo de exposición, se pueden estudiar los mecanismos de inhibición del crecimiento por fuerzas de corte y detectar umbrales de estrés en dinoflagelados.

Materiales y métodos

La especie cultivada fue *P. reticulatum* GG1AM, amablemente cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. Los cultivos se realizaron en matraces erlenmeyer dispuestos sobre un agitador orbital, usando medio de cultivo L1, ciclos luz-oscuridad 12:12 y temperatura de 18 °C. En la Tabla 1 se recogen las condiciones del diseño experimental. La evolución de la población celular fue seguida a través de medidas diarias de concentración celular. Una vez detectado el umbral de daño se realizaron ensayos siguiendo el diámetro celular promedio, viabilidad y actividad esterasa y auto-fluorescencia por citometría de flujo. En cultivos expuestos a estrés promedio inhibitorio (no letal), se analizó el ciclo celular en mitad de la fase exponencial, utilizando yoduro de propidio tras un tratamiento previo de 30 minutos con RNasaH ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los resultados fueron analizados y compensados mediante FlowJo software (Tree star, Ashland, Oregon). Así mismo, para dicho ensayo se cuantificaron el contenido en yessotoxinas y en lipoperóxidos en células una vez alcanzada la fase estacionaria.

Resultados y Discusión

La Fig. 1 ilustra los datos de velocidad específica de crecimiento relativos al cultivo control no agitado en función de la velocidad de corte promedio aplicada a la suspensión celular. El umbral de daño para esta especie estaría alrededor de 0.1 s^{-1} . Este valor es varios órdenes de magnitud inferior a los valores mínimos de estrés de corte existentes en fotobio-reactores convencionales (ver Fig. 1).

Los ensayos C7 a C14 de la Tabla 1 se realizaron al mismo estrés promedio pero diferente régimen de turbulencia. Se registraron valores muy diferentes de la velocidad específica de crecimiento relativa. Las Figs. 2 y 3, para estos cultivos, muestran la influencia que la frecuencia de agitación y el periodo (día o noche) pueden tener cuando los cultivos son expuestos a fuerzas de corte inhibitorias. Claramente, la agitación durante el periodo nocturno tuvo un efecto más nocivo sobre el crecimiento que cuando ésta se aplicaba durante el periodo luminoso.

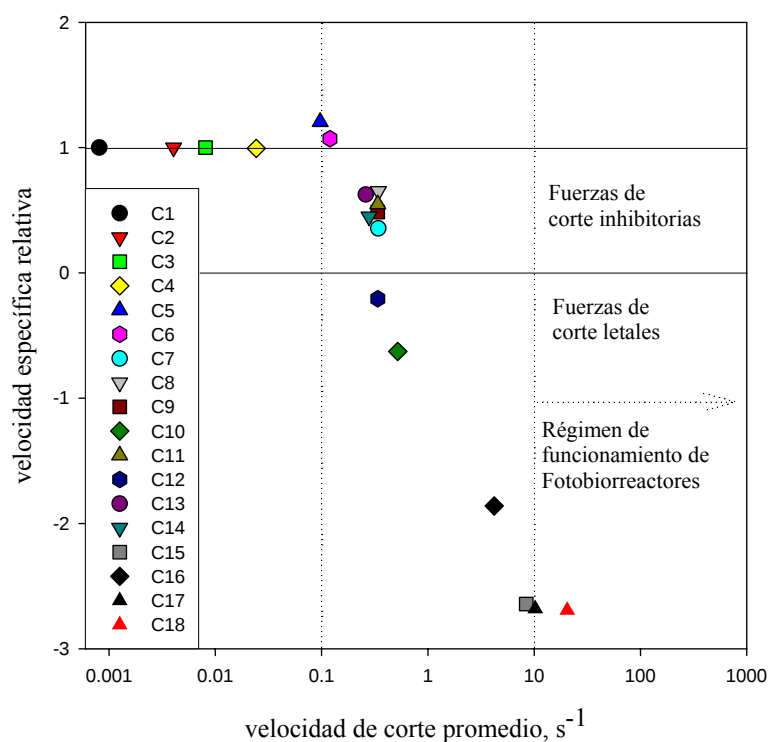


Figura 1.-Efecto de la velocidad de corte promedio sobre el crecimiento de *P. reticulatum*, expresado como la velocidad específica de crecimiento relativa a un cultivo control no agitado.

Ensayo	Características del régimen de agitación					
	t	t _e	t	Nº	*Fas	Re
C1	0	0.9	1	12	L	9934
C2	0	0.9	1	12	L	9934
C3	0	0.8	1	12	L	9934
C4	0	0.5	1	12	L	9934
C5	2	0	2	1	LO	9934
C6	2	0	2	1	LO	9934
C7	6	6	1	2	LO	1986
C8	1	1	2	12	LO	1986
C9	0	0.5	1	24	LO	1986
C10	1	1	2	12	LO	1986
C11	1	12	2	1	L	1986
C12	1	12	2	1	O	1986
C13	1	1	2	6	L	1986
C14	1	1	2	12	LO	1586
C15	2	0	2	1	LO	3973
C16	1	1	2	12	LO	3973
C17	1	1	2	12	LO	6510
C18	2	0	2	1	LO	6510

*L= luz; O=oscuridad; LO=luz y oscuridad

Tabla 1. Condiciones experimentales de los ensayos realizados. (t_c=t_a+t_e, tiempo de ciclo de la turbulencia; t_a=periodo de turbulencia en el ciclo; t_e=periodo de reposo en el ciclo).

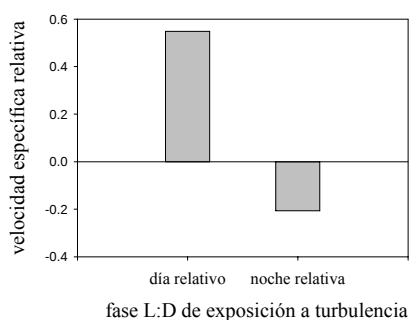


Figura 2.-Influencia de la agitación en diferentes fases del periodo L:D.

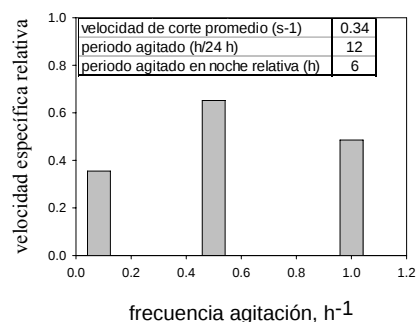


Figura 3.-Influencia de la frecuencia de agitación.

La Fig. 4 resume el efecto de las fuerzas de corte inhibitorias (no letales) sobre el ciclo celular en relación a un cultivo control estático. Puede observarse que en el cultivo agitado la fracción de células en fase S fue considerablemente mayor desde las 19:00 h hasta las 9:00 h del día siguiente. Sin embargo, esto no se tradujo en un aumento en el número de células respecto del control. Sino todo lo contrario, la fracción de células en fase G2/M fue mayor en el control desde las 3:00 h a las 9:00 h.

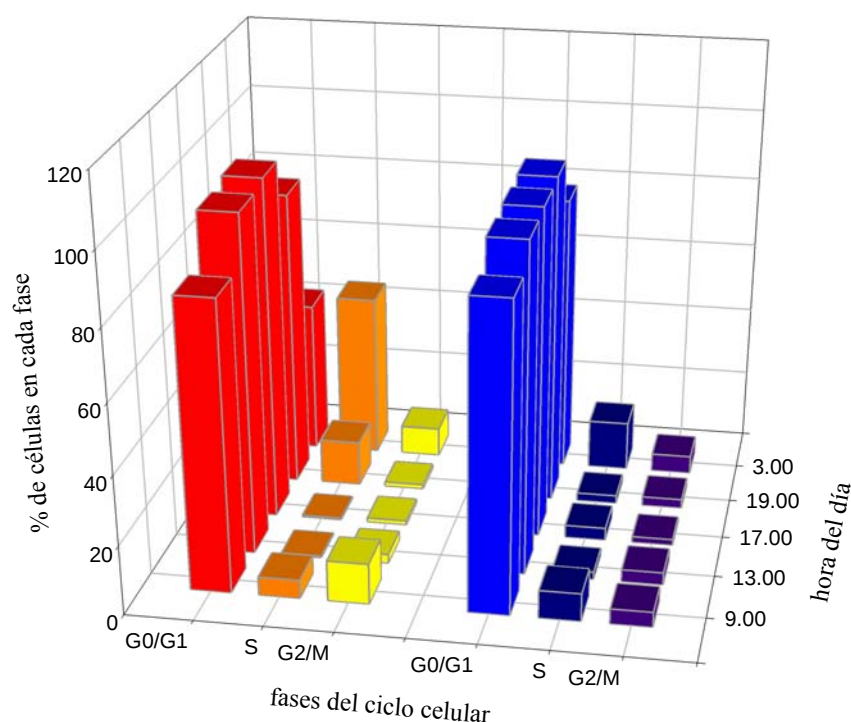


Figura 4.-Efecto de un nivel de turbulencia inhibitoria del crecimiento sobre el ciclo celular de *P. reticulatum*.

La progresión en el ciclo celular de los dinoflagelados está parcialmente ligada al reloj circadiano. De esta manera, las células que han completado ciertos requerimientos previos y pueden progresar en el ciclo celular comenzarán la fase de síntesis al final de la fase luminosa. La mitosis se producirá en un periodo que comprende las últimas horas de oscuridad y las primeras de luz. La agitación durante la fase oscura produce un daño mucho más acusado (ver Fig. 2). Esto es consistente con los datos publicados por Juhl [8], que encontró mayor sensibilidad en los periodos cercanos a la división celular. También Pollinger y Zemel [9] produjeron inhibición agitando durante las 2 últimas horas de la fase oscura y no observaron efecto trasladando la agitación a la fase luminosa. Sin duda, las fases más sensibles a las fuerzas de corte son las que preceden la mitosis. El daño estructural que sufre una célula en un momento cercano a la división es claramente mayor porque su volumen es mayor y porque la conformación de la membrana celular está alterándose para permitir la escisión en dos células. Sin embargo, los mecanismos de daño a través de la alteración del ciclo celular son más complejos. En la Figura 5 se han representado los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular relativos a cultivos control estáticos. Lo que se observa para la 2ª hora de luz es un aumento de células en fase S para los cultivos agitados, que es, además, proporcional a la extensión del periodo agitado a todo el ciclo L:D (el estrés promedio es el mismo). Yeung y Wong [11], con *H. triquetra* y *C. cohnii*, encontraron detención de la progresión del ciclo en fase G1 tras introducir agitación continua. Por tanto, es probable que exista algún punto de restricción en G1 que se mantenga como resultado de las fuerzas de corte.

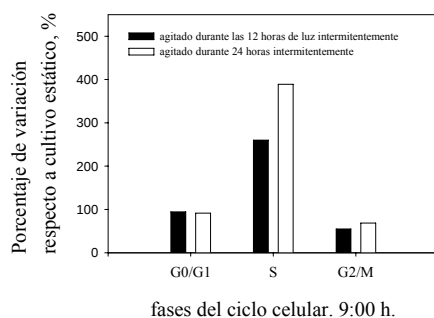


Figura 5.- Porcentaje de variación de fases del ciclo celular para cultivos sometidos a agitación

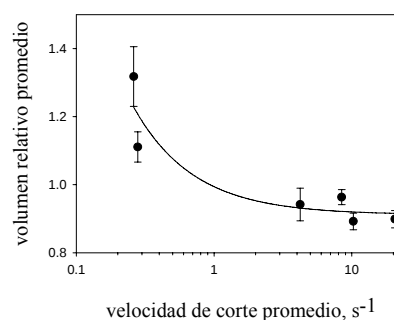


Figura 6.-Biovolumen relativo para diferentes intensidades de agitación

En nuestros ensayos, con agitación intermitente, la progresión en el ciclo continuaba, observándose una alteración en el porcentaje de células en fase S. Por otro lado, si como hemos argumentado, las células que están a punto de dividirse son más sensibles a las fuerzas hidrodinámicas, y se rompen antes de completar la mitosis, es improbable observar una posible detención en G2/M. El daño estructural y la mecano-transducción como resultado de las fuerzas de corte tendrán, probablemente, efecto sobre los

diferentes puntos de restricción del ciclo celular de los dinoflagelados, a tenor de los datos referenciados y los aquí expuestos.

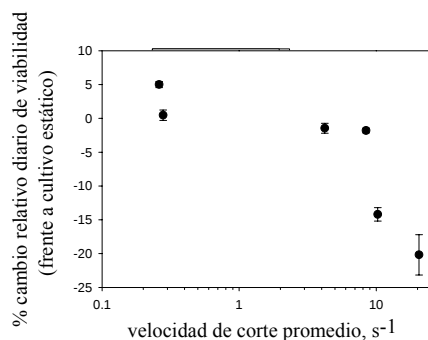


Figura 7.- Cambio relativo en la viabilidad celular para diferentes intensidades de agitación.

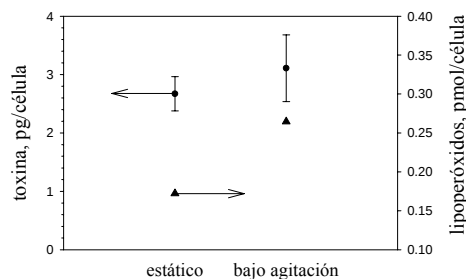


Figura 8.- Contenido de yessotoxina y lipoperóxidos por célula para cultivo estático y agitado

Las Figs. 6 y 7 muestran los cambios relativos en tamaño y viabilidad para cultivos sometidos a diferentes intensidades de agitación. Hasta aproximadamente $1 s^{-1}$ se observa aumento del biovolumen y de viabilidad respecto al cultivo estático. A partir de este punto se registra disminución del biovolumen relativo y de viabilidad con el aumento de la fuerza de corte promedio. Está referenciado [2-5] un aumento de volumen para células de dinoflagelados sometidas a fuerzas de corte. La pérdida de viabilidad no había sido referenciada antes. Al sobrepasar cierto umbral (en este caso $1 s^{-1}$) la rotura de células es más acusada, siendo más proclives las de mayor volumen. Esto explicaría la disminución de tamaño en los agitados. Además, el estrés oxidativo y el consiguiente desencadenamiento de procesos de apoptosis podrían acelerarse al aumentar la energía hidrodinámica disipada ya que existe para dichos niveles de agitación (por encima de $1 s^{-1}$) pérdida de viabilidad celular. Prueba de la aparición de estrés oxidativo es el aumento en el contenido de lipoperóxidos en los cultivos estresados fluidodinámicamente. En este sentido, los resultados de la Fig. 8, obtenidos con fuerzas de corte inhibitorias, muestran un aumento tanto del contenido de lipoperóxidos como de toxinas respecto al cultivo control.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

Referencias

- [1] Camacho, F.G., J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates, *Biotechnology Advances*. 25:176-194.
- [2] Berdalet, E., M. Estrada. 1993. Effects of turbulence on several dinoflagellate species. Elsevier Science Publishers B.V. 737-739.
- [3] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2000. Effect of growth conditions on flow-induced inhibition of population growth of a red-tide dinoflagellate. *Limnology and Oceanography*. 45:905-915.
- [4] Juhl, A.R., V.L. Trainer, M.I. Latz. 2001. Effect of fluid shear and irradiance on population growth and cellular toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnology and Oceanography*. 46:758-764.
- [5] Sullivan, J.M., E. Swift. 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*. 39:83-94.
- [6] Thomas, W.H., C.H. Gibson. 1990. Quantified small-scale turbulence inhibits a red tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. *Deep-Sea Research*. 37:1583-1593.
- [7] Berdalet, E. 1992. Effects of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. *Journal of Phycology*. 28:267-272.
- [8] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2002. Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *Journal of Phycology*. 38:683-694.
- [9] Pollinger, U., E. Zemel. 1981. In situ and experimental-evidence of the influence of turbulence on cell-division processes of *Peridinium-Cinctum* Forma Westii (Lemm) Lefevre. *British Phycological Journal*. 16:281-287.
- [10] Paz, B., J.A. Vázquez, P. Riobó, J.M. Franco. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar. Environ. Res.* 62:286-300.
- [11] Yeung, P.K.K., J.T.Y. Wong. 2003. Inhibition of cell proliferation by mechanical agitation involves transient cell cycle arrest at G1 phase in dinoflagellates. *Protoplasma*. 220:173-178.

Purificación de cultivos mediante separación de células con citometría de flujo

Sil-lá Abad, Isabel Rodríguez Carvajal y Javier Gilabert

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental,

Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT),

Alfonso XIII, 44 30203-Cartagena.

sil_la.abad@upct.es;

Resumen

Dos especies de dinoflageladas (*Amphidinium carterae* y un dinoflagelado desnudo de pequeño tamaño) fueron aislados del puerto de Cartagena mediante técnicas clásicas de separación en placa y dilución. Los cultivos se purificaron posteriormente mediante “sorter” con citometría de flujo y se mantuvieron viables. Aquí describimos el protocolo seguido, las dificultades encontradas en el proceso y las soluciones encontradas.

Introducción

El mantenimiento de las colecciones de cultivo es una tarea fundamental en cualquier laboratorio de fitoplancton tóxico. El aislamiento y purificación de cultivos requiere precisión y tiempo. La citometría de flujo es una técnica que puede ayudar en estas tareas. Los separadores de células (*sorters*) permiten la adquisición de un elevado número de células de las mismas características por unidad de tiempo. El citómetro permite definir las características de las células al menos con cinco parámetros, normalmente tres de fluorescencia y dos de dispersión de la luz, en función del equipamiento del instrumento. Los citogramas – gráficos que enfrentan dos o tres de los parámetros medidos por el citómetro- de muestras naturales permiten distinguir nubes de puntos correspondientes a células con características citométricas relativamente homogéneas. Suelen mostrar clusters de células bien diferenciados cuando las características citométricas son diferentes y muy solapados cuando las características son homogéneas. Aunque la citometría no es una técnica taxonómica *per se* puede de gran utilidad para diferenciar organismos una vez separados e identificados. En nuestro caso hemos trabajado sobre dos cultivos en diferentes estados de conservación y contaminación por otras células para purificar el cultivo mediante la separación automática de las células cultivadas.

Los cultivos aislados con el método de diluciones seriadas en microplacas y posteriormente escalados a tubos de ensayo y matraces a menudo no quedan completamente separados, quedando algunos ejemplares de otras especies que en ocasiones proliferan y compiten con la cepa de interés. Para realizar estudios posteriores se requieren monocultivos de una sola cepa. También ocurre que en ocasiones los cultivos se estropean por exudados celulares y por células muertas quedando un cultivo sucio, aunque no contaminado por otras células. Habitualmente la limpieza de estos cultivos se hace mediante diluciones pero hay ocasiones en que los cultivos quedan excesivamente estropeados y la técnica de diluciones resulta

costosa, lenta y no siempre con garantía de éxito. La citometría de flujo es la técnica adecuada para este tipo de trabajo en que se quiere separar las células sanas de las otras muertas o del detritus originado por el propio cultivo. En caso de contaminación por otro tipo de células, sobre todo cuando éstas son de tamaño mucho menor, la citometría es la técnica más precisa para ello.

Material y métodos

Del puerto de Cartagena se aislaron dos cepas, la primera de *Amphidinium* sp y la segunda de un dinoflagelado pequeño y desnudo probablemente del género *Karenia*. Los cultivos se aislaron mediante técnicas convencionales de aislamiento con micropipeta, diluciones seriadas y cultivo en placa de pocillos para su posterior escalado a matraces (250 mL) con medio L. Los cultivos se dejaron contaminar en laboratorio para intentar su posterior purificación mediante separación con citómetro de flujo (FACScalibur de Becton-Dickinson) equipado con un *sorter* mecánico de alta velocidad. Los parámetros utilizados por el citómetro fueron la fluorescencia verde (FL1), naranja (FL2) y roja (FL3) y la dispersión de la luz hacia delante (FSC) y lateral (SSC).

En primer lugar se procedió al lavado de los contenedores y los conductos por donde circula el fluido envolvente "*sheath fluid*". Para ello se lavaron con etanol 70% según el protocolo establecido pro Beckton-Dickinson para el tratamiento de muestras estériles. El contenedor de fluido envolvente fue limpiado 3 veces agitando fuertemente para el lavado de las paredes y posteriormente rellenado (3 L) con etanol 70%. Los tubos de recogida de muestras a la salida del *sorter* fueron también esterilizados con etanol. En el dispositivo de toma de muestras del citómetro se introdujo un tubo también relleno de etanol 70%. En nuestro caso el citómetro dispone de 3 tubos de ensayo de recogida de las células separadas por el *sorter*. El citómetro estuvo en funcionamiento con etanol 70% y con el *sorter* activado hasta el llenado total de los 3 tubos de recogida de muestras. Con ellos se aseguraba que todo el circuito interno quedaba completamente estéril.

Una vez acabada la limpieza del citómetro se procedió a sustituir el depósito de líquido envolvente por otro previamente esterilizado con etanol 70% y conteniendo el medio de cultivo L. Para evitar las impurezas y cristales que suelen quedar en el medio tras su autoclavado éste se filtró dos veces por filtro de fibra de vidrio GF/F (con soporte Millipore cat. N° XX4304700) en un sistema impulsado por bomba peristáltica y en campana de flujo laminar. Todos los tubos y soportes para filtros fueron previamente esterilizados. El tubo de toma de muestra del citómetro fue sustituido por otro conteniendo el medio de cultivo doblemente filtrado. Se repitió el procedimiento de limpieza del citómetro para asegurar que no quedara ningún resto de etanol en los circuitos internos del sistema incluidos los que van a los tubos donde se recogen las muestras separadas. Tras este procedimiento se procedió a colocar los tubos de muestra con los cultivos contaminados para su purificación.

Resultados y discusión

La Fig. 1 muestran algunos ejemplares de las especies aisladas de *Amphidinium* en cultivos envejecidos.

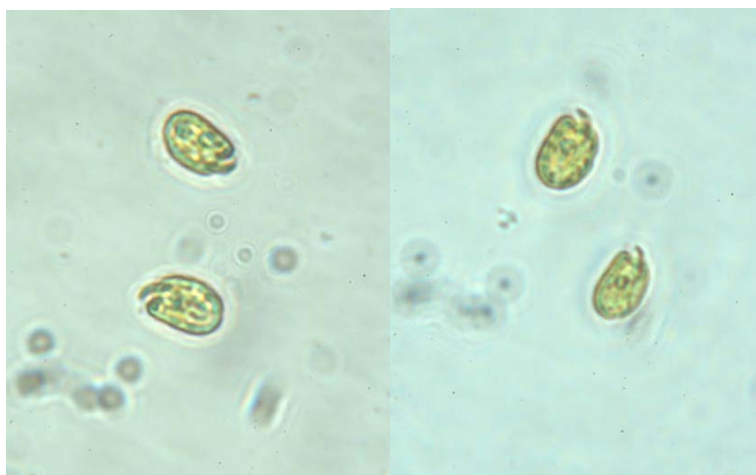


Figura 1. Ejemplares de *Amphidinium* en cultivos envejecidos antes de la purificación con citometría de flujo.

Los resultados obtenidos por el citómetro de flujo para *Amphidinium* se muestran en la Fig. 2 donde se incluyen los histogramas para cada uno de los parámetros medidos y los citogramas de dispersión lateral de la luz (SSC) frente a la dispersión hacia delante (FSC). En este caso se aprecia una población bien definida aunque con cierta heterogeneidad lo que se debe a diferencias morfológicas de las células pero también a otros componentes detríticos o de otro tipo de células. En el citograma se delimitó una región de separación de células (marcada en rojo) y se aislaron cantidades relativamente elevadas con el fin de mejorar la viabilidad de los cultivos posteriores. El resultado fue satisfactorio obteniéndose tres tubos de ensayo con densidades del orden de $60.000 \text{ cel mL}^{-1}$ cada uno.

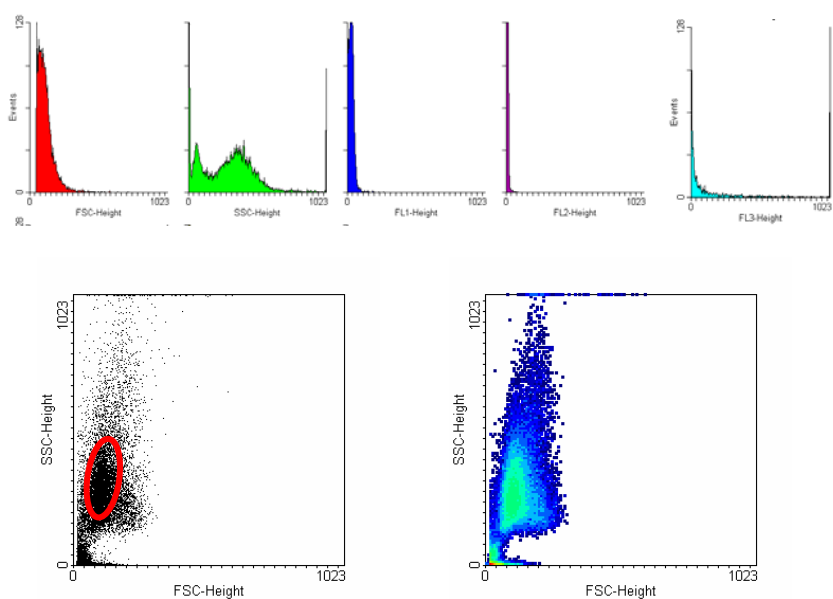


Figura 2. Citogramas para *Amphidinium*. En la parte superior se muestran los histogramas para FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3. En la parte inferior se representan los gráficos de dispersión de puntos de SSC frente a FSC. En el gráfico de la izquierda se ha marcado la ventana de separación de células para el *sorter*, en el de la derecha se muestra el mismo gráfico con más eventos con los colores indicando la densidad de eventos.

La Fig. 3 muestran algunos ejemplares de *Amphidinium* procedentes de cultivos crecidos a partir de células “*sorteadas*” mediante el citómetro de flujo.

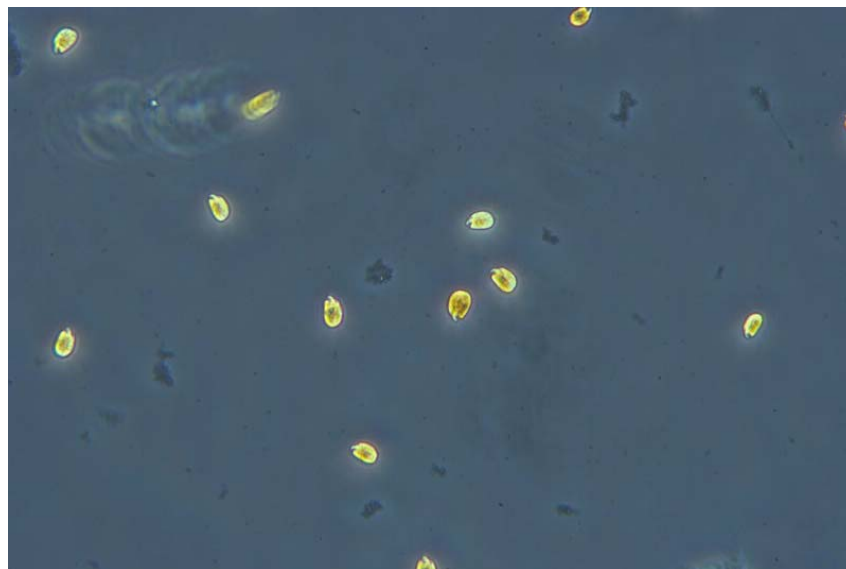


Figura 3. Ejemplares de *Amphidinium* procedentes de cultivos crecidos a partir de células separadas mediante el citómetro de flujo.

Las células del tipo *Karenia*, a diferencia de las de *Amphidinium*, son de menor tamaño y más homogéneas en cuanto a forma y tamaño por lo que cabe esperar que en los citogramas basados en SSC y FSC aparezcan poblaciones bien definidas.

La Fig. 4 muestra algunas células de este pequeño dinoflagelado desnudo que hemos asignado tentativamente al género *Karenia* en cultivos estropeados y contaminados.

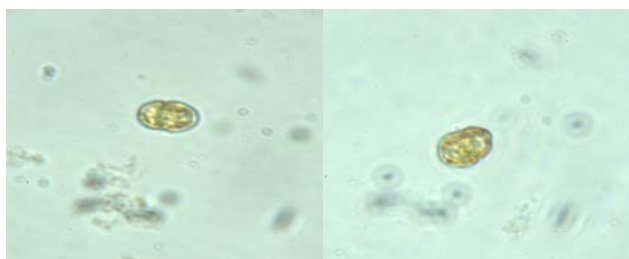


Figura 4. Ejemplares de *Karenia* en cultivos envejecidos y contaminados antes de la purificación con citometría de flujo.

La Fig. 5 muestra los citogramas para este cultivo. Los gráficos de dispersión SSC frente a FSC muestran claramente tres grupos de puntos bien diferenciados, dos de ellos correspondientes a dos poblaciones de especies diferentes. En efecto, los cultivos se habían contaminado con una especie no identificada de pequeñas esferas mostradas en la Fig. 6. En el gráfico inferior izquierdo se ha marcado la ventana de las condiciones para la separación de células del tipo *Karenia*.

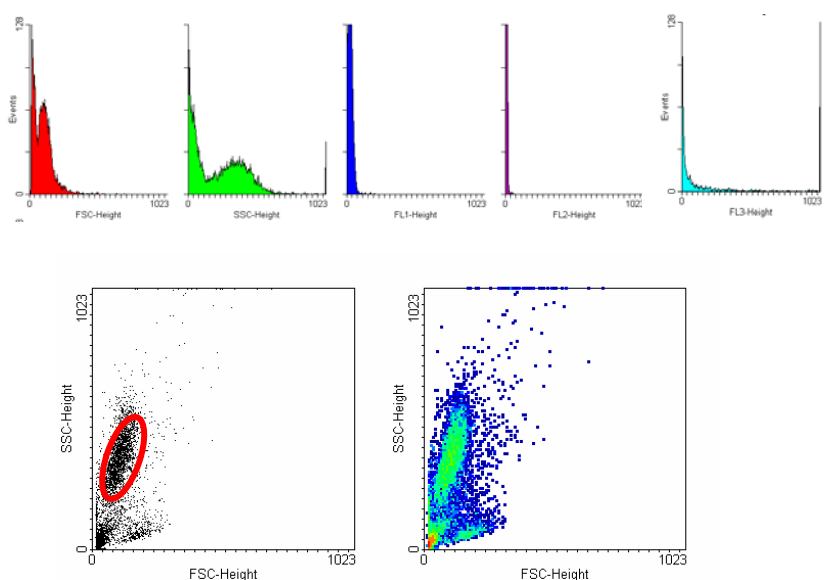


Figura 5. Citogramas para *Karenia*. En la parte superior se muestran los histogramas para FSC, SSC, FL1, FL2 y FL3. En la parte inferior se representan los gráficos de dispersión de puntos de SSC frente a FSC. En el gráfico de la izquierda se ha marcado la ventana de separación de células para el sorter, en el de la derecha se muestra el mismo gráfico con más eventos con los colores indicando la densidad de eventos.

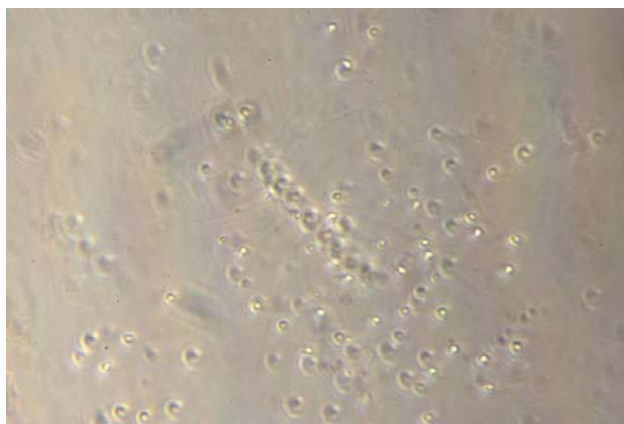


Figura 6. Microorganismos contaminantes encontrados en los cultivos de *Karenia*.

La Fig. 7 muestran algunos ejemplares de *Karenia* procedentes de cultivos crecidos a partir de células separadas por el citómetro.

Como se puede apreciar las células mantienen una morfología definida, se observa la estructura interna que denota el buen estado de los organismos.

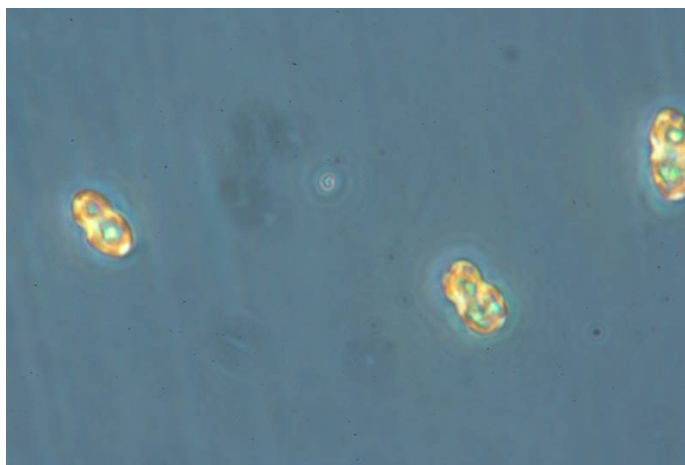


Figura 7. Ejemplares de células del tipo *Karenia* procedentes de cultivados crecidos a partir de células “*sorteadas*” mediante el citómetro de flujo.

Conclusión

Los resultados obtenidos para estas dos especies sugieren que el uso de la citometría de flujo puede ser de gran utilidad para la purificación de cultivos. Aunque resulta difícil utilizarla como herramienta primaria de aislamiento de especies, excepto en casos muy concretos, se presenta como una herramienta fiable y rápida para la purificación de cultivos envejecidos o contaminados.

Estimación de incertidumbre de recuentos celulares de *Dinophysis acuminata* por el método Uthermöhl: Resultado de un ejercicio de intercalibración interlaboratorio

Yolanda Pazos¹, Luz Mamán² y Maximino Delgado³

(1) Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR)
Vilagarcía de Arousa.

(2) Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros (L.C.C.R.R.P.P.). Huelva.

(3) Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA). Tarragona.

Resumen

Un ejercicio de intercalibración interlaboratorio, realizado con muestras naturales de agua de mar, en el que han participado 62 investigadores de 13 países, ha permitido determinar una relación entre la concentración celular de *Dinophysis* calculada por el método de Uthermöhl y su incertidumbre. El 89% de los participantes presentaron, tras una evaluación estadística, resultados satisfactorios. Se estableció una relación $I = 1,67 C^{0.55}$ ($R^2 = 0,99; n = 12$). Esto implica que la incertidumbre es dependiente de la concentración celular, aumentando al aumentar ésta. Sin embargo, la incertidumbre relativa (%) disminuirá. Por ejemplo, para una concentración de 200 cel L⁻¹ de *Dinophysis acuminata*, la incertidumbre sería de ± 30 cel L⁻¹ y esto representa un 15 % del valor mientras que para una concentración de 1.000 cel L⁻¹, la I sería ± 73 cel L⁻¹, lo que representa un 7% del valor calculado. Este método de caja negra, de estimación de incertidumbre, en base a ejercicios de intercalibración, requiere la repetición y realización en condiciones de reproducibilidad antes de poder expresar una incertidumbre asociada a cada resultado individual y su continuidad en el tiempo para verificar la competencia interna de los laboratorios y su grado de compatibilidad. Deberían realizarse, además, experimentos para la intercalibración de las identificaciones taxonómicas y estudios de estabilidad de las muestras sobrantes de los ejercicios para posible uso como patrones internos de validación.

Introducción

El control oficial de salubridad de organismos marinos destinados a consumo humano en las zonas de producción se realiza siguiendo una normativa que implica, entre otros, el análisis de biotoxinas. Así la normativa europea, establece los controles de condiciones oceanográficas y el fitoplancton tóxico en las zonas de producción [1]. Esta información es usada para identificar la causa de los resultados positivos de biotoxinas, para la clasificación de las zonas de producción/reinstalación como indicadora de un próximo episodio tóxico o de la finalización de uno anterior con fines predictivos, como apoyo en la toma de decisiones sobre planes y frecuencia

de muestreo para biotoxinas, para las decisiones a raíz de los controles y para la información al sector productor, las autoridades sanitarias y la sociedad en general.

Es necesario decretar el cierre de una zona de producción siempre que existan niveles de biotoxinas que superen los límites legales o cuando se prevea un riesgo para la salud pública. En este sentido, es posible realizar un cierre de las zonas de producción ante la presencia de una proliferación masiva de una especie de microplancton tóxico. Estos cierres cautelares están recogidos en la legislación, por ejemplo, en la Orden 14 de Noviembre 1995 [2]. De este modo, los recuentos de microplancton tóxico están implicados en la toma de decisiones de control sanitario de alimentos.

La Directiva 93/99/CEE del Consejo [3], traspuesta al R.D. 1397/1995 [4], de 4 de Agosto de 1995, establece la necesidad de que los laboratorios implicados directamente en el control sanitario de alimentos estén acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación según la norma ISO 17025 [5]. En el caso de los recuentos de fitoplancton tóxico es necesario conocer la incertidumbre para saber su orden de magnitud y si es o no relevante en la toma de decisiones.

En el marco de las Reuniones Ibéricas sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas, los investigadores encargados del control oficial de fitoplancton tóxico en las Comunidades Autónomas Españolas y en Portugal, plantearon la necesidad de hacer estimaciones de incertidumbre asociada a los recuentos de especies de fitoplancton tóxico. La inexistencia de patrones y la dificultad debida a fuentes múltiples de variación implica la necesidad de la organización rutinaria de ejercicios de intercalibración interlaboratorio que cubran todos los aspectos de los métodos incluyendo los cuantitativos, como los volumétricos, y los cualitativos, así como los relacionados con las identificaciones taxonómicas [6]. Resultaría muy complejo el diseño de un ejercicio de intercalibración que abarcara la mayor parte de las fuentes posibles de variación.

Este primer estudio se realizó para evaluar el componente relacionado con los aspectos cuantitativos, en relación con la especie *Dinophysis acuminata*, una de las principales especies tóxicas de la costa de la Península Ibérica, por relación con los episodios de acumulación de toxinas lipofílicas y por su persistencia. Se trató de realizar un estudio de tipo colaborativo como indica la ISO 5725 [7] para la estimación de la incertidumbre que representa la parte del resultado completo, que caracteriza el intervalo de valores dentro del cual se encuentra, con una cierta probabilidad determinada, el valor verdadero de la cantidad medida.

Material y métodos

La convocatoria se realizó entre los asistentes a la VII Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Se extendió a algunos investigadores de la Península Ibérica y colaboradores habituales de otros países, responsables de sistemas de monitorización o que realizan, con

frecuencia, recuentos de fitoplancton tóxico. En un determinado momento fue necesario acotar el número de investigadores interesados en participar, para dimensionar el ejercicio a los medios disponibles.

Se realizó un diseño para la estimación de la incertidumbre relacionada con los recuentos celulares de *D. acuminata* por el método de Uthermöhl [8], tal como se aplica en los laboratorios oficiales de control de fitoplancton tóxico ibérico.

Se recogió mediante una manguera, una muestra integrada (0-15 metros) de un volumen de unos 30 litros de agua de mar en la estación de Bueu (P2) de la Ría de Pontevedra (42° 21.40' N, 8° 46.42' W) el 1 de Julio de 2003, que se fijó con Lugol. Con objeto de poder aplicar procedimientos estadísticos estándar, esta muestra fue enriquecida con varios concentrados de la misma, obtenidos mediante una red de plancton, por aproximación hasta que el nivel de concentración celular que se obtuviese, en un recuento de todo el fondo de la cubeta, tras sedimentar 3 mL, fuese un número mayor de 20 células de *D. acuminata*. Del mismo modo se procuró que el número de participantes en el ejercicio fuese mayor de 20.

En el primer correo se envió el código confidencial de identificación personal del investigador (asignado mediante números aleatorios) dos submuestras que eran réplicas de la misma, junto con el protocolo, fichas para la emisión de los resultados y una hoja de confirmación de la recepción que debía ser devuelta firmada de inmediato. En esta hoja se comprobaba la asignación del código confidencial, la recepción correcta de las submuestras y el resto de los documentos, la confirmación de que el nombre y la dirección eran las correctas y el tiempo en el que el investigador estimaba que podría tener los resultados.

El protocolo trató de eliminar varios de los componentes de la incertidumbre y minimizar los referidos a la taxonomía, al submuestreo y a los componentes volumétricos tanto en la fase de sedimentación como en la de recuento en el microscopio invertido. Por ello se especificó que había que homogenizar la submuestra 100 veces, utilizar la cámara de sedimentación sin columna (~ 3 mL), esperar un mínimo de 12 horas de sedimentación, realizar el recuento con 100 aumentos y contar todo el fondo de la cubeta (para evitar los aspectos volumétricos en relación con la aplicación de cuadrículas o transectos diametrales). También se explicaba que las dos submuestras provenían de la misma muestra y que, al ser del medio natural, contenían además de *D. acuminata*, otras especies del mismo género que debían ser contadas. Se pedía que no se contasen valvas vacías. La expresión de los resultados debía ser en células por litro teniendo en cuenta el volumen exacto sedimentado. Se especificaba que, en el estadillo final, debía ir el código del investigador pero no el nombre de la persona ni la institución.

La preparación de las submuestras requirió el trabajo coordinado de 10 personas para colaborar en la homogenización inicial (100 veces) de la muestra de gran volumen y distribución en submuestras progresivas hasta

las submuestras finales que fueron barajadas para obtener una distribución aleatoria en los diferentes investigadores participantes.



Figura 1. Personal de INTECMAR durante la preparación del material para el ejercicio de intercalibración de recuentos de *D. acuminata*.

La hoja de resultados constaba de un primer cuadro con los siguientes apartados: código del investigador, código de la muestra, fecha de recepción de la muestra, fecha de realización del análisis, homogenización por agitación suave (número de veces), volumen sedimentado (mL), tiempo de sedimentación (horas), área contada (cm²) y aumentos totales utilizados. En un segundo cuadro constaban las siguientes columnas: nombre científico de la especie, células contadas y concentración final en cel L⁻¹.

La recepción de las hojas de resultados y custodia de la confidencialidad de los códigos fue realizada por una persona de INTECMAR ajena al ejercicio de intercalibración.

Para descartar la presencia de valores anómalos, se aplicó el criterio de la Q de Dixon [9] .

$$Q = \frac{|\text{Valor sospechoso} - \text{Valor más próximo}|}{\text{Valor más grande} - \text{Valor más pequeño}}$$

Siendo el valor crítico $Q_{n=104;\alpha=0,05} = 0,372$

Para evaluar el grado de satisfacción de cada resultado [10] se aplicó el criterio

$$z = \frac{\text{Dato} - \text{Valor verdadero}}{\text{Desviación estándar}}$$

Considerando el “valor verdadero” como el promedio de los resultados de los diferentes investigadores. La desviación estándar es la muestral, calculada según la función DESVEST de Excel®

Se consideró el resultado satisfactorio si el valor $|z| \leq 2$ en los recuentos de *D. acuminata* de las dos submuestras; se consideró cuestionable si $2 \leq |z| \leq 3$ en alguna de las dos submuestras e insatisfactorio si $|z| > 3$ para el resultado de los recuentos de *D. acuminata* en alguna de las dos submuestras de cada investigador.

La aplicación del criterio de la Q de Dixon conllevó la eliminación del investigador N° 60 que había enviado valores con un sesgo inaceptable. Se repitió el proceso y el nuevo cálculo de Q y z conllevó la eliminación de uno de los resultados asociados al N° 41#3 (Q = 0,570) y del N° 43 (Q = 0,506).

Se comprobaron algunos errores de taxonomía y de cálculo. Como se disponía de los valores originales de los recuentos y del volumen sedimentado y del área contada, se pudieron recalcular los datos de varios investigadores que habían enviado resultados cuestionables. A partir de aquí se consideró un ejercicio cooperativo y se recalculó el promedio y la desviación estándar (DESVEST).

La incertidumbre se calculó como $I = \frac{\text{DESVEST}}{\sqrt{n}}$ y la incertidumbre relativa se expresó como un porcentaje en relación al valor promedio.

Resultados y discusión

Participaron la mayoría de los investigadores de los laboratorios relacionados con el control oficial de fitoplancton tóxico en España y Portugal además de varios laboratorios de investigación en fitoplancton. Esto representó un total de 62 investigadores de 13 países y representantes de seis comunidades autónomas españolas.

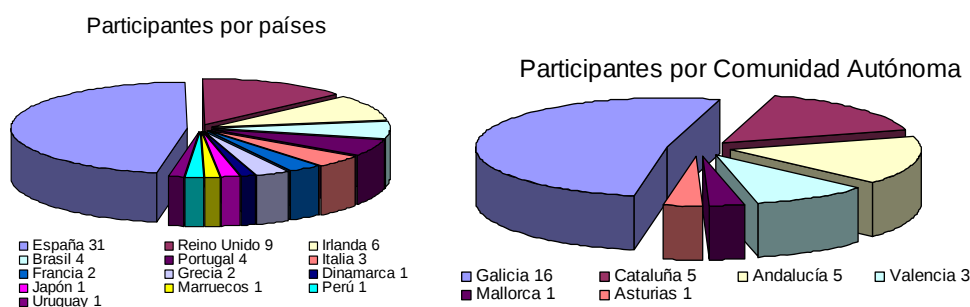


Figura 2. Distribución de los participantes en el ejercicio de intercalibración por países y Comunidades Autónomas.

Bio/consult. Dinamarca; Centre d'Aqüicultura-IRTA. Cataluña ; Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS). Dorset. UK; Centro de Ciencias Tecnológicas da Terra e do Mar. UNIVALI. Brasil; Centro de Control do Medio Mariño. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Xunta de Galicia; Centro de Experimentación Pesquera. Principado de Asturias; Departament de Biologia Marina i Oceanografia. Institut de Ciències del Mar, CMIMA; Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Valencia; Departamento de Biología. Universidad Illes Balears; Department of Botany School of Biology. Aristotle University of Thessaloniki. Grecia; Dipartimento di Scienze del mare. Università Politecnica delle Marche. Ancona. Italia; Dirección Nacional de Recursos Acuáticos de Uruguay; Fisheries Research Services. FRS. Marine Laboratory. Aberdeen. UK; Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Brasil; Ifremer, Centre de Nantes. Francia; Institut d'Ecologia Litoral. Alicante; Institut National de recherche Halieutique. Marocco; Instituto de Investigaciones Marinas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Vigo. España; Instituto del Mar de Perú; Instituto Español de Oceanografía. Centro Costero de La Coruña y Centro Costero de Vigo; Instituto Nacional de Investigação Agraria e das Pescas. INIAP. IPIMAR. Portugal; Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia. Xunta de Galicia; Istituto di Scienze Marine. Biologia del Mare. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Italia; Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía. Junta de Andalucía; Laboratorio di Biologia Marina di Trieste. Italia; Marine Institute. Galway. Irlanda; Martin Ryan Institute. National University of Ireland Galway. Irlanda; Monitoring Japón; Plankton Laboratory. CEFAS, Lowestoft Laboratory. UK.

Tabla 1. Instituciones participantes en el ejercicio de intercalibración

Es posible que algunos investigadores no leyeran el protocolo y aplicaron su metodología. Un laboratorio justificó el cambio de volumen de sedimentación por no disponer de columnas móviles.

El protocolo informó de que las submuestras eran réplicas. Algunos investigadores enviaron los mismos valores de concentración celular para todas las especies de las dos submuestras. Esto es muy improbable debido a la variabilidad natural de la distribución de células en la naturaleza. Esto invalidó la realización de análisis de varianza. Sería aconsejable en lo sucesivo, no informar del envío de réplicas.

Algunos investigadores, al ser la muestra suficiente, la duplicaron y compartieron con algún compañero no registrado. Enviaron varios resultados con un solo código. Esto ocasionó algunos problemas de organización que fueron resueltos.

Sólo dos investigadores, del mismo laboratorio, encontraron como muy abundante la especie *Dinophysis sacculus*. Lo mismo ocurrió con la especie *Dinophysis norvegica*. En ambos casos, y para el estudio cooperativo se asignaron estos valores a *D. acuminata*. Estos errores se produjeron intralaboratorio y se interpretaron por el acceso a la misma formación y bibliografía.

Se detectaron varios errores de cálculo pues se declaraba un procedimiento y un número de células contadas, que luego no coincidía con el resultado final. Se constató que tres investigadores de un mismo laboratorio presentaban el mismo error en la aplicación del coeficiente para

el cálculo final de la concentración celular y que los datos fueron enviados en la misma fecha. Otros investigadores del mismo laboratorio presentaron valores correctos. Esto parece indicar que se han comparado los resultados antes del envío. Es imprescindible, en este tipo de ejercicios para el cálculo de la incertidumbre, concienciar a los investigadores sobre la necesidad de la independencia.

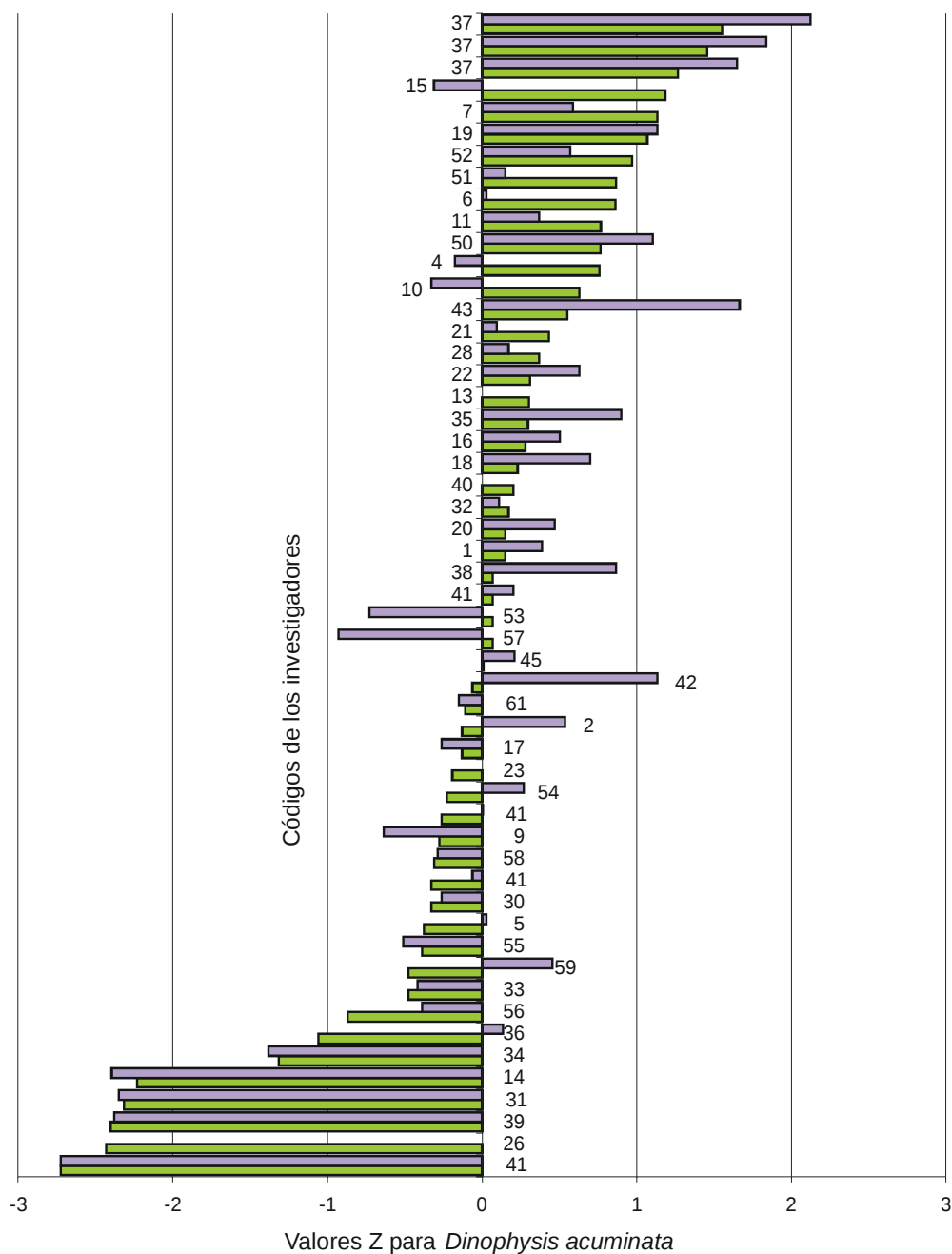


Figura 3. Valores de Z para los recuentos de *Dinophysis acuminata* para cada una de las submuestras de cada investigador. Los valores del investigador N° 60 ($z_1=33.3$ y $z_2=32.3$) no fueron graficados por una cuestión de escala. $|z| \leq 2$ satisfactorio; $2 \leq |z| \leq 3$ cuestionable; $|z| > 3$ insatisfactorio.

El 89,1% de los datos resultaron satisfactorios y sólo un 2% insatisfactorios. La mayoría de los resultados cuestionables se referían a errores de aplicación de los coeficientes volumétricos.

	Promedio (cel L ⁻¹)	DESVEST	C.V	Nº muestras	Incertidumbre (cel L ⁻¹)	I relativa %
<i>D. acuminata</i>	14612	2867	20	102	284	2
<i>D. acuta</i>	5	35	742	102	3	73
<i>D. caudata</i>	173	314	182	102	31	18
<i>D. diegensis</i>	24	88	369	102	9	37
<i>D. fortii</i>	7	53	711	102	5	70
<i>D. parvula</i>	4	28	707	102	3	70
<i>D. rotundata</i>	832	614	74	102	61	7
<i>D. sacculus</i>	13	69	513	102	7	51
<i>D. skagii</i>	429	507	118	102	50	12
<i>Dinophysis</i> spp	72	286	396	102	28	39
Total	16170	3042	19	102	301	2

Tabla 2. Resumen de los valores estadísticos para cada una de las especies.

El recuento de las diferentes especies se consideró independiente. Se aplicó el cálculo de la incertidumbre y se ajustó una función matemática para relacionar ambas variables.

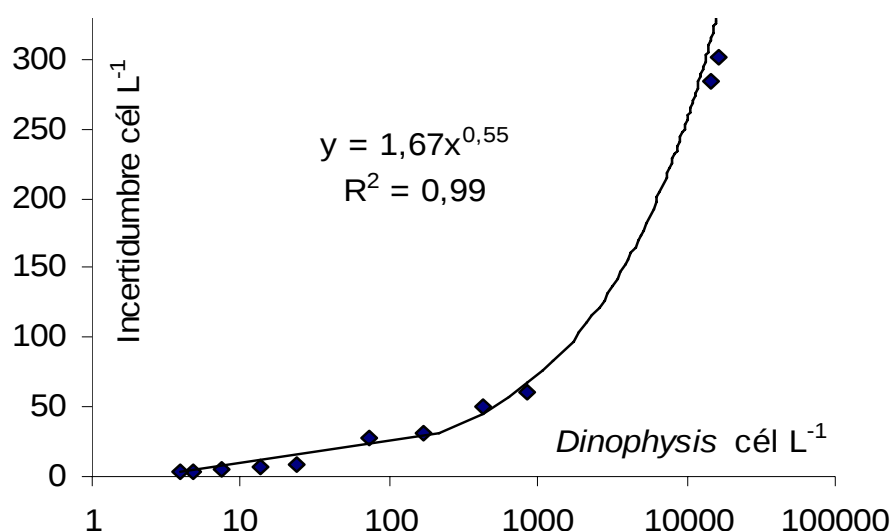


Figura 4. Relación entre la incertidumbre en los recuentos y la concentración celular de *Dinophysis* estimada a partir del ejercicio de intercalibración interlaboratorio.

Sin embargo la relación del porcentaje de incertidumbre con la concentración celular es inversa. Las fuentes de la incertidumbre más importantes, en el caso de los recuentos de *Dinophysis* spp. en agua de mar por el método Uthermöhl, incluyen la de la distribución de las células en el

submuestreo, las volumétricas relacionadas con la columna de sedimentación y las que dependen de la competencia técnica del investigador. El número de células contadas es un factor que no ha sido evaluado al determinar, el protocolo, el volumen de sedimentación y especificar el recuento de todo ese volumen.

Conclusiones

La incertidumbre en los recuentos es dependiente de la concentración celular. Se estableció una relación $I = 1,67C^{0.55}$ ($R^2 = 0,9863; n = 12$). Por tanto, cuanto mayor es la concentración celular, mayor será la incertidumbre estimada y menor el porcentaje de incertidumbre relativa. Por ejemplo, para una concentración de 200 cel L⁻¹ de *Dinophysis acuminata*, la incertidumbre sería de ± 30 cel L⁻¹ y esto representa un 15 % del valor mientras que para una concentración de 1.000 cel L⁻¹, la I sería ± 73 cel L⁻¹, lo que representa un 7% del valor calculado.

Este método de caja negra, de estimación de incertidumbre, en base a ejercicios de intercalibración, requiere la repetición y realización en condiciones de reproducibilidad antes de poder expresar una incertidumbre asociada a cada resultado individual y su continuidad en el tiempo para verificar la competencia interna de los laboratorios y su grado de compatibilidad. Deberían realizarse, además, experimentos para la intercalibración de las identificaciones taxonómicas y estudios de estabilidad de las muestras sobrantes de los ejercicios para posible uso como patrones internos de validación. Es imprescindible, para los laboratorios que realizan control oficial de fitoplancton tóxico, la participación en ejercicios de intercalibración para la evaluación de la competencia técnica y para el cálculo de la incertidumbre de sus resultados.

Agradecimientos

Al personal de INTECMAR por su colaboración en la preparación de las muestras: Ángeles Iglesias, Celia Díaz, Francisca Miráz, Mariló Doval, Víctor García y el personal que, además participó en el ejercicio. A Luz Barallobre por la custodia de los códigos confidenciales de identificación de los investigadores participantes. A Jesús Mouriño por el apoyo informático. A los participantes en el ejercicio de calibración: Adela López, Ana Sofía Palma, Ángeles Moroño, Armindo Moraes, Beatriz Reguera, Bibiana Gómez, Carmen Rodríguez, Caroline Cusack, Caterine Belin, Cecilia Totti, Clarisse Odebrecht, Cristian Gomís, David Jaen, Eileen Bresnan, Florentina Amoedo, Francisco Figueiras, Graça Vilarinho, Isabel Lemos, Isabel Ramilo, Jorge Diogène, Jorge Lorenzo, Juan A. Alcober, Katerina Aligizaki, Konstantinos Koukaras, Laila Joutei, Laura Arín, Linda Percy, Lourdes Velo, Luis Proença, Luz Mamán, Manuel Varela, Manuela Morillo, Margarita Fernández, Margarita Puigserver, María González, Marina Cabrini, Mauro Bastianini, Maximino Delgado, Minouri, Montserrat

Sante, Nagore Sanpedro, Nikki Smith, Per Andersen, Pilar García, Pilar Pazos, Pippa Sammes, Raúl Fernández, Robin Raine, Rosa Figueroa, Sheila Fraser, Silvia Méndez, Silvia Roura, Sonia Sánchez, Steve Milligan, Tara Chamberlain, Teresa Moita, Tracy McCollin, Wendy Higman, Yolanda Pazos. A la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia que financió este ejercicio de intercalibración.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) N° 854. Normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. DO L 226 de 25.6.2004, p. 83-134
- [2] D.O.G. Orde do 14 de novembro de 1995. Regula o programa para o control de biotoxinas mariñas. DOG N° 221. 8453-8467.
- [3] Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29/10/93. Medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios . L 290 de 24/11/1993 p. 14-17.
- [4] R.D. 1397/1995 de 4 de Agosto. Medidas adicionales sobre el control oficial de productos alimenticios. BOE 246 de 14/10/1995 p. 30135- 30137.
- [5] UNE-EN ISO/IEC 17025:2000. Requisitos competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- [6] Pazos Y., M. Delgado. 2003. Resumen de la mesa redonda sobre estimación de incertidumbre asociada a recuentos de especies de fitoplancton tóxico. En: Gómis *et al.*, (Eds). *VII Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*. C. Pesca, Generalitat Valenciana. Valencia. 226-228.
- [7] ISO 5725, Accuracy trueness and precision of measurements methods and results.
- [8] Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplakton-Methodic. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9:1-38, pl.1.
- [9] Dean R.B., W.J. Dixon. 1951. Simplified statistics for small numbers of observations. *Anal. Chem.* 23:636-638.
- [10] EURACHEM (2000): Quantifying uncertainty in analytical measurement.

Actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas

María L. Rodríguez-Velasco, Begoña Ben-Gigirey,
Adriano Villar-González y Luis M. Botana.

*Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM),
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN),
Estación Marítima s/n, 36200 Vigo.*

Resumen

El Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en Vigo es Laboratorio Comunitario de Referencia para el control de las biotoxinas marinas (LCRBM), lo que conlleva unas tareas de coordinación y liderazgo en el análisis de biotoxinas marinas en el marco de la Unión Europea. Por otro lado, el LCRBM es también el Laboratorio Nacional de Referencia (LNRBM) en España. Las funciones que como LCR y como LNR le asigna la legislación europea, incluyen labores de coordinación de actividades de los laboratorios europeos o nacionales, según el caso, en la aplicación de los métodos oficiales de análisis de biotoxinas marinas. Entre ellas, la organización de ensayos comparativos y su adecuado seguimiento de acuerdo con los protocolos internacionalmente reconocidos; así como la provisión de información, formación y asistencia científico-técnica a los laboratorios nacionales de control oficial, a los laboratorios de la red europea, a las autoridades competentes y a los Países Terceros. En el presente trabajo, se describen las diferentes actividades llevadas a cabo por el LCRBM, en especial, en cuanto a la organización de ensayos comparativos para la determinación de toxinas PSP y lipofílicas, dirigidos a la red europea y nacional, así como todas aquellas actividades encaminadas a la armonización de los métodos que se vienen aplicando y al desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos alternativos al bioensayo en ratón, por tratarse de una urgente necesidad en este campo de la seguridad alimentaria.

Introducción

El Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo [1], sobre los controles oficiales de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales, establece como necesaria la designación de laboratorios comunitarios y nacionales de referencia con el fin de contribuir a que los resultados de los análisis sean de elevada calidad y uniformes. En sus artículos 32 y 33 el citado Reglamento establece, respectivamente, las responsabilidades y requisitos de los laboratorios comunitarios y nacionales de referencia. El Reglamento (CE) nº 776/2006 [2] designa al Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en Vigo como Laboratorio Comunitario de Referencia para el control de las

biotoxinas marinas (LCRBM). Por otro lado, el LCRBM es, a su vez, laboratorio nacional de referencia en España (LNRBM). Las funciones asignadas al LCRBM son, por tanto, las de coordinar y liderar las actividades relacionadas con el control, desarrollo de métodos analíticos, etc, de las biotoxinas marinas en España y en la Unión Europea. Entre dichas funciones se encuentran: 1) proporcionar a los LNR los detalles de los métodos analíticos, en especial de los métodos de referencia; 2) coordinar la aplicación de dichos métodos mediante la organización de ensayos comparativos, asegurando un adecuado seguimiento de los mismos; 3) coordinar la investigación de nuevos métodos analíticos e informar de los avances; 4) organizar cursos de formación inicial y continua dirigidos al personal de los LNR y a expertos de países en desarrollo; 5) proporcionar a la Comisión asistencia científica y técnica, sobre todo en los casos en que un Estado miembro cuestione los resultados de los análisis; 6) colaborar con los laboratorios encargados de realizar los análisis en terceros países.

Dentro de las actividades de coordinación, provisión de asistencia técnica y formación, el LCRBM viene organizando Grupos de Trabajo en los que participan diferentes expertos en la materia, que se proponen a medida que las necesidades analíticas y científicas van emergiendo en el campo de las biotoxinas marinas. Actualmente, están en marcha cuatro Grupos de Trabajo:

Grupo de Trabajo Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS) para toxinas lipofílicas, cuyo objetivo es la validación de un método de LC-MS para el análisis simultáneo de los distintos grupos de toxinas lipofílicas reguladas en la Unión Europea [3].

Grupo de Trabajo Bioensayo para toxinas lipofílicas, con el objetivo de establecer un protocolo de trabajo armonizado a nivel europeo para el análisis de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón, actual método de referencia para el control de este tipo de toxinas [4].

Grupo de Trabajo sobre determinación de toxinas PSP por el método de HPLC (AOAC 2005.06), recientemente aprobado en Europa como método de detección alternativo para el control oficial de este tipo de toxinas [5].

Grupo de Trabajo sobre Palitoxinas, al haberse identificado en la última reunión general de LNR de la red europea como un problema a tener en cuenta debido a la reciente descripción de la presencia de este tipo de toxinas en el Mediterráneo [6,7].

Una importante actividad que el LCRBM lleva a cabo es la organización de ejercicios intercomparativos con el objeto de evaluar la aptitud de los laboratorios de la red europea y nacional en la aplicación de los métodos de control de ficotoxinas, así como valorar la equivalencia de los distintos métodos de ensayo utilizados (bioensayo y métodos alternativos). Durante el año 2006, el LCRBM organizó dos tipos de estudios interlaboratorio: 1) ejercicio para la determinación de toxinas paralizantes y 2) ejercicio para la determinación de toxinas lipofílicas.

Materiales y métodos

Laboratorios participantes en los ejercicios intercomparativos 2006.

En el ejercicio para la determinación de toxinas paralizantes participaron 20 laboratorios (14 laboratorios de la red europea y 6 laboratorios nacionales); mientras que en el ejercicio para toxinas lipofílicas participaron un total de 17 laboratorios (11 europeos y 6 nacionales).

Materiales de estudio. Dos muestras de cuerpo entero de mejillón homogeneizado (*Mytilus galloprovincialis*) procedentes de las rías gallegas e identificadas como CRL/06/P/07 Y CRL/06/P/08, fueron enviadas a los participantes en el ejercicio de determinación de toxinas PSP.

Para el estudio de toxinas lipofílicas, los participantes recibieron dos muestras de cuerpo entero de mejillón homogeneizado (*Mytilus galloprovincialis*), procedentes de las rías gallegas e identificadas como CRL/06/L/01 Y CRL/06/L/02.

En todos los casos los materiales fueron recibidos frescos en el LCRBM, donde se limpiaron y abrieron; tras su homogeneización se distribuyeron en alícuotas, que se conservaron congeladas a aproximadamente -24 °C hasta su envío o análisis.

Los estudios de estabilidad y homogeneidad se realizaron por HPLC para las toxinas PSP y LC-MS para las toxinas lipofílicas, de acuerdo con las normas internacionalmente reconocidas [8,9], comprobándose que todos los materiales cumplían con los criterios establecidos al respecto.

Metodologías utilizadas por los laboratorios participantes. En el caso del ejercicio interlaboratorio para toxinas PSP, los participantes utilizaron tanto el método de referencia de bioensayo en ratón (AOAC 959.08) como otros métodos alternativos reconocidos, como es el caso del método de HPLC-Fluorescencia (AOAC 2005.06) y no reconocidos (ELISA y Jellet).

Los métodos utilizados por los participantes en el estudio para toxinas lipofílicas fueron el bioensayo en ratón y dos técnicas alternativas: LC-MS y/o ensayo de inhibición de fosfatasa por fluorescencia (a través del kit comercial Toxiline DSP).

Evaluación de los resultados. Para el estudio estadístico de los resultados de los ejercicios (en el caso de resultados cuantitativos), en primer lugar se procedió a la identificación de resultados no válidos y/o resultados discrepantes (test de Dixon $\alpha = 0,05$). Tras ello, se determinó “el valor asignado” como valor consenso de los participantes tras la eliminación de resultados discrepantes. Para la evaluación de la aptitud de los laboratorios se calculó el valor del parámetro Z-score [10]. Para esta evaluación se consideró que si $|z| \leq 2$ el resultado era satisfactorio; si $2 < |z| < 3$ el resultado era cuestionable; si $|z| \geq 3$ el resultado no era satisfactorio.

Resultados y discusión

Las Tablas 1 y 2 muestran, respectivamente, los resultados obtenidos para las muestras CRL/06/P/07 y CRL/06/P/08 por los laboratorios participantes en el ejercicio intercomparativo para la determinación de toxinas paralizantes, por los distintos métodos empleados, así como la evaluación de su aptitud a través del cálculo de los valores de Z-score. La muestra CRL/06/P/07, resultó ser una muestra negativa (< límite de detección) por bioensayo en ratón, mientras que con el método cromatográfico se cuantificaron algunas toxinas PSP, obteniéndose en todos los casos una toxicidad inferior al límite establecido por la legislación europea (80 µg equivalentes de STX/100g). Para la muestra CRL/06/P/08, dos participantes obtuvieron resultados no satisfactorios en la evaluación de su aptitud; en el caso del laboratorio N° 16, se pudo haber debido al ajuste de extracto clorhídrico en la extracción del bioensayo a un pH no adecuado (pH en torno a 2,5), al que los derivados N-sulfo-carbamoyl, presentes en esta muestra, pudieron ser hidrolizados a sus derivados carbamato, más tóxicos, favoreciendo la sobreestimación de la toxicidad en el bioensayo en ratón. El laboratorio N° 3 obtuvo para las dos muestras del estudio un resultado insatisfactorio que posteriormente fue identificado como debido a un error en las unidades de expresión de resultados.

MUESTRA CRL/06/P/07, valor asignado: 25.76 µg eq. STX.2HCl/100g, DER: 85.05%			
Código laboratorio	Método	Resultado µg eq. STX.2HCl/100g	Z-score
1	HPLC	17.6	-0,91
2	HPLC	11.0	-1,64
3	HPLC	376.6	38,91
4	ELISA	15.0	-1,19
5	HPLC	9.0	-1,86
6	HPLC	6.9	-2,09
7	HPLC	77.2	5,70
8	ELISA	42.8	1,89
9	HPLC	18.0	-0,86
10	HPLC	35.8	1,11
14	HPLC	6.8	-2,10
16	MBA	43.3	1,95

Tabla 1. Resultados obtenidos por los participantes para la muestra CRL/06/P/07 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas PSP y evaluación de su aptitud.

MUESTRA CRL/06/P/08, valor asignado: 204.0 µg eq. STX.2HCl/100g, DER: 50.75%			
Código laboratorio	Método	Resultado µg eq. STX.2HCl/100g	Z-score
1	HPLC	123.2	-1,13
3	ELISA	2429.3	31,17
4	HPLC	101.0	-1,44
	MBA	154.0	-0,70
5	HPLC	87.0	-1,64
6	MBA	184.3	-0,28
	MBA (pH 2.45-2.55)	339.5	1,90
7	HPLC	156.5	-0,67
	MBA	254.0	0,70
8	ELISA	344.8	1,97
	MBA	360.5	2,19
9	HPLC	136.0	-0,95
10	HPLC	65.2	-1,94
	MBA	167.0	-0,52
12	MBA	117.0	-1,22
13	MBA	128.0	-1,06
15	MBA	143	-0,85
16	MBA	663.8	6,44
17	MBA	185	-0,27
18	MBA	351	2,06
19	MBA	356	2,13
20	MBA	327	1,72

Tabla 2. Resultados obtenidos por los participantes para la muestra CRL/06/P/08 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas PSP y evaluación de su aptitud.

En las Tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos por los participantes en el ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón, LC-MS y ensayo de inhibición de fosfatasa, respectivamente. Aunque en la muestra CRL/06/L/02 ninguno de los 11 laboratorios que utilizó LC-MS encontró toxinas lipofílicas y los tres laboratorios que usaron el kit Toxiline DSP obtuvieron un resultado inferior al límite de detección, 9 de 12 laboratorios que estudiaron esta muestra por bioensayo en ratón, tuvieron un resultado positivo. Por tratarse de una muestra adquirida en el mercado y a la vista de los resultados obtenidos, el resultado de bioensayo podría ser un falso positivo. Posteriores estudios en el LCRBM con esta muestra no consiguieron determinar la razón de este hallazgo. La muestra CRL/06/L/01 era una muestra altamente contaminada con ácido okadaico, DTX2 y ésteres de ambos, para la que los resultados obtenidos por todos los métodos empleados fueron muy homogéneos, aunque 2 de los 11 laboratorios que la estudiaron por LC-MS tuvieron resultados discrepantes y 1 de los 12 laboratorios que utilizó bioensayo en ratón obtuvo un resultado negativo, que pudo ser debido a la utilización de un protocolo no adecuado.

Código laboratorio	MUESTRA CRL/06/L/01 ⁽¹⁾	MUESTRA CRL/06/L/02 ⁽¹⁾
4	POSITIVO	POSITIVO
6	POSITIVO	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO
8	POSITIVO	POSITIVO
10	POSITIVO	NEGATIVO
11	POSITIVO	NEGATIVO
15	POSITIVO	POSITIVO
16	-	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO
18	POSITIVO	POSITIVO
19	NEGATIVO	NEGATIVO
20	POSITIVO	POSITIVO

⁽¹⁾Resultado Positivo o Negativo, de acuerdo con los límites establecidos por el Reglamento (EC) 853/2004, según lo descrito en el Reglamento (EC) 2074/2005.

Tabla 3. Resultados obtenidos por los participantes para las muestras CRL/06/L/01 y CRL/06/L/02 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón.

Valor asignado: 2929 µg equivalentes AO total/kg, DE: 356, DER: 12%				
Código laboratorio	µg equiv AO /kg		ésteres (%)	Z-score
	Libre	Total		
01*	423	807	48	-5,96
02	320	2578	88	-0,99
04	464	3288	80	1,01
05	379	2923	87	-0,02
06	460	2947	84	0,05
7	401	3180	87	0,70
09*	578	5455	89	7,09
10	446	2243	80	-1,93
11	435	3063	86	0,37
17*	680	713	5	-6,23
21	403	3217	87	0,81

*Resultados discrepantes

Tabla 4. Resultados obtenidos para la muestra CRL/06/L/01 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas por LC-MS y evaluación de la aptitud de los laboratorios.

Código laboratorio	µg equivalentes AO total/kg	
	CRL/06/L/01	CRL/06/L/02
02	> 300	< 85.5
08	> 300	< 85.5
15	> 300	< 85.5

Tabla 5. Resultados obtenidos para las muestras CRL/06/L/01 y CRL/06/L/02 del ejercicio interlaboratorio para la determinación de toxinas lipofílicas mediante el ensayo de inhibición de fosfatasa (Toxiline DSP kit).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por DG SANCO (Comisión Europea, Bruselas) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

El LCRBM quiere agradecer a INTECMAR (Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia) y a la asociación gallega de productores de mejillón SOCOMGAL por el suministro de material tóxico para estos estudios.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L165, 1–141.
- [2] Reglamento (CE) nº 776/2006 de la Comisión, de 23 de Mayo de 2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L136, 3–8.
- [3] Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L139, 55–205.
- [4] Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión, de 5 de Diciembre de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 27–59.
- [5] Reglamento (CE) nº 1664/2006 de la Comisión, de 6 de Noviembre de 2006. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L320, 13–45.
- [6] CRLMB, Minutes of the IX Meeting of EU-CRL/NRLs for Marine Biotoxins, Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins, Galway, Ireland, 23-24 November 2006.
- [7] Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, GS., Tartaglione, L., Grillo, C., and Mercurio, N. 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical chemistry*. 78: 6154–6159.
- [8] Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. 2006. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*. 78:145–196.
- [9] International Organization for Standardization. 2005. ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, Geneva, Switzerland.
- [10] ISO/IEC Guide 43-1: 1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons. Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

Monitorização de PSP na costa portuguesa através de espécies-indicadoras

Paulo Vale, Susana Sousa Gomes, Maria João Botelho,
Susana Margarida Rodrigues
IPIMAR, Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal

Resumo

A monitorização de PSP através do uso das mesmas espécies-indicadoras para a contaminação com DSP foi avaliado por HPLC-FLD durante os blooms que ocorreram na costa NW portuguesa durante o Outono/Inverno de 2005 e Verão de 2006. Entre as espécies estuarinas consumidas habitualmente, o mexilhão foi a espécie que atingiu níveis mais elevados e manteve as toxinas por mais tempo, não podendo ser usado por si só como único indicador para todos os bivalves comerciais. Já o berbigão apresenta contaminação durante períodos mais curtos e adequa-se a representar as restantes espécies. Uma excepção foi constituída por *Scrobicularia plana* que apresenta toxicidade prolongada. De entre as espécies litorais, não foi possível obter dados para a conquitilha, a principal espécie indicadora da contaminação com DSP. Sabe-se actualmente que a amêijoia-branca não deve ser usada como única espécie indicadora, devido à potencialização da toxicidade por conversão enzimática.

Introdução

As biotoxinas do tipo PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) começaram a ser monitorizadas em Portugal em 1986, recorrendo ao bioensaio em ratinhos. A partir de 1996 introduziu-se o estudo por HPLC com derivatização pré-coluna (baseado no método de Lawrence [1]). No entanto, após a disponibilidade de HPLC no programa de monitorização, não surgiram proliferações de microalgas produtoras de PSP na costa portuguesa. Somente foi possível estudar algumas espécies que apresentavam contaminação PSP recorrente, devida a episódios que ocorreram em 1995, como a lambujinha (*Scrobicularia plana*) [2]. A legislação comunitária vigente [3] estipula que “sempre que se conheçam as taxas de acumulação de toxinas para um determinado grupo de espécies em crescimento na mesma zona, a espécie com a taxa mais elevada deve ser utilizada enquanto espécie indicadora, o que permitirá a exploração de todas as espécies incluídas no grupo, se os teores de toxinas na espécie indicadora estiverem abaixo dos valores-limite regulamentares.” O programa de monitorização português definiu em 2002 o uso de espécies-indicadoras: mexilhão e berbigão (*Mytilus galloprovincialis*, *Cerastoderma edule*) em zonas estuarinas e lagunares, e conquitilha e amêijoia-branca (*Donax* spp., *Spisula solida*) nas zonas costeiras do litoral), com base na contaminação mais importante que vinha a ser estudada até então – a contaminação com DSP.

No Outono de 2005 e no Verão de 2006 surgiu novamente contaminação de bivalves com toxinas PSP, permitindo verificar se estava adequada à monitorização de PSP o uso das espécies indicadoras estipuladas previamente.

Material e métodos

Foi seguido o procedimento de Lawrence et al. [1] modificado como detalhado em [4]. Para calibração foram usadas 4 níveis de concentração de uma mistura de dcGTX2+3, dcSTX, GTX2+3, B1 e STX obtidas no NRC (Canadá).

Resultados e discussão

Os resultados mostraram que nos estuários e lagoas (Ria de Aveiro, Estuário do Mondego e Lagoa de Óbidos) a espécie que apresentava os níveis mais elevados foi o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) seguido pelo berbigão (*Cerastoderma edule*) (Figs. 1 e 2a). A amêijoia-boia e amêijoia-macha (*Ruditapes decussatus* e *Venerupis senegalensis*, respectivamente), longueirão (*Solen* spp.) e ostra (*Crassostrea* spp.) apresentaram níveis semelhantes ou inferiores ao berbigão. A análise dos perfis de toxinas mostraram que o mexilhão e o berbigão têm perfis semelhantes, não se devendo a maior toxicidade à conversão de toxinas *N*-sulfocarbamoiladas em carbamato ou decarbamoiladas (Fig. 2b e 2c). Os níveis de PSP na lambujinha (*S. plana*) igualaram ou ultrapassaram os níveis máximos registados no mexilhão, pois esta espécie retém habitualmente as toxinas PSP por muito tempo. Na zona litoral só foi possível estudar a amêijoia-branca (*Spisula solida*) cujos níveis de PSP excederam o limite regulamentar. Estudos recentes da bioquímica desta espécie permitiram concluir que possui uma rápida actividade carbamoilásica. Esta actividade enzimática invalida o uso desta espécie como espécie-indicadora isoladamente, pois é de esperar que mantenha toxicidade tão elevada ou superior à conquitilha (*Donax* spp.) devido à rápida conversão das toxinas *N*-sulfocarbamoiladas de *G. catenatum* em análogos decarbamoilados, potenciando a toxicidade destes bivalves [5].

A escolha de duas espécies-indicadoras para cada ecossistema revelou-se adequada e necessária, pois o mexilhão retém as toxinas PSP por períodos mais prolongados que as restantes espécies comerciais. Aquando da eliminação de toxinas PSP, o mexilhão não serve isoladamente para seguir a depuração das restantes espécies, pois causaria encerramentos desnecessários da apanha de diversas espécies de bivalves se estas não forem também analisadas. Estes dados confirmam estudos antigos obtidos pelo bioensaio em ratos, que mostram que o mexilhão pode estar mais tóxico que as amêijoas e os berbigões [6]. Relativamente a zonas em que exista lambujinha e ocorram frequentemente blooms de microalgas tóxicas, este bivalve deve ser monitorizado separadamente da monitorização dos restantes bivalves.

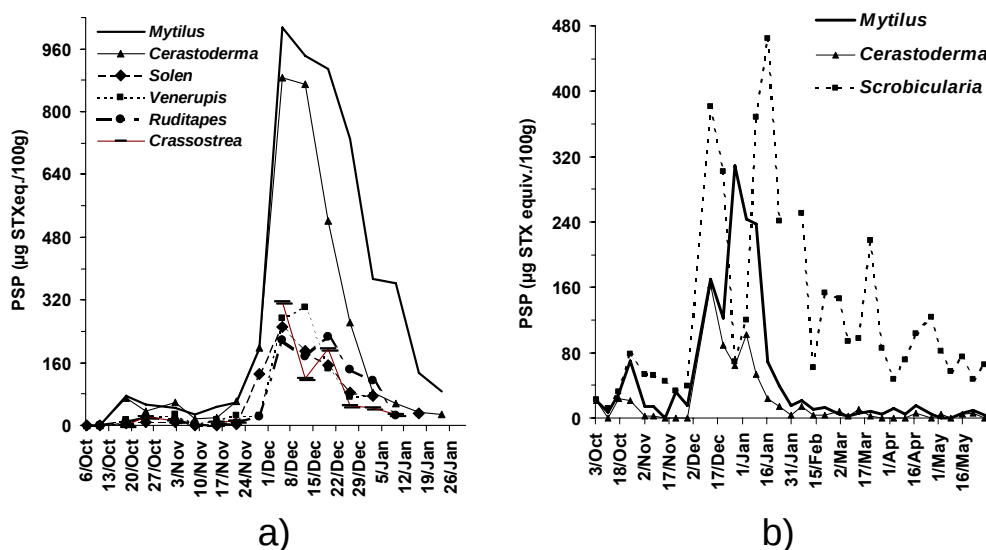


Figura 1. Evolução temporal de toxinas PSP durante o Outono/Inverno de 2005/2006 em bivalves de: a) Ria de Aveiro; b) Estuário do Mondego.

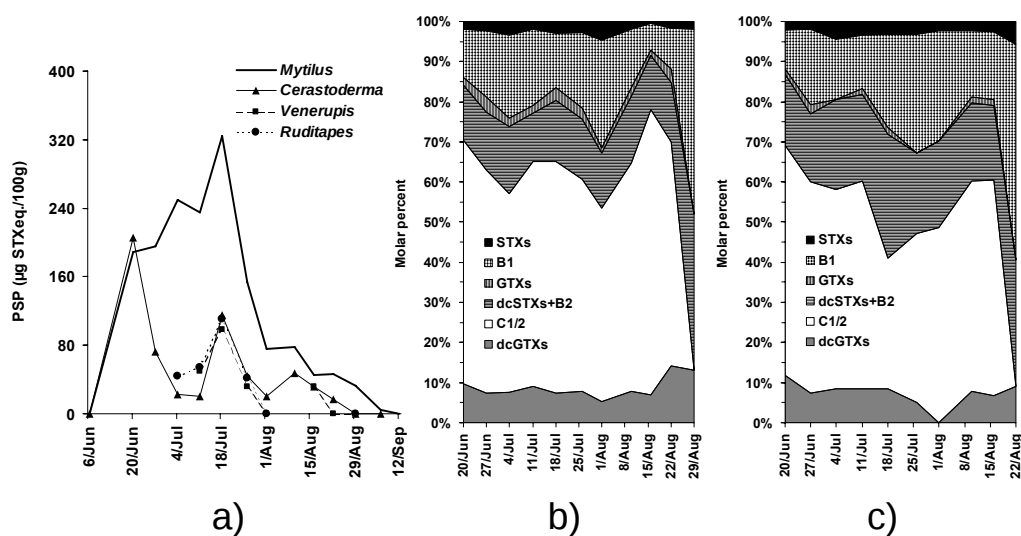


Figura 2. a) evolução temporal de toxinas PSP durante o Verão de 2006 em bivalves da Lagoa de Óbidos; e perfis de toxinas em b) mexilhão c) berbigão colhido na mesma zona e mesmas datas.

Agradecimentos

O Programa “Segurança, vigilância e qualidade de moluscos bivalves” (QCAIII/med.4/MARE) financiou este trabalho na totalidade. Às técnicas Alcina Santos e Delfina Augusto pela preparação das amostras.

Referências

- [1] Lawrence, J.F., C. Ménard, C. Cleroux. 1995. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *J. AOAC Internat.* 78:514-520.
- [2] Vale, P., M.A.M. Sampayo. 2001. Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. *Toxicon*. 39:561-571.
- [3] Regulation (EC) n° 854/2004. *Official Journal of the European Communities*, L139, 206-320.
- [4] Vale, P., H. Taleb. 2005. Assessment of quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins by pre-column derivatization and elimination of interfering compounds by SPE extraction. *Food Additives and Contaminants*. 22:838-846.
- [5] Artigas, M.L., P. Vale, S.S. Gomes, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues, A. Amorim. 2007. Profiles of PSP toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. *J. Chromatogr. A.*, doi:10.1016/j.chroma.2007.04.008.
- [6] Franca, S., Almeida, J.F. 1989. Paralytic shellfish poisons in bivalve molluscs on the Portuguese coast caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. En: Okaichi, T., D.M. Anderson and Nemoto (Eds.). *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York: 89-92.

Avaliação do risco de exposição a toxinas DSP ao longo da costa portuguesa por LC-MS: anos 2003 a 2006

Paulo Vale, Susana Margarida Rodrigues, Maria João Botelho,
Susana Sousa Gomes

IPIMAR, Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal

Resumo

A partir de 2003 todas as amostras do programa de monitorização de biotoxinas em Portugal foram pesquisadas para toxinas DSP por LC-MS. Utilizaram-se apenas espécies-indicadoras (mexilhão e berbigão em zonas estuarinas e lagunares, e conculha e amêijoa-branca nas zonas do litoral), mas quando necessário foram também analisadas outras espécies comerciais. A contaminação com toxinas DSP foi recorrente em toda a costa, principalmente entre a Primavera e o Outono. Os bivalves dos estuários e lagoas da costa noroeste apresentaram contaminações elevadas. Nos estuários e lagoas da costa sudoeste e sul a contaminação com DSP foi baixa, e raramente ocorreram interdições da apanha de bivalves. Na zona litoral da costa NW a amêijoa-branca excedeu por vezes o limite regulamentar durante períodos curtos. Na costa SW e Sul, somente a conculha excedeu habitualmente o limite regulamentar por períodos prolongados, as restantes espécies comerciais foram pouco afectadas pelo DSP.

Introdução

As biotoxinas do tipo DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) começaram a ser monitorizadas em Portugal em 1987, recorrendo ao bioensaio em ratinhos. A partir de 1994 introduziu-se o estudo de algumas amostras por HPLC-FLD após derivatização com o reagente fluorescente ADAM, e a partir de 2000 através de análise directa em espectrometria de massa (LC-MS). Apesar de serem realizadas análises químicas desde 1994, na Europa não existia qualquer legislação que especificasse o limite máximo admissível para DSP em bivalves. Somente em 2002 foi publicada legislação comunitária que estabeleceu pela primeira vez o limite quantitativo para a DSP de 16 µg de equivalente de ácido ocadaico (OA) por 100g de parte edível [1].

Seguindo as recomendações de um grupo de trabalho comunitário sobre planos de amostragem [2], o programa de monitorização português foi redefinido em 2002, de modo a testar preferencialmente espécies-indicadoras: mexilhão e berbigão (*Mytilus galloprovincialis* e *Cerastoderma edule*) em zonas estuarinas e lagunares, e conculha e amêijoa-branca (*Donax trunculus* e *Spisula solida*) nas zonas costeiras do litoral (Fig. 1).

O uso do bioensaio não permite avaliar o risco de exposição à toxina DSP, pois fornece apenas resultados qualitativos. Os resultados do bioensaio

têm adicionalmente a desvantagem de não serem específicos, pois toxinas questionavelmente perigosas para a saúde humana (como as iessotoxinas, que não apresentam toxicidade oral) podem facilmente induzir resultados falsamente positivos [3]. Somente um método quantitativo nos permite caracterizar adequadamente o risco de gastroenterites especificamente atribuíveis às toxinas DSP. A partir de 2003 todas as amostras do programa de monitorização foram pesquisadas por LC-MS para toxinas DSP. Utilizaram-se apenas as espécies-indicadoras, mas quando necessário foram também testadas outras espécies comerciais.

Material e métodos

Foi seguido o procedimento descrito em [4]. Resumidamente, as toxinas foram extraídas com 20 ml de metanol aquoso a 80% a partir de 5 g de parte edível homogeneizada. Após hidrólise alcalina para clivagem dos ésteres, os extractos foram limpos com hexano e extraídos para diclorometano. O resíduo foi seco a vácuo e ressuspendido em metanol, tendo sido injectado 2.5 µl numa coluna *Lichrospher*-100 RP-18 (5 µm). A fase móvel foi constituída por acetonitrilo/ácido acético 0.05% (65:35, v/v) bombeado a 0.2 ml/min. O eluente foi introduzido num MS de quadrupolo simples, e os iões $[M-H]^-$ de m/z 803.5 (OA e DTX2), 817.5 (DTX1) foram monitorizados. Todo o equipamento usado foi da série 1100 da Agilent, o espectrómetro de massa foi o modelo 1946-A da Agilent. O padrão de ácido ocadáico do NRC/Canada foi usado para determinar a resposta de OA. Foi assumido que a DTX2 apresentava resposta equivalente ao OA.

Resultados e discussão

As únicas toxinas parentais encontradas foram OA e DTX2. A contaminação com toxinas DSP foi recorrente em toda a costa,

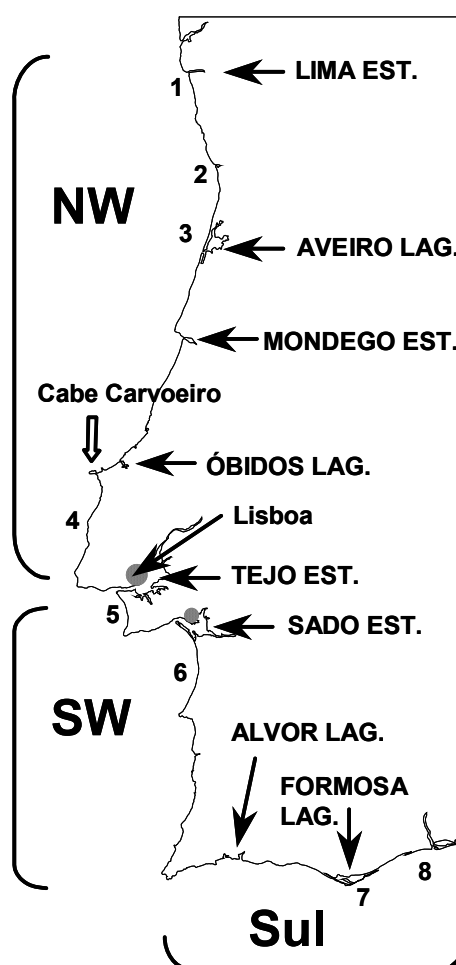


Figura 1. Localização das principais zonas de produção. Est. = Estuário; Lag. = lagoa; NW = costa litoral noroeste; SW = costa litoral sudoeste. As áreas litorais estão numeradas de norte para sul.

principalmente entre a Primavera e o Outono. Os bivalves dos estuários e lagoas da costa noroeste apresentaram contaminações elevadas (Tabela 1). Nos estuários e lagoas da costa sudoeste e sul a contaminação com DSP foi baixa, e raramente ocorreram interdições da apanha de bivalves. Na zona litoral da costa NW, a amêijoia-branca excedeu por vezes o limite regulamentar durante curtos períodos (Tabela 2). Na costa SW e Sul, somente a conculha excedeu habitualmente o limite regulamentar por períodos prolongados, as restantes espécies comerciais foram pouco afectadas por DSP.

Costa	estuário/lagoa	espécie-indicadora	2003	2004	2005	2006
NW	Estuário do Lima	<i>Mytilus spp.</i>	140	23	87	99
	Ria de Aveiro	<i>Mytilus spp.</i>	418	156	659	77
	Estuário do Mondego	<i>Mytilus spp.</i>	103	85	310	110
	Lagoa de Óbidos	<i>Mytilus spp.</i>	34	90	55	213
SW	Estuário do Tejo	<i>Mytilus spp.</i>	na	1	1	1
	Lagoa de Albufeira	<i>Mytilus spp.</i>	7	na	43	53
	Estuário do Sado	<i>S. plana / C. edule</i>	nd	nd	6	nd
Sul	Ria de Alvor	<i>Ruditapes decussatus</i>	7	17	5	na
	Ria Formosa	<i>Mytilus spp.</i>	10	18	25	14

na = dados não disponíveis; nd = não detectado

Tabela 1. Concentrações máximas de DSP em zonas de produção estuarinas/lagunares entre 2003 e 2006 (níveis em µg OA equiv./100g).

Costa	área litoral (nº)	espécie-indicadora	2003	2004	2005	2006
NW	Viana (1)	<i>Mytilus spp.</i>	238	49	386	103
	Matosinhos (2)	<i>Spisula solida</i>	131	20	154	14
	Aveiro (3)	<i>Spisula solida</i>	35	20	60	14
	Ericeira (4)	<i>Mytilus spp.</i>	11	146	46	104
SW	Lisboa (5)	<i>Donax spp.</i>	na	na	276	516
	Setúbal/Sines (6)	<i>Donax spp.</i>	123	32	173	260
Sul	Faro/Olhão (7)	<i>Donax spp.</i>	144	199	71	96
	Tavira/VRSA (8)	<i>Donax spp.</i>	56	137	18	57

na = dados não disponíveis; VRSA = Vila Real de Santo António.

Tabela 2. Concentrações máximas de DSP em zonas de produção do litoral entre 2003 e 2006 (níveis em µg OA equiv./100g).

Para melhor comparar resumidamente a contaminação ao longo do ano foram seleccionadas zonas muito tóxicas (Aveiro), zonas moderadamente tóxicas (Óbidos), e zonas fracamente tóxicas (Formosa) e foi estudada a concentração média anual de DSP (Tabela 3). Na zona mais problemática – Aveiro – a média anual foi quase sempre superior ao limite regulamentar. A tabela ilustra a diferença entre espécies que destoxificam rápido (berbigão e ameijoia-branca) e espécies que destoxificam mais

lentamente (mexilhão e conculha) nos ecossistemas estuarino/lagunares e oceânicos.

Zona	espécie	2003	2004	2005	2006
Litoral de Aveiro	<i>Spisula solida</i>	7.7	3.2	8.0	4.2
Ria de Aveiro	<i>Mytilus spp.</i>	56.3	23.6	93.6	19.5
	<i>Cerastoderma edule</i>	25.5	13.3	65.8	11.0
Lagoa de Óbidos	<i>Mytilus spp.</i>	7.8	9.2	10.4	29.0
	<i>Cerastoderma edule</i>	2.7	3.5	5.6	13.7
Litoral Formosa	<i>Donax trunculus</i>	16.5	42.2	10.2	21.3
	<i>Spisula solida</i>	2.4	7.6	2.7	1.3*
Ria Formosa	<i>Mytilus spp.</i>	3.2	5.7	2.6	3.0
	<i>Tapes decussatus</i>	1.0	1.4	1.8	0.7

* Média subestimada devido a defeso biológico prolongado de 4,5 meses.

Tabela 3. Níveis médios de DSP em zonas de produção seleccionadas da costa NW e Sul (μg OA equiv./100g).

A Fig. 2a ilustra a distribuição da globalidade dos resultados encontrados: cerca de 20% das amostras apresentaram níveis de DSP que excederam 16 μg OA equiv./100g. Estes resultados não se distribuíram uniformemente: as amostras de mexilhão e de conculha (Fig. 2b) apresentaram maior percentagem de resultados positivos do que os restantes bivalves (Fig. 2c).

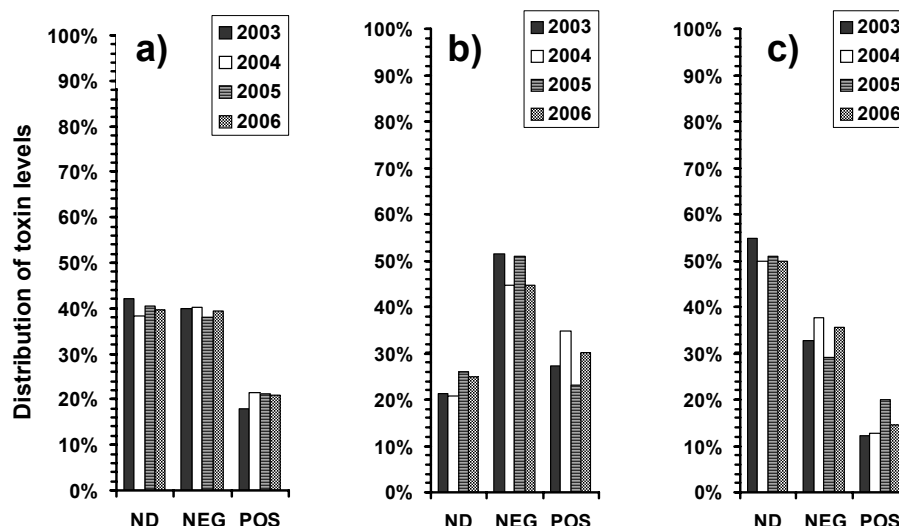


Figura 2. Distribuição relativa dos níveis de toxinas em todas as amostras analisadas entre 2003 and 2006 por três categorias: acima do limite regulamentar (POS), entre 0.1-1.0 vezes o limite regulamentar (NEG), e níveis residuais inferiores a 0.1 vezes o limite regulamentar (ND): a) todas as amostras; b) amostras de *Mytilus* spp. e *Donax* spp.; c) amostras das restantes espécies de bivalves.

A escolha de duas espécies-indicadoras para cada ecossistema revelou-se adequada e necessária, pois o mexilhão e a conculha retêm as toxinas DSP por períodos mais prolongados que as restantes espécies comerciais [5, 6]. Aquando da depuração de toxinas DSP, estas duas espécies por si só não servem para assinalar a depuração das restantes espécies, o que causaria encerramentos desnecessários da apanha de diversas espécies de bivalves se não forem também analisadas.

O conhecimento pormenorizado da contaminação com DSP obtido através de LC-MS permitiu realizar uma avaliação do risco muito melhor do que aquela até agora efectuada através do bioensaio com ratinhos e HPLC-FLD. Uma avaliação recente dos episódios de gastroenterites diagnosticados nos hospitais da região de Aveiro aponta para um aumento do número de casos semanais em alguns hospitais de maior proximidade com a Ria de Aveiro quando a concentração de DSP ultrapassa 100-150 µg OA equiv./100g [7]. Em função do conhecimento crescente sobre o risco de exposição a toxinas DSP, a Delegação do IPIMAR na região centro (CRIP-Centro) tem organizado desde 2003 sessões de divulgação junto da população piscatória e distribuição de panfletos e cartazes para alertar a população sobre os perigos da pesca desportiva de bivalves durante os períodos de contaminação [8]. O conhecimento de que os bivalves, em particular o mexilhão e a conculha, apresentam frequentemente vestígios de DSP, também se revela importante para o estudo dos efeitos crónicos da exposição ao OA. O OA tem reconhecidas propriedades tumorais [9], mas estas foram descobertas *in vitro* recorrendo a elevadas doses de OA a que os consumidores não estão habitualmente expostos. Por este motivo, os efeitos crónicos não foram considerados para o estabelecimento da actual legislação comunitária, tendo em conta somente os efeitos diarreicos [10]. No entanto, recentemente foi levantada a hipótese que em Espanha o consumo de moluscos estaria relacionado com o cancro colorectal [11].

Agradecimentos

O Programa “Segurança, vigilância e qualidade de moluscos bivalves” (QCAIII/med.4/MARE) financiou este trabalho na totalidade. O apoio técnico foi dado por Alcina Santos, Delfina Augusto e Jorge Lameiras.

Bibliografia

- [1] Anónimo. 2002. Commission Decision 2002/225/EC from 15 March 2002. Off. J. Eur. Comm., L 75, 62-64.
- [2] CRL, 2001. Report of the working group on sampling plans. Brussels, 3-4/Oct/2001.
- [3] Tubaro, A., S. Sosa, G. Altinier, M.R. Soranzo, M. Satake, R. Della Loggia, T. Yasumoto. 2004. Short-term oral toxicity of homoyessotoxins, yessotoxin and okadaic acid in mice. *Toxicon*. 43:439-445.
- [4] Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2002. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS — a widespread phenomenon. *Toxicon*. 40:33-42.

- [5] Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*. 44:123-134.
- [6] Vale, P. 2006. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, part II: offshore bivalve species. *Toxicon*. 47:163-173.
- [7] Burri, S., Vale, P. 2006. Contaminação de bivalves por DSP – risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endémica. *Rev. Port. de Saúde Pública*, 24:115-124.
- [8] Burri, S., Cerejo, M., Vidal, T., Sobral, V. 2006. Divulgação das normas de produção e comercialização de moluscos bivalves/sensibilização para o consumo de bivalves salubres. III Jornadas – Moluscos bivalves: ambiente, produção, qualidade, Lisboa, 25 de Outubro de 2006.
- [9] Fujiki, H., Suganuma, M. 1999. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:150-155.
- [10] CRL, 1999. Report of the working group on toxicology of yessotoxins, pectenotoxins and the okadaic acid group toxins. Brussels, 24/Feb/99.
- [11] Lopez-Rodas, V., E. Maneiro, J. Martinez, M. Navarro, E. Costas. 2006. Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72:391-408.

Evolución de los episodios tóxicos detectados en las zonas de producción de moluscos en la costa gallega entre los años 2003 y 2006

J. Correa, A. Vidal, M. Goicoechea, C. Salgado, F. Arévalo
*Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia,
Peirao de Vilaxoan s/n, 36611 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra.*

Resumen

En este trabajo se muestra la evolución de los episodios tóxicos detectados en las principales áreas de producción de moluscos en las Rías Gallegas durante los años 2003, 2004, 2005 y 2006.

Lo más destacable en estos cuatro años fue la presencia de un fuerte episodio tóxico de tipo PSP que se inicia durante los últimos meses del año 2005, provocando cierres en las distintas zonas de producción que se alargaron hasta mediados de Abril de 2006. Este episodio fue debido a afloramientos de *Gymnodinium catenatum* que afectaron a todas las rías. Este tipo de proliferaciones son poco frecuentes en el litoral gallego, hasta el punto de no haberse registrado ninguno tan intenso desde el año 1995.

Introducción

El programa de vigilancia por el que se regula el control de las biotoxinas PSP (Paralytic Shellfish Poison), Biotoxinas Lipofílicas y ASP (Amnesic Shellfish Poison) en moluscos bivalvos y otros organismos procedentes de la pesca, marisqueo y acuicultura (Orden de 15 de Enero de 2002. D.O.G. nº 12, 2002; Decreto 28/2005 del 28 de Enero 2005. D.O.G. nº 38, 2005), que se lleva a cabo en la Unidad de Biotoxinas del INTECMAR, incluye, entre otros aspectos, el análisis periódico y exhaustivo de las diferentes especies de moluscos destinadas al consumo humano en las zonas de producción de Galicia (Orden de 14 de Noviembre de 1995. D.O.G nº 221, 1995).

La red de control del INTECMAR comprende 52 puntos fijos primarios de control (bateas con cultivo de moluscos bivalvos), estratégicamente distribuidos en las 7 rías principales de Galicia. Además, hay establecidos 40 puntos de control para moluscos infaunales y 17 para epifaunales. La información sobre la localización de cada uno de estos puntos y su situación administrativa se puede obtener en la página web del INTECMAR (www.intecmar.org).

Como laboratorio oficial para el control analítico de biotoxinas en las zonas de producción, así como en las etapas de transformación, comercialización, medios de transporte y puntos de venta, la Unidad de Biotoxinas del INTECMAR, también realiza los análisis correspondientes a los moluscos procedentes de las redes de inspección de la Comunidad Autónoma de Galicia.

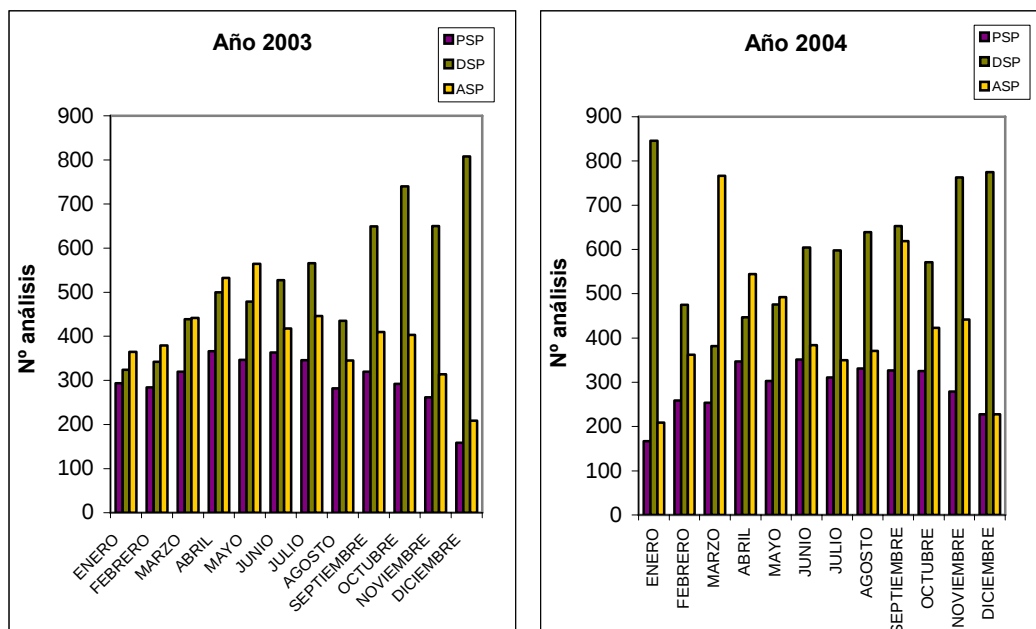
Resultados

Datos de Programa de Control. La Unidad de Biotoxinas del INTECMAR, dentro de su programa de control de biotoxinas marinas, recibió durante los años 2003-2004 un total de 17.219 muestras, con las que se realizaron 30.822 análisis. Durante el bienio 2005-2006 la cantidad de muestras recibidas fue de 16.675, con las que se realizaron un total de 32,172 análisis. La distribución de estos análisis se presenta en la Tabla 1. Cabe destacar el aumento del número de análisis efectuados en el año 2006 debido, principalmente, a un fuerte episodio tóxico tipo PSP que comenzó a finales del 2005.

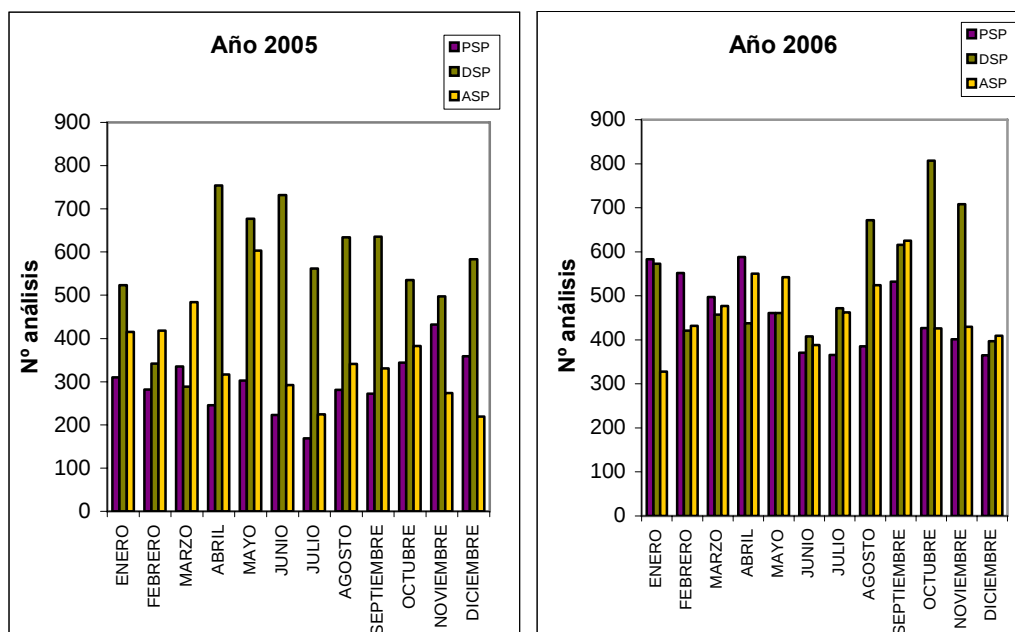
Año	Nº Muestras	Nº análisis			Nº Total de análisis
		PSP	DSP	ASP	
2003	7.759	3.635	6.459	4.827	14.921
2004	9.460	3.482	7.229	5.190	15.901
2005	8.633	3.556	6.764	4.301	14.621
2006	8.042	5.528	6.430	5.593	17.551

Tabla 1. Relación de número de muestras y análisis realizados en los años 2003-2006.

Distribución mensual de los análisis de biotoxinas en las zonas de producción. En las Figs. 1a, 1b, 1c y 1d se representa la distribución mensual de los ensayos para los tres tipos de toxicidad durante los años 2003, 2004, 2005 y 2006, respectivamente.



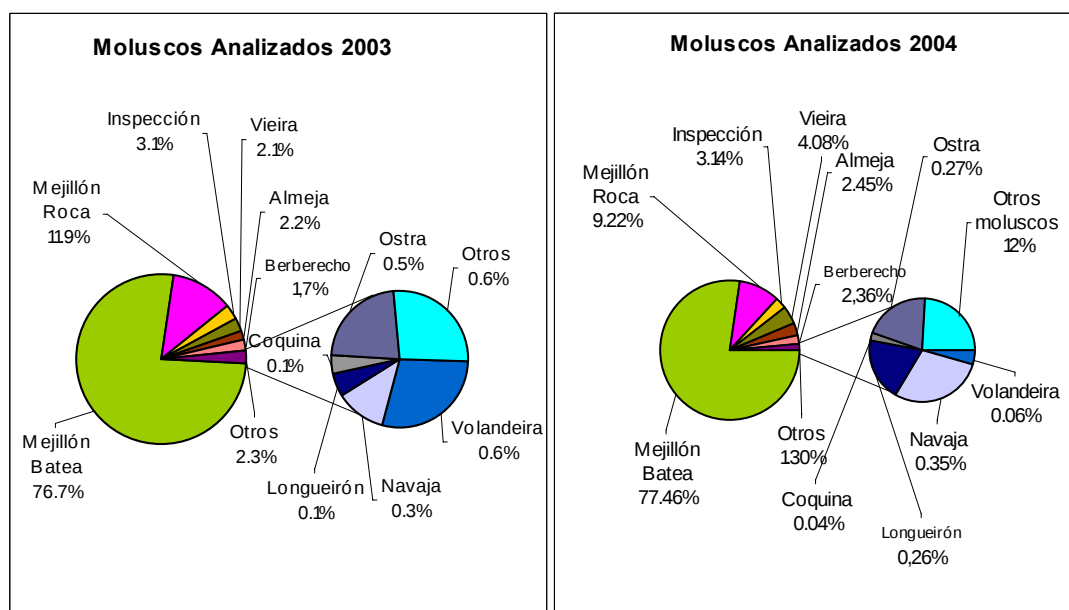
Figuras 1a y 1b. Distribución mensual de los análisis de biotoxinas PSP, DSP y ASP, años 2003 y 2004.



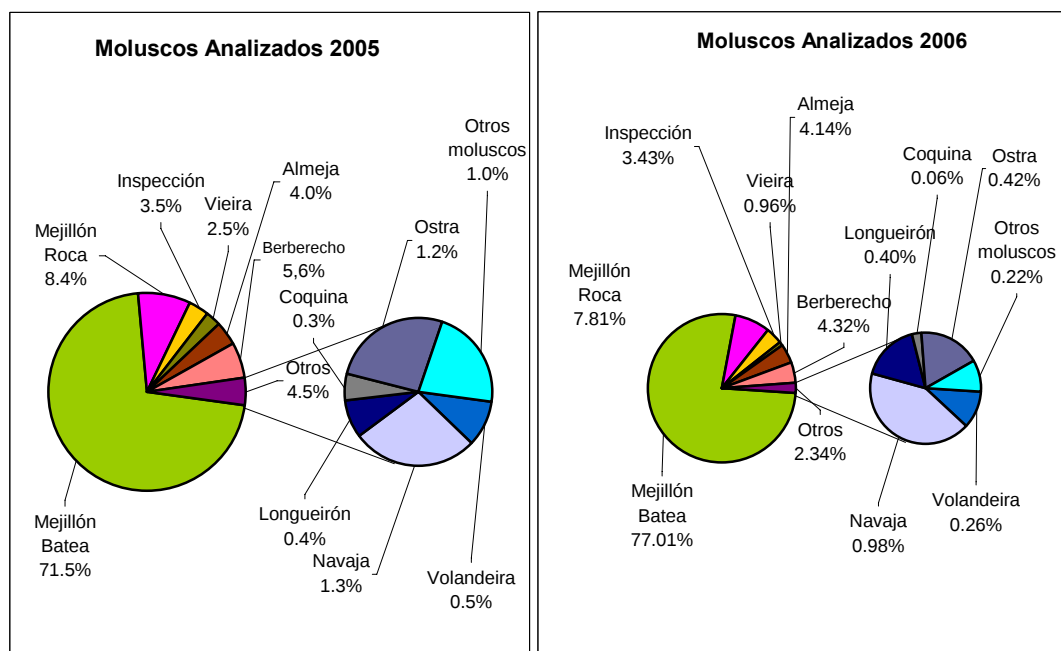
Figuras 1c y 1d. Distribución mensual de los análisis de biotoxinas PSP, DSP y ASP, años 2005 y 2006.

De forma general, a lo largo de estos años, el número de análisis de ASP y DSP es considerablemente mayor al de PSP lo que está en concordancia con el hecho de que las especies responsables de la producción de estas toxinas sean autóctonas y presenten, de forma general, episodios tóxicos en primavera y en otoño. Sin embargo, como se pueden ver en las Figs. 1c y 1d, el número de análisis PSP efectuados aumentó mucho entre finales del año 2005 y principios del 2006 coincidiendo con un episodio tóxico producido por *G. catenatum* especie alóctona en las Rías Gallegas.

Distribución en porcentaje de los distintos tipos de moluscos analizados en el programa de control. Tal y como se refleja en las Figs. 2a, 2b, 2c, 2d las muestras correspondientes a mejillón cultivado en viveros flotantes representan entre un 70 % y un 80 % de las muestras analizadas anualmente por el laboratorio. Las muestras recogidas por los Servicios Veterinarios Oficiales de la Consellería de Sanidad y por los Servicios de Guardacostas de la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos normalmente representan en torno a un 3,5 %. El mejillón de roca, como indicador de toxicidad para control en las zonas de marisqueo, representa entre un 7 y 12 % de las muestras, y el resto lo completan pectínidos, almejas, berberechos, navajas, ostras y otros moluscos en las proporciones indicadas en los gráficos que se muestran a continuación.



Figuras 2a y 2b. Proporción de los diferentes moluscos analizados. Años 2003 y 2004.



Figuras 2c y 2d. Proporción de los diferentes moluscos analizados. Años 2005 y 2006.

Evolución de los episodios tóxicos en las zonas de producción de moluscos cultivados en viveros flotantes entre los años 2003 y 2006. Los periodos de prohibición de extracción provocados por los diferentes grupos de toxinas regulados en la Comunidad Autónoma de Galicia quedan recogidos en las Figs. 3a, 3b, 3c y 3d.

Año 2003



Figura 3a. Periodos de cierres en las zonas de producción de moluscos de batea durante el año 2003.

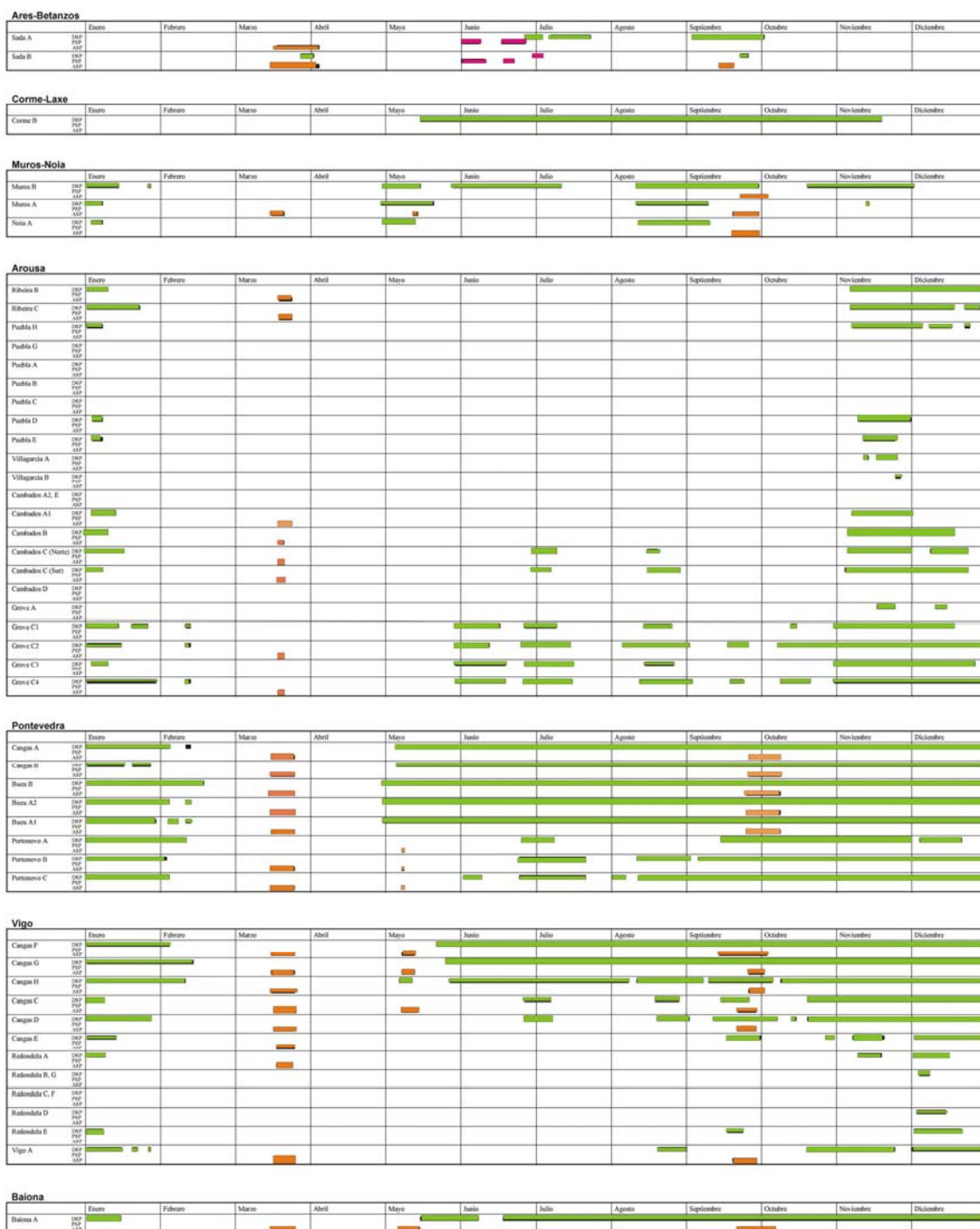
Año 2004

Figura 3b. Periodos de cierres en las zonas de producción de moluscos de batea durante el año 2004.

Año 2005



Figura 3c. Periodos de cierres en las zonas de producción de moluscos de batea durante el año 2005.

Año 2006



Figura 3d. Periodos de cierres en las zonas de producción de moluscos de batea durante el año 2006.

Biotoxinas Lipofílicas. Es la toxicidad que se presenta con más frecuencia en las zonas de producción de la Comunidad Autónoma y la responsable de la mayoría de los cierres siendo estos por lo general prolongados.

Suele haber dos episodios anuales uno en primavera y otro que comienza a finales del verano, principios del otoño. El episodio de primavera es generalmente de corta duración y no afecta a todas las zonas de producción, mientras que el segundo afecta prácticamente a todas las zonas y es mucho más intenso, prolongándose en ocasiones hasta Enero del año siguiente como ocurrió en los años 2003, 2004 y 2005.

Las zonas más afectadas durante estos años han sido la totalidad de la Ría de Pontevedra, y la zona externa de la Ría de Vigo donde los episodios de primavera y otoño prácticamente se solapan en los años 2003 y 2004. Por el contrario, las zonas menos afectadas correspondieron al norte e interior de la Ría de Arousa.

Biotoxinas ASP. Los cierres producidos por esta toxina suelen ser de corta duración y tienen lugar normalmente durante la primavera y al final del verano. En el año 2003 se produjo un solo episodio de ASP entre los meses de Abril y mayo, de menos de 30 días de duración, que afectó a Baiona, y a la Ría de Ares-Betanzos, alcanzándose un valor máximo de 173,4 µg AD/g en esta última.

Durante el año 2004 se producen dos episodios uno en primavera que afecta a todas las rías menos a la de Corme-Laxe y otro en otoño que además tampoco se detecta en la Ría de Arousa. El valor máximo alcanzado fue de 171,0 µg AD/g en la Ría de Muros-Noia.

En el año 2005 se produce un único episodio en primavera que afecta a todas las rías menos a la de Ares-Betanzos.

Finalmente durante la primavera del año 2006 se registró un episodio relativamente corto en las Rías de Ares-Betanzos y en la de Vigo, mientras que en otoño otro afectó a todas las rías excepto a Ares-Betanzos y Arousa.

Biotoxinas PSP. Es la menos frecuente de las que afectan a las zonas de producción de la Comunidad Autónoma. Provocó, durante el verano, cierres de muy pocos días de duración debido a la proliferación de *Alexandrium minutum*, en la Ría de Baiona en el año 2003 y en Ares-Betanzos durante el 2004.

A finales de Octubre, principios de Noviembre del año 2005, da comienzo un fuerte episodio tóxico de PSP causado por la presencia de *Gymnodinium catenatum*, que afecta a todas las zonas de producción excepto a la Ría de Ares-Betanzos, prolongándose en algunas zonas de la Ría de Vigo hasta el mes de Abril del año siguiente y alcanzando valores de toxicidad que en ocasiones superaron los 4.000 µg STX eq /100g vianda.

Debemos destacar que los cierres producidos por proliferaciones de *Gymnodinium catenatum* son muy poco frecuentes, no habiéndose registrado ninguno de estas características desde el año 1995.

El episodio tóxico detectado en el año 2005, fue estudiado exhaustivamente con el objeto de conocer la distribución de toxicidad a diferentes profundidades de toma de muestra y su relación con la presencia de especies productoras (*Gymnodinium catenatum*). Se estableció como punto de control el polígono Bueu-A1 situado en la Ría de Pontevedra, los resultados obtenidos indicaron toxicidades superiores en superficie con respecto a las halladas en profundidad y, además, concordante con los valores de recuento de células tóxicas presentes en esas toxicidades. El mejillón cultivado en este polígono permaneció tóxico durante 1 mes después de la desaparición de células tóxicas en el agua y 60 días más presentó toxicidad residual.

Evolución de los episodio tóxicos en las zonas de producción de moluscos infaunales. En condiciones oceanográficas favorables y ausencia de células tóxicas se realiza un muestro semanal en todas las zonas de producción, usando el mejillón de roca como especie indicadora. Cuando las condiciones oceanográficas o la presencia de toxina en mejillón de roca lo aconsejan se analizan las distintas especies sometidas a explotación. Éstas, generalmente, están mucho menos afectadas por biotoxinas que los moluscos cultivados en viveros flotantes.

Es frecuente que en rías como la de Muros-Noia y la de Arousa no se produzca ningún cierre anual y en caso de producirse, su duración suele ser muy corta.

Las zonas más afectadas son normalmente las Rías de Vigo y Pontevedra y las zonas que van desde a Costa da Morte al litoral de Lugo. Se aprecia una clara tendencia a que estos cierres tengan lugar a principios de la primavera, finales del verano y durante el otoño.

Biotoxinas Lipofílicas. Los cierres provocados por esta toxicidad no son tan intensos como en las zonas de producción de moluscos cultivados en viveros flotantes, y su duración es mucho menor; la toxina sólo aparece cuando la marea roja es muy intensa y prolongada. Se producen fundamentalmente a finales del verano y durante el otoño, y excepcionalmente durante la primavera como ocurrió en el año 2005 en todas las zonas de producción menos en las pertenecientes a la Ría de Arousa.

Durante los años 2003, 2004 y 2006, no se produjo ningún cierre en la Ría de Arousa ni en la de Muros-Noia, exceptuando uno ocurrido a finales de Agosto de 2006 en esta última que duró apenas una semana.

Biotoxinas PSP. Son cierres debidos habitualmente a la presencia de *Alexandrium minutum*. Suelen presentarse entre los meses de Mayo, Junio y Julio y afectan, principalmente, a Baiona y a las Rías de Ferrol, Ares-Betanzos y A Coruña (donde se han producido cierres durante estos cuatro años) y en menor manera a zonas de la Costa da Morte (Camariñas).

A finales del año 2005 principios del 2006 se registran cierres en las zonas de producción de las Rías de Vigo, Pontevedra y parte de las zonas de la Ría de Arousa debidos a la aparición de *Gymnodinium catenatum*.

El valor más alto alcanzado durante estos años, 1.600 µg STX eq. /100g. de vianda, se obtuvo en una muestra de almeja procedente de la zona II de Pontevedra el 16 de Diciembre de 2005.

Biotoxinas ASP. Afectan de la misma manera al mejillón de batea y a los moluscos infaunales. Los cierres son de corta duración, extendiéndose habitualmente en un periodo corto de tiempo a un gran número de zonas.

En el año 2003 se ven afectadas durante el mes de Mayo las zonas de producción de Cedeira, Ferrol, Ares y A Coruña; los meses de Julio y Octubre Camariñas, y en Julio la Ría de Vigo.

Durante el año 2004 tienen lugar dos episodios, uno en la primavera que afecta a todas las zonas a excepción de Arousa y Costa da Morte y otro que comienza en Septiembre y que afectó a las Rías de Vigo, Pontevedra, Muros-Noia y a la Costa da Morte.

En el año 2005 se produce un episodio que comienza hacia el mes de Mayo y que se extiende a todas las zonas de producción excepto a las Rías de Ferrol, Ares-Betanzos y A Coruña, donde se produce un único episodio, en la Ría do Burgo, en Octubre.

Para finalizar, resaltar que en el 2006 se registran dos periodos de cierre, uno en primavera que afecta a Celeiro, Ferrol, Ares, O Burgo y otro en torno al mes de Septiembre que afecta a zonas de la Costa da Morte, Muros, Pontevedra y Vigo.

El valor más alto alcanzado en estos cuatro años corresponde a una muestra de almeja procedente de la Zona I de Vigo, analizada el día 21 de Septiembre de 2004, que alcanzó los 316 µg. AD/g. de vianda.

Ecossistema costeiro de Aveiro (Portugal): Proliferações de *Gymnodinium catenatum* e detecção de toxinas PSP

M.J. Botelho¹, T. Vidal², S. Palma¹, S.S. Gomes¹, S.M. Rodrigues¹,
P. Vale¹, M.G. Vilarinho¹ y M.T. Moita¹

(1) Instituto Nacional de Recursos Biológicos- INRB /IPIMAR,
Av. Brasília 1449-006 Lisboa

(2) Instituto Nacional de Recursos Biológicos- INRB /IPIMAR, CRIP Centro,
Canal das Pirâmides 3800-242 Aveiro

Resumo

As proliferações de *Gymnodinium catenatum* detectadas na Baía de Lisboa em Agosto de 2005, permitiram confirmar esta zona como epicentro para o início destes *blooms*, relacionados com a pluma de afloramento do Cabo da Roca. A progressão do *bloom* para Norte foi observada sucessivamente nas estações costeiras de monitorização, tendo atingido as Rias Galegas no final de Outubro.

A zona de Aveiro, onde se detectaram nos bivalves as concentrações mais elevadas de toxinas e com maior persistência no tempo, foi a região escolhida para se apresentarem os resultados da relação entre as toxinas paralisantes (PSP) e a ocorrência de *Gymnodinium catenatum*, entre Outubro de 2005 e Maio de 2006.

Em Novembro de 2005, *G. catenatum* atingiu a concentração máxima (43.000 células L⁻¹) na zona costeira de Aveiro, mantendo-se na zona norte de Portugal até Janeiro de 2006. Verificaram-se dinâmicas diferenciadas na toxificação de bivalves, em que a concentração máxima de PSP foi detectada em mexilhão com a concentração de 1.014 µg. equivalentes STX/100 g. tecido. Este valor, foi registado 5 dias após a abundância máxima de *G. catenatum*. Na amêijoia-branca o valor máximo de toxina foi detectado 10 dias depois apresentando a concentração de 589 µg. equivalentes STX/100 g. tecido. A toxicidade manteve-se no mexilhão e berbigão até final de Janeiro de 2006.

Introdução

A região de Aveiro, localizada na costa Noroeste de Portugal, é anualmente afectada por *blooms* de algas tóxicas que originam contaminações em bivalves do tipo DSP e ASP. Os problemas tipo PSP registados entre 1985 e 1995 resultaram de *blooms* de *G. catenatum*, espécie que após 1995 só foi detectada em baixas concentrações. Com base nos resultados observados em 1985, 1994 e 1999, colocou-se a hipótese de que, durante o Verão, os *blooms* de *G. catenatum* poderiam originar-se na Baía de Lisboa. Estes seriam formados a partir da acumulação e retenção de algumas células de *G. catenatum* na área norte daquela baía, uma zona de “sombra” ao jacto de afloramento com origem no cabo da Roca [1]. No final

da época de afloramento estes *blooms* poderiam ser advectados para norte de acordo com a circulação prevalente, devido à alteração dos ventos dominantes do quadrante norte para sul [2].

A toxificação e detoxificação por toxinas paralisantes de bivalves da região de Aveiro não foram ainda objecto de um estudo detalhado, em parte devido à ausência de *blooms* de *G. catenatum* nos últimos anos. Também o método de cromatografia líquida com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) para a detecção destas toxinas só foi implementado após os últimos *blooms* de 1995, sendo o método anterior do bioensaio pouco sensível a baixas concentrações de toxinas e não permitindo detectar as fases iniciais da toxificação dos bivalves. Os poucos estudos utilizando HPLC incidiram sobre a toxicidade recorrente em *Scrobicularia plana* do Estuário do Mondego e *Tellina crassa* da costa Noroeste quando se sugeriu que, face à ausência de *G. catenatum* na coluna de água, essa toxicidade seria resultado da ingestão de quistos de dormência presentes no sedimento [3].

Neste trabalho, apresentam-se as concentrações máximas de *G. catenatum* e de toxinas PSP registadas respectivamente, nas estações de monitorização de algas tóxicas da costa Noroeste de Portugal e em 3 espécies de bivalves da ria de Aveiro e zona costeira adjacente, desde Julho de 2005 até Maio de 2006. Estes resultados permitiram descrever o transporte dos *blooms* de *G. catenatum* desde a Baía de Lisboa até ao topo Norte de Portugal e a dinâmica de toxificação e detoxificação dos bivalves dentro e fora da ria.

Material e métodos

As amostras de fitoplâncton foram colhidas semanalmente à superfície em estações costeiras pouco profundas e uma hora antes da preia-mar. A identificação e contagem das espécies de fitoplâncton foi realizada utilizando microscopia óptica de inversão e a técnica de Utermöhl.

A determinação de toxinas PSP foi realizada nas espécies de bivalves *Mytilus galloprovincialis* (mexilhão), *Cerastoderma edule* (berbigão) e *Spisula solida* (ameijoa-branca), que foram colhidos em duas zonas de produção, interior da ria de Aveiro e litoral adjacente, com periodicidade semanal. O método utilizado foi HPLC-FLD com oxidação pré-coluna por periodato e em modo automático [4]. O equivalente a 1,25 mg de extrato (2,5 µl) foi oxidado e injectado na coluna sem purificação da amostra. Para o cálculo da toxicidade total da amostra utilizaram-se padrões de referência certificados para as diferentes toxinas PSP (dcGTX2+3, dcSTX, B1, GTX2+3, STX), fornecidos pelo *National Research Council of Canada* (NRC-CRMP), com a excepção das toxinas C1+2, em que se assumiu que a resposta de fluorescência era idêntica à da toxina B1.

Resultados e discussão

As primeiras ocorrências de *G. catenatum* no ano de 2005 foram observados pontualmente na estação de monitorização de Cascais, na segunda semana de Julho (940 células L⁻¹) e de Agosto (80 células L⁻¹). No final de Agosto, durante um cruzeiro realizado na Baía de Lisboa para o estudo das relações do fitoplâncton com a pluma de afloramento do cabo da Roca, verificou-se uma distribuição continuada das populações de *G. catenatum* ao longo do lado sul (lado oposto à influência do vento norte) da pluma que se estendia para Oeste [5, dados não publicados], confirmando uma acumulação desta espécie em Cascais [1]. Durante o cruzeiro as concentrações de *G. catenatum* atingiram as 2.000 células L⁻¹, valores mínimos que parecem ter sido críticos para o desenvolvimento do *bloom*. Após o cruzeiro, a progressão do *bloom* para norte foi sucessivamente observada nas estações de monitorização atingindo as rias galegas no final de Outubro (Fig. 1) [6]. Este movimento para norte parece estar relacionado com a intensificação da circulação que se estabelece para norte no final da época de afloramento. No fim de Novembro, início de Dezembro, *G. catenatum* atingiu a sua concentração máxima (43.000 células L⁻¹) na costa de Aveiro e manteve-se nas águas da costa noroeste de Portugal até ao final de Janeiro de 2006.

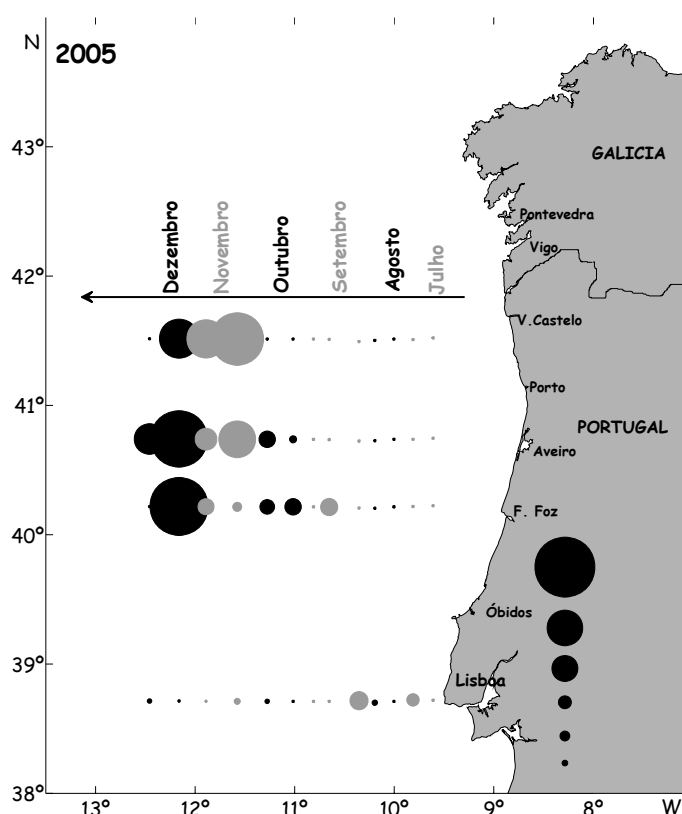


Figura 1. Distribuição quinzenal dos máximos de *G. catenatum* (células L⁻¹) nas estações de monitorização da costa NW de Portugal de Julho a Dezembro de 2005, mostrando a propagação do *bloom* para norte.

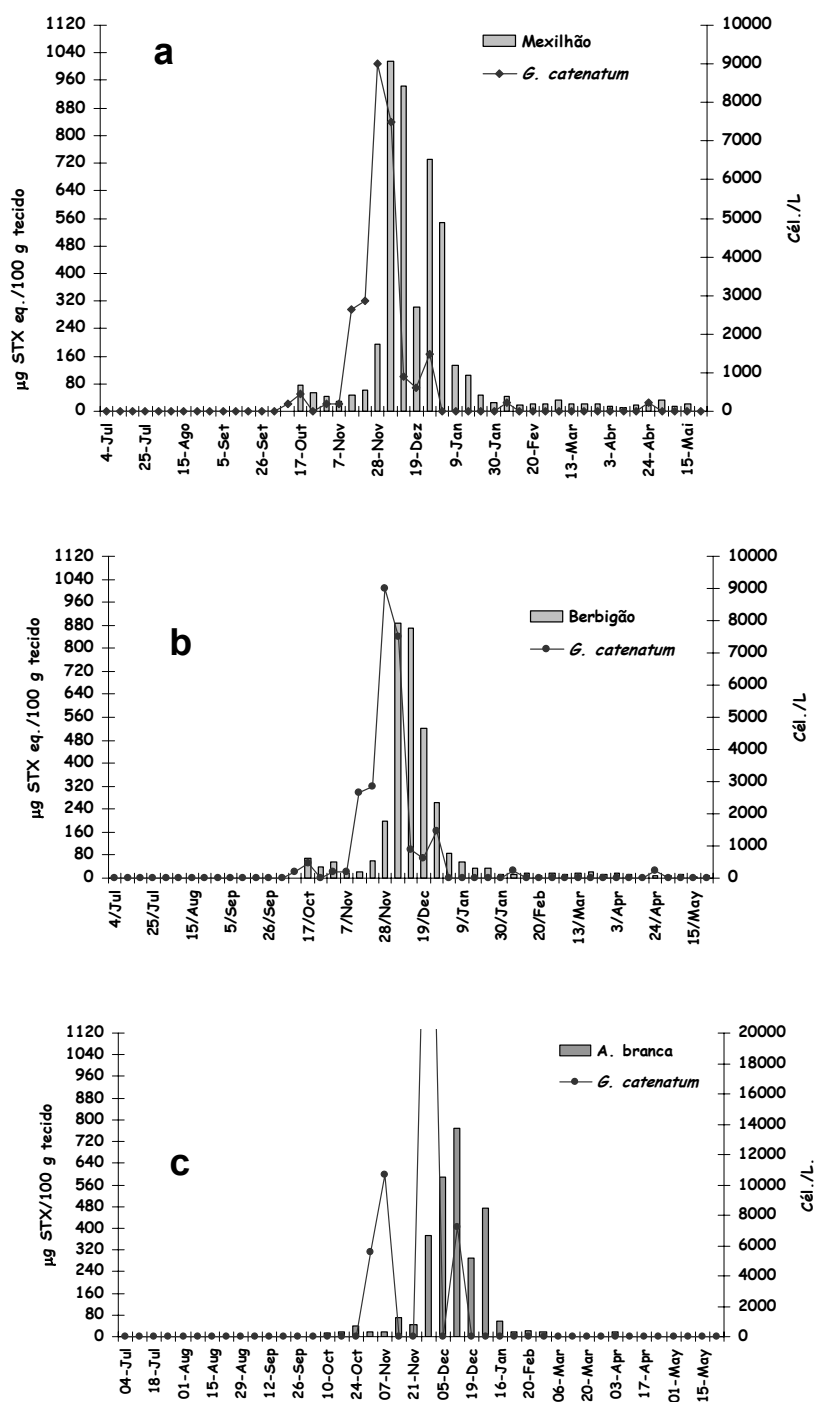


Figura 2. Relação entre a concentração de toxinas PSP em (a) mexilhão da ria de Aveiro, (b) berbigão da ria de Aveiro e (c) amêijoia-branca da zona litoral de Aveiro, e a concentração de células de *Gymnodinium catenatum* na coluna de água, desde Julho de 2005 até Maio de 2006.

A detecção de toxinas PSP nos bivalves das zonas de produção de Aveiro iniciou-se no mês de Outubro e a toxicidade manteve-se, com níveis acima do limite regulamentar (80 µg equivalentes STX /100 g tecido), até Janeiro de 2006. Este episódio tóxico teve um forte impacto económico na região, em consequência do prolongado período de interdição de colheita de bivalves, uma vez que esta região contribui com uma produção de cerca de 5.000 toneladas de bivalves por ano [7]. A detecção observada na amêijoá-branca foi rápida visto que ocorreu na mesma semana em que se detectou *G. catenatum* na coluna de água do litoral de Aveiro, enquanto que no mexilhão e berbigão do interior da ria houve um desfasamento de uma semana. A concentração mais elevada nas diferentes zonas de produção (1.014 µg equiv. STX/100 g tecido) foi registada em mexilhão proveniente do interior da ria de Aveiro. A relação da concentração de toxinas PSP e de células de *G. catenatum*, no interior da ria, mostra que o máximo de toxina foi detectado em mexilhão e ocorreu cerca de 5 dias após o máximo de células observado na coluna de água (9.000 células L⁻¹) (Fig. 2a). O mesmo tempo de toxificação foi verificado no berbigão, mas com uma concentração máxima menos elevada (886 µg equiv. STX/100 g tecido) (Fig. 2b). A relação da concentração de toxinas PSP e de *G. catenatum* para a zona litoral de Aveiro (Fig. 2c) mostra que o máximo de contaminação registado na amêijoá-branca (589 µg equiv. STX/100 g tecido) ocorreu cerca de 10 dias após o máximo de 43.000 células L⁻¹ do dinoflagelado.

A diferenciação observada na dinâmica de toxificação dos diferentes bivalves deve-se provavelmente (i) à elevada capacidade de filtração do mexilhão relativamente às outras espécies e (ii) ao facto dos bancos de amêijoá-branca se encontrarem a profundidades mais elevadas (~20 m de profundidade) do que os bancos de bivalves da ria, onde as profundidades são menores (profundidade média ~ 1 m) e a coluna de água se encontrar verticalmente homogénea [8]. Neste caso, *G. catenatum* dentro da ria encontra-se forçosamente mais misturado na coluna de água do que no litoral, onde a espécie se poderá concentrar mais tempo em menores profundidades, ou mesmo à superfície [9], não permitindo a toxificação da amêijoá-branca de fundo.

Conclusões

Os resultados que se apresentam neste trabalho permitem confirmar que a Baía de Lisboa é um importante epicentro dos *blooms* de *Gymnodinium catenatum* e, que estes *blooms* de início de Outono se propagam para norte, em consequência da intensificação da circulação para norte no final da época de afloramento.

As toxinas PSP foram detectadas na amêijoá-branca em simultâneo com o aparecimento de *G. catenatum* nas águas do litoral de Aveiro, mas nos bivalves da ria apenas se detectou uma semana depois. Contudo, o tempo entre os máximos de *G. catenatum* detectados na água e de toxicidade na amêijoá-branca foi cerca do dobro do observado nos bivalves

da ria, facto que poderá estar relacionado com uma diferente distribuição vertical do dinoflagelado no interior e exterior da ria.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelos programas QCAIII /med.4/ MARE – Segurança, Vigilância e Qualidade dos Moluscos Bivalves e QCAIII-POPesca MARE - Caracterização ecológica da zona costeira - Plataforma Continental.

A participação na IX Reunión Ibérica foi suportada pelo projecto POCI/Mar/56296/2004, Studying the impact of the climate change in the Portuguese coastal waters - the Aveiro coastal ecosystem (SIMCLAVE).

Referências

- [1] Moita, M.T., P.B. Oliveira, J.C. Mendes, A.S. Palma. 2003. *Acta Oecologica*: 24:S125-S132.
- [2] Moita, M.T. 1993. Development of toxic dinoflagellates in relation to upwelling patterns off Portugal. In: T.J. Smayda, Y.Shimizu (Eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier. Amsterdam. 299-304.
- [3] Vale, P., M.A.M. Sampayo. 2001. Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. *Toxicon*. 39:561-571.
- [4] Vale, P., H. Taleb. 2005. Assessment of quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins by pre-column derivatization and elimination of interfering compounds by SPE extraction. *Food Additives and Contaminants*. 22:838-846.
- [5] Moita, M.T., S. Palma, P.B. Oliveira, T. Vidal, A. Silva, M.G. Vilarinho. 2006. The return of *Gymnodinium catenatum* after 10 years: bloom initiation and transport off the Portuguese coast. Poster nº PO.06-14, XII International Conference on HABs, Copenhagen, Denmark.
- [6] Pazos, Y., A. Moroño, J. Triñanes, M. Doval, P. Montero, M.G. Vilarinho, M.T. Moita. 2006. Early detection and intensive monitoring during an unusual toxic bloom of *Gymnodinium catenatum* advected into the Galician Rías (NW Spain). Poster nº PO.13-53, XII International conference on HABs, Copenhagen, Denmark.
- [7] Sobral, M.P., F. Vieira, V. Sobral. 2000. Zonas de produção de moluscos bivalves da Ria de Aveiro. IPIMAR Divulgação nº12, Lisboa, Portugal.
- [8] Dias, J.M, J.F. Lopes, I. Dekeyser. 1999. Hydrological characterization of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. *Oceanologica Acta*. 22:473-485.
- [9] Moita, M.T, A.J. Silva. 2001. Dynamics of *Dinophysis acuta*, *D. acuminata*, *D. tripos* and *Gymnodinium catenatum* during an upwelling event off the Northwest coast of Portugal. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch & R.J. Lewis (Eds.), *Harmful Algal Blooms*, IOC of UNESCO, pp.169-172.

Programa de control de biotoxinas en las costas andaluzas 2003-2006: Observaciones sobre el comportamiento de distintas especies ante episodios tóxicos tipo PSP

M.A. Ocaña¹, M. Gordillo¹, L. Mamán¹, L. Fernández¹ e I. Márquez²

(1) Empresa Pública Desarrollo Agrario y Pesquero. Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. (L.C.C.RR.PP). Carretera Punta Umbria-Cartaya, km 12. El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva.

(2) Dirección General de Pesca y Acuicultura. Consejería de Agricultura y Pesca. Calle Tabladilla s/n. 41071 Sevilla.

Resumen

En este estudio se presenta un resumen de los episodios detectados en Andalucía durante los cuatro últimos años, relacionados con los tres grupos de toxinas marinas legislados en la actualidad en la Unión Europea: toxinas Paralizantes (PSP), toxinas diarreicas (DSP) y toxinas amnésicas (ASP).

Durante este período han destacado los episodios tóxicos de tipo PSP por su amplitud y duración. Los datos obtenidos han permitido conocer las pautas de comportamiento de especies tan diferentes como: concha fina (*Callista chione*), chirla (*Chamelea gallina*), almeja chocha (*Venerupis rhomboides*) y mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), constituyendo una herramienta de gran ayuda para el programa de control.

Introducción

En la costa andaluza se viene realizando el control de las zonas de producción de moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos desde 1994. El Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros es el encargado de realizar esta tarea desde 1996.

Actualmente existen 45 zonas de producción declaradas en la costa, en las que se engloban zonas de mar abierto e interior. La producción de estas zonas proceden fundamentalmente de bancos naturales, aunque en algunos casos son cultivos intensivos. Las especies que se analizan son diversas, entre ellas: almeja fina (*Tapes decussatus*), almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), almeja chocha (*Venerupis rhomboides*), coquina (*Donax trunculus*), concha fina (*Callista chione*), corruco (*Acanthocardia tuberculata*), vieira (*Pecten maximus*), berberecho (*Cerastoderma edule*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), coquinas de fango, erizos, anémonas, etc.

Durante los cuatro últimos años se han detectado distintos episodios relacionados con la presencia de microalgas tóxicas en el agua, que se engloban, en relación con los síntomas producidos en humanos, como:

intoxicaciones de tipo PSP (toxinas paralizantes); DSP (toxinas diarreicas) y ASP (toxinas amnésicas).

Los episodios más frecuentes en nuestras costas son los de tipo PSP. Los resultados obtenidos han demostrado que existe un comportamiento particular de cada especie en cuanto a la acumulación y/o desintoxicación de este tipo de toxinas. En casos como corruco [5] o vieira, los niveles de toxina se mantienen elevados incluso cuando no hay presencia de microalgas productoras en el medio.

Durante este período se ha examinado el comportamiento ante este tipo de eventos de varias especies de la zona mediterránea, constituyendo las diferencias observadas en éste un factor a tener en cuenta a la hora de establecer el orden y la frecuencia de los muestreos.

Materiales y métodos

La costa andaluza se encuentra dividida en 45 zonas de producción. En cada una de estas zonas existe una especie declarada como “principal” sobre la que se establecen los muestreos para el control y una “secundaria” en la que se verifica, dado el caso, la generalización de un episodio tóxico.

Dicho control, de carácter periódico, se intensifica ante determinados factores como: concentraciones elevadas de especies de fitoplancton potencialmente tóxicas, resultados por encima de los niveles establecidos en alguna de las toxinas analizadas, especies con tendencia a mantener valores elevados de toxinas o zonas que presentan históricamente una mayor incidencia de episodios. Los métodos de análisis son procedimientos internos basados en bioensayo de ratón para PSP [1] y DSP [2,3] y cromatografía líquida de alta eficacia [3] para el ácido domoico.

A continuación se presenta, en primer lugar, un resumen de los valores alcanzados en los tres tipos de toxinas durante los años 2003-2006. En segundo lugar, se analizan todos los resultados de PSP obtenidos en este periodo, seleccionando aquellos en los que el episodio ha afectado a un mayor número de especies de una misma zona y los datos en los que durante un episodio se han muestreado distintas especies de una misma zona en un plazo máximo de 24 horas.

Resultados

Episodios relacionados con toxinas DSP. Durante los últimos cuatro años, como se puede apreciar en la figura 1, los episodios tóxicos de este tipo afectan en mayor medida a la franja atlántica de la costa, y en particular a coquina (*Donax trunculus*), aunque también han sido detectados resultados positivos en otras especies como la chirla (*Chamelea gallina*). Son eventos estacionales que se dan en primavera y verano y a veces se solapan en el tiempo.

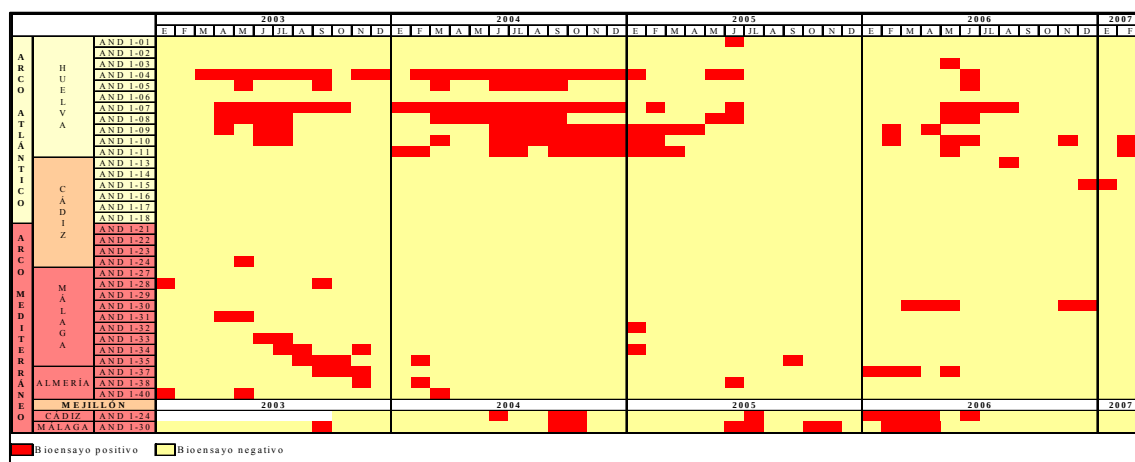


Figura 1. Resultados de bioensayo de ratón para toxinas DSP durante 2003-2006. Se identifica como bioensayo positivo si durante ese mes se obtiene este resultado en al menos una ocasión.

En cuanto a la costa mediterránea andaluza, este tipo de fenómenos son en general puntuales, excepto en el verano de 2003 en el que se detectó un episodio relacionado con un incremento de las concentraciones de especies productoras de este tipo de toxinas, que afectó a varias zonas de las provincias de Málaga y Almería.

Episodios relacionados con toxinas amnésicas. Durante estos cuatro años se han detectado valores cuantificables de este tipo de toxinas a lo largo de toda la costa, tanto en la zona atlántica como en la mediterránea, como se aprecia en la Fig. 2.

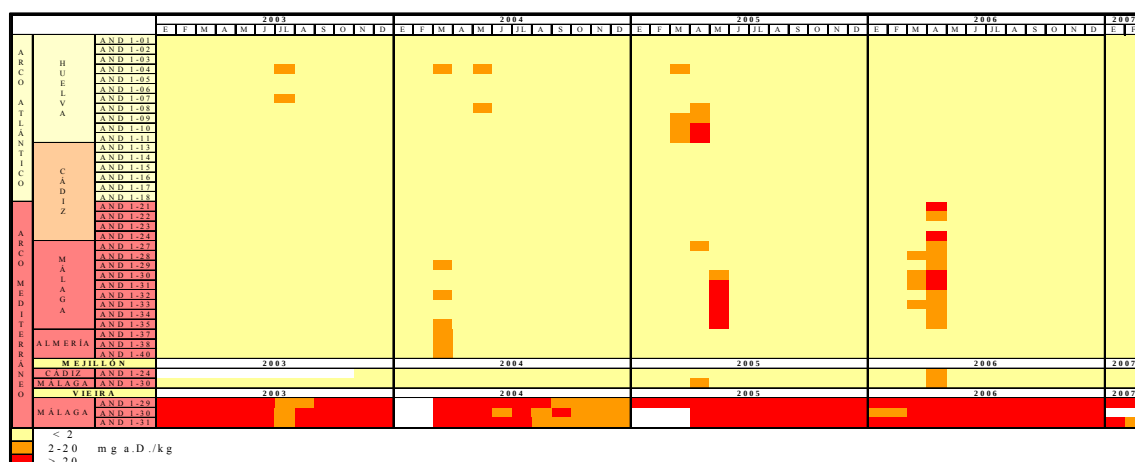


Figura 2: Representación de los valores de ácido domoico durante 2003-2006. El tramo de toxicidad aplicado corresponde al valor máximo detectado en ese mes.

Los episodios no manifiestan una periodicidad anual clara, aunque en la mayoría de los casos se han detectado en primavera. Son fenómenos de corta duración y muy sincrónicos con el incremento de las concentraciones de especies de fitoplancton productoras de este tipo de toxinas.

Episodios relacionados con toxinas paralizantes. Este tipo de eventos son los más frecuentes y de mayor importancia en nuestra costa. Durante estos cuatro años han afectado exclusivamente al área mediterránea. Son episodios estacionales que se producen en verano y/o invierno (Fig. 3).

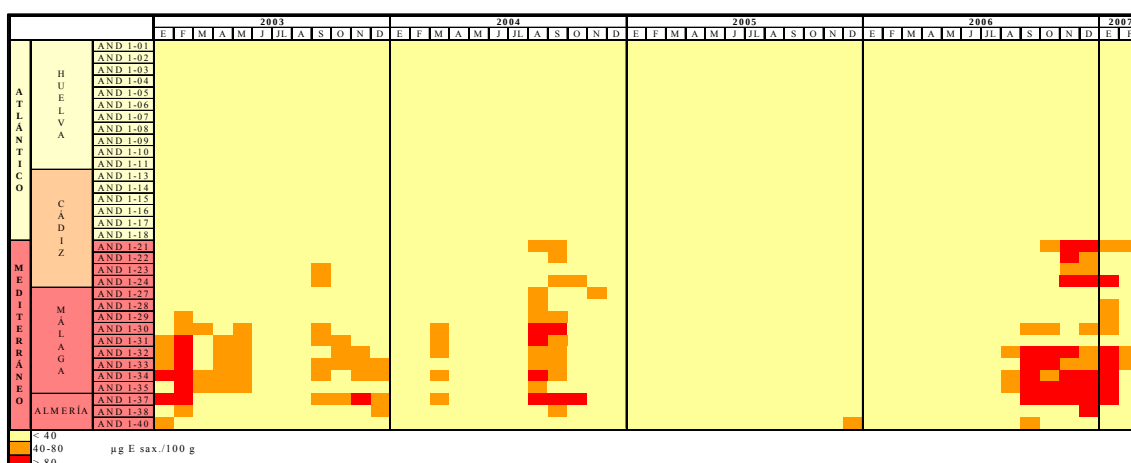


Figura 3: Representación de los valores de toxinas paralizantes durante 2003-2006. El tramo de toxicidad aplicado corresponde al valor máximo detectado en ese mes.

Lo más notable durante estos cuatro años ha sido la ausencia de resultados cuantificables durante casi todo el año 2005.

Comportamiento de distintas especies ante episodios tóxicos tipo PSP. En los casos del corruco y la vieira, el control se ha visto incrementado especialmente en las épocas de mayor extracción de las mismas.

Los resultados obtenidos en estos moluscos, como se puede comprobar en las Figs. 2 y 4, no se corresponden ni con los de otras especies de la misma zona, ni directamente con los episodios de floraciones tóxicas. De nuevo, se hace indispensable hacer mención al año 2005, en que se alcanzaron niveles muy bajos de PSP que, en vieira, llegaron a estar incluso por debajo del límite de cuantificación de la técnica.

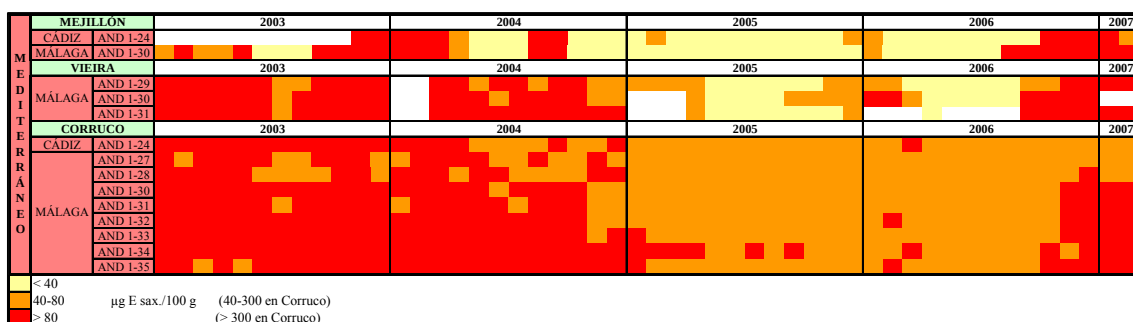


Figura 4: Representación de los valores de μg de equivalentes de saxitoxina durante 2003-2006. El tramo de toxicidad aplicado corresponde al valor máximo detectado durante ese mes, excepto en el caso del corruco, en que corresponde al valor mínimo.

Tras seleccionar aquellos resultados en los que durante un episodio se han muestreado distintas especies de una misma zona en un plazo máximo de 24 horas, se obtienen gráficos como el que se muestra en la Fig. 5.

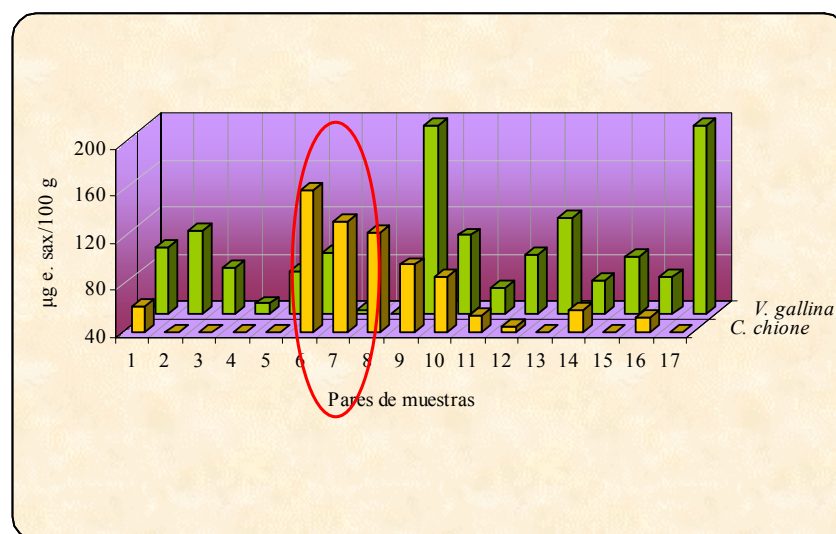


Figura 5. Parejas de datos de concha fina (*Callista chione*), y chirla (*Chamelea gallina*), cada categoría se refiere a un día y/o una zona distintas.

Como se puede apreciar, en la mayoría de los casos, los valores obtenidos en muestras de chirla son superiores a los que se alcanzan en concha fina. La única ocasión en la que no se manifiesta esta tendencia es un episodio detectado en Málaga y Almería en Agosto de 2004 (puntos 6-8 de la Fig. 5).

En la Fig. 6 se localiza el episodio del que proceden estos datos. En éste, la especie concha fina (*Callista chione*) alcanzó niveles muy elevados de toxinas y fue más lenta a la hora de descender hasta concentraciones por debajo del límite de cuantificación de la técnica.

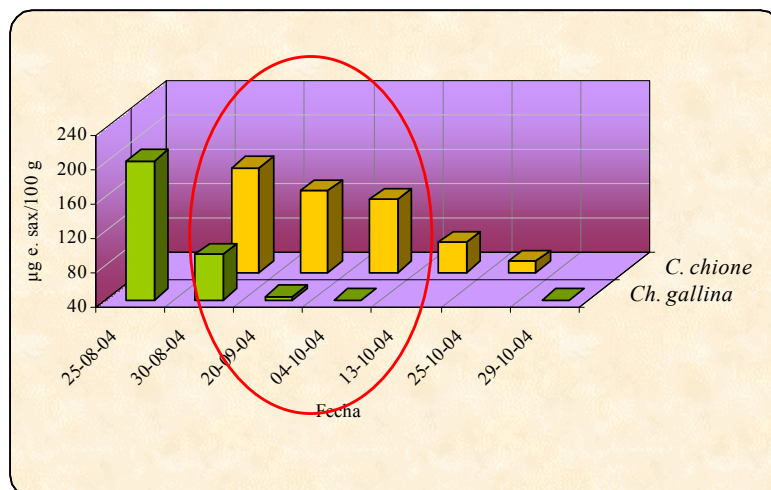


Figura 6. Resultados de muestras procedentes de Almería (zona Playa de la Juana) durante un episodio tóxico detectado en el verano de 2004.

Al comparar coquina (*Donax trunculus*) y concha fina (*Callista chione*) se aprecian resultados similares. En la Fig. 7 se advierte cómo los niveles obtenidos en la especie más pequeña son mayores que los detectados en concha fina.

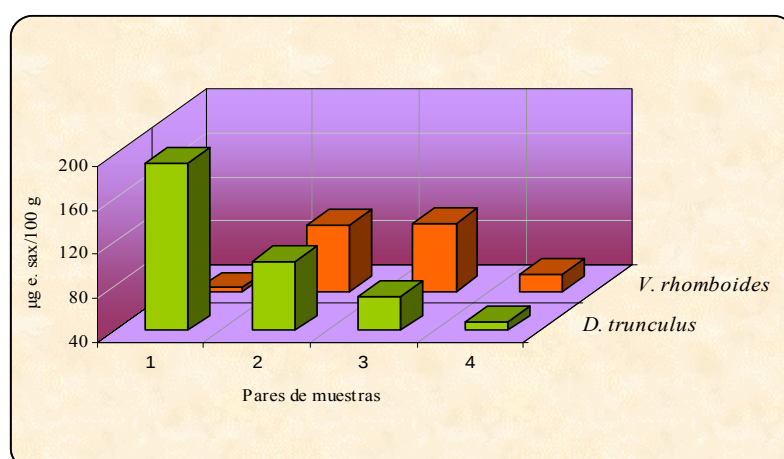


Figura 7. Pares de resultados de muestras de *Donax trunculus* y *Callista chione*.

Venerupis rhomboides (almeja chocha) y *Donax trunculus* (coquina) se comportan de forma similar la una respecto a la otra (Fig. 8).

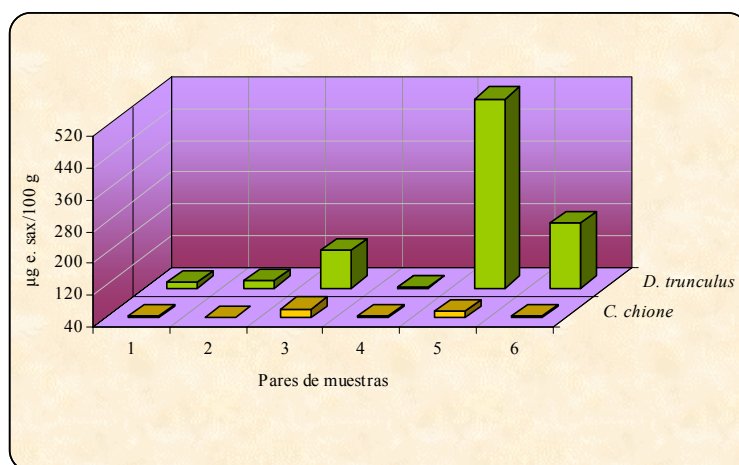


Figura 8. Pares de resultados de *Donax trunculus* y *Venerupis rhomboides*.

Durante el año 2006 se produjo un episodio, de gran duración, que afectó, a tres especies diferentes de una misma zona. Una de estas es el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Los niveles alcanzados en muestras de mejillón sobrepasan notablemente los detectados en las otras dos especies (Fig. 9).

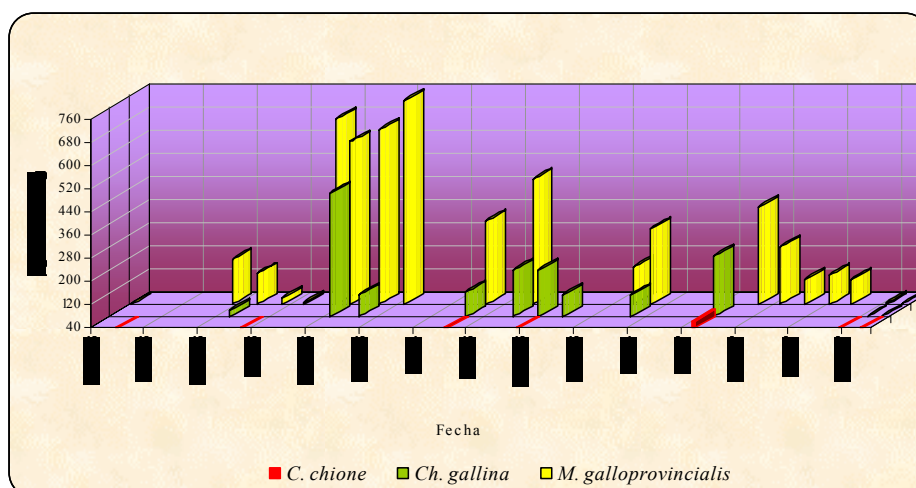


Figura 9. Resultados de muestras de tres especies procedentes de la provincia de Málaga (zona Torrox-Nerja) durante un episodio tóxico detectado en el 2006.

En resumen, en la Fig. 10 se muestran datos apareados de cuatro especies diferentes y mejillón.

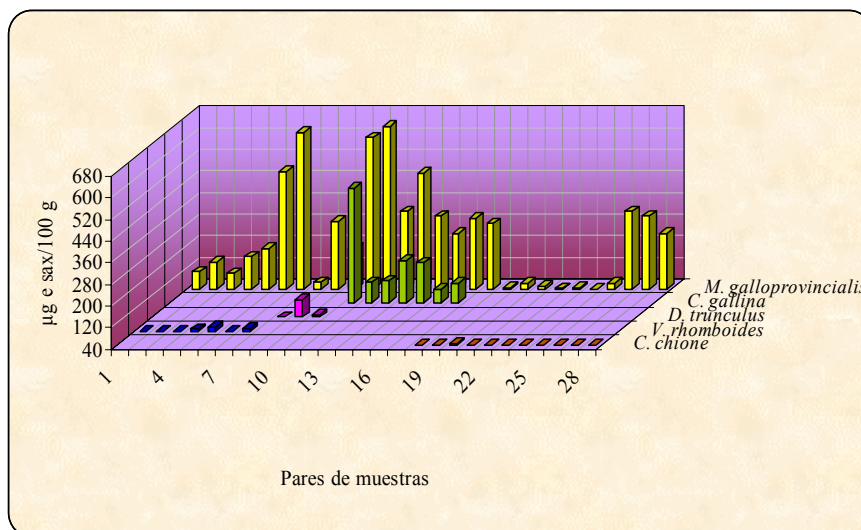


Figura 10. Pares de resultados por zonas de *Mytilus galloprovincialis*, *Venerupis rhomboides*, *Donax trunculus* y *Chamelea gallina*.

Los valores en mejillón son muy superiores a los obtenidos en el resto de las especies. Incluso *Callista chione* se mantiene cerca del límite de cuantificación de la técnica mientras que se sobrepasa ampliamente el legal para su captura en mejillón.

Conclusiones

Las costas andaluzas se ven afectadas por tres tipos de episodios generados por toxinas marinas: episodios de tipo DSP, de tipo ASP y de tipo PSP.

Durante estos cuatro años, los episodios de tipo DSP han afectado fundamentalmente al arco atlántico de la costa. Se presentan con ciclos estacionales en primavera-verano. Los eventos relacionados con toxinas del tipo ASP afectan a la totalidad de la costa sin una periodicidad clara. Los episodios más importantes respecto a su duración e intensidad son los del tipo PSP. Durante estos años afectaron exclusivamente a la zona mediterránea, en verano e invierno.

Este último tipo de episodios incide en distintas especies que atendiendo a los resultados obtenidos, se podrían agrupar como:

Especie muy sensible: Mejillón. Alcanza valores muy elevados de toxinas, que fluctúan paralelamente a cambios en la concentración de microalgas tóxicas. Tiene una gran importancia como indicador biológico del proceso en la zona, pero no del estado sanitario de otras especies.

Especies moderadas: Coquina (*Donax trunculus*), chirla (*Chamelea gallina*) y almeja chocha (*Venerupis rhomboides*). Desde el punto de vista sanitario son prioritarias, puesto que incrementan su concentración tóxica rápidamente.

Especies lentas: Concha fina. Es poco sensible a las proliferaciones tóxicas. Sin embargo, una vez ha alcanzado niveles altos, su tasa de desintoxicación es lenta.

Estas categorías definidas, son de gran ayuda para establecer prioridades y frecuencias de muestreo en un sistema de control de las características del establecido en Andalucía.

Agradecimientos

A todos los compañeros que han estado relacionados con el área de biotoxinas marinas durante estos casi once años, en particular a Manuela Morillo, Rosario Martín, Carmen Sánchez y Raúl Fernández.

Referencias

- [1] AOAC. 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemist, sec 959.08
- [2] Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, K. Matsumoto, J. Clardy. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. En: E. P. Ragelis (Ed.). *Seafood Toxins*. Washington, D. C., American Chemical Society (ACS Symposium Series 262.) 207-14.
- [3] Harmonised EU MBA SOP. Test Method for the Detection of Okadaic acid, Dinophysistoxins, Pectenotoxins, Yessotoxins & Azaspiracids by Mouse Bioassay. Nov 2005 v 2
- [4] Quilliam, M. A., M. Xie, W. R. Hardstaff. 1995. A rapid extraction and cleanup procedure for the liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.* No. 78:543-54.
- [5] Marquez, I. 1993. Presencia de PSP en corruco (*Acanthocardia tuberculata*) en el litoral de la provincia marítima de Málaga y distritos marítimos de La Línea y Algeciras. En: Mariño, J., J. Maneiro, J (Eds.) *Actas de la Tercera Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas*. Xunta de Galicia. 27-33.

Evidencia de Yessotoxinas en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) de la Bahía de Alfacs, Delta del Ebro.

J. Diogène^{1,2}, B. Paz³, M. Fernández^{1,2}, E. Mallat^{1,2}, E. Cañete^{1,2}, A. Caillaud^{1,2}, L. Elandaloussi^{1,2}, P. de la Iglesia^{1,2}, A. G. Cabado⁴, J. Lago⁴, J. Vieites⁴, J. Franco³.

(1) IRTA Sant Carles de la Ràpita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita.

(2) XRAq, Xarxa de Referència en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya.

(3) Fitoplànton Tóxico, Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC), Eduardo Cabello, 6, 36200 Vigo.

(4) Area de Microbiología y Toxinas ANFACO-CECOPESCA, Ctra. Col Univ, 16, 36310 Vigo.

Resumen

Durante el invierno de 2007 se ha registrado un importante episodio de presencia de yessotoxina (YTX) en mejillones de la bahía de Alfacs, Tarragona. Durante este episodio, se detectó YTX en muestras de mejillón repartidas por los diferentes puntos del polígono de producción coincidiendo con una proliferación de *Protoceraium reticulatum* que alcanzó un máximo de 2.000 células L⁻¹. Considerando las evidencias previas de presencia de YTX en la zona, y con el fin de mejorar la evaluación de toxinas lipofílicas en bivalvos, se ha procedido a implementar el bioensayo ratón específico para discriminar YTXs de otras toxinas lipofílicas y se han analizado muestras por cromatografía de líquido acoplada a espectrometría de masas. Si bien se habían identificado con anterioridad YTXs en mejillón en esta zona y proliferaciones de *P. reticulatum* incluso a densidades más altas que las registradas en el evento descrito, este episodio constituye la primera evidencia en Catalunya de presencia de YTX con implicaciones claras en el programa de vigilancia de toxinas diarreicas en bivalvos.

Introducción

Las yessotoxinas (YTXs) son unas toxinas marinas del grupo de los poliéteres, que presentan una fuerte toxicidad aguda en ratón por inyección intraperitoneal, con dosis letales 50 (LDs50) que típicamente oscilan entre 100 y 750 µg Kg⁻¹ para la mayoría de los derivados [1], no obstante para ciertos análogos descritos como el isómero 1,3-enona de la heptanor-41-oxoYTX o las amidas trihidroxiladas de la 41-a-homoYTX esta puede ser mayor de 5000 µg Kg⁻¹. Por contra, su administración por vía oral no ha demostrado poseer efectos letales incluso a la dosis más alta administrada de 10 mg Kg⁻¹ [2], y no existen hasta la fecha evidencias de intoxicación en humanos [1]. Las YTXs se encuentran actualmente reguladas por la Unión Europea con un límite máximo autorizado para el consumo de 1.000 µg Kg⁻¹ en moluscos bivalvos. Sin embargo y como consecuencia de su elevada toxicidad por vía intraperitoneal, se obtienen resultados positivos

incluso para niveles menores que los legislados, como demuestran las LD₅₀ descritas, al aplicar el protocolo clásico de bioensayo ratón denominado “Yasumoto 78” [1,3]. Las YTXs han afectado en los últimos años las áreas de producción de bivalvos de países como Japón, Nueva Zelanda, Noruega e Italia [1]. En el caso particular de Italia, la gestión de las zonas de producción afectadas por YTXs se realiza implementando un bioensayo ratón específico para discriminar YTXs de otras toxinas lipofílicas [4] también conocido como “Yasumoto, 2001” conjuntamente con el análisis de YTXs por cromatografía de líquido acoplada a espectrometría de masas (R. Poletti, comunicación personal).

En España, en concreto en la Bahía de Alfacs, con anterioridad al presente episodio, ya se había detectado la presencia de *Protoceratium reticulatum* y YTXs en mejillones [5]. El presente estudio describe un episodio importante de presencia de YTX en mejillones en la bahía de Alfacs del Delta del Ebro así como las aproximaciones metodológicas utilizadas en este contexto para abordar los análisis rutinarios de toxinas en esta zona de producción de bivalvos.

Material y métodos

Muestras de fitoplancton y recuentos. Los recuentos de fitoplancton se llevaron a cabo a partir de muestras de 50 mL previamente fijadas con formol, sedimentadas 24 h y observación con microscopio invertido (método Utermhol).

Muestras de bivalvos. Las muestras de bivalvos se tomaron en la Bahía de Alfacs en las zonas de producción del Delta del Ebro durante el invierno de 2007.

Bioensayo ratón “Yasumoto 2001”. El protocolo aplicado fue el descrito por Fernández *et al.* [4]. Muy brevemente, partiendo de 100 g vianda fresca se procede a una extracción acetónica y posterior partición líquido-líquido en Cl₂CH₂ y MeOH/H₂O (60:40). En la fracción Cl₂CH₂ se recuperan ácido okadaico (AO), dinofisistoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs) y azaspirácidos (AZAs) y se evalúa mortalidad/supervivencia de ratones expuestos a este extracto a 24 h. En la fracción MeOH se recuperan las YTXs y se evalúa mortalidad/supervivencia de ratones expuestos a este extracto a 6 h.

LC-MS/MS. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna Xterra MS C18, 5µm, 2,1x150 mm, temperatura de 35°C e inyectando un volumen de 10 µL. Se utilizó acetato amónico 2 mM a pH 5,8 como fase móvil A y MeOH como fase móvil B, a flujo de 0,20 mL min⁻¹. El gradiente empleado para las separaciones fue: 40 a 30 % A en 5 min, 30 a 20 % A en 5 min, seguido por 5 min con 20 % A, después de 20 a 0 % A en 5 min y finalmente 0 % A durante 2 min.

Los análisis mediante espectrometría de masas se realizaron con un equipo Thermo Finnigan LCQ-Advantage, con ionización por electrospray (ESI). Las condiciones de la fuente de iones se detallan a continuación: voltaje del electrospray 4,5 kV, temperatura del capilar 200°C, flujo sheath gas 40 mL min⁻¹ y gas auxiliar 20 mL min⁻¹. Adquisición en modo *full scan* negativo de 200 a 2000 *m/z*.

Resultados y discusión

La especie *P. reticulatum* identificada con anterioridad en aguas del Delta del Ebro ha demostrado su capacidad para proliferar en estas aguas a densidades que tienen un impacto sobre la acuicultura y pueden coexistir en un mismo sistema con especies productoras de toxinas DSP como *Dinophysis caudata* y *D. sacculus* (Fig. 1). Anteriormente, se había descrito en la bahía de Alfacs concentraciones de *P. reticulatum* de hasta 1.920 células L⁻¹ identificándose concentraciones de YTXs en mejillón de 50 µg Kg⁻¹ [5]. En estudios anteriores, Paz y colaboradores [6] han descrito en detalle el perfil tóxico de esta especie a partir de cultivos de *P. reticulatum* procedente de la bahía de Alfacs.

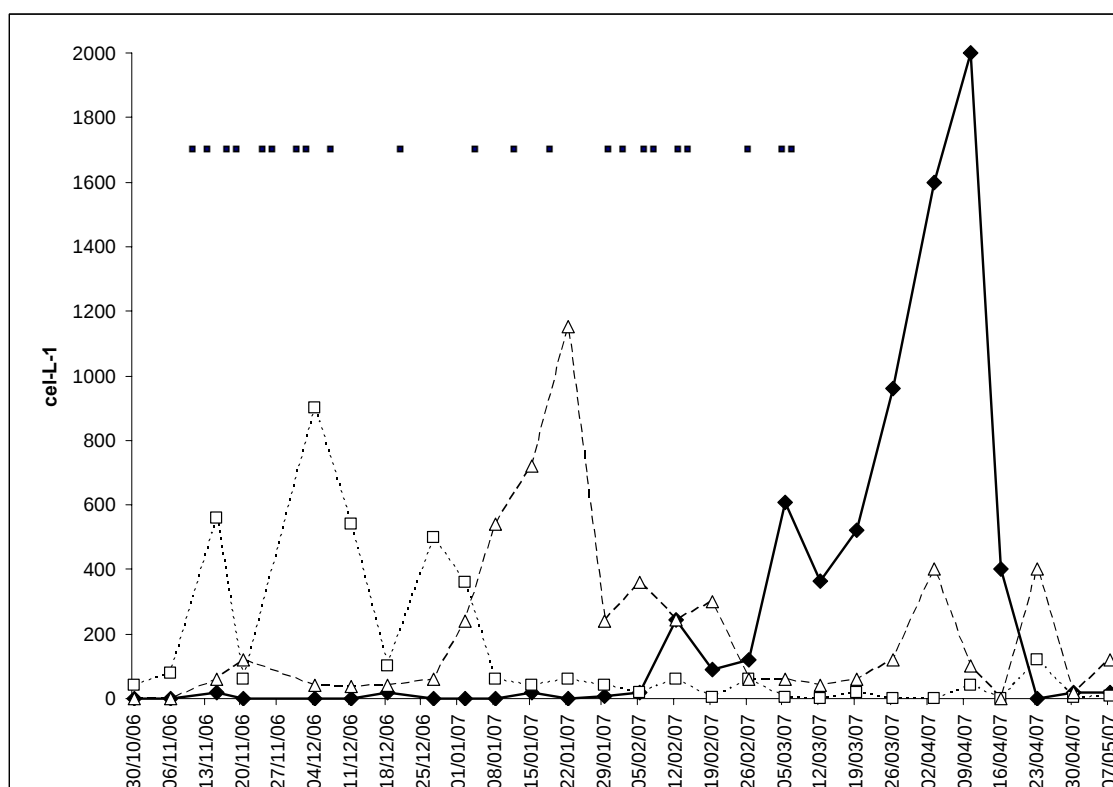


Figura 1.- Densidades máximas de *Dinophysis* y *Protoceratium* en la Bahía de Alfacs durante el evento descrito y resultados positivos del bioensayo ratón para DSP. *Dinophysis caudata* (□), *D. sacculus* (Δ), *Protoceratium reticulatum* (◆). Todos los resultados positivos de toxicidad (■) se obtuvieron según el bioensayo “Yasumoto 78”. Ante la evidencia de abundancia de *P. reticulatum* en el medio y de Yessotoxinas en mejillón, se

procedió a utilizar el bioensayo “Yasumoto 2001” a partir del 12 de Marzo de 2007, obteniéndose resultados negativos.

Durante este episodio, en su fase inicial (Noviembre 2006-Enero 2007), mientras que *P. reticulatum* estuvo presente a densidades muy bajas, se detectaron YTXs en una partida de mejillón juvenil introducido en Noviembre de 2006 en la bahía para repoblar el polígono de producción y que tenía un origen incierto. La toxicidad de esta partida tuvo una persistencia inusual que duró hasta el 10 de Enero de 2007. Durante este periodo de ausencia significativa de *P. reticulatum* en el medio se observó muy puntualmente toxicidad DSP en ostión (6 de Noviembre) y mejillón (9, 29 de Noviembre y 16 de Enero) en presencia de *D. caudata* o *D. sacculus* en la bahía. Posteriormente, la evolución temporal en las densidades de *P. reticulatum* estuvieron en concordancia con la presencia de YTXs en mejillón, durante los meses de Febrero y Marzo de 2007. Las densidades de *P. reticulatum* durante el episodio, alcanzaron concentraciones de hasta $2.000 \text{ células} \cdot \text{L}^{-1}$ determinando concentraciones de YTXs en mejillón del mes de Marzo de 2007 de $520 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (LC-MS/MS) y ausencia de las otras toxinas lipofílicas (AO, DTXs, PTXs, AZAs).

Los niveles de YTXs detectados explican los resultados positivos del bioensayo ratón “Yasumoto 78” obtenidos en la última fase del episodio. Este bioensayo es utilizado convencionalmente en análisis rutinarios para toxinas lipofílicas (AO y derivados, DTXs, PTXs, AZAs y YTXs). Ante estos resultados, la aplicación del protocolo alternativo de bioensayo ratón conocido como “Yasumoto, 2001” [4] en sustitución del anterior, ha permitido evaluar correctamente la presencia, por un lado, de las toxinas lipofílicas AO y derivados, DTXs, PTXs y AZAs (fracción diclorometano) y, por el otro, la de las YTXs (fracción metanólica). La aplicación del protocolo “Yasumoto, 2001” que está de acuerdo con la actual normativa comunitaria [7] ha permitido gestionar una importante área de producción en presencia de YTXs a concentraciones por debajo de los límites máximos permitidos, pero que representaban una clara interferencia en la determinación de las otras toxinas lipofílicas mediante el bioensayo “Yasumoto 78”.

Si bien en Italia, que es probablemente el país del área mediterránea más afectado por las YTXs, la metodología de “Yasumoto, 2001” forma parte del protocolo de actuación convencional en zonas con presencia de YTXs, recientemente Ciminello *et al.* [8] han aportado conclusiones críticas respecto a este bioensayo. Estos autores demuestran que existen desulfotyessotoxinas, unos derivados de las YTXs, que pueden encontrarse en la fracción diclorometano e interferir con la evaluación de las otras toxinas lipofílicas. Ello aparentemente no fue el caso durante este episodio, ya que cuando se aplicó este protocolo, en ningún caso la fracción diclorometano resultó positiva. Ello sin embargo constituye un elemento a tener en cuenta en la aplicación del bioensayo “Yasumoto, 2001” en otras situaciones en que *P. reticulatum* esté presente.

El análisis complementario de YTXs por cromatografía de líquido acoplada a espectrometría de masas ha permitido identificar y cuantificar

las YTXs en muestras de mejillón ayudando a entender con mayor precisión la extensión del problema y las toxinas implicadas. En un estudio sobre la distribución espacial de las YTXs en mejillones de diferentes puntos de la bahía (Marzo 2007, Tabla 1), se detectaron YTXs en todas las muestras analizadas. Igualmente el empleo de la LC-MS/MS permitió descartar la presencia de AO y otras toxinas lipofílicas en mejillón durante el episodio, tal como concluían los resultados obtenidos de los bioensayos por “Yasumoto, 2001”. No obstante, la multitud de derivados de las YTXs y la carencia de patrones de referencia, dificulta la obtención de un perfil toxínico preciso y la cuantificación mediante LC-MS/MS las YTXs presentes en las muestras analizadas (Fig. 2).

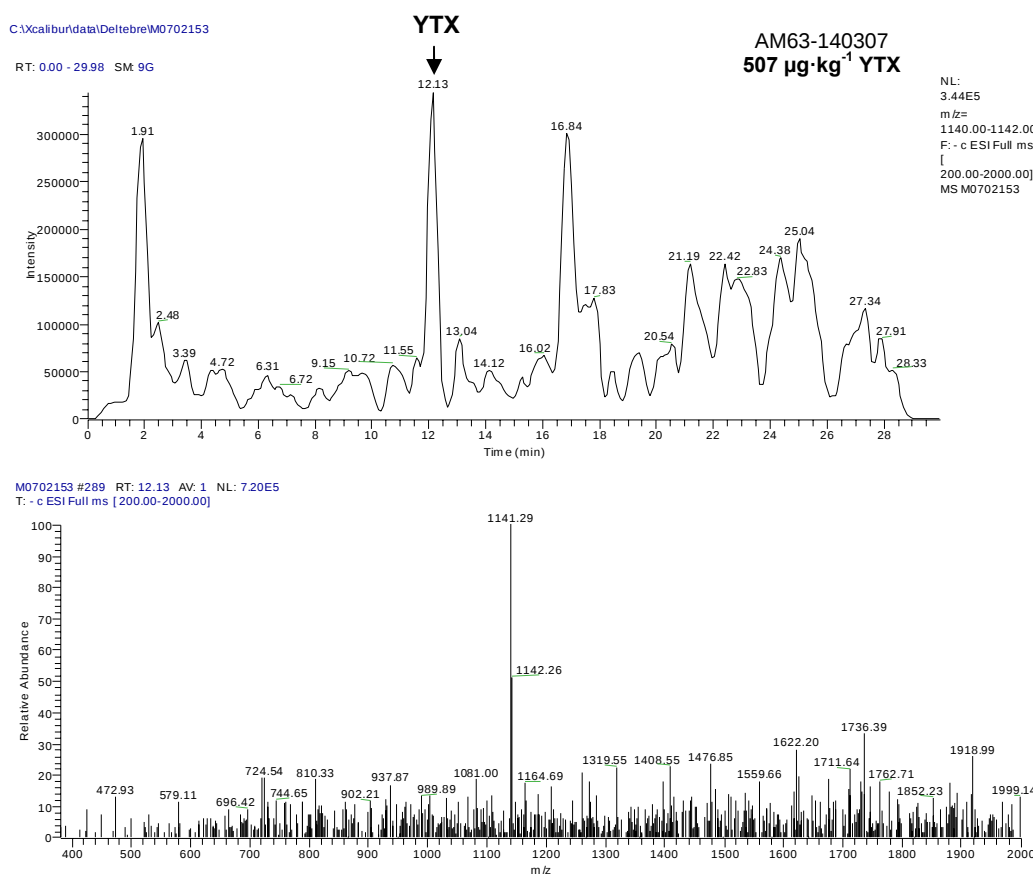


Figura 2. Cromatograma obtenido mediante análisis con LC-MS/MS de un extracto de muestra de mejillón (AM63-140307) en el que se observa la presencia de 507 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de YTX.

Muestra	µg de YTXs Kg ⁻¹ mejillón
AM09-140307	348
AM63-140307	507
AM78-140307	520
AM89-140307	264
AM09-120307	247
AM63-120307	231
AM67-120307	381
AM89-120307	338

Tabla 1.- Determinación de YTX en mejillón mediante LC-MS/MS.

Los resultados obtenidos en este trabajo invitan a estudiar con mayor detenimiento la producción de YTXs por *P. reticulatum* y los procesos de acumulación y bio-transformación de estas toxinas en bivalvos. Igualmente, si bien la aplicabilidad del protocolo de “Yasumoto 2001” puede aportar soluciones para una mejor gestión de las zonas de producción de bivalvos cuando *P. reticulatum* (u otra especie productora de YTXs) esté presente, cabe considerar con cuidado su aplicabilidad para mantener los niveles adecuados de protección del consumidor.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a Roberto Poletti sus comentarios durante la gestión del episodio de *P. reticulatum* y presencia de YTXs en mejillón. Nuestro agradecimiento también a Isabel Bravo e Isabel Ramilo por el establecimiento de cultivos de *P. reticulatum* procedentes del Delta del Ebro que en este y otros trabajos han permitido entender la importancia de esta especie y su contribución a la producción de YTXs. Este trabajo ha sido financiado por la Generalitat de Catalunya y por el INIA (Proyectos ACU-02-005 y RTA2006-00103-00-00).

Bibliografía

- [1] Background Document. Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004.
- [2] Aune, T., R. Sorby, T. Yasumoto, H. Ramstad, T. Landsverk. 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon*, 40:77-82.
- [3] Yasumoto, T., Y. Oshima, M. Yamaguchi (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 44:1249-1255.
- [4] Fernández, M., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogène, J. & T. Yasumoto (2002). Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. En: Sar, E. A., Ferrario M.E., Reguera B. *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía. pp: 77-120
- [5] E. Mallat, E. Cañete, A. Caillaud, M. Fernández, I. Bravo, B. Paz, J.M. Franco and J. Diogène (2006). Evidence of Yessotoxins in Alfacs Bay- Toxic effect evaluation by

- cell-based assays and toxin profile determination by liquid chromatography. *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae*, en prensa.
- [6] Paz., B, P. Riobó, I. Ramilo and J. Franco (2007). Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon*, 50:1-17.
- [7] EU, Official Journal of the European Union, Rule No. 853/2004, 2004.
- [8] P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, S. G. Magno, R. Poletti and L. Tartaglione (2007). Desulfoyessotoxins from Adriatic Mussels: A New Problem for Seafood Safety Control. *Chem. Res. Toxicol.* 20:95-98.

Monitorização de iessotoxinas em mexilhão na Baía de Lisboa

Susana Sousa Gomes, Sofia Palma, Maria João Botelho,
M. Teresa Moita, Paulo Vale

*Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR),
Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal*

Resumo

A iessotoxina (YTX) e os seus análogos (YTXs) são compostos lipofílicos, poliéteres de dissulfato, produzidos por microalgas como *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* e *Gonyaulax spinifera*. Em Portugal, a pesquisa de YTXs iniciou-se em 2005 recorrendo a um kit de imunoensaio comercial. O presente trabalho teve como objectivo monitorizar a presença de YTXs em mexilhão colhido na Baía de Lisboa, cujo o lado Norte representa uma zona de concentração e retenção de fitoplâncton. Numa tentativa de explicar a persistência da concentração de iessotoxina em mexilhão realizou-se em laboratório um estudo de destoxificação. Na Baía de Lisboa, o mexilhão apresentou contaminação com YTXs de Maio a Dezembro de 2005 com dois picos máximos, um em Junho com 1.53 mg Kg^{-1} e outro em Agosto com 1.42 mg Kg^{-1} . Os valores máximos de YTXs foram simultâneos com a presença de *Lingulodinium polyedrum* na água, embora em baixas concentrações. Os ensaios laboratoriais de destoxificação evidenciaram uma lenta eliminação desta toxina o que explica a persistência de YTXs no mexilhão até ao final de 2005. O facto de as elevadas concentrações de YTXs terem sido registadas quando houve baixas concentrações de células na água pode também estar relacionado com a lenta eliminação destas toxinas.

Introdução

A iessotoxina (YTX) e os seus análogos (YTXs) são compostos lipofílicos, poliéteres de dissulfato, produzidos por microalgas como *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum*, espécies que em cultura foram identificadas como as responsáveis pela produção dos análogos de YTX no Japão, Nova Zelândia, Itália e Noruega [1]. Recentemente, na Nova Zelândia foi detectada uma outra microalga produtora de YTXs em cultura, a *Gonyaulax spinifera* [2].

Inicialmente, as YTXs foram incluídas no grupo das toxinas diarreicas (DSP), no entanto, a sua forma química e os seus efeitos toxicológicos diferem grandemente das toxinas DSP [3]. Na Europa, e desde 2002, as YTXs encontram-se separadas das toxinas DSP e regulamentadas ao nível de 1 miligrama de equivalente de YTX por quilograma de parte edível (Regulamento (CE) nº 853/2004 [4]).

Os Laboratórios da Biosense (Bergen, Norway) desenvolveram um kit ELISA, presentemente em validação internacional, recorrendo a um anticorpo desenvolvido pela AgResearch (Hamilton, New Zealand) [5] que detecta todos os análogos de iessotoxina estabelecidos na legislação da União Europeia.

A pesquisa de YTXs através deste kit de imunoensaio comercial foi iniciada em Portugal em 2005. Nesse estudo foi detectada a contaminação de diversas espécies de bivalves da costa noroeste, Ria de Aveiro, e costa sul, Ria Formosa, e respectivas zonas litorais. Nas zonas estuarinas o mexilhão apresentou a contaminação mais elevada, enquanto na zona litoral a amêijoia-branca foi a espécie mais contaminada [6].

O presente trabalho teve como objectivo monitorizar a presença de YTXs em mexilhão colhido na Baía de Lisboa, cujo o lado Norte representa uma zona de acumulação e retenção de células de fitoplâncton [7], e explicar a persistência da concentração de iessotoxina em mexilhão através de um estudo de destoxificação em laboratório.

Material e métodos

Durante o ano 2005, na Baía de Lisboa colheram-se semanalmente à superfície amostras de água para a contagem e identificação de células fitoplanctónicas e mexilhão para monitorização de biotoxinas (YTXs, DSP e ASP) na parte edível.

As amostras de água foram preservadas em formol para uma concentração final de 2,4% e as células fitoplanctónicas foram identificadas e quantificadas pelo método de Utermöhl [8].

Para o estudo de destoxificação colocou-se durante 10 dias mexilhão num tanque de aquacultura com alimentação artificial (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, 1:1), com 24°C de temperatura e salinidade 33,5‰. A pesquisa de YTXs foi realizada de 2 em 2 dias em hepatopâncreas (HP) de 12 mexilhões.

A extracção das amostras e ensaio por ELISA, para a determinação de YTXs, foi realizada de acordo com as instruções que acompanham o kit [9]. Para a extracção no HP, o volume de metanol aquoso a 90% foi adicionado proporcionalmente à massa de HP retirada dos 12 indivíduos.

Resultados e discussão

Monitorização de Fitoplâncton e YTXs. Na Fig. 1 observa-se que durante o ano de 2005, na zona em estudo as amostras de mexilhão apresentaram contaminação por YTXs, de Maio até final do ano. Os dois picos máximos, que ocorreram em Junho e Agosto, foram de 1,53 mg Kg⁻¹ e de 1,42 mg Kg⁻¹, respectivamente, tendo sido neste período o limite regulamentar de 1 mg Kg⁻¹ excedido em 4 das amostras analisadas. Após

cada máximo de contaminação a concentração de YTXs manteve-se acima de 0,30 mg/kg.

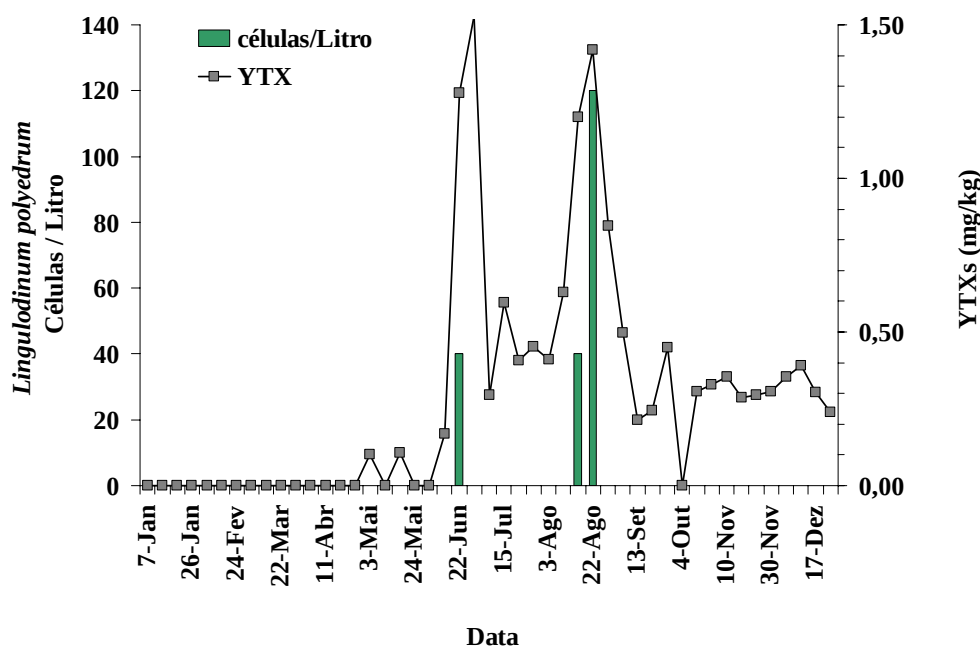


Figura 1. Concentração de um *L. polyedrum* (células/L) e de YTXs no mexilhão (mg/kg) na Baía de Lisboa, em 2005.

A contaminação máxima do mexilhão por YTXs coincide com a presença de *L. polyedrum* na água, em baixas concentrações ($\sim 10^2$ células L^{-1}). Esta espécie de microalga está inserida numa comunidade onde predominam os dinoflagelados, em particular as espécies *Dinophysis acuminata*, *Ceratium fusus*, *Ceratium furca*, e *Scirpsiella* cf. *trochoideia*. Estudos de produção de YTXs por diferentes estirpes de *L. polyedrum* isolados na costa portuguesa evidenciaram que nenhuma das estirpes era produtora de YTXs, em cultura [10]. Contudo, na Baía de Lisboa a estirpe *L. polyedrum* pode estar associada com a produção de YTXs. Durante o ano de 2005 nunca se registou em Cascais a presença de *Protoceratium* sp. e *Gonyaulax spinifera*, espécies associadas com a produção de YTXs na Ria Formosa e Ria de Aveiro [6].

Estudo comparativo de YTXs e toxinas DSP. Na estação fixa da Baía de Lisboa, verificou-se que a contaminação do mexilhão com YTXs ocorreu simultaneamente com a contaminação por DSP (Fig. 2).

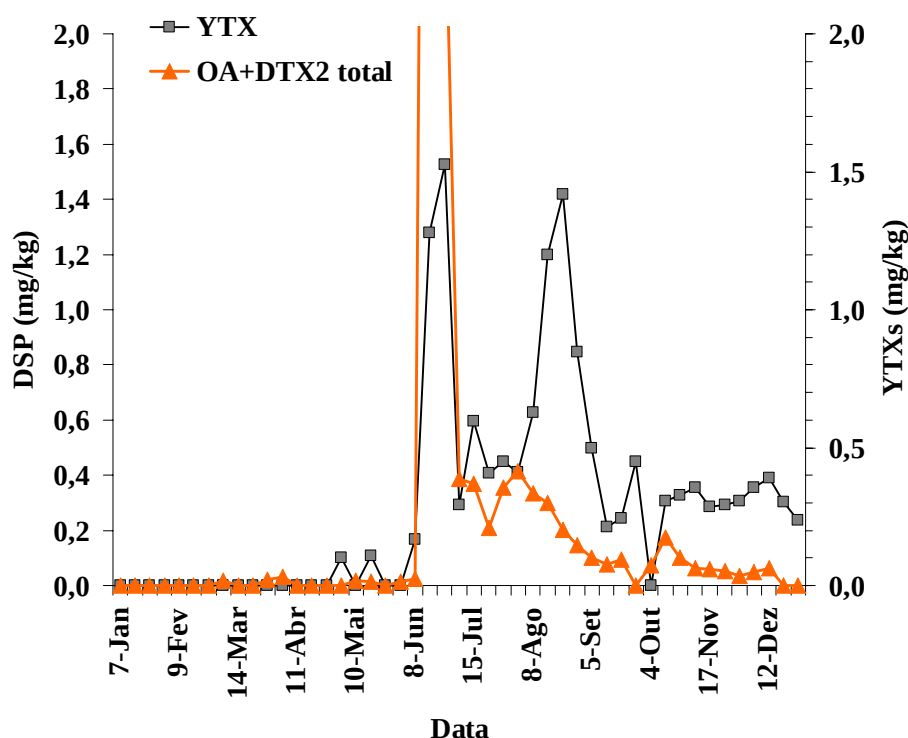


Figura 2. Concentração de DSP e YTXs no mexilhão (mg/kg) colhido na Baía de Lisboa.

No mês de Junho observou-se o máximo de concentração de ácido ocadáico (AO) e dinofisistoxina-2 (DTX2) com 7,45 mg/kg, que coincide com a concentração máxima em YTXs, 1,53 mg/kg. Apesar de os máximos destas toxinas terem ocorrido em simultâneo, espécies produtoras podem proliferar independentemente. A contaminação de YTXs esteve associado com *L. polyedrum* e a elevada contaminação com AO esteve associada à presença de *D. acuminata* que atingiu uma concentração de 16.240 células/L.

Em Julho e Outubro registaram-se dois picos mais baixos de DSP com 0,41 mg Kg⁻¹ e 0,17 mg Kg⁻¹, respectivamente, sendo o pico de Outono associado à presença de *D. acuta*. Após cada pico de contaminação ocorreu uma diminuição das toxinas DSP.

Estudo de destoxificação de YTXs. Durante o período em que decorreu a depuração artificial verificou-se um aumento da concentração de YTXs e uma diminuição da massa de hepatopâncreas (HP) (Fig. 3).

A perda de massa do HP poderá estar associada à insuficiente quantidade de alimento fornecido durante o decorrer do estudo, e contribuído para o aumento da concentração de YTXs.

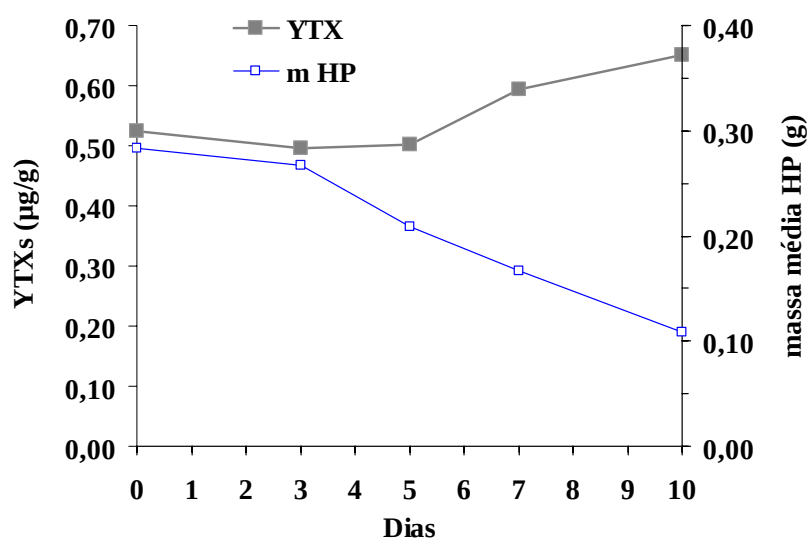


Figura 3. Concentração de YTXs no HP do mexilhão ($\mu\text{g g}^{-1}$) em função da massa média de HP(g) durante o período de destoxificação de 10 dias.

Anteriormente foram realizados ensaios laboratoriais de destoxificação de outras toxinas marinhas com mexilhão contaminado em meio natural. Os diferentes ensaios de destoxificação evidenciaram uma rápida eliminação das pectenotoxinas (PTX2 e PTX2sa), no entanto as dinofisistoxinas (DTXs) e saxitoxinas (STXs) permaneceram com uma concentração residual entre 20 – 38%, após uma semana de depuração [11,12]. Na tabela 1 apresenta-se o resumo destes resultados executados em condições semelhantes ao descrito neste trabalho.

Toxina	Concentração residual (%)
AO	20
DTX2	38
PTX2	<1
PTX2sa	<1
STXs	27
YTXs	> 100

Tabela 1. Concentração de toxina residual, expressa em %, quantificada em mexilhão da costa portuguesa ao fim de uma semana de depuração (dados obtidos em diferentes estudos [11,12]).

As iessotoxinas, surgem assim como as toxinas marinhas de eliminação mais lenta, uma vez que no final dos 10 dias de estudo não se registou qualquer diminuição da sua concentração. Resultados semelhantes foram obtidas num estudo realizado com mexilhão da Noruega, em que se

obtiveram tempos de semi-vida entre 20 e 60 dias, dependendo do análogo da iessotoxina [13].

Conclusão

Na Baía de Lisboa, as elevadas contaminações do mexilhão por YTXs foram associadas à presença da microalga *L. polyedrum*. Contudo, em cultura não se verificou a produção de YTXs pelas diferentes estirpes de *L. polyedrum* colhidas na Costa Portuguesa [10]. As espécies *Protoceratium* sp. e *G. spinifera*, associados com a contaminação registada na Ria de Aveiro, não foram observadas na estação de Lisboa no ano 2005 [6].

As elevadas concentrações de YTXs, em Junho e Agosto, foram associadas a baixas concentrações de células na água. Tal facto poderá estar relacionado com a lenta eliminação destas toxinas, confirmada através da depuração artificial.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelos programas QCAIII /med.4/ MARE – Segurança, Vigilância e Qualidade dos Moluscos Bivalves e QCAIII/POPesca/MARE – Caracterização ecológica da zona costeira – Plataforma Continental.

Os autores agradecem a disponibilidade demonstrada pelos técnicos do Departamento de Aquacultura, IPIMAR.

Referências

- [1] Samdal, I.A., J.A.B., Aasen, L.R. Briggs, E. Dahl, C.O. Miles. 2005. Comparison of ELISA and LC-MS analyses for yessotoxins in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*. 46:7-15.
- [2] Rhodes, L., P. McNabb, M. Salas, L. Briggs, V. Beuzenberg, Gladstone. 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae*. 5:148-155.
- [3] Aune, T., R. Sorby, T. Yasumoto, H. Ramstad, T. Landsverk. 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of YTX towards mice. *Toxicon*. 40:77-82.
- [4] Jornal Oficial L 139, 30.04.2004, p. 55.
- [5] Briggs, L.R., C.O. Miles, J.M. Fitzgerald, K.M. Ross, I. Garthwaite, N.R. Towers. 2004. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Yessotoxin and its Analogues. *J. Agric. Food Chem.* 52:5836-5842.
- [6] Gomes, S.S., P. Vale, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues, M. Cerejo, M.G. Vilarinho. 2006. ELISA screening for yessotoxins in Portuguese shellfish. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [7] Moita, M.T., P.B. Oliveira, J.C. Mendes, A.S. Palma. 2003. Distribution of chlorophyll A and *Gymnodinium catenatum* associated with coastal upwelling plumes off central Portugal. *Acta Oecologia*. 24:125-132.
- [8] Hasle, G.R. 1978. The inverted microscope method. In: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. Monographs on Oceanic Methodology. Unesco. Paris. 88-96.
- [9] YTX ELISA pilot kit protocol. Biosense Laboratories.
- [10] Reis, M., A.C. Kraberg, K. Erler, B. Luckas, A. Amorim, K.H. Wiltshire. 2006. Ecotoxicology of different strains of *Lingulodinium polyedrum* from Portuguese

- coast. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [11] Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*. 44:123-134.
- [12] Artigas, M.L., A. Amorim, P. Vale, S.S. Gomes, M.J. Botelho, S.M. Rodrigues. 2006. Prolonged toxicity of *Scrobicularia plana* after PSP events and its relation to *Gymnodinium catenatum* cyst consumption and toxin depuration. *Actas da "12th International Conference on Harmful Algae", Setembro de 2006* (aceite para publicação).
- [13] Aasen, J., I.A. Samdal, C.O. Miles, E. Dahl, L.R. Briggs, T. Aune. 2005. Yessotoxin in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*. 45:265-272.

Estudio comparativo de distribución vertical de toxicidad PSP en mejillón de cultivo

M. Gordillo ¹, M. A. Ocaña ¹, L. Mamán ¹, L. Fernández ¹ e I. Márquez ²

(1) Empresa Pública Desarrollo Agrario y Pesquero. Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. (L.C.C.RR.PP). Carretera Punta Umbria-Cartaya, km 12. El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva.

(2) Dirección General de Pesca y Acuicultura. Consejería de Agricultura y Pesca. Calle Tabladilla s/n. 41071 Sevilla.

Resumen

Desde finales de 2006 a principios de 2007 tiene lugar en el litoral andaluz un episodio de toxinas paralizantes de larga duración que afecta a la totalidad de los cultivos de mejillón situados en el mediterráneo.

Con objeto de estudiar la distribución vertical de toxicidad PSP se realiza una experiencia con 21 muestras de mejillón procedentes de 3 zonas de producción diferentes. De cada muestra se realizan cuatro análisis, tres de ellos corresponden a los distintos tramos en los que se divide la cuerda del cultivo (superior, medio y fondo) y para el cuarto se realiza un integrado de la cuerda.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos no revela diferencias significativas ni entre los distintos tramos, ni entre estos y la muestra integrada, a la vez que manifiesta una gran correlación entre ellos.

Introducción

El Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros es el encargado de llevar a cabo el Programa de control de las zonas de producción de moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos en Andalucía dentro del cual se realiza la vigilancia de toxinas paralizantes. Las especies incluidas en el Plan de Control son en su mayoría de bancos naturales aunque también se incluyen las procedentes de explotaciones de cultivo.

La Orden del 10 de Abril de 2006 [1] regula el cultivo del mejillón en la Comunidad Autónoma de Andalucía, una actividad de reciente aparición y actualmente en auge en nuestro litoral.

El cultivo de mejillón se lleva a cabo en estructuras flotantes, bateas o líneas de cultivo, de las que cuelgan las cuerdas donde se fijan los moluscos. Estas cuerdas de cultivo, tanto en un caso como en otro, tienen una longitud máxima de 12 metros a lo largo de los cuales se distribuyen los mejillones verticalmente en la columna de agua.

El último episodio de toxinas paralizantes detectado empezó a desarrollarse a finales de Agosto de 2006 y no remitió totalmente hasta el mes de Febrero de 2007, afectando a las zonas de producción mediterráneas. Este episodio, ocasionado por la especie *Gymnodinium catenatum* tuvo una

duración superior a lo observado en años anteriores y afectó de manera particular al mejillón de cultivo.

En este trabajo se presenta el estudio realizado para determinar si los niveles de toxicidad del mejillón varían en función de la profundidad a la que está fijado en la cuerda de cultivo.

Material y métodos

El método para la detección de toxinas PSP empleado es el bioensayo de ratón basado en el método de AOAC (1990) [2].

Para realizar este estudio se emplearon muestras procedentes de tres zonas de producción del litoral mediterráneo en diferentes fases de desarrollo del episodio. De cada zona se extrajeron moluscos fijados a diferentes profundidades en la cuerda de cultivo. Para ello se establecieron tres niveles: superficial, medio y profundo.

Finalmente cada muestra se dividió en 4 submuestras cada una de las cuales fue analizada para la detección de PSP: tres de ellas correspondientes a los niveles de profundidad establecidos, y una cuarta submuestra integrada por el mismo número de individuos de cada uno de los niveles.

Se realizaron dos estudios estadísticos: correlación y análisis de varianza (ANOVA de un factor).

El análisis de varianza se realizó en primer lugar con los datos de toxicidad obtenidos y pertenecientes a muestras recogidas en diferentes fases del episodio tóxico. Con el fin de reducir el efecto de la evolución del episodio en los resultados se realizó un segundo análisis de varianza, empleando esta vez las diferencias en valores absolutos entre cada grupo de datos.

Resultados y discusión

Los resultados de los análisis realizados son los que se muestran en la Tabla 1. La Fig. 1 muestra los resultados en orden cronológico agrupados según las zonas de producción

El estudio del coeficiente de correlación, Tabla 2, nos mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas, en este caso la relación lineal entre los datos de dos de las submuestras. En todos los casos el coeficiente de correlación está muy próximo a 1, indicando una estrecha interdependencia positiva entre los grupos de datos.

Se realizó un primer análisis de varianza (ANOVA de un factor) de los datos de toxicidad. A través del análisis de varianza contrastamos si un factor o variable independiente, en este caso la posición en la columna de agua del molusco, afecta los valores de la variable cuantitativa o dependiente: toxicidad.

DATOS DE TOXICIDAD	muestras en orden cronológico	S U B M U E S T R A S			
		FONDO	MEDIO	SUPERIOR	INTEGRADO
1ª ZONA DE PRODUCCIÓN	2	203	136	104	119
	4	118	89	64	170
	10	89	84	66	70
	15	44	46	42	46
	19	37	31	31	35
2ª ZONA DE PRODUCCIÓN	3	268	271	223	285
	5	127	128	184	114
	6	209	178	192	168
	9	201	188	172	202
	12	83	84	117	85
	13	95	99	92	96
	16	82	45	67	66
	18	45	53	64	45
3ª ZONA DE PRODUCCIÓN	1	584	507	665	742
	7	342	310	324	326
	8	126	173	131	234
	11	178	193	191	125
	14	173	129	177	139
	17	68	113	124	125
	20	43	40	39	44
	21	36	37	37	32

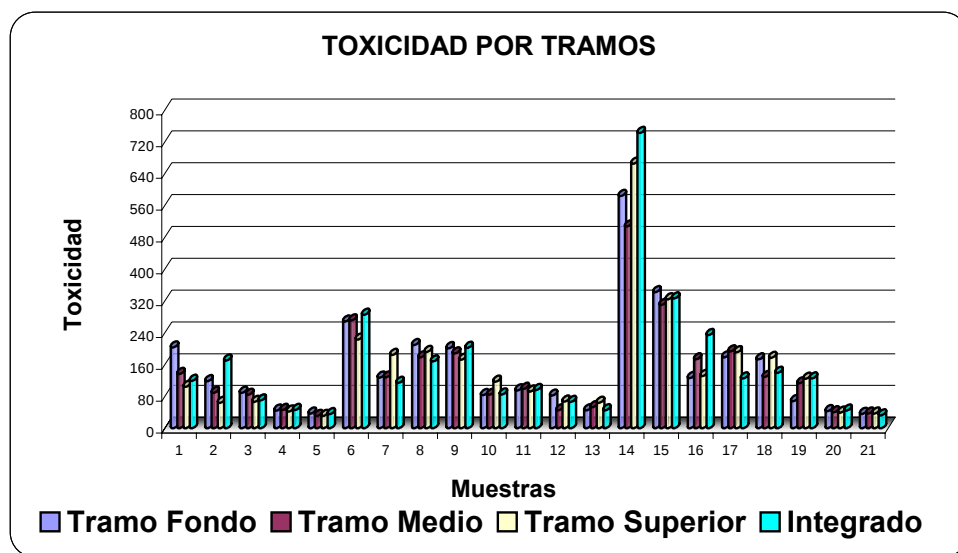
Tabla 1. Resultados de toxicidad en μg Eq. Sax/100 g. vianda.

Figura 1. Grafico de resultados agrupados por zonas de producción. Del 1 al 5 zona de producción 1; del 6 al 13 zona de producción 2; del 14 al 21 zona de producción 3. En todos los casos se presentan los datos cronológicamente, desde el comienzo del episodio tóxico hasta el final del mismo.

	FONDO	MEDIO	SUPERIOR	INTEGRADO
FONDO	1			
MEDIO	0,97572004	1		
SUPERIOR	0,95986608	0,96354452	1	
INTEGRADO	0,95035868	0,95931184	0,95622897	1

Tabla 2. Estudio de correlación.

De forma previa al análisis de varianza hacemos el cálculo del estadístico de Levene, que nos permite confirmar la hipótesis de que las varianzas poblacionales son iguales

La hipótesis que se contrasta supone que las medias poblacionales, es decir las medias de la variable dependiente, son iguales en cada nivel de la variable independiente. Si las medias poblacionales son iguales, las medias muestrales también lo son y por lo tanto no existen diferencias significativas entre ellas.

Entre los datos descriptivos de la Tabla 3, nos encontramos con una desviación típica elevada. La razón de esta dispersión de los datos puede explicarse por la influencia de la evolución del episodio tóxico con resultados elevados al principio del mismo y bajos cuando está finalizando.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Fondo	21	150,0476	129,13848	28,18033	91,2645	208,8308	36,00	584,00
Medio	21	139,7143	113,55137	24,77894	88,0263	191,4023	31,00	507,00
Superficie	21	147,9048	140,32281	30,62095	84,0306	211,7789	31,00	665,00
Integrado	21	155,6190	157,15231	34,29344	84,0842	227,1539	32,00	742,00
Total	84	148,3214	133,61969	14,57910	119,3242	177,3187	31,00	742,00

Tabla 3. Datos descriptivos de los resultados de toxicidad.

Siendo una población normal y existiendo igualdad de varianzas, el estadístico F se distribuye según el modelo de probabilidad de *Fisher-Snedecor*. El valor crítico asociado al estadístico F es mayor a 0,05 como podemos ver en la tabla 4 por lo que aceptamos la hipótesis de igualdad de medias y por lo tanto las medias poblacionales que hemos comparado son iguales.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	2740,321	3	913,440	0,049	0,985
Intra-grupos	1479160,000	80	18489,500		
Total	1481900,321	83			

Tabla 4. ANOVA de un factor para los resultados de toxicidad.

De forma paralela se realizó un estudio similar de las diferencias en valores absolutos de los resultados de toxicidad con el fin de evitar la influencia de la evolución del episodio tóxico en los resultados finales.

Los datos de partida se calcularon realizando en cada muestra la diferencia entre los valores de toxicidad de cada submuestra realizando todas las combinaciones posibles entre ellas.

Los datos descriptivos en este caso (Tabla 5) muestran una desviación típica menor a la de los datos de toxicidad como consecuencia de amortiguar los efectos de la evolución del episodio tóxico. Se comprobó que el estadístico de Levene igualmente nos confirmaba que las varianzas poblacionales son iguales.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
I-F	21	32,4286	41,56991	9,07130	13,5062	51,3510	0,00	158,00
I-M	21	29,1429	52,22096	11,39555	5,3722	52,9136	0,00	235,00
I-S	21	32,0000	34,65545	7,56244	16,2250	47,7750	1,00	106,00
F-M	21	22,4286	23,21545	5,06603	11,8610	32,9961	1,00	77,00
F-S	21	27,8571	27,74218	6,05384	15,2291	40,4852	1,00	99,00
M-S	21	26,7619	34,59610	7,54949	11,0139	42,5099	0,00	158,00
Total	126	28,4365	36,29512	3,23343	22,0372	34,8359	0,00	235,00

Tabla 5. Datos descriptivos de los datos obtenidos por las diferencias.

El valor crítico asociado al estadístico F que hallamos al realizar el análisis de varianzas (Tabla 6) es mayor a 0,05 por lo que también en este caso aceptamos la hipótesis de igualdad de medias y por lo tanto las medias poblacionales que hemos comparado son iguales.

	SUMA DE CUADRADOS	GL	MEDIA CUADRÁTICA	F	SIG.
Inter-grupos	1.435,754	5	287,151	0,211	0,957
Intra-grupos	163.231,238	120	1.360,260		
Total	164.666,992	125			

Tabla 6. ANOVA de un factor para los resultados de las diferencias.

Conclusiones

Como conclusión y para los datos aportados en este estudio podemos decir que no existen diferencias significativas entre las poblaciones y por lo tanto la toxicidad en las muestras analizadas de moluscos extraídos en diferentes tramos de profundidad y en la muestra integrada pueden ser consideradas similares para las zonas de producción estudiadas.

Referencias

- [1] Orden del 10 de Abril de 2006, por las que se establecen las condiciones para el cultivo del mejillón en la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- [2] Método de AOAC. 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. sec 959.08.

Análisis morfológico, molecular y contenido de toxinas de *Dinophysis* cf *ovum*, registrado en las Rías Baixas en Mayo de 2005

Nicolás Raho¹, Gemita Pizarro², Laura Escalera², Beatriz Reguera²
e Irma Marín¹.

(1) Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid,
Cantoblanco, 28049 Madrid.

(2) Instituto Español de Oceanografía, Cabo Estai, Canido, Aptdo 1552, 36200 Vigo.

Resumen

Dinophysis acuminata Claparède et Lachmann es el principal organismo portador de toxinas DSP, causantes de prolongados cierres de extracción de bivalvos, en la costa suratlántica europea (Francia, Irlanda, España y Portugal). No obstante, bajo esta denominación taxonómica se incluyen una serie de morfoespecies de *Dinophysis* cuya característica común es poseer sus grandes placas hipotécales con un contorno que varía entre ovoide, elipsoidal y sub-esférico.

A finales de Mayo de 2006 se registró una repentina floración de un *Dinophysis* sp. de contorno ovalado muy regular, tecas muy delicadas, y talla pequeña (L: 31-42 µm; W: 22.5-32µm), fácilmente distinguible del *D. acuminata* típico de las Rías Baixas gallegas. Este *Dinophysis* cf *ovum*, con morfología próxima a *D. ovum* Schüt y a *D. sphaerica* Stein, es muy similar a los *D. cf acuminata* descritos en Bahía de Thermaikos (Grecia) y en las costas de Huelva. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC/MS) de arrastres ricos en esta especie revelaron un contenido moderado (< 10 pg cel⁻¹) de ácido okadaico (AO).

El análisis comparado de diferentes regiones del operón del rRNA obtenido a partir de células de *D. cf ovum*, aisladas *in vivo* por micromanipulación, presentan diferencias con respecto a las obtenidas para el *D. acuminata* típico de la región, lo que sugiere una diferente adscripción filogenética.

Introducción

Varias especies del género *Dinophysis* han sido señaladas como las principales responsables de la presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos en Japón, Europa, Chile y Nueva Zelanda. Dada la persistencia de estas especies a lo largo del año, pueden constituir la principal amenaza para la explotación de los recursos marisqueros (cultivados o en bancos naturales) en las regiones costeras expuestas a proliferaciones de *Dinophysis*.

Todos los resultados disponibles confirman la gran variabilidad en cuanto al contenido de toxina por célula que presentan estos organismos,

inclusive entre células de la misma especie y localidad [1,2,3]. A su vez, se observa una gran variedad morfológica intraespecífica [4,5,6], por lo que su correcta identificación resulta difícil.

La identificación taxonómica de especies del género *Dinophysis* se basa fundamentalmente en el tamaño y forma de las dos grandes placas hipotecales, forma de la aleta sulcal izquierda y sus radios, presencia o ausencia de cloroplastos y la ornamentación de las tecas [5]. Estos criterios agregan dificultad a la hora de identificar las especies potencialmente tóxicas que deben ser identificadas en programas de seguimiento. Es, por lo tanto, muy importante el control de la presencia de especies de fitoplancton productores de toxinas en las costas de producción de moluscos así como la cuantificación de las toxinas que se acumulan en las diferentes especies de moluscos, especialmente de moluscos filtradores bivalvos, que captan las células y sus toxinas con gran facilidad.

La biología molecular provee de herramientas que permiten mejorar la identificación de organismos en laboratorio, así como en muestras ambientales. Debido a las dificultades encontradas para establecer especies de *Dinophysis* en cultivo, se emplearon técnicas muy sensibles de amplificación de DNA a partir de células individuales. Recientemente estas técnicas han generado secuencias para un rango de especies de *Dinophysis* y han provisto de datos importantes en cuanto a variabilidad genética dentro del género y su filiación filogenética con otros dinoflagelados [7,8,9].

A finales de Mayo de 2006 se registró una repentina floración de un *Dinophysis* sp. de contorno ovalado muy regular, tecas muy delicadas, y talla pequeña, fácilmente distinguible del *D. acuminata* típico de las Rías Baixas gallegas. Este *Dinophysis* cf *ovum*, con morfología próxima a *D. ovum* Schüt y a *D. sphaerica* Stein, es muy similar a los *D. cf acuminata* descritos en Bahía de Thermaikos, Grecia (2004) [10].

Materiales y métodos

El muestreo se realizó en la estación de Bueu (Pontevedra), el 12 de Junio de 2006, con bomba sumergible, a 1m de profundidad. Mediante un sistema de salabres superpuestos, se obtuvo un concentrado de la fracción de plancton de 20-70 µm.

Se filtró un volumen conocido del concentrado de plancton para posterior extracción de toxinas lipofílicas y análisis mediante cromatografía líquida acoplada a masas (LC/MS). Previamente se tomó una alícuota de este concentrado y se fijó con lugol para la identificación y conteo de las células fitoplanctónicas contenidas en el extracto. A su vez, se midió la longitud máxima (L), la profundidad (W) y el cingulo (C) de 44 individuos de *D. cf ovum*, y de 6 células pequeñas mediante el micrométrico ocular de un microscopio invertido NIKON ECLIPSE 2000.

La amplificación por PCR del 28s rDNA, a partir de células de *D. cf ovum* aisladas por micromanipulación, se llevó a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Cada célula se lavó 3 veces en agua de mar filtrada y por último en solución tamponada de fosfato (PBS 1X). Las células se transfirieron a tubos eppendorf de 200 µl que contenían 1x tampón de la enzima, 1 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,5 mM de los cebadores FD8 (5'-GGATTGGCTCTGAGGGTTGGG-3') y RB (5'-GATAGGAAGCGACATCGA-3') y 0,025 u/µl Taq DNA Polimerasa (Roche).

Las secuencias obtenidas se compararon con aquéllas disponibles en el GenBank mediante el algoritmo de BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) y se alinearon utilizando Clustal X [11]. Los análisis filogenéticos se realizaron mediante la técnica de "Neighbor Joining".

Resultados

En el muestreo realizado se observó una población formada sólo por dinoflagelados, y en la que la especie dominante era un *Dinophysis* de talla pequeña-mediana, claramente distinguible del *D. acuminata* habitual en las Rías Baixas.

El análisis de las muestras, fijadas con lugol, reveló una población formada sólo por dinoflagelados, y en la que la especie dominante era un *Dinophysis* de talla pequeña-mediana, claramente distinguible del *D. acuminata* habitual en las Rías Baixas. Este *Dinophysis*, al que denominaremos provisionalmente *Dinophysis cf ovum*, constituía el 97% de las especies de *Dinophysis* presentes (Tabla 1).

Especie	Nº cel.	Factor	Cel./mL	%
<i>Ceratium furca</i>	42	6,67	280	5,9
<i>Ceratium fusus</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Ceratium horridum</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Dinophysis acuminata</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Dinophysis caudata</i>	2	6,67	13	0,3
<i>Dinophysis rotundata</i>	4	6,67	27	0,6
<i>Dinophysis skagii</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Dinophysis cf ovum</i>	333	6,67	2220	47,0
<i>Diplopsalis lenticula</i>	58	6,67	387	8,2
<i>Protoperidinium depressum</i>	1	6,67	7	0,1
<i>Protoperidinium diabolus</i>	75	6,67	500	10,6
<i>Protoperidinium divergens</i>	7	6,67	47	1,0
<i>Protoperidinium cf leonis</i>	2	6,67	13	0,3
<i>Protoperidinium steinii</i>	65	6,67	433	9,2
<i>Protoperidinium t ovatum small</i>	105	6,67	700	14,8
<i>Scrippsiella sp</i>	5	6,67	33	0,7
TOTAL			4727	

Tabla 1. Composición específica y frecuencia de las distintas especies obtenidas en la fracción 20-70 µm .del concentrado de plancton

Las mediciones de células indicaron que se trataba de una especie de *Dinophysis* de talla inferior a *D. acuminata*, con placas hipotecales ovaladas y de textura muy delicada y radio R3 de la aleta sulcal izquierda corto y delicado (Fig. 1 a-b). Por otro lado, las células pequeñas de *D. cf ovum* presentaron una morfología muy distintas de la de *D. skagii*, la angulosa célula pequeña de *D. acuminata* (Fig. 1c).

		L (μm)	W (μm)	C (μm)
<i>Dinophysis cf. ovum</i> (n =44)	Media ± SD	36,6 ± 2,4	26,4 ± 2,1	8,5 ± 1,2
	Rango	32 - 42	22,5 - 32	7,5 - 12
<i>Dinophysis cf. ovum</i> Células pequeñas (n = 6)	Media ± SD	27,5 ± 1,55	19,5 ± 1,3	6,9 ± 1,2
	Rango	25,5 - 30	18 - 21	5,8 - 9

Tabla 2. Morfometría (micrométrico ocular) de *D. cf ovum* y sus células pequeñas



Figura 1. Célula vegetativa normal (a), mediana (b) y pequeña (c) de *D. cf ovum*. Micrografía Nomarski (DIC), 600 X, tomada con cámara NIKON en microscopio invertido NIKON ECLIPSE TE-2000.

El análisis por LC-MS del extracto del concentrado de plancton (Fig. 2) reveló la presencia de niveles bajos de ácido okadaico (OA) ($8,5 \text{ pg cel}^{-1}$). Al igual que como es habitual en *D. acuminata*, no se detectó presencia de otras toxinas, tales como las Dinophysistoxinas y Pectenotoxinas (DTX2, PTX2), comunes en extractos de las Rías Baixas que contienen *D. acuta* y/o *D. caudata*.

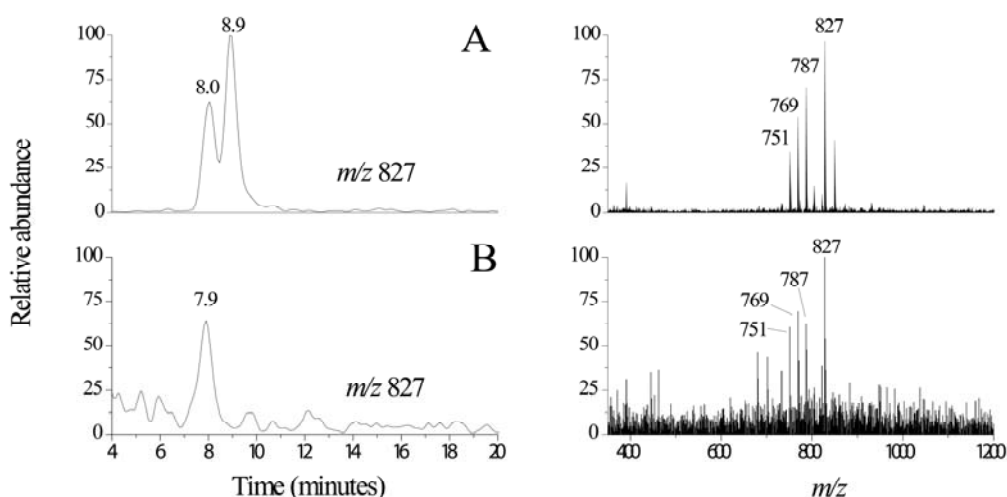


Figura 2. A. Cromatograma de estándar de AO (TR 8,0 min) y DTX2 (TR 8,9 min) (izda.), y espectro m/z de AO estándar. B. Cromatograma de AO (TR 7,9 min) estándar de muestra de concentrado de plancton (20-77 μm) rico en *Dinophysis* cf. *ovum* (izqda.) y espectro m/z de AO presente en la misma muestra.

Estudios preliminares basados en el estudio de secuencias de la región D8 a D10 del 28s rDNA (Fig. 3) parecen indicar una separación entre la especie en estudio y las otras especies de *Dinophysis* analizadas, lo cual estaría de acuerdo con las diferencias observadas en la morfometría y contenido de toxina por célula.

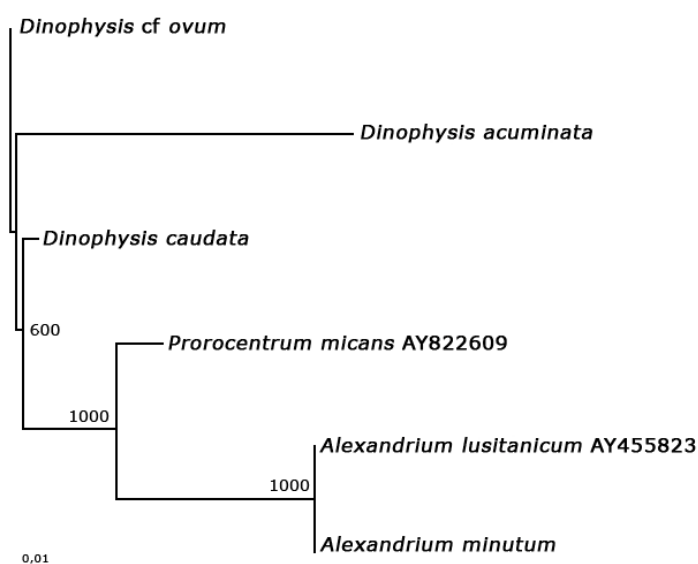


Figura 3. Árbol filogenético inferido por Neighbor Joining basado en secuencias parciales del 28s rDNA (850 pb). Los índices Bootstrap (1000) se observan en los nodos internos.

Discusión

Bajo la denominación taxonómica *Dinophysis acuminata* (o *D. cf acuminata*) se incluyen una serie de morfoespecies (*D. acuminata*, *D. ovum*, *D. sphaerica*, *D. okamurai*, etc.) cuya característica común es poseer las dos grandes placas hipotecales de tamaño medio-pequeño, con un contorno que varía entre ovoide, elipsoidal y sub-esférico. La separación de estas especies al microscopio óptico en contajes rutinarios de programas de seguimiento, y en especial si coinciden en la misma muestra, es muy dificultosa. La diferenciación mediante secuenciación del 28s rDNA y futura preparación de sondas moleculares contra las distintas especies ayudaría a aliviar este problema.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los subproyectos DINOPHYSIS GALICIA y DINOGENES del proyecto coordinado PHYCODISIS (CTM2004-04078-C03). Esto es una contribución al Core Research Project "HABs in Upwelling Systems" del programa GEOHAB de SCOR-COI.

Referencias

- [1] Andersen, P., Hald, B. & Emsholm, H. 1996. Toxicity of *Dinophysis* in Danish coastal waters. En: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 281-284.
- [2] Lee, J.-S., T.T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard, T. Yasumoto. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1:147-152.
- [3] Reguera, B., G. Pizarro. En prensa. Planktonic dinoflagellates which produce polyether toxins of the old "DSP Complex". En: Botana, L. (Ed) *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology physiology and detection*. Taylor and Francis, 2nd edition. Chapter 15.
- [4] Solum, I. 1962. The taxonomy of *Dinophysis* populations in Norwegian waters in view of biometric observations. *Nytt. Mag. Bot.* 10:5-32.
- [5] Larsen, J., Q. Moestrup. 1992. Potentially toxic phytoplankton. 2. Genus *Dinophysis* (Dinophyceae). En: Lindley, J.A. (Ed.). *ICES Identification Leaflets for Plankton*. 180:1-12.
- [6] Reguera, B., S. González-Gil. 2001. Small cell and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 37:318-333.
- [7] Rehnstam-Holm, A.S., A. Godhe, D.M. Anderson. 2002. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America. *Phycologia*. 41:348-357.
- [8] Edvardsen, B., K. Shalchian-Tabrizi, K.S. Jakobsen, L.K. Medlin, E. Dahl, S. Brubak, E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA, *J. Phycol.* 39:395-408.
- [9] Hart, M.C., D.H. Green, E. Bresnan, C.J. Bolch. 2007. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. *Harmful Algae*. 6:271-287.
- [10] Koukaras, K., G. Nikolaidis. 2004. *Dinophysis* blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea). *J. Plankton Res.* 26:445-457.
- [11] Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24:4876-4882.

Identificación y caracterización por LC-MS de derivados del Ácido Okadaico en cultivos de *Prorocentrum belizeanum*.

Beatriz Paz^{3,4}, Antonio H. Daranas^{1,2}, Patricia G. Cruz¹,
José M. Franco^{3,4}, José G. Napolitano¹, Manuel Norte¹ y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Islas Canarias.

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38071, Islas Canarias.

(3) Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36080 Vigo.

(4) Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36200 Vigo.

Resumen

En el presente estudio, las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum* (Ácido okadaico, DTX-5c y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato) fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS), lo que permitió determinar los tiempos de retención (t_R) respectivos y los patrones de fragmentación asociados. Como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de cultivos *in vitro* de *P. belizeanum* fueron analizadas.

Introducción

Los dinoflagelados del género *Prorocentrum* poseen una amplia distribución geográfica que abarca las regiones tropicales y subtropicales. Algunas especies son reconocidas como productoras de toxinas responsables del síndrome diarreico conocido como DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) [1]. Entre ellas destacan el ácido okadaico (Fig. 1.1), un inhibidor selectivo de las fosfatasa de serina/treonina de tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A), y numerosos compuestos relacionados, como los diol-ésteres y las dinophysistoxinas (DTX's). La mayoría de estas toxinas son lipofílicas [2], aunque en los últimos años han sido detectadas las primeras sustancias hidrosolubles, como es el caso de la DTX-5c (Fig. 1.2), una toxina sulfatada aislada de *P. belizeanum* [3].

Aunque la estructura de muchas de estas toxinas es conocida desde hace más de una década, hasta el momento no se ha desarrollado un método apropiado para la detección e identificación de estas sustancias. En la actualidad el método más común para la detección de toxinas DSP sigue siendo el bioensayo en ratones [4], aunque se trata de una metodología con baja sensibilidad y una pobre reproducibilidad. En la búsqueda de nuevos métodos de detección, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se ha revelado como una poderosa herramienta para la detección de sustancias conocidas, así como para la identificación de nuevas toxinas [5].

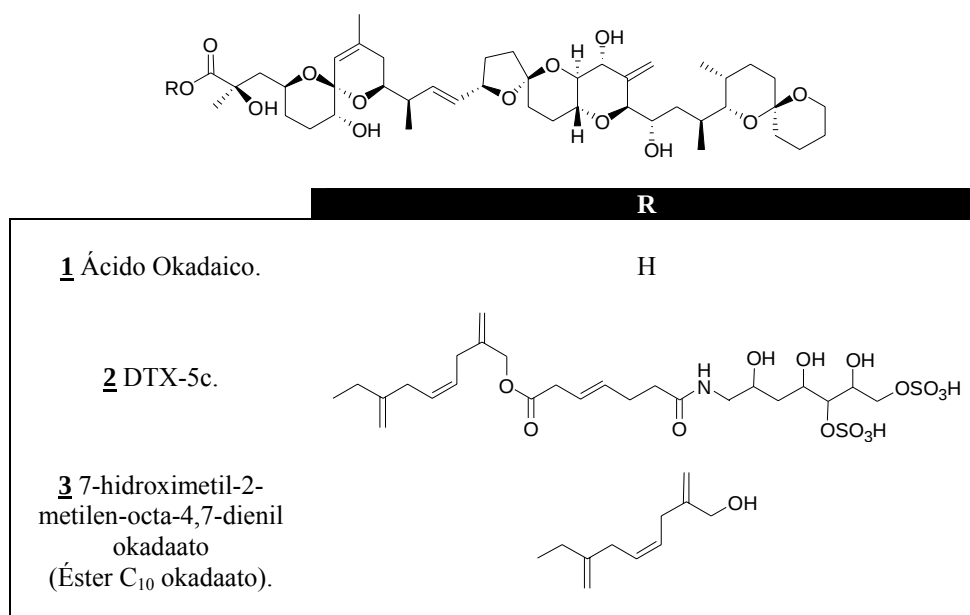


Figura 1. Estructuras de las principales toxinas aisladas de *P. belizeanum*.

En el presente estudio, se ha recurrido a la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para analizar las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, logrando así determinar los tiempos de retención de Ácido okadaico (Fig. 1.1), DTX-5c (Fig. 1.2) y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato (Fig. 1.3), así como el patrón de fragmentación específico de cada una de estas toxinas.

Materiales y métodos

La identificación y caracterización de la toxinas de interés se llevó a cabo utilizando patrones de ácido okadaico (Fig. 1.1), DTX-5c (Fig. 1.2) y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato (Fig. 1.3), aislados previamente de cultivos de *P. belizeanum* e identificadas a través de resonancia magnética nuclear (RMN) [3]. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna HPLC Waters XBridge C-18 5 mm (150mm x 2,1 mm) utilizando un gradiente de acetato de amonio 2mM (pH 5,8) a metanol. La detección de masas se realizó con un espectrómetro de trampa iónica Thermo Finnigan LCQ-Advantage, equipado con una interfase de ionización en electrospray (ESI).

Resultados y Discusión

De acuerdo con la metodología empleada, y como se puede observar en la Fig. 2, los tiempos de retención para cada una de las toxinas analizadas son los siguientes: Ácido okadaico, $t_R = 7,07$ min., DTX-5c, $t_R = 11,91$ min., y Éster C₁₀ okadaato, $t_R = 25,89$ min. Con respecto a los patrones de

fragmentación, tanto en el ácido okadaico como en el éster C₁₀ okadaato destaca el ión pseudo-molecular correspondiente a $[M+NH_4]^+$ (m/z 822.0 y 972.1, respectivamente), mientras que en el caso de DTX-5c el patrón es más complejo, siendo posible identificar en modo negativo los iones correspondientes a $[M-2H]^{2-}$ (m/z 715.0) y $[M-H]^-$ (m/z 1430.1).

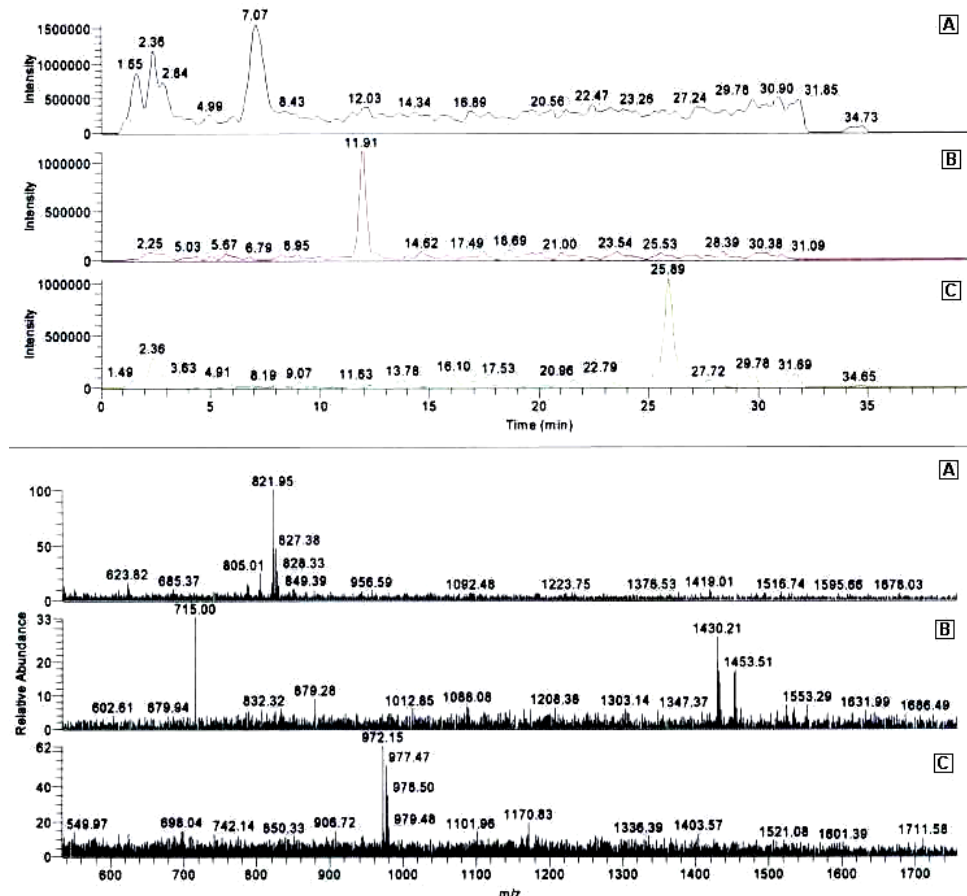


Figura 2. Cromatogramas LC-MS para las principales toxinas de *P. belizeanum*. **A:** Ácido okadaico (**1**) m/z 822,0 $[M+NH_4]^+$; **B:** DTX-5c (**2**) m/z 1430,2 $[M-H]^-$; **C:** Éster C₁₀ okadaato (**3**) m/z 972,1 $[M+NH_4]^+$.

Por último, como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de cultivos de *P. belizeanum* fueron analizadas. Las tres toxinas mayoritarias fueron detectadas en los extractos celulares (extractos realizados empleando como disolvente acetona y metanol, respectivamente), mientras que en el medio de cultivo sólo se detectaron trazas de ácido okadaico (Fig. 1.1).

Conclusiones

En el presente estudio se han analizado a través de LC-MS las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum*

belizeanum, determinando los tiempos de retención respectivos y estudiando los patrones de fragmentación. Esta metodología puede ser utilizada como un modelo para la caracterización de sustancias relacionadas con el ácido okadaico en extractos celulares.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento del MEC (AGL2005-07924-C04-01 y 02/ALI), VALBIOMAR, ICIC (PGC) y CajaCanarias (JGN). La cepa de *P. belizeanum* fue facilitada por el Dr. S. Fraga, del CCVIEO (Vigo, España).

Referencias

- [1] Quilliam, M.A., W.R. Hardstaff, N. Ishida, J.L. McLachlan, A.R. Reeves, N.W. Ross, A.J. Windust. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Sendai, Japan. 289-292.
- [2] Daranas, A.D., M. Norte, J.J. Fernández. 2001. Toxic marine microalgae. *Toxicon*. 39:1101-1132.
- [3] Cruz, P.G., A.H. Daranas, J.J. Fernández, M.L. Souto, M. Norte. 2006. DTX5c, a new OA sulphate ester derivative from cultures of *Prorocentrum belizeanum*. *Toxicon*. 47:920-924.
- [4] Fernández, M.L., D.J.A. Richard, A.D. Cembella. 2003. *In vivo* assays for phycotoxin. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella (Eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO. Paris. 347-380.
- [5] Quilliam, M. A., N. W. Ross. 1996. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry. En: Snyder, A.P. (Ed). *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, ACS Symposium Series, vol. 619. Anaheim, CA. Washington, DC: American Chemical Society. 351-364.

Estudio de ostreocinas en cultivos de *Ostreopsis ovata*

Humberto J. Domínguez¹, José J. Fernández¹, M. Norte¹, José M. Franco²,
P. Riobó³, Fernando Gutiérrez¹ y Maria L. Souto¹

(1) Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" Departamento de Química Orgánica. Universidad de La Laguna. La Laguna 38206, Islas Canarias. España.

(2) Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36080 Vigo, España.

(3) Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36200 Vigo, España.

Resumen

La intoxicación por palitoxina ha sido relacionada con especies de dinoflagelados del género *Ostreopsis* productor de numerosos análogos conocidos con el nombre de ostreocinas. Debido a la proliferación de estas especies en las costas canarias, y a la peligrosidad de las mismas, se ha iniciado un estudio de éstas comenzando con la preparación de cultivos a gran escala de *Ostreopsis ovata*, optimización de los métodos de aislamiento y detección mediante ensayo hemolítico y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).

Introducción

La palitoxina es un compuesto de naturaleza poliéter cuyos efectos fueron descritos por primera vez en 1964 (Fig. 1). Fue aislada inicialmente del zoanthidio *Palythoa toxica*, pero realmente es producida por dinoflagelados del género *Ostreopsis* [1-4]. Es una de las más potentes y complejas toxinas marinas conocidas y la segunda molécula de mayor peso molecular aislada de fuentes marinas que no contenga unidades repetidas de aminoácidos y monosacáridos [5]. Posee potentes y variadas actividades, entre las que destacan: la despolarización de membrana, la estimulación de la liberación de ácido araquidónico, la estimulación de la liberación de neurotransmisores, la inhibición de la Na⁺/K⁺ ATPasa, la inducción de la contracción de músculo liso así como la actividad promotora de tumores. Estas actividades hacen de la palitoxina una extraordinaria herramienta biomédica [6].

Materiales y métodos

Cultivos de Ostreopsis ovata. Para este estudio se ha llevado a cabo un cultivo axénico a gran escala de la cepa *Ostreopsis ovata* (OS01Br, Zona Atlántica, Río de Janeiro, Brasil) (Fig. 2), para ello se usó agua de mar con medio Guillard-K, hasta obtener 360 L. Los cultivos se escalan de forma gradual, primero en erlenmeyers de 50 mL conteniendo 30 mL de cultivo pasando por intermedios de 250 mL con 150 mL de cultivo hasta peceras de 70 L con 40 L de cultivos. El paso de un nivel de escalado a otro se realizó

cada cuatro semanas tomando como inóculo los volúmenes inferiores. Las condiciones de incubación fueron a 21°C, en un cuarto con luz generada por tubos fluorescentes a ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Transcurrido el proceso se recogieron las células por centrifugación.

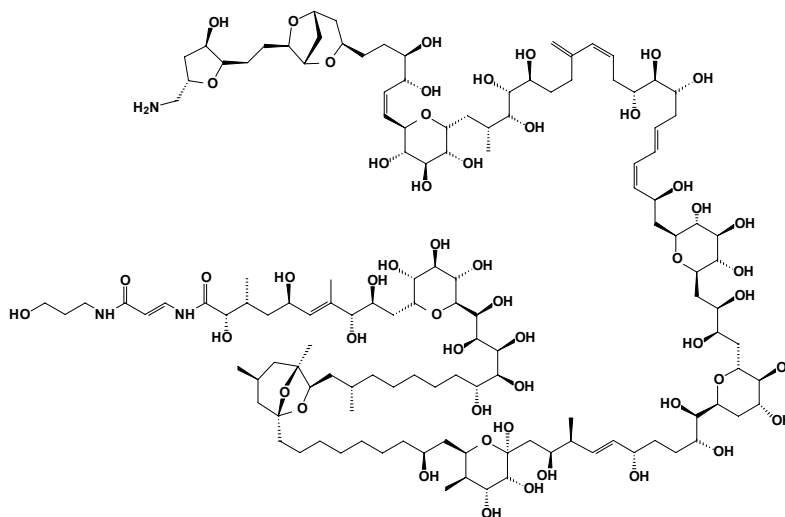


Figura 1. Estructura de la palitoxina.

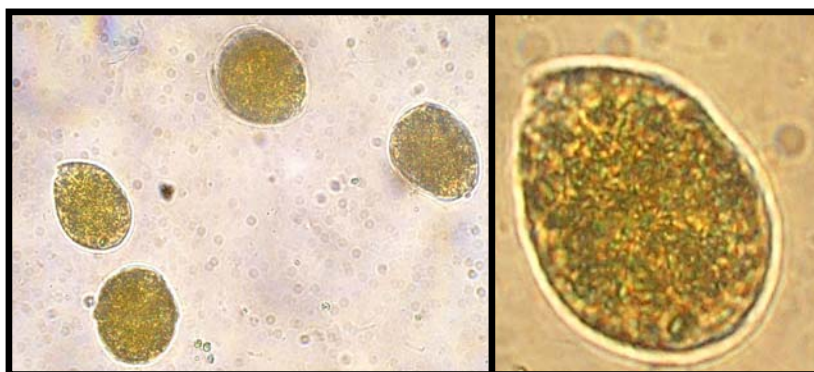


Figura 2. Fotografía de *Ostreopsis ovata*.

Extracción y purificación de Toxinas. Se siguió el protocolo de extracción descrito por Lenoir *et al.* [2]. La extracción a partir de las células se realizó primero con metanol y luego con metanol/agua (8/2) bajo ultrasonido. El extracto fue llevado a sequedad y disuelto en metanol/agua (8/2), éste se desengrasó dos veces con dos volúmenes de hexano (1,5:1 v/v hexano/metanol-agua). La parte acuosa se llevó a sequedad y se disolvió en metanol/agua (7/3), particionado éste dos veces con diclorometano (1,5:1 v/v diclorometano/metanol-agua). La fracción acuosa se llevó a sequedad y se disolvió en agua y se extrajo tres veces con n-butanol (1:2 v/v agua/n-butanol). Al final se obtuvieron cuatro fracciones: el extracto de hexano de

463 mg, uno de diclorometano de 135 mg, uno acuoso de 5,08 g y uno butanólico de 1,151 g de peso. Los extractos se analizaron con CL-EM y mediante ensayo hemolítico, viendo que la mayor parte de ostreocinas estaban en la fracción butanólica. Se cromatografió la fracción tóxica de *n*-butanol en una columna Sephadex LH-20 eluida con MeOH con una concentración de TFA de 200 μ M.

Detección mediante CL-EM. El análisis con espectrometría de masas se realizó después de una separación por HPLC en una columna X-Terra C-18 5 μ m (150 x 2,1 mm). La fase móvil consistió en un gradiente de concentración de metanol/acetato amónico 2 mM (pH 5,8). Se utilizó una trampa iónica Thermofinnigan LCQ Advantage en modo electrospray positivo con un voltaje de 4.5 kV a una temperatura del capilar de 300°C, flujo de N₂ 10 mL min⁻¹ y gas auxiliar 3 mL min⁻¹. El patrón de palytoxina utilizado es un patrón comercial suministrado por Wako Chemicals extraído de *Palythoa tuberculosa*.

Ensayo hemolítico. Las ostreocinas son potentes hemolisinas con la característica de producir la hemólisis lentamente y en periodos de incubación largos, 4 horas, a 37°C. El protocolo de hemólisis se basó en el método de Bignami con algunas modificaciones [8]; trabajamos con sangre desfibrinada de oveja diluida 100 veces y como antagonista se utilizó ouabaina 1 mM [9], así las muestras que produzcan hemólisis y en las que se inhiba completamente ésta en presencia de ouabaina consideraremos que existe presencia de ostreocinas.

Resultados y discusión

En el análisis con espectrometría de masas, se monitorizaron los iones de doble carga de las ostreocinas a m/z 1330-1336 y además uno de los fragmentos característicos de la palitoxina y sus análogos a m/z 326-327. El cromatograma mostró la presencia de un pico, para las muestras de la fracción de *n*-butanol y las fracciones 2 y 3 del Sephadex (Fig. 3 b, c y d), que coincide en tiempo de retención con el patrón de palitoxina (Fig. 3 a).

En la Fig. 4 se muestra a modo de ejemplo el cromatograma y el espectro de masas de la fracción de *n*-butanol, donde se ve la presencia de unos iones de doble carga ($m/z=1335,6$; $m/z=1346,7$), además del fragmento de $m/z=327$ característico para estos compuestos. Este mismo espectro lo generan las fracciones 2 y 3, al igual que en el patrón de palitoxina.

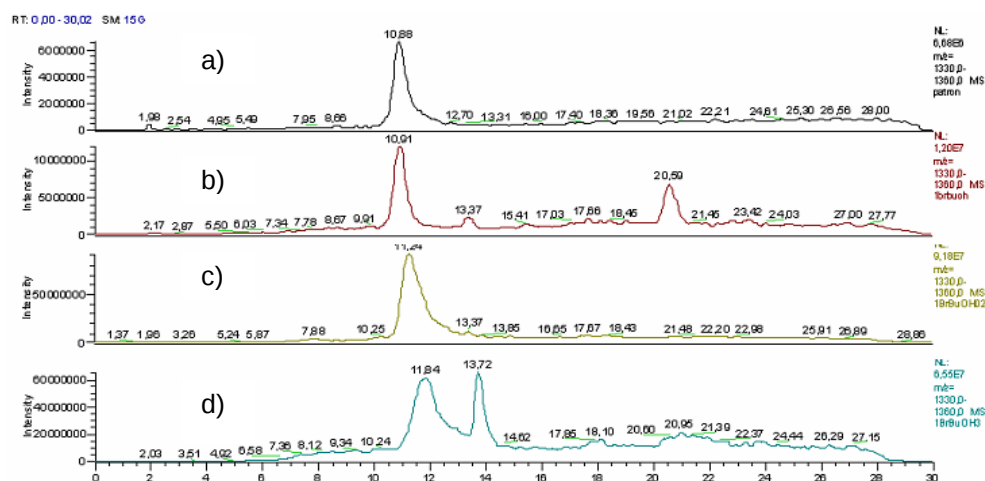


Figura 3. Cromatogramas de a) Patrón de palitoxina, b) extracto de *n*-butanol, c) fracción 2 y d) fracción 3.

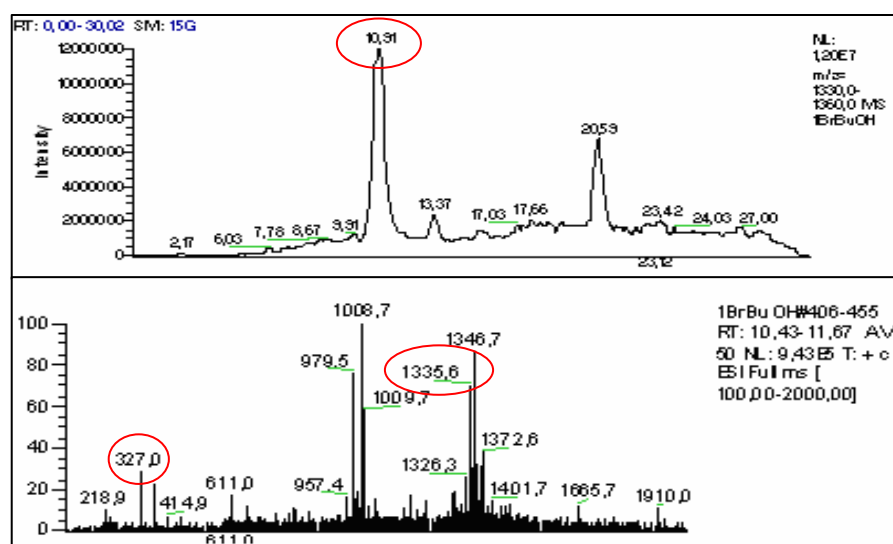


Figura 4. Cromatograma y espectro de masas de la fracción de *n*-butanol.

Con respecto a la actividad hemolítica, todos los extractos fueron analizados realizando dos ensayos, cada uno de ellos por triplicado, uno con ouabaina y otro sin ella. Los extractos que tuvieron actividad hemolítica retardada y en los que esta actividad era inhibida en presencia de ouabaina fueron: el extracto bruto, la fracción de *n*-butanol y las fracciones 2 y 3 procedentes de la cromatografía por Sephadex.

Conclusiones

Se confirmó la presencia de ostreocinas en los cultivos de *Ostreopsis ovata*, estableciéndose una pauta inicial de separación cromatográfica eficaz. Se fijaron las condiciones experimentales para la detección de ostreocinas tanto por CL-EM, como por ensayo hemolítico, esto a nivel de extracto inicial como en el transcurso de la cromatografía.

Para el estudio en profundidad de las ostreocinas se necesitan cultivos de mayor volumen debido a la baja producción de los análogos de palitoxina.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico del MEC (AGL2005-07924-CO4-01/02). Humberto J. Domínguez agradece el apoyo económico de ULL-Caja Canarias.

Referencias

- [1] Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T. 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5389-90.
- [2] Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Bernard, C., Hennion, M.-C. 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *J. Phycol.* 40:1042-1051.
- [3] Gleibs, S., Mebs, D., Werding, B. 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* 33:1531-1537.
- [4] Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobo, Vernesi, P.C. 2004. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.* 41:212-225.
- [5] Kan, Y., Uimura, D., Hirata, Y., Ishiguro, M., Iwashita, T. 2001. Complete NMR signal assignment of palytoxin and N-acetylpalytoxin. *Tetrahedron Lett.* 42:3197-3202.
- [6] Ichida, K., Ikeda, M., Goto, K., Ito, K. 1999. Characterization of a palytoxin-induced non-selective cation channel in mouse megakaryocytes. *Jpn. J. Pharmacol.* 81: 200-208.
- [7] Wachi, K.M., Hokama, Y., Haga, L.S., Shiraki, A., Takenaka, W.E., Bignami, G.S., Levine, L. 2000. Evidence for palytoxin as one of the sheep erythrocyte lytic in lytic factors in crude extracts of ciguateric and non-ciguateric reef fish tissue. *J. Natural Toxins* 9:139-146.
- [8] Bignami, G.S. 1993. A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. *Toxicon* 6:817-820.
- [9] Riobo, P., Paz, B., Franco, J. M. 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566:217-223.

Disminución del contenido en ácido domoico en vieiras (*Pecten maximus*) mediante un proceso fácilmente aplicable en la industria transformadora

Jorge Lago, Iago Valverde, Juan M. Vieites, Ana G. Cabado*

Area de Microbiología y Toxinas, ANFACO-CECOPECA.

Campus Univ. Vigo, 36310 Vigo (Pontevedra) España

*Autora para correspondencia

Resumen

La incidencia económica de las mareas rojas con toxicidad ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) es especialmente trágica en el sector de la vieira (*Pecten maximus*) debido a su baja tasa de detoxificación natural.

El ácido domoico se acumula mayoritariamente en el hepatopáncreas de este molusco. Por ello, la normativa comunitaria actual permite la ablación del hepatopáncreas para disminuir la toxicidad, si bien exige garantías de que este procedimiento consiga disminuir la concentración de toxina en la parte comestible hasta niveles tolerables. Por otra parte, existe normativa específica para la disminución de la toxicidad PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) en el corruco o langostillo (*Acanthocardia tuberculatum*).

En este trabajo hemos estudiado el efecto de la combinación de ambos procedimientos sobre la toxicidad ASP en vieiras. Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de ambos métodos es más efectiva que la ablación por sí sola y que puede suponer una alternativa para disminuir el efecto económico negativo de la toxicidad ASP sobre el sector de la vieira.

Introducción

La aparición de episodios de mareas rojas genera graves daños económicos en el sector productor y transformador, y para mitigar estos daños se han probado distintos métodos de detoxificación [1-5].

La baja tasa de detoxificación natural de las vieiras (*Pecten maximus*) contaminadas con ácido domoico llevó a la publicación de la Decisión Europea 2002/226/CE [6], que permite la extracción de aquellas vieiras que contengan niveles de ASP entre 20 y 250 mg Kg⁻¹ en determinadas condiciones. Por otra parte, la Decisión Europea 96/77/EC establece un método para la eliminación de toxinas PSP para el corruco (*Acanthocardia tuberculatum*) mediante la aplicación de una combinación de tratamientos térmicos y lavados aplicable en el caso de que el contenido en PSP esté comprendido entre 80 y 300 µg Eq. STX/100 g [7].

Teniendo en cuenta que tanto las toxinas PSP como la ASP son hidrosolubles, en este trabajo decidimos evaluar el efecto de este

tratamiento, solo o en combinación con la evisceración, sobre los niveles de ácido domoico de vieiras contaminadas.

Material y métodos

Material contaminado con ASP. Tras obtener el permiso de extracción, se adquirieron 100 kg de vieiras contaminadas a la Cofradía de Pescadores de Cambados (Pontevedra). Parte de las vieiras se procesaron el mismo día de su extracción, mientras que el resto se almacenó a -20°C.

Procesado térmico/lavado. Se aplicó el proceso descrito por la Decisión Europea 96/77/EC [7].

Evisceración. La evisceración se realizó de manera manual, dejando únicamente el pie y la gónada.

Extracción y determinación del ácido domoico. Pesar 100 g de un homogeneizado de 10 individuos. Añadir 100 ml de CIH 0,18 N y hervir durante 5 minutos, llevando a un volumen de 200 ml con CIH 0,18 N.

La determinación de ácido domoico se realizó mediante HPLC-UV siguiendo el método de Lawrence [8,9].

Tratamiento estadístico. Las determinaciones de ácido domoico se realizaron por triplicado. Se muestran las medias $\pm$ SEM (desviación estándar de la media) de los resultados obtenidos.

Resultados

Una vez extraídas del área de cultivo, las vieiras se sometieron a los distintos tratamientos (evisceración, tratamiento térmico, o ambos) y se analizó el contenido en ácido domoico por triplicado. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Ambos tratamientos consiguieron una importante reducción de la cantidad de toxina presente en la vieira, aunque el tratamiento térmico no logró alcanzar valores de ácido domoico por debajo de lo permitido. La unión de los dos tratamientos logró disminuir la toxicidad amnésica a niveles no detectables.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió repetir los procedimientos sobre una mayor cantidad de producto, para estudiar un posible efecto de escalado y la aplicabilidad en condiciones industriales. Para ello se partió de 50 kg de vieiras de la misma fecha de extracción que se habían mantenido en congelación desde su recepción al laboratorio. Las vieiras se descongelaron a temperatura ambiente durante la noche anterior, y se repartieron en cuatro lotes similares que se sometieron a los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 2. En este caso, la evisceración no consiguió alcanzar valores por debajo del límite establecido, mientras que el tratamiento térmico, sí. Una vez más, la combinación de ambos métodos disminuyó la toxicidad por debajo del límite de detección.

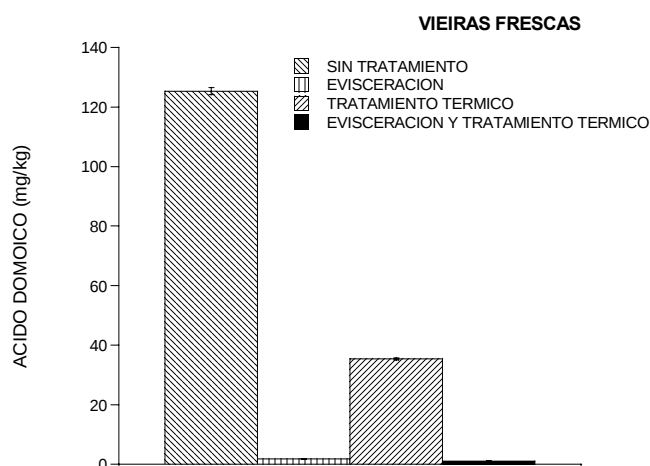


Figura 1. Efecto de los tratamientos empleados sobre el contenido en ácido domoico de vieiras recién extraídas. Media de 3 determinaciones $\pm$ SEM.

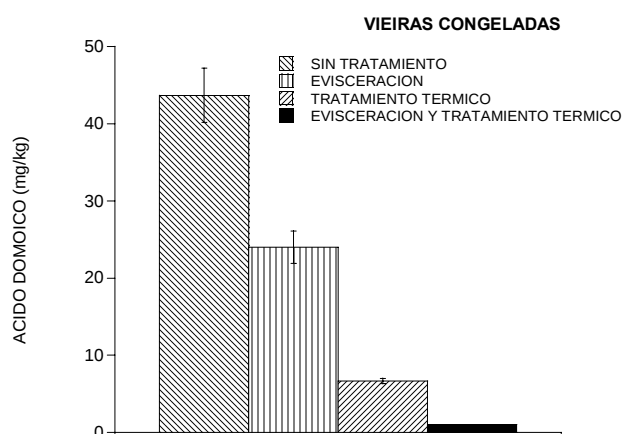


Figura 2. Efecto de los tratamientos empleados sobre el contenido en ácido domoico de vieiras tras un mes de congelación. Media de 3 determinaciones $\pm$ SEM.

Además, se realizó un control de mermas del procesado térmico más evisceración, ya que éstos son datos de interés a la hora de plantear la aplicabilidad real de los procedimientos en la industria transformadora. Los resultados que se presentan en la Tabla 1, se expresan con respecto a la vieira con concha y tras la precocción y separación de la concha.

Vieira	Rendimiento			
	Sin procesar	Precocción	Cocción	Evisceración
Con concha	100%	37.7%	33.5%	23.53%
Tras precocción		100%	88.86%	62.41%

Tabla 1. Rendimientos obtenidos tras las sucesivas etapas del método de detoxificación empleado.

Discusión

Los dos métodos empleados para disminuir el contenido de ASP en vieiras resultaron efectivos, aunque sólo parcialmente si consideramos como objetivo final conseguir que el producto alcance concentraciones por debajo del límite establecido de 20 mg Kg⁻¹ [6]. Sin embargo la asociación de ambos métodos consiguió resultados plenamente satisfactorios al eliminar el ácido domoico hasta alcanzar niveles por debajo de nuestro límite de detección (1,6 mg Kg⁻¹).

La mayor parte de la toxicidad se concentra en el hepatopáncreas en las vieiras vivas, ya que su eliminación disminuyó en gran medida el contenido en ácido domoico (prácticamente en su totalidad, Fig. 1); sin embargo esto no parece ser así en vieira congelada, ya que las vieiras evisceradas contienen aproximadamente la mitad de la toxina de las vieiras sin eviscerar (Fig. 2). Además, nuestros resultados sugieren que la congelación afecta en diversos aspectos al contenido y distribución del ácido domoico en la vieira, ya que por un lado la toxicidad disminuye (comparar los niveles en las vieiras sin tratamiento de la Fig. 1 y la Fig. 2), probablemente por una pérdida en el agua de descongelación, pero también parece producirse una migración desde el hepatopáncreas a la vianda.

La aplicación del procedimiento destinado a la detoxificación de PSP en *Acanthocardia tuberculatum* se ha mostrado como efectivo a la hora de disminuir la toxicidad amnésica en vieira, especialmente cuando va asociado a la evisceración. Este método sería de fácil aplicación en las industrias conserveras, por tratarse fundamentalmente de tratamientos térmicos de cocción.

La aplicación real de este procedimiento en las empresas transformadoras requeriría un estudio profundo para establecer valores límites dentro de los que se permitiese la aplicación del procedimiento.

Agradecimientos

Este trabajo se financió con los fondos del proyecto PGIDIT06RMA00804CT de la Xunta de Galicia.

Referencias

- [1] González, J.C., O.I. Fontal, M.R. Vieytes, J.M. Vieites, L.M. Botana. 2002. Basis for a new procedure to eliminate diarrhetic shellfish toxins from a contaminated matrix. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50:400-405.
- [2] Leira, F.J., J. M. Vieites, L.M. Botana, M.R. Vieytes. 1998. Domoic acid levels of naturally contaminated scallops as affected by canning. *Journal of Food Science*. 63:1081-1083.
- [3] Smith, E.A., *et al.* 2001. Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2345-2353.
- [4] Stewart, J.E., *et al.* 1998. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:456-464.

- [5] Vieites, J.M., L.M. Botana, M.R. Vieytes, F.J. Leira. 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal of Food Protection*. 62:515-519.
- [6] Decisión 2002/226/EC Decisión de la Comisión, de 15 de Marzo de 2002, por la que se establecen controles sanitarios especiales para la recolección y transformación de determinados moluscos bivalvos con un nivel de toxina amnésica de molusco (ASP) superior al límite establecido en la Directiva 91/492/CEE del Consejo. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002: p. 65-66.
- [7] Decisión 96/77/EC Decisión de la comisión de 18 de Enero de 1996 por la que se establecen las condiciones de recogida y transformación de algunos moluscos bivalvos procedente de zonas donde los niveles de toxinas paralizantes superan el límite fijado por la Directiva 91/492/CEE del Consejo. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1996. DOCE n L 15/46, 20/1/96.
- [8] Lawrence, J.F., C.F. Charbonneau, C. Menard. 1991. Liquid-Chromatographic Determination of Domoic Acid in Mussels, Using Aoac Paralytic Shellfish Poison Extraction Procedure - Collaborative Study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 74:68-72.
- [9] Lawrence, J.F., *et al.* 1989. Liquid-Chromatographic Determination of Domoic Acid in Shellfish Products Using the Paralytic Shellfish Poison Extraction Procedure of the Association of Official Analytical Chemists. *Journal of Chromatography*. 462:349-356.

Caracterización de la respuesta citotóxica de la pectenotoxina-2 (PTX-2) en dos modelos celulares humanos: células de neuroblastoma y células Caco-2

Iago Valverde, Jorge Lago, Juan M. Vieites, Ana G. Cabado *

Area de Microbiología y Toxinas, ANFACO-CECOPECA.

Campus Univ. Vigo, 36310. Vigo (Pontevedra). Spain.

* Corresponding author: Tel: 34-986469303. Fax: 34-986469269. agcabado@anfaco.es

Resumen

La presencia de pectenotoxinas (PTX) en los moluscos fue descubierta debido a su elevada toxicidad aguda en el bioensayo en ratón mediante inyección intraperitoneal de extractos lipofílicos. Los estudios en animales indican que son mucho menos potentes vía oral y que no inducen diarrea.

En este trabajo, hemos caracterizado la respuesta citotóxica de la PTX-2 *in vitro* en dos líneas celulares, las células de Caco-2 y las células de neuroblastoma, incluyendo marcadores de citotoxicidad y de apoptosis.

Hemos evaluado los potentes cambios estructurales que provoca la PTX-2 sobre ambos modelos celulares, el desprendimiento del sustrato, el redondeamiento celular y los cambios en el citoesqueleto, así como la integridad de la membrana plasmática que no se ve afectada por la PTX-2 en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Por otro lado, hemos abordado el estudio de distintos marcadores de apoptosis: potencial de membrana de mitocondria, fragmentación del DNA y activación de caspasas. Entre ellos el que más se ve afectado por el tratamiento celular con la PTX-2 es el potencial de membrana de mitocondria, mientras que otros marcadores o no se ven afectados o el efecto es poco relevante.

Introducción

Las PTXs son toxinas con una amplia distribución geográfica. Se han detectado en diversos países, entre otros, Australia, Japón, Noruega y España [1-5]. Las PTXs provienen exclusivamente del dinoflagelado *Dinophysis* spp. y normalmente están asociadas a toxinas del grupo del ácido okadaico [6-8]. Este dinoflagelado contiene y acumula PTX-2 que, por el contrario, nunca se encuentra en los moluscos. Se sabe que en el hepatopáncreas de los moluscos tienen lugar varios mecanismos para producir otras toxinas. Las PTX-1, 3 y 6 son metabolitos formados por oxidación de la PTX-2 en vieiras japonesas. Las PTX-2 seco-ácidos (PTX-2 sa) y su epímero 7-epi PTX-2 sa son metabolitos de la PTX-2 producidos en mejillones y vieiras de Nueva Zelanda. La potencia citotóxica de los seco-ácidos es significativamente menor que la de la PTX-2 lo que implica que la estructura cíclica de las PTXs es importante para expresar su

citotoxicidad [1,9-11]. Por lo tanto, esta conversión de la PTX-2 en las glándulas digestivas de los moluscos reduce su toxicidad y por ello, los moluscos ante estas condiciones parecen detoxificarse de forma natural.

En la Decisión de la Comisión de 15 de Marzo de 2002 por la que se establecen normas detalladas para la aplicación de la Directiva 91/492/CEE del Consejo en lo que se refiere a los niveles máximos y los métodos de análisis de determinadas biotoxinas marinas en moluscos bivalvos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos, se regulan los grupos de toxinas anteriormente incluídas en el grupo de las diarreicas (DSP) [12]. En esta Decisión se establece un nivel máximo total de ácido okadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas de 160 microgramos de equivalentes de ácido Okadaico/kg.

Se han realizado algunos estudios sobre los efectos citotóxicos de la PTX en diferentes líneas celulares tumorales [13], observando que la PTX-1 y 2 son hepatotóxicas [14-17]. Por otro lado, se sabe que la PTX-6 despolimeriza la F-actina, aunque no parece causar apoptosis en células de neuroblastoma [18]. Por el contrario, otros trabajos ponen de manifiesto que la PTX1 ó 2 provocan apoptosis en otras líneas celulares [15,19].

En este trabajo se ha evaluado el papel citotóxico de la PTX-2 sobre dos modelos celulares humanos, células de neuroblastoma y células Caco-2. Además, hemos estudiado el potencial efecto apoptótico de la PTX-2, analizado ciertos marcadores de apoptosis en ambas líneas celulares.

Material y métodos

Reactivos. La biotoxina PTX-2 ha sido adquirida al “Nacional Research Council” de Canadá. Los reactivos: Triton X-100, Earle’s modified Eagle’s medium (EMEM), Nutrient Mixture F-12 HAM, la anfotericina B ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), suero fetal bovino, agarosa, Trizma® base, bromuro de etidio, formaldehído, solución salina tamponada con fosfatos (PBS) pH 7,4, solución de aminoácidos no esenciales (100 X), EDTA (0,5 M, pH 8,0), el kit Lactato Deshidrogenasa, AcDEVD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, BSA, DTT, aprotinina, benzamidina, pepstatina, leupeptina y el kit cromoFluor96 fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. La gentamicina (10 mg mL^{-1}) y la penicilina/estreptomicina ($10.000 \text{ U}/10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), se obtuvieron de Biochrom KG, Berlin, Alemania. El ácido bórico, de Pharmacia Biotech. El kit NucleoSpin® Tissue, fue proporcionado por Macherell-Nagel (Cultek, Spain). KG. El MitoTracker® Red CMCRos, el kit CyQuant® Cell Proliferation Assay, Oregon Green®514 phalloidin y el yoduro de propidio se adquirieron de Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA.

Cultivos celulares. El estudio se llevó a cabo utilizando dos líneas celulares humanas procedentes de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECCC), la línea celular Caco-2 y la línea Neuroblastoma BE(2)-M17.

Las células de Neuroblastoma se cultivaron en medio de cultivo Earle's modified Eagle's médium (EMEM): Ham's F12 (1:1) con 2 mM de glutamina, 1 % aminoácidos no esenciales, 10 % suero fetal bovino, 0,1 mg mL⁻¹ de gentamicina y 0,05 ng mL⁻¹ de anfotericina B. Las células Caco-2 se cultivaron en Earle's modified Eagle's medium (EMEM) con 2 mM de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino, penicilina (50 U mL⁻¹) y estreptomycin (50 µL mL⁻¹). Ambos cultivos celulares se incubaron en frascos a 37 °C y 5 % CO₂ hasta alcanzar una confluencia de 70-90 %.

Imágenes microscópicas. Las células se expusieron a la PTX-2 durante distintos tiempos, se observaron en un microscopio óptico Olympus y se fotografiaron con una cámara Leica DFC 480.

Despolimerización de la F-actina. La medición de la despolimerización de la F-actina fue llevada a cabo mediante un indicador fluorescente en microplaca, usando *Oregon Green-514 Phalloidin*, como se describió anteriormente [18, 20]. La fluorescencia fue medida en un lector de fluorescencia en microplaca LS-50B Perkin Elmer, a una longitud de onda de 511 nm de excitación y 528 nm de emisión. Los valores de fluorescencia de cuatro experimentos independientes por triplicado se expresan como porcentaje respecto a los controles.

Integridad de la membrana plasmática. Los efectos que la PTX-2 produce sobre la integridad de la membrana plasmática de la célula se estudiaron a través de dos métodos: liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y entrada de ioduro de propidio (IP), según se describe en [20,21]. Los valores de fluorescencia de cuatro a seis experimentos independientes por triplicado se expresan como porcentaje respecto a los controles positivos.

Cambios en el potencial de Membrana de Mitocondria. Se evaluaron los cambios en el Potencial de Membrana Mitocondrial provocados por la PTX-2 mediante un ensayo de fluorescencia usando el marcador Mitotracker Red CMCRos, como se describió anteriormente [20,22]. Se realizaron cuatro experimentos independientes por triplicado, y sus resultados se expresan como porcentaje de los valores de fluorescencia respecto a los controles.

Fragmentación del ADN. Se incubaron las células con PTX-2 (50 nM) en medio de cultivo durante 24, 48 y 72 horas. La extracción del ADN fue llevada a cabo con el kit *NucleoSpin Tissue kit*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % en el cual se cargaron 20 µg mL⁻¹ de ADN. En este

ensayo se incluyó un control positivo de ADN tratado con enzimas de restricción Ava-I y Bfa-I.

Detección de Caspasas. Se analizó la actividad de las caspasas-3, 8 y 9 mediante un ensayo de fluorescencia con el kit cromoFluor96 siguiendo las directrices del fabricante y como se describió en [20,21]. Los resultados de dos experimentos independientes realizados por triplicado se expresan como porcentajes de los valores de fluorescencia obtenidos con los controles.

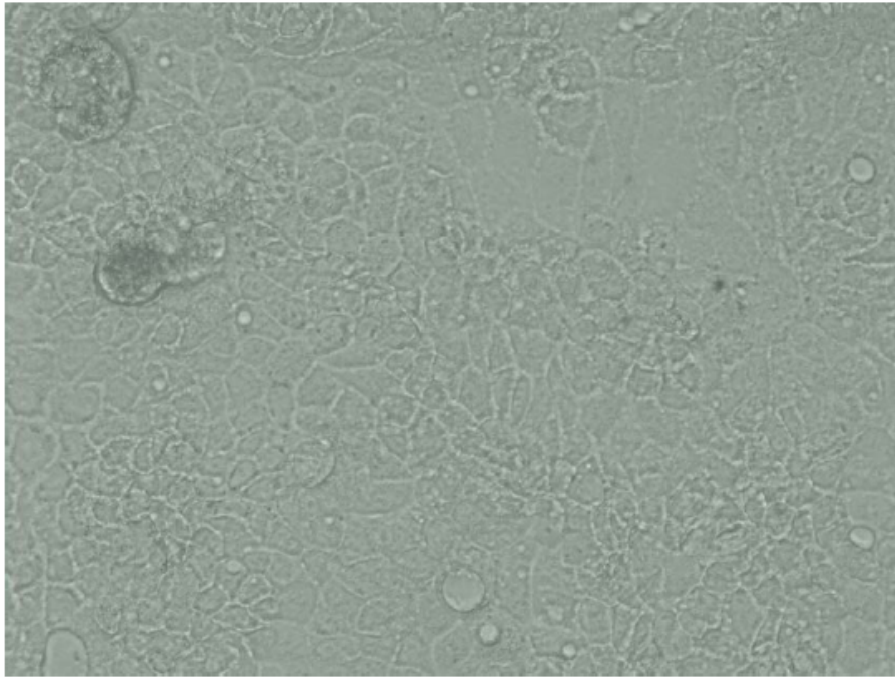
Análisis estadístico. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM (error estándar de la media) de 2 a 6 experimentos realizados por triplicado, como se establece en las leyendas de las figuras. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$ usando el test de la T-Student para datos pareados.

Resultados y Discusión

Las Figs. 1 y 2 muestran las células Caco-2 (Fig. 1) y células de neuroblastoma (Fig. 2) sin tratamiento (Figs. 1A y 2A) o tratadas con PTX-2 (50 nM) durante 96 horas (Figs. 1B y 2B). Se observa una morfología típica en las células control, sin embargo en células expuestas a la PTX-2 se aprecia un desprendimiento celular así como un redondeamiento en ambas líneas celulares. Estos resultados son similares a otros descritos en hepatocitos tratados con PTX-1 [15].

Estos cambios pueden ser causados por daños al citoesqueleto celular, por lo tanto, a continuación estudiamos los posibles cambios en los filamentos de actina producidos por la PTX-2 (Figs. 3 y 4). En las células Caco-2 (Fig. 3), se producen cambios significativos, que se aprecian con tiempos cortos de incubación y bajas dosis de PTX-2 (Fig. 3A, 1 h de incubación). Estos cambios se aprecian con dosis menores de PTX-2 cuando se aumenta el tiempo de exposición a la toxina ((Fig. 3B, 24 h de incubación).

A) Control



B) PTX 96 h

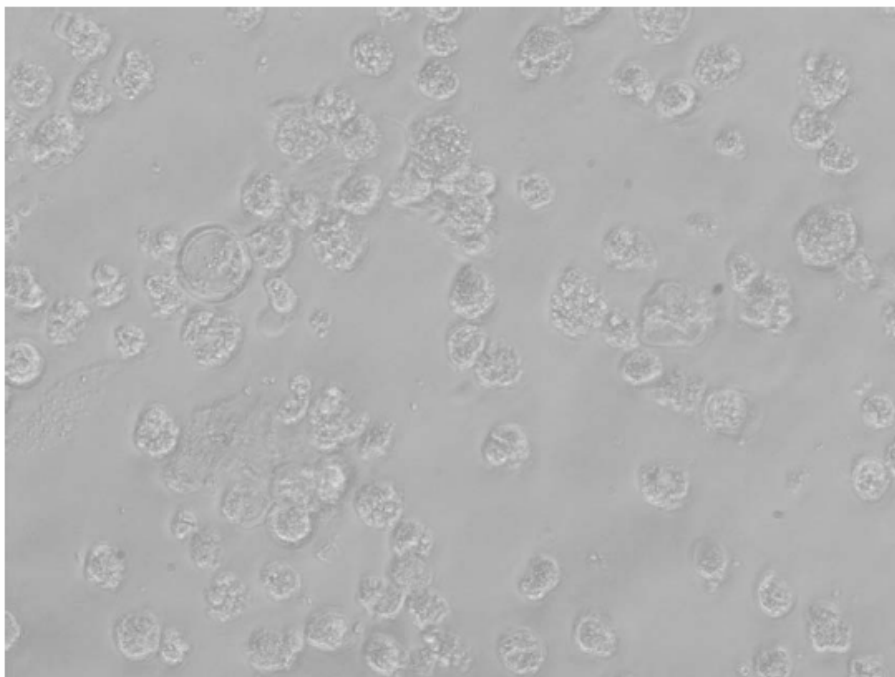
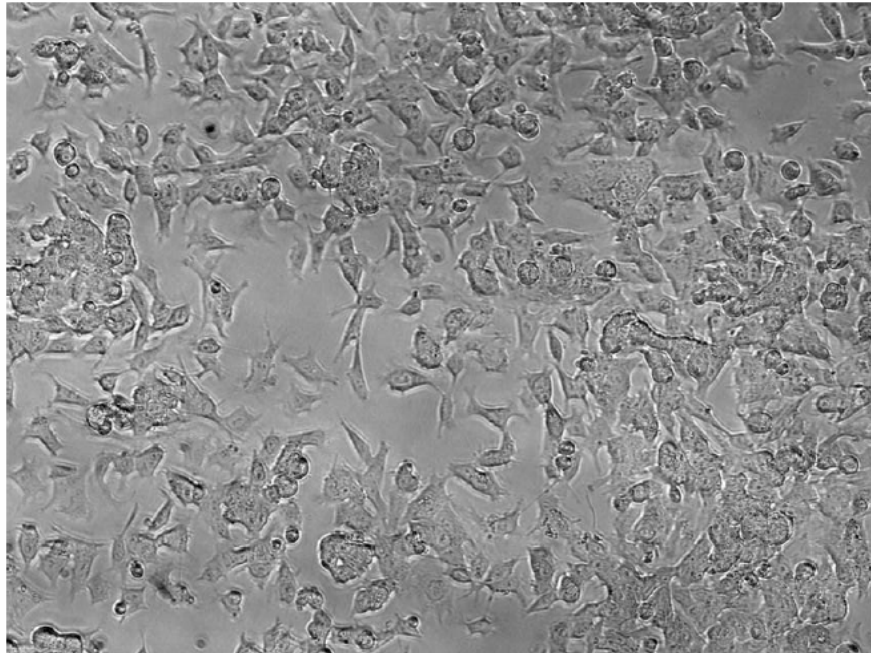


Figura 1. Efecto de la PTX-2 sobre la morfología de células Caco-2. La Figura 1A corresponde a células control y la Figura 1B a células tratadas con 50 nM de PTX-2 durante 96 horas.

A) Control



B) PTX 96 h

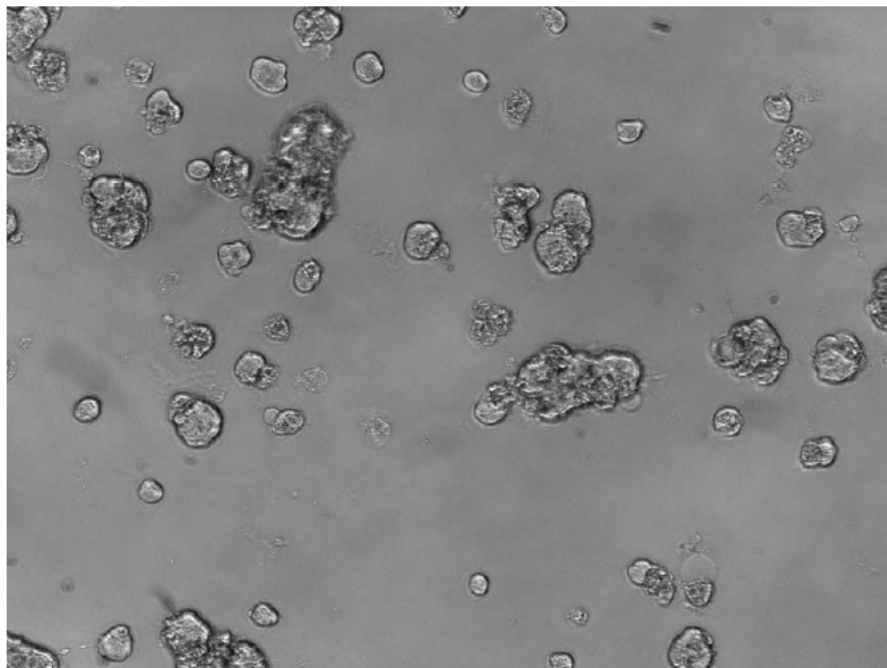


Figura 2. Efecto de la PTX-2 sobre la morfología de células de neuroblastoma. La Figura 2A corresponde a células control y la Figura 2B a células tratadas con 50 nM de PTX-2 durante 96 horas.

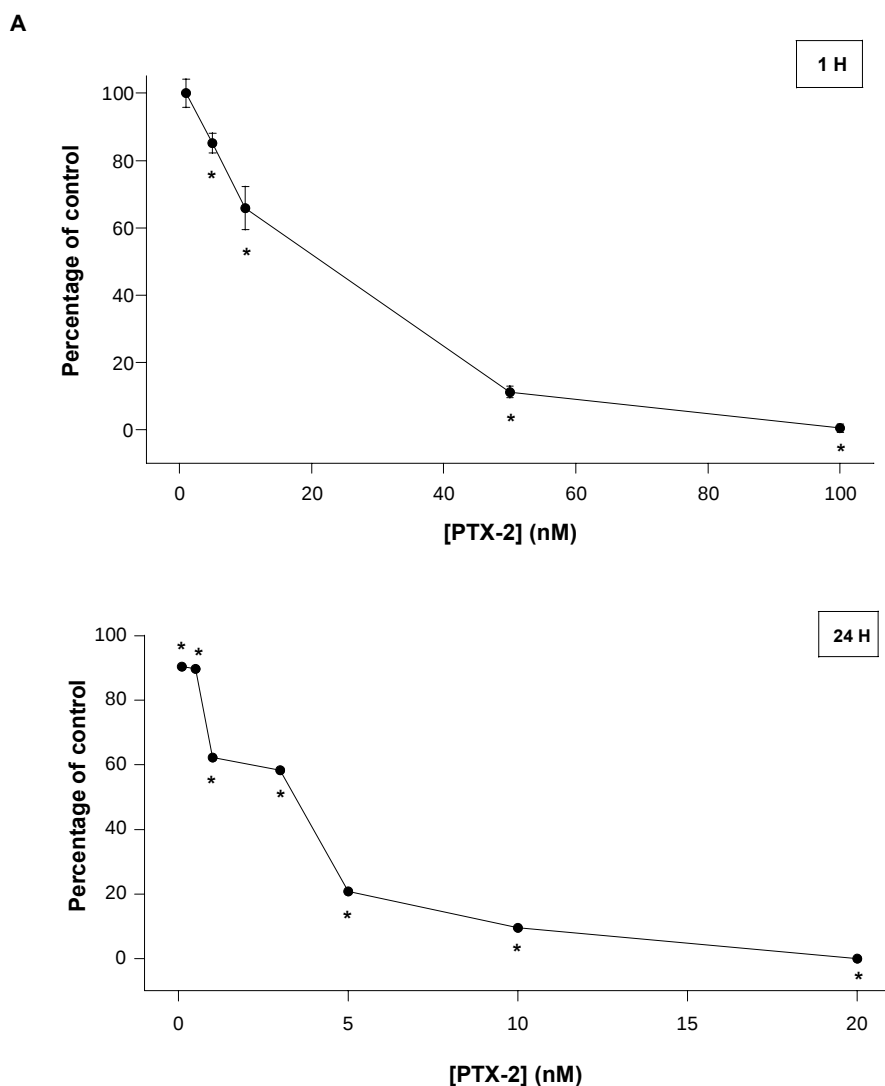


Figura 3. Despolimerización de la F-actina producida en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de PTX-2 durante 1 hora (Figura 3 A) o 24 horas (Figura 3 B). Los valores son la media $\pm$ SEM de 4 experimentos por triplicado.

En las células de neuroblastoma estos efectos son más potentes (Fig. 4), ya que se observa una despolimerización total de la F-actina con una exposición de 1 hora a 50 nM de PTX-2 y dosis mayores (Fig. 4A). Una exposición de 24 horas provoca una despolimerización total con dosis de PTX-2 superiores a 20 nM (Fig 4B). Este efecto es similar al obtenido en neuroblastoma con PTX-6 [18] y reafirma el hecho de que la disrupción de la F-actina es un mecanismo clave en la toxicidad inducida por la PTX [6, 19].

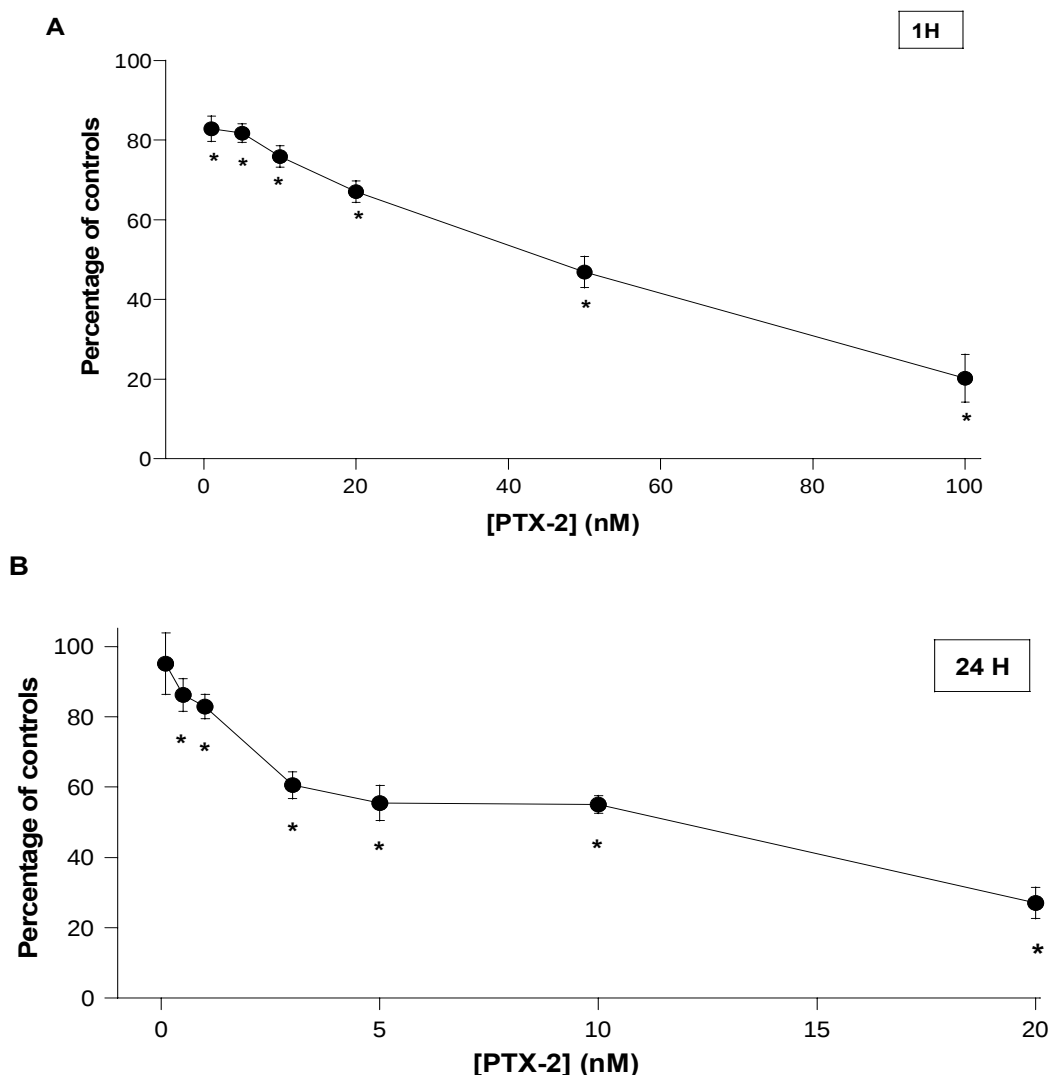


Figura 4. Despolimerización de la F-actina producida en células de células de Neuroblastoma expuestas a diferentes concentraciones de PTX-2 durante 1 hora (Figura 3 A) o 24 horas (Figura 3 B). Los valores son la media $\pm$ SEM de 4 experimentos por triplicado.

A continuación estudiamos los efectos de la PTX-2 sobre la integridad de la membrana plasmática. En ambas líneas celulares un tratamiento de PTX-2 durante 24 horas no provoca, ni liberación de LDH, ni entrada de PI en la célula (no se muestran los datos). Similares resultados fueron obtenidos por otros autores mediante la utilización de PTXs en otras líneas celulares [14,15].

Es bien conocido que algunas biotoxinas marinas, incluida las PTXs, provocan apoptosis en distintas líneas celulares [15,19]. En este contexto, los resultados anteriores muestran que, por un lado, ambos modelos celulares se desprenden del sustrato, se observa un redondeamiento celular y disrupción de la F-actina. Esto podría ser indicativo de que las células están experimentando un tipo de apoptosis llamada anoikis, provocada por el desprendimiento celular [23,24]. Además, tampoco se observa daño en la

membrana plasmática, como indican los parámetros LDH y IP, como ocurre en la apoptosis. Por lo tanto, estos resultados nos motivaron a realizar un estudio de varios marcadores de apoptosis.

En primer lugar, analizamos los posibles cambios en el potencial de membrana de mitocondria de ambas líneas celulares (Fig. 5). Se observa que en las células de Caco-2 se produce una ligera, pero significativa, disminución del potencial de membrana de mitocondria (Fig. 5A). En las células de neuroblastoma también se produce una caída en el potencial de membrana de mitocondria, pero en este caso el efecto es mucho más potente (Fig. 5B).

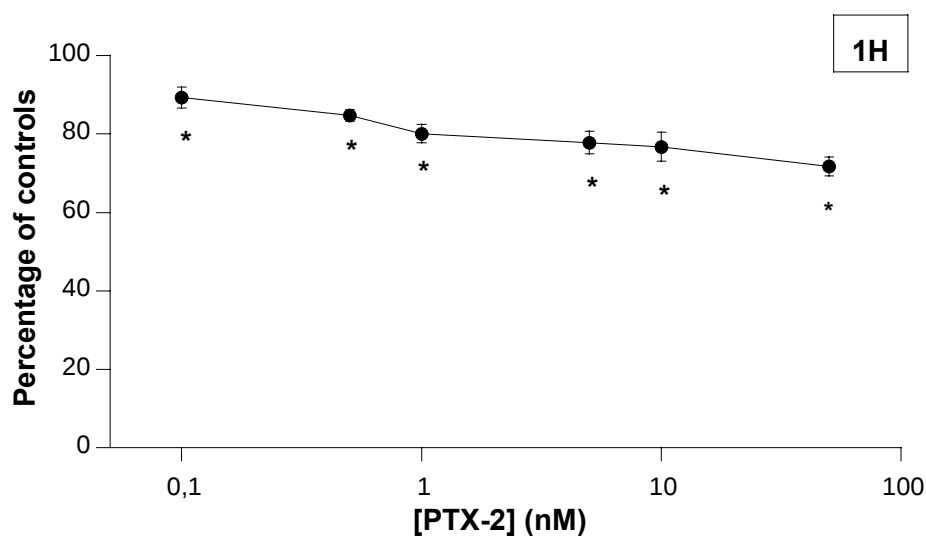
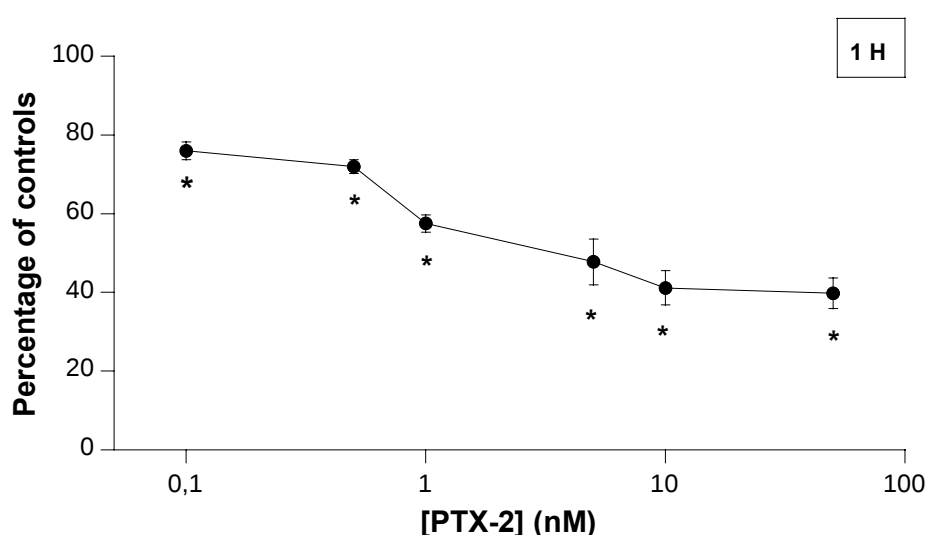
A**B**

Figura 5. Cambios en el potencial de membrana de mitocondria en células Caco-2 (Figura 5A) y células de Neuroblastoma (Figura 5B) expuestas a la PTX-2 durante 1 hora. Los valores son la media $\pm$ SEM de 4 experimentos por triplicado.

Por otro lado, decidimos estudiar el potencial efecto de la la PTX-2 (50 nM) sobre la fragmentación del ADN que es un marcador clave en la apoptosis celular (Fig. 6). En ninguna condición estudiada se aprecia fragmentación del ADN, ni en células Caco-2 (Fig. 6A) ni en células de neuroblastoma (Fig. 6B).

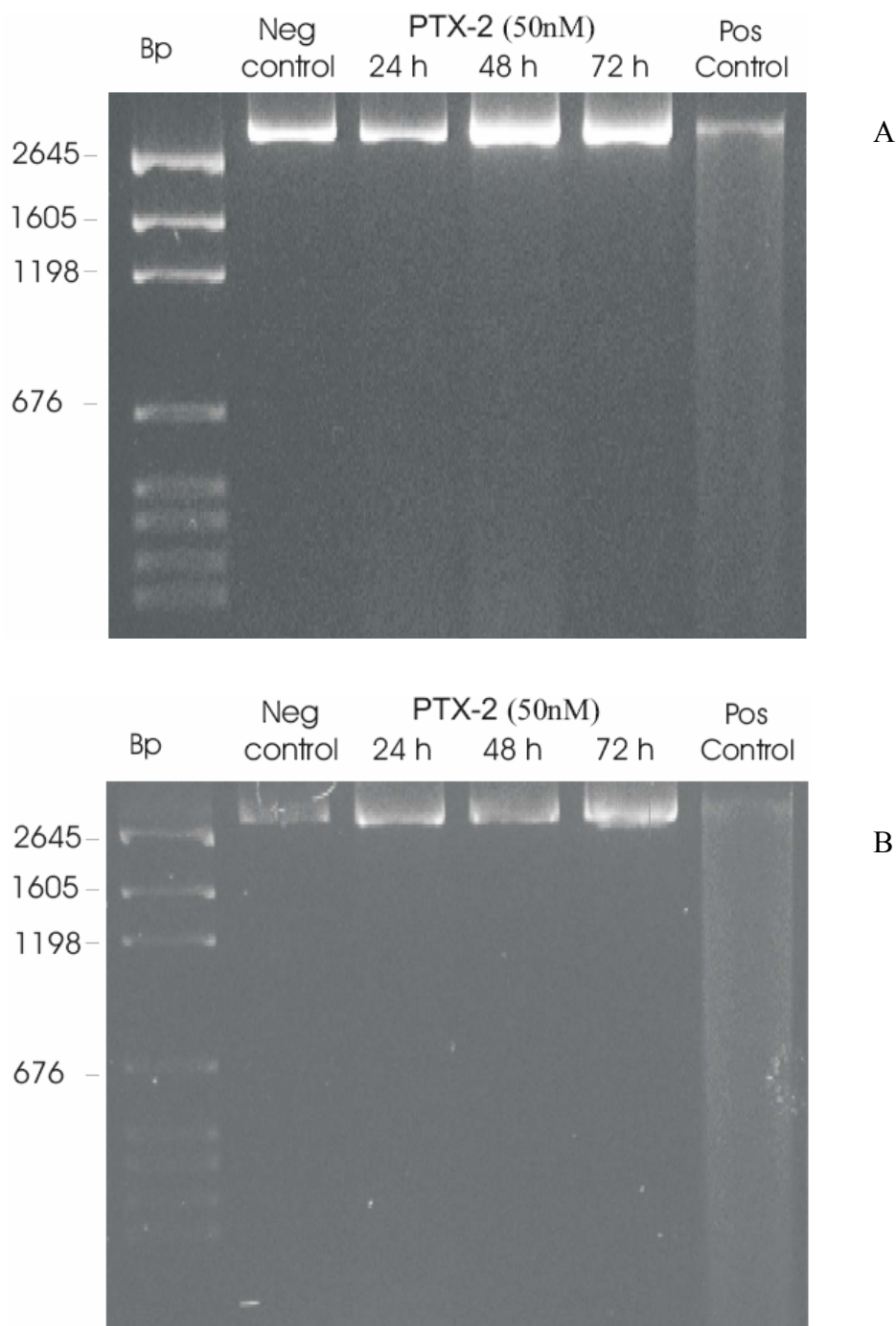


Figura 6. Efecto de PTX-2 (50 nM) sobre la fragmentación del ADN en células Caco-2 (Figura 6A) y en células de Neuroblastoma (Figura 6 B) tratadas con la toxina durante 24, 48 y 72 horas. Los geles son representativos de tres experimentos similares.

Por último, analizamos el efecto de la PTX-2 (50 nM) sobre la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en ambas líneas celulares. Tan sólo en las células de neuroblastoma se aprecia una activación de la caspasa 3 con 24 horas de exposición a la PTX-2 (50 nM) (no se muestran los datos).

Estos resultados parecen apuntar por un lado a que las células están experimentando apoptosis ya que se aprecia caída en el potencial de membrana de mitocondria. Sin embargo, a pesar del papel central de la mitocondria en muchas formas de apoptosis, su participación parece ser dependiente, no sólo del modelo celular, sino también del agente inductor [25]. Por otro lado, no se detecta fragmentación del ADN sugiriendo que no existe apoptosis. En cuanto al papel de las caspasas tampoco está claro, ya que estudios recientes ponen en entredicho el papel de las caspasas en la apoptosis.

En conclusión el efecto citotóxico de la PTX-2 en Caco-2 y en células de neuroblastoma es muy complejo, provoca cambios morfológicos, redondeamiento celular, desprendimiento celular del sustrato, despolimerización de la F-actina y caída en el potencial de membrana de mitocondria, que es un marcador de apoptosis. Sin embargo, otros marcadores de apoptosis como la fragmentación del ADN o la activación de caspasas no se ven prácticamente afectados.

Agradecimientos

Este trabajo se financió con fondos de los proyectos AGL-2004-08268-C02-01/ALI y REN-2003-06598-C02-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología

Referencias

- [1] Suzuki, T., *et al.* 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *Journal of Chromatography A*. 815:155-160.
- [2] Vale, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*. 44:123-134.
- [3] Vale, P., M.A.D. Sampayo. 2002. Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon*. 40: 979-987.
- [4] Miles, C.O., *et al.* 2004. A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chemical Research in Toxicology*. 17:1423-1433.
- [5] FAO. 2004. *Marine Biotoxins*. En: FAO Food and Nutrition Paper. Roma.
- [6] Draisci, R., *et al.* 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*. 34:923-935.
- [7] James, K.J., *et al.* 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *Journal of Chromatography A*. 844:53-65.

- [8] MacKenzie, L., *et al.* 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*. 40: 1321-1330.
- [9] Suzuki, T., *et al.* 2001. Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *Fisheries Science*. 67:506-510.
- [10] Suzuki, T., *et al.* 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*. 39:507-514.
- [11] Miles, C.O., *et al.* 2006. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon*. 48:152-159.
- [12] Commission, E., Commission Decision 2002/225/EC of 15 March 2002, laying down detailed rules for the implementation of Council Directive 91/492/EEC as regards the maximum levels and the methods of analysis of certain marine biotoxins in bivalve molluscs, echinoderms, tunicates and marine gastropods 2002: Official Journal of the European Communities. pp. 62-64.
- [13] Jung, J.H., C.J. Sim, C.O. Lee. 1995. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *Journal of Natural Products*. 58:1722-1726.
- [14] Aune, T., T. Yasumoto, E. Engeland. 1991. Light and Scanning Electron-Microscopic Studies on Effects of Marine Algal Toxins toward Freshly Prepared Hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 34:1-9.
- [15] Fladmark, K.E., *et al.* 1998. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*. 36:1101-1114.
- [16] Zhou, Z.H., *et al.* 1994. Effects of pectenotoxin-1 on liver cells in vitro. *Natural Toxins*. 2:132-135.
- [17] Spector, I., *et al.* 1999. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*. 47:18-37.
- [18] Leira, F., *et al.* 2002. Characterization of F-actin depolymerization as a major toxin event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastomas cells. *Biochem Pharmacol*. 7235:1-10.
- [19] Chae, H.D., *et al.* 2005. Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors. *Oncogene*. 24:4813-4819.
- [20] Lago, J., *et al.* 2005. Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated Caco-2 cells. *Toxicon*. 46:579-586.
- [21] Valverde, I., *et al.* 2006. *Neuroblastoma cells a a cell model to study BADGE (Bisphenol A diglycidyl-ether) and BFDGE (Bisphenol F diglycidyl-ether) toxicity, in Neuroblastoma cells*. Nova Science Publishers, Inc. New York.
- [22] Leira, F., *et al.* 2002. Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxicology in Vitro*. 16:23-31.
- [23] Frisch, S.M. and E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*. 9:701-706.
- [24] Grossman, J. 2002. Molecular mechanisms of detachment-induced apoptosis-anoikis. *Apoptosis*. 7:247-260.
- [25] Fulda, S., *et al.* 2001. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 20:1063-1075.

Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas

Elisabeth Cañete, Amandine Caillaud y Jorge Diogène

Centre d'Aquicultura, IRTA,

Ctra Poble Nou s/n, 4340 Sant Carles de la Rapita. Tarragona

Resumen

Los métodos de detección de toxinas marinas basados en el estudio del efecto tóxico en cultivos celulares aportan información relevante respecto a la actividad tóxica de las toxinas y eventualmente contribuyen a describir su mecanismo de acción. Al igual que todas las metodologías de detección de toxinas, los ensayos de citotoxicidad necesitan de validaciones para convertirse en métodos de uso convencional. En éste trabajo abordamos la respuesta de células Neuro-2a (ATCC, CCL131) frente a diferentes estándares de toxinas marinas utilizando un método dependiente de ouabaina y veratridina (O/V). Este modelo celular, rico en canales de sodio, es un modelo habitualmente empleado para estudios de toxinas que actúan sobre estos canales. Con el fin de estudiar su aplicabilidad a otras toxinas, hemos realizado un estudio multi-toxínico. En las condiciones utilizadas en presencia de O/V se obtuvieron EC50s de 8,6 nM para la saxitoxina (bloqueadora de canales de sodio), 8,2 nM para la brevetoxina-3 y 36,9 nM para la brevetoxina-2 (activadoras de canales de sodio). Entre las toxinas que no actúan sobre canales de sodio, se produjo mortalidad en las células Neuro-2a sin tratamiento previo con O/V de forma dosis-dependiente, obteniéndose las siguientes EC50s: palitoxina 0,1nM, pectenotoxina-2 28,3 nM, ácido okadaico 21,9 nM y dinophysistoxina-1 20,6 nM. El ácido domoico no produjo mortalidad en las células Neuro-2a con o sin O/V. El modelo Neuro-2a se configura como una estrategia potente para el estudio de un amplio espectro de toxinas marinas.

Introducción

La necesidad de utilizar modelos biológicos bajo condiciones controladas en la detección de toxinas marinas junto a la presión por reducir la experimentación animal favorece la utilización de cultivos celulares como modelos para estudiar las toxinas marinas presentes en el fitoplancton o en los bivalvos. Muchos tipos celulares se han utilizado hasta el momento tanto en el estudio de la detección tóxica como en el estudio de los mecanismos de acción de dichas toxinas [1]. Uno de los sistemas más robustos utilizados hasta el momento en el estudio citotóxico de toxinas que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje ("Voltaje gated sodium channels", VGSC) tiene como herramientas el cultivo de células de neuroblastoma Neuro-2a [2,3,4] y el estudio de la viabilidad de estas células, tras la exposición de las toxinas, mediante el ensayo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, Sigma] [4].

En éste estudio se ha evaluado el potencial citotóxico de 8 toxinas (ácido okadaico, dinophysistoxina-1, pectenotoxina-2, palytoxina, ácido domoico, saxitoxina, brevetoxina-2 y brevetoxina-3) sobre la viabilidad celular de células de neuroblastoma Neuro-2a para establecer la sensibilidad de este método de detección a cada una de ellas. La detección de la toxicidad tanto del ácido okadaico como de la dinophysistoxina-1 (toxinas inhibidoras de fosfatasas) en una gran variedad de tipos celulares permite gran plasticidad en la elección del tipo celular escogido para su estudio citotóxico. Sin embargo, las toxinas que actúan sobre canales VGSC dependen de tipos celulares que presenten estos canales, como son los cultivos de células de neuroblastoma Neuro-2a. Las exposiciones de las células a las toxinas se realizan con y sin tratamiento previo de ouabaina y veratridina (OV). La veratridina aumenta el flujo del sodio hacia el interior de la célula a través de los canales de sodio de la membrana y un inhibidor de la bomba sodio potasio (ouabaina) impide que la célula contrareste el efecto de la veratridina.

Material y métodos

Cultivo de las células Neuro-2. Las células de neuroblastoma, Neuro-2a (ATCC, CCL131), se mantienen en cultivo con RPMI al 10% de FBS a una temperatura de 37°C y a 5,0% de CO₂. El medio de cultivo RPMI es de Sigma y se suplementa con 1% de solución de piruvato de sodio (100 mM), 1% de solución L-glutamina (200 mM) y 0,5% de solución antibiótica (10 mg mL⁻¹ de estreptomicina y 1.000 u mL⁻¹ de penicilina). Para la resiembra de las células se utiliza solución tripsina (diluida con PBS hasta 0,5g L⁻¹).

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizan placas de 96 pocillos, con medio de cultivo RPMI al 5% de FBS con aproximadamente 30.000 células por pocillo. La placa puede ser utilizada a las 24 horas de su preparación.

Exposición de las toxinas y evaluación de los efectos tóxicos. Para la exposición de los extractos a los cultivos celulares, éstos se deben evaporar con flujo de nitrógeno y con calor. El extracto evaporado se resuspende en medio de cultivo al 5% de FBS y se dosifica en los pocillos correspondientes. A partir de la dosis más concentrada se preparan las 8 dosis (dilución 1:2) y se dispensan tres pocillos por dosis (tres réplicas).

Cultivos celulares control y células pretratadas (minutos antes de la exposición a la toxina a estudiar) con ouabaina y veratridina son expuestas a las toxinas. Las concentraciones de ouabaina y de veratridina empleadas (10:1) son escogidas para producir mortalidad en aproximadamente el 80% (0,3 mM ouabaina, 0,03 mM veratridina) para toxinas bloqueadoras de canales VGSC (saxitoxina) o el 20% (0,1 mM ouabaina, 0,01 mM veratridina) para toxinas activadoras del canal de sodio (brevetoxina 2 y 3) y para el resto de toxinas estudiadas.

La evaluación de los efectos tóxicos se hará mediante la lectura de la viabilidad celular con el ensayo MTT.

El análisis de las curvas dosis-respuesta se realiza con el software Prism 4 (GraphPad, San Diego, California, USA).

Toxinas. Las toxinas utilizadas para el estudio son: ácido okadaico (AO) (Sigma); saxitoxina (STX), pectenotoxina 2 (PTX2) y ácido domoico (NRC-CNRC); brevetoxina 2 (PbTx-2) y brevetoxina 3 (PbTx-3) (Calbiochem); dinophysistoxina 1 (DTX-1) y palytoxina (Wako).

Resultados y discusión

La STX, toxina bloqueadora del canal de sodio, contrarresta el efecto tóxico de O/V (a dosis letales de O/V del 80 % de la población) a una concentración efectiva del 50% (EC50) en 8,6 nM (Tabla 1). En células sin tratamiento previo con O/V no dan respuesta a las mismas concentraciones de STX (Figura1).

TOXINA	SIN O/V		CON O/V	
	EC50	Error tipo	EC50	Error tipo
Saxitoxina	No efecto	No efecto	8,6	4,08
Ácido domoico	No efecto	No efecto	No efecto	No efecto
Brevetoxina 2	No efecto	No efecto	36,9	5,34
Brevetoxina 3	No efecto	No efecto	8,2	12,28
Pectenotoxina 2	28,3	3,37	17,4	11,43
Palytoxina	0,1	3,95	0,04	4,32
Ácido okadaico	21,9	2,12	8,8	3,11
Dinophysistoxina 1	20,6	3,49	23,1	9,77

Tabla 1. Resumen de las EC50 calculadas a partir de células N2a expuestas a los seis estándares de toxinas estudiadas con y sin la utilización de ouabaina y veratridina tras 24 horas de exposición.

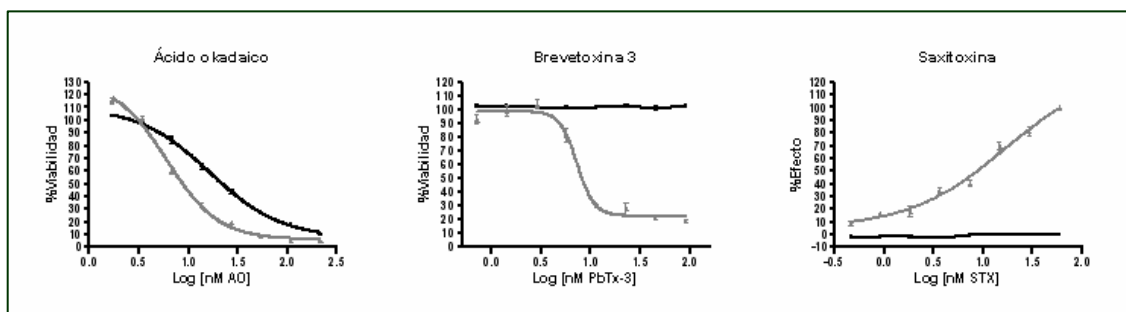


Figura 1. Ejemplo de curvas dosis-respuesta en células N2a expuestas a ácido okadaico, Brevetoxina 3 y saxitoxina con (gris) y sin (negro) la utilización de ouabaina y veratridina tras 24 horas de exposición. Tres réplicas por dosis en placas de 96 pocillos a una densidad celular aproximada a 30.000 células por pocillo.

Las concentraciones de AD utilizadas en el experimento, determinadas en base a estudios sobre cultivos primarios de células procedentes de hipocampo de rata [5], no producen efectos sobre la viabilidad de las células con o sin tratamiento previo con O/V. El ácido domoico es un análogo del neurotransmisor glutamato y compiten por el mismo receptor de membrana [6], por lo que era de esperar que el ensayo que trata de sensibilizar las células frente a toxinas que actúen sobre canales de sodio (ensayo O/V), no tuviera repercusión sobre el efecto del AD en éstas células. De forma a determinar el potencial tóxico del AD a nivel celular, el modelo escogido deberá disponer de canales de membrana específicos [7] y los sistemas de detección deberán adaptarse a los cambios producidos en las células tras la exposición tóxica (detección de la movilidad de calcio intracelular o del cambio de potencial de membrana).

Las toxinas activadoras del canal de sodio PbTx-2 y 3 tienen capacidad de matar células pretratadas con O/V con una respuesta dosis-dependiente (Fig.1). Para este tipo celular la PbTx-3 tiene mayor potencia tóxica (EC50: 8,2 nM) que la PbTx-2 (EC50: 36,9 nM) (Tabla1).

La Palytoxina se sabe que afecta al equilibrio iónico celular, aumentando la permeabilidad de la célula para el Na^+ y el K^+ pero no para el Ca^{2+} , pero en altas concentraciones (100 nM) inhibe la Na^+ , K^+ -ATPasa [9]. Las curvas dosis-respuesta obtenidas en éste experimento determinan que las células son sensibles a bajas concentraciones de esta toxina tanto para células no tratadas con O/V con una EC50 de 0,1 nM que se reduce a 0,04 nM si se tratan previamente las células con O/V (Tabla1). El equilibrio iónico celular se ha desestabilizado con la presencia de la ouabaina y de la veratridina y como consecuencia la respuesta citotóxica de la palytoxina aumenta. En el caso de la PTX2 y del AO la concentración a la que se presenta el 50% del efecto tóxico sin O/V es de aproximadamente 10 nmoles L^{-1} superior que para las células previamente tratadas con O/V. Las EC50's obtenidas para células sin tratamiento con O/V para la PTX2 y el AO son de 28,3 nM y 21,9 nM respectivamente (Tabla 1).

En las curvas dosis-respuesta de la DTX-1 se obtiene una similar EC50 para células con y sin tratamiento previo de O/V con EC50's de 23,1 y 20,6 nM respectivamente (Tabla1).

Con este trabajo quedan definidas las limitaciones del sistema frente a las toxinas estudiadas para su posterior aplicación en muestras procedentes de extractos de bivalvos o de fitoplancton tóxico. La utilización de este método en la detección de toxicidad de muestras problema parece ser una buena alternativa al bioensayo ratón debido a la sencillez, rapidez y sensibilidad del ensayo a excepción de las muestras que presenten AD.

Agradecimientos

Al equipo de R.W. Dickey en el Gulf Coast Seafood Laboratory del FDA (Alabama, U.S.A).

Bibliografía

- [1] Sar, E.A., M.E. Ferrario, B. Reguera. 2002. Ensayos *in vivo* e *in vitro* para la detección de toxinas. En: E.A. Sar, Ferrario M.E. y Reguera B. (Eds.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía. Capítulo 3.
- [2] Jellett J.F., L.J. Marks, J.E. Stewart, M.L. Dorey, W. Watson-Wright, J.F. Lawrence. 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: Automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon*. 30:1143-1156.
- [3] Kogure K., M.L. Tamplin, U. Simidu, R.R. Colwell. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*. 26:191-197.
- [4] Manger R.L., S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M.M. Wekell 1993. Tetrazolium-Based Cell Bioassay for Neurotoxins Active on Voltage-Sensitive Sodium Channels: Semiautomated Assay for Saxitoxins, Brevetoxins, and Ciguatoxins. *Analytical Biochemistry*. 214:190-194.
- [5] Van Dolah F.M., T.A. Leighfield, B.L. Haynes, D.R. Hampson, J.S. Ramsdell. 1997. A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor. *Analytical Biochemistry*. 245:102-105.
- [6] Shenfeng Q., P.C. Wook, M.C. Currás-Collazo. 2005. Sequential involvement of distinct glutamate receptors in domoic acid-induced neurotoxicity in rat mixed cortical cultures: Effect of multiple dose/duration paradigms, chronological age, and repeated exposure. *Toxicological Sciences*. 89:243-256.
- [7] Habermann E. 1989. Palytoxin acts through Na^+ , K^+ -ATPase. *Toxicon*. 27: 1171-1187.

Distribución del ácido okadaico en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*

Araceli Escudeiro^{1*}, Helena Martín², Juan Blanco¹

(1) Centro de Investigacións Mariñas (CIMA). Pedras de Corón, s/n. Apdo.13,

36620 Vilanova de Arousa (Pontevedra) *E-mail: ara@cimacoron.org

(2) Centro Tecnolóxico do Mar (CETMAR). Eduardo Cabello, s/n.

36208 Bouzas Vigo (Pontevedra)

Resumen

La mayor parte de las estrategias para mitigar las consecuencias de los procesos tóxicos pasan, además de por controlar su presencia, por conseguir que los bivalvos acumulen la menor cantidad de toxinas posibles o que las eliminen más rápidamente. Para ello resulta necesario conocer los mecanismos implicados en estos procesos y los factores que las regulan. Aunque se han realizado avances significativos en estos temas aún existe una notable carencia de conocimiento de las bases de la acumulación y depuración. Por este motivo y con el fin de abrir nuevas vías para el desarrollo de estos mecanismos, se realizó el presente estudio en el que se pretende averiguar la distribución, a nivel celular, del ácido okadaico en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. Se realizó un fraccionamiento mediante el cual se disoció la glándula (con solución CMFS) y dos centrifugaciones diferenciales (100 y 180 xg) para separar los tipos celulares grandes o células digestivas, de los pequeños o células proliferativas. A cada uno de estos dos tipos celulares se les extrajo el okadaico con metanol al 80%, y se cuantificó, mediante HPLC-MS con trampa iónica, la cantidad de toxina presente en cada uno de ellos. Los resultados muestran una acumulación preferencial del okadaico por los tipos celulares de mayor tamaño. Esto puede abrir camino para determinar la distribución a nivel subcelular de la toxina y averiguar si presenta o no algún tipo de ligamiento a moléculas que nos permitan conocer más sobre sus mecanismos de actuación.

Introducción

Las toxinas DSP en mejillón son, junto con las ASP en vieira, las que más repercusión económica y social tienen en Galicia.

El poder llegar a establecer las bases de los procesos de acumulación y depuración, permitiría minimizar las consecuencias de los procesos tóxicos. Se han realizado numerosos estudios tratando de determinar los factores que las regulan [1,2,3,4] y muchos menos sobre los mecanismos implicados en estos procesos [5], por lo que la información que se posee actualmente es todavía insuficiente.

La glándula digestiva es el principal órgano en el que el mejillón acumula las toxinas DSP. Dicha glándula está compuesta por diferentes

tipos celulares, con distintas características, funciones y tamaños. En este trabajo se estudia si existe una acumulación preferencial del ácido okadaico (Fig. 1) por un tipo celular concreto de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*.

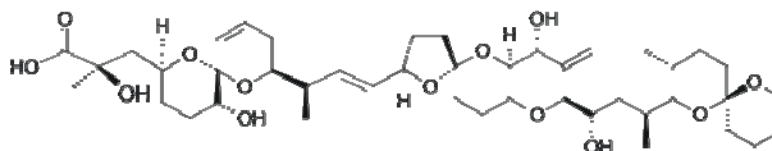


Figura 1. Estructura del Ácido Okadaico

Material y métodos

Los mejillones *Mytilus galloprovincialis* se obtuvieron de bateas situadas en Bueu (Ría de Pontevedra) y en ellos se confirmó la presencia del ácido okadaico.

Se realizó una separación de los tipos celulares de la glándula digestiva de 2 mejillones (aprox. 1,2 g de tejido húmedo) siguiendo el procedimiento de [7] aunque con ligeras variaciones.

Para ello se diseccionó la glándula digestiva de 2 mejillones en pequeñas piezas de aproximadamente 2 mm. Dichas piezas se lavaron con solución salina CMFS [solución salina de calcio/magnesio CMFS; 1.100 mOsm, Ph 7,3 (que contiene 20 mM de tampón HEPES, 500 mM NaCl, 12,5 mM KCL)] (10 mL/glándula digestiva) durante 2 horas y se disociaron para obtener las células individualizadas (recogiendo cada 30 minutos las células en suspensión). A continuación se realizó una centrifugación diferencial de la suspensión celular (a 100 xg) para separar los tipos celulares grandes o células digestivas. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar (a 180 xg) para obtener los tipos celulares pequeños, células proliferativas o basófilas. Cada uno de los pellets resultantes de las centrifugaciones (100 y 180 xg) se resuspendieron en 5 ml de la solución CMFS y sus pesos secos fueron calculados mediante pesadas de filtros precalcificados (9,289 y 6,995 mg para tipos celulares grandes y pequeños respectivamente). Finalmente se volvieron a centrifugar los pellets resuspendidos en CMFS a 8.000 rpm 5 minutos y se les extrajo el ácido okadaico, con metanol al 80%, (proporción 1:5), centrifugando a 15.000 rpm 5 minutos. La concentración de toxina presente en cada tipo celular (grande y pequeño) se cuantificó mediante HPLC-MS con trampa iónica.

Resultados y Discusión

La distribución del ácido okadaico en la glándula digestiva no es homogénea. Su concentración (Fig. 2.A) es notablemente superior en las células digestivas, mostrando un porcentaje del 99,7% con respecto a las

células proliferativas (Fig. 2.B), por lo que existe una acumulación preferencial por los tipos celulares de mayor tamaño.

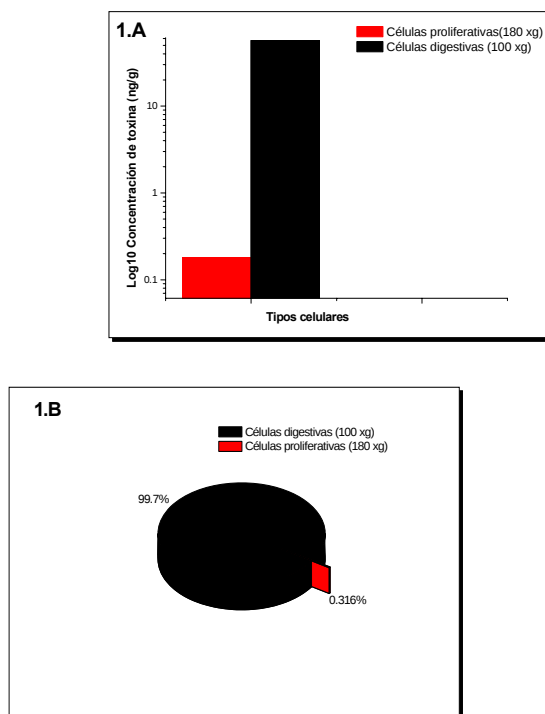


Figura 2. Concentración de toxina (ng/g) (2.A) y Porcentaje de toxina (%) (2.B) obtenidos en cada tipo celular.

Ambos tipos celulares difieren en tamaño (grandes y pequeñas, [6]); función (autofágica [7] y secretora [8]) y composición (alto y bajo contenido lisosomal [9]). Es esta última característica la que, probablemente, provoque que la toxina, desde el momento en que es ingerida se acumule directamente en los tipos celulares de mayor tamaño, atravesando, debido a su naturaleza lipofílica, la membrana de los lisosomas y sin pasar, en ningún momento, por las células basófilas. Esto también es sugerido por [10] para las yesotoxinas. Además el hecho de que el paso a través de las membranas lisosomales sea unidireccional explicaría el escaso o inexistente transporte que pueda existir entre ambos tipos celulares. Otra posibilidad es que la mayor presencia del okadaico en los tipos grandes, se deba a la existencia de una o varias moléculas (dentro de algún orgánulo que pueden ser o no los lisosomas) que, debido seguramente a su naturaleza apolar, provocan que el ácido okadaico se ancle a ellas. Ambas posibilidades están siendo objeto de estudio.

Agradecimientos

Financiado por la Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Consellería de Innovación, Industria e Comercio, a través del proyecto PGIDIT04RMA50107PR.

Referencias

- [1] Sampayo, M.A., P. Alvito, S. Franca, I. Sousa. 1990. *Dinophysis* spp. Toxicity and relation to accompanying species. En: Granéli, E., B. Sundström, L. Edler, D.M. Anderson (Eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier. New York. 215-220.
- [2] Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A. and Morono, A. (1999) Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series*. 176:53-163.
- [3] Blanco, J., A. Morono, M.L. Fernández. 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Revista galega de recursos mariños*. Monografía 1:1-70.
- [4] Duinker, A., M. Bergslien, Ø. Strand, C.D. Olseng, A. Svoldal. 2007. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Harmful Algae* 6:288-300.
- [5] Svensson, S., L. Forlin. 2004. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (Diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology*. 66: 405-418.
- [6] Birmelin, C., R.K. Pipe, P.S. Goldfarb, D.R. Livingstone. 1999. Primary cell-culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: a time-course study of antioxidant- and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Marine Biology*. 135:65-75.
- [7] Moore, M.N. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and the NADPH-ferrihemoprotein in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46:81-89.
- [8] Henry, M., E. Boucaud-Camou, Y. Lefort. 1991. Functional microanatomy of the digestive gland of the scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquatic living Resour.* 4:191-202.
- [9] Owen, G. 1972. Lysosome, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog. Oxf.* 6:299-318.
- [10] Malagoli, D., E. Marchesini, E. Ottaviani. 2006. Lysosomes as the target of yessotoxin in invertebrate and vertebrate cell lines. *Toxicology letters*. 167:75-83.

Distribución intracelular y ligamiento del ácido domoico en la vieira *Pecten maximus*

Aida Mauriz y Juan Blanco

*Centro de Investigacións Mariñas, Procesos oceanográficos costeros,
Pedras de Corón s/n. Apdo. 13. Vilanova de Arousa 36620, España*

Resumen

La búsqueda de una vía de aceleración de la depuración de las toxinas ASP en *Pecten maximus* requiere conocer los mecanismos de retención-eliminación. El objetivo de este estudio es establecer la distribución del ácido domoico a nivel subcelular y comprobar si existe ligamiento en la glándula digestiva de la vieira, órgano que concentra la mayor parte de esta toxina. Se realizaron dos experimentos de fraccionamiento de los componentes celulares de la glándula digestiva, con distintos medios de homogeneización, para asegurar que el potencial ligamiento de toxina a sus receptores no se rompa. En el primero, el buffer de homogeneización contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y en el segundo una mezcla de protectores de grupos tiol. En ambos casos se rompieron las células en Utraturrax y se separaron dos fracciones por centrifugación (45.000 g una hora). La primera previsiblemente contenía las membranas y los orgánulos, y la segunda el citosol (y probablemente algunos microsomas). El sobrenadante se ultrafiltró por un ultrafiltro de masa molecular nominal de 10.000 Da. En ambos experimentos el análisis de las distintas fracciones mostró que la mayor parte del ácido domoico se encuentra en la fracción soluble del citoplasma y no ligado a ninguna sustancia que no pasa por el ultrafiltro empleado. El análisis cromatográfico de esta fracción mediante una columna SEC (*size exclusion chromatography*) realizado para comprobar si existe ligamiento a algún compuesto que pasa por ultrafiltro de masa molecular de 10.000 Da, mostró que el ácido domoico se encuentra, prácticamente en su totalidad, libre en el citosol.

Introducción

La baja tasa de depuración de la toxina ASP en la vieira *Pecten maximus* [1,2] es la causa de prolongados cierres a la explotación de este bivalvo, siendo éste uno de los principales problemas del sector marisquero en Galicia. Además, el riesgo económico que supone provoca que se destinen pocos recursos para el desarrollo de su cultivo. Por todo esto, es importante la búsqueda de vías de reducción de la acumulación o de aceleración de la depuración, para lo cual es necesario conocer los mecanismos de retención y eliminación. Los largos tiempos de retención del ácido domoico hacen suponer la existencia de ligamiento de este tipo de toxina a algún componente de la glándula digestiva de la vieira. Aunque el descubrimiento de la existencia de tal ligamiento abriría las puertas hacia

futuros estudios sobre mecanismos de aceleración de la depuración o dirigidos a evitar la acumulación, no existen estudios a este respecto, a pesar de que existen estudios similares en otros bivalvos [3,4,5]. En este trabajo hemos tratado de comprobar la existencia del citado ligamiento.

Material y métodos

Se realizaron dos experimentos de fraccionamiento de los componentes celulares de la glándula digestiva mediante centrifugación tras la ruptura de las células en presencia de un medio que contenía inhibidores de proteasas en un caso (experimento 1) y protectores de grupos tiol en otro (experimento 2) asegurando de esta forma que el ligamiento de toxinas a sus receptores, en caso de existir, no se rompa.

Las vieiras empleadas eran recogidas en las rías gallegas durante un episodio tóxico y mantenidas en un tanque en agua de mar con aireación hasta la realización del experimento.

Para este estudio se empleó la glándula digestiva de una vieira en cada uno de los experimentos. Una vez pesada se rompieron las células en Utraturrax (3 minutos, 12.000 rpm) en presencia de los inhibidores de proteínas en un caso y de los protectores de grupos tiol en otro, añadiendo el buffer de homogeneización correspondiente (Tris 0,1M, pH7,8; Formiato amónico 0,15M; cóctel inhibidores de proteasas, Sigma-Aldrich (AEBSF 2mM, EDTA 1mM, Bestatin 130µM, E-64 14µM, Leupeptin 1µM, Aprotinin 0,3µM) / Mezcla protectores grupos tiol (Dithiothreitol 1mM + Mercaptoetanol 1mM)) en proporción 1:5 (p/v). Se recogió una alícuota del homogeneizado como la muestra inicial (FracA, Fig. 1). Para su análisis en HPLC se extrajo el ácido domoico, añadiendo MeOH:H₂O 50% en proporción 1:4 (v/v) y centrifugando 5 minutos a 11.135,9 g.

A partir del resto del homogenizado se separaron dos fracciones [6] por centrifugación a 45.000 g durante una hora. La primera de ellas previsiblemente contenía las membranas y los orgánulos (*pellet*), y la segunda el citosol (y probablemente algunos microsomas) (sobrenadante).

El *pellet* obtenido (FracC, Fig. 1) se sometió a extracción metanólica (MeOH:H₂O 50% en proporción 1:4 (p/v)) y se centrifugó cinco minutos a 15.000 rpm.

A partir del sobrenadante (Frac B, Fig. 1) se obtuvieron tres muestras. Una inicial que únicamente es filtrada por filtro de fibra de vidrio GF/C de jeringa (FracB1, Fig. 1). Una segunda extraída con MeOH:H₂O 50% en proporción 1:4 (v/v) y centrifugada a 11.135,9 g durante 5 minutos (FracB2, Fig. 1). Finalmente una muestra ultrafiltrada consistente en una alícuota del sobrenadante (FracB, Fig. 1) pasada por un ultrafiltro de 10.000 NMWL (Ultrafree-MC, Millipore) en el que se retienen todas las partículas y moléculas más voluminosas que proteínas globulares de 10.000 Da (FracB3, Fig. 1). Una alícuota de cada una de las fracciones separadas en el proceso (Fig. 1) es recogida para su análisis en HPLC Beckman Gold con

detector de diodos Beckman 168 por el método desarrollado por Quilliam [7].

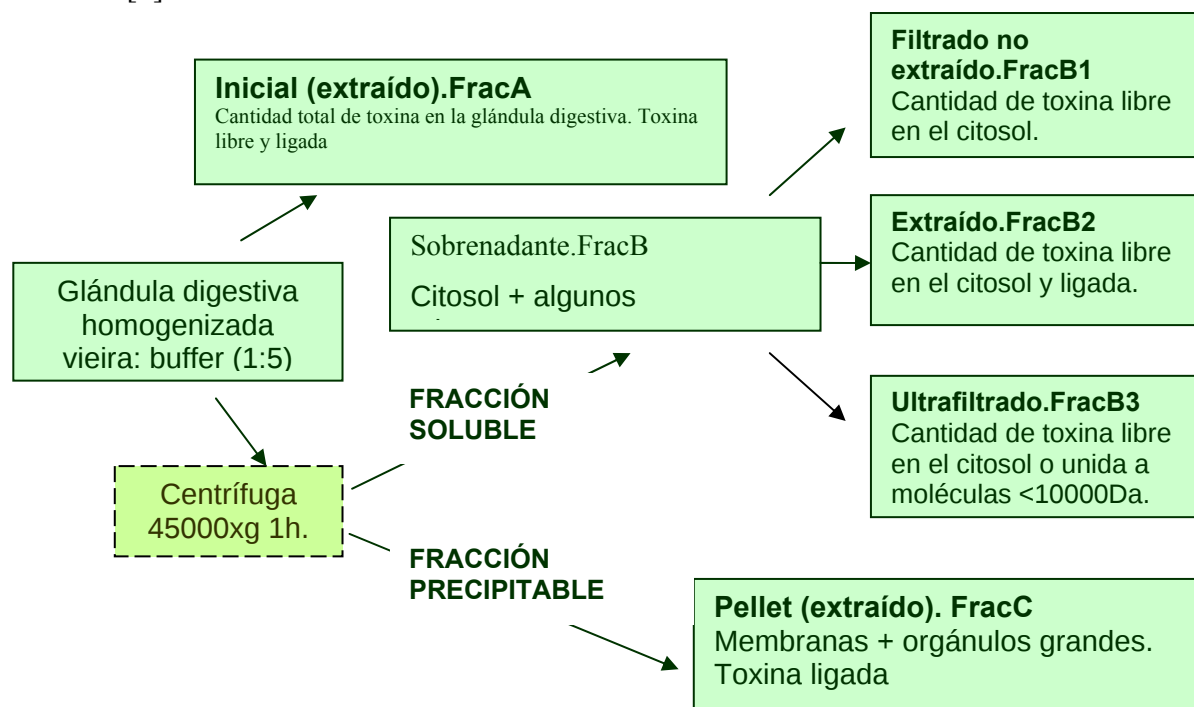


Figura 1. Esquema del fraccionamiento. Correspondencia de las fracciones con los componentes subcelulares y posible estado de la toxina en cada una de ellas.

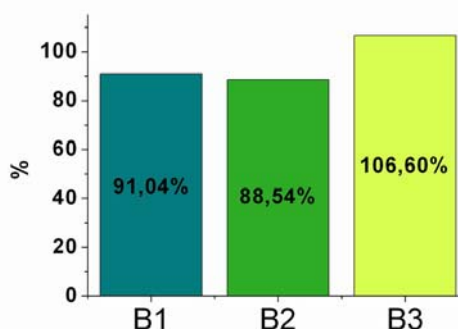
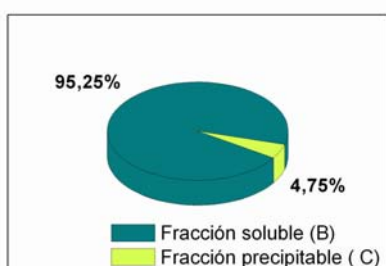
Finalmente para comprobar si dentro de la fracción B3 (Fig. 1), el ácido domoico se encuentra libre o ligado, ésta se analizó utilizando una columna SEC (*size exclusion chromatography*) Ultrahydrogel 250 Å, 7,8 x 300 mm y precolumna Ultrahydrogel 200 Å, 6 x 40 mm (Waters), (fase móvil: tris 0,1M, pH 7,8; flujo 0,8 mL min⁻¹; temperatura ambiente; volumen de muestra inyectada: 20µL) monitorizando la absorbancia correspondiente a los dobles enlaces conjugados del ácido domoico (242nm).

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en ambos experimentos fueron similares (Fig. 2), la práctica totalidad del ácido domoico se encuentra en la fracción soluble constituyendo un 95.25% de la cantidad de toxina total de la glándula digestiva en el experimento 1 y un 96.6% en el experimento 2. Dentro de la fracción soluble la mayor parte del ácido domoico se encuentra en la fracción del citosol que atraviesa el ultrafiltro (FracB3), que representa un 106% de la cantidad de toxina total en el experimento 1 y un 88% en el experimento 2. En esta fracción el ácido domoico puede estar libre o ligado a

moléculas de masa molecular nominal menor de 10.000 Da. Para comprobar la existencia de este ligamiento se analizó esta fracción por SEC. En este tipo de columnas el tiempo de elución depende del tamaño de las moléculas, siendo mayor cuanto menor es la molécula. Así, el complejo molécula-ácido domoico tendría un tiempo de elución menor.

Experimento 1



Experimento 2

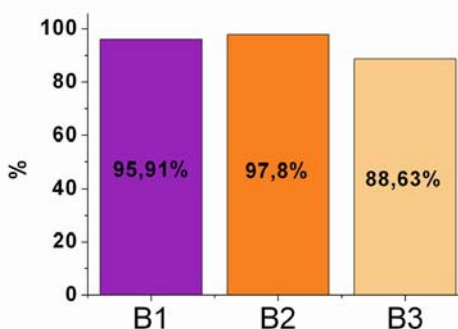
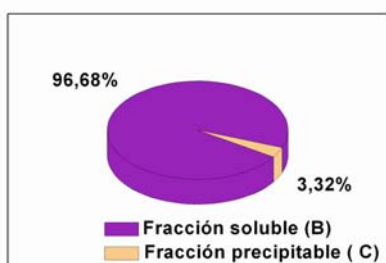


Figura 2. Distribución intracelular del ácido domoico. Porcentaje de ácido domoico en cada fracción con respecto a la toxina contenida en la fracción inicial (A) correspondiente a la cantidad de toxina total en la glándula digestiva. Distribución en la fracción soluble e insoluble, así como en las distintas fracciones del sobrenadante (B1,B2,B3, Figura 1).

En ninguna de las dos experiencias hubo variaciones en el tiempo de retención del pico de absorbancia de 242nm (Tabla 1), correspondiente al ácido domoico libre o ligado con respecto al del patrón de esta sustancia, por lo cual se concluye que la toxina se encuentra libre en el citosol de las células de la glándula digestiva.

	Inhibidores de Proteasas	Protectores Grupos Tiol
	Tiempo de retención (min)	
Patrón	11,479	11,538
Muestra (Frac.B3)	11,452	11,508

Tabla 1 Tiempos de absorción del pico de absorbancia 242 nm en patrón (ácido domoico libre) y en la fracción ultrafiltrada (B3) al ser analizados por SEC.

No tenemos explicación de porqué una sustancia hidrosoluble y libre en el citosol, no ligada ni compartimentalizada en orgánulos puede retenerse tanto tiempo en la glándula digestiva de la vieira. Nuestros resultados apuntan a la inexistencia de algún mecanismo de transporte/excreción más que a un secuestro activo de la sustancia.

Agradecimientos

Financiado por la Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Consellería de Innovación, Industria e Comercio.

Bibliografía

- [1] Blanco, J., C.P. Acosta, M.B. de la Puente, C. Salgado. 2002. Depuration and Anatomical Distribution of the Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) Toxin Domoic Acid in the King Scallop *Pecten Maximus*. *Aquatic Toxicology*. 60:111-121.
- [2] Douglas, D.J., E.R. Kenchington, C.J. Bird, R. Pocklington, B. Bradford, W. Silvert. 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop *Placopecten magellanicus* fed cultured cells of toxic pseudo-nitzschia multiseria. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*. 54:907-913.
- [3] Madhyastha, M.S., I. Novaczek, R.F. Ablett, G. Johnson, M.S. Nijjar, D.E. Sims. 1991. In vitro study of domoic acid uptake by digestive gland tissue of blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquatic Toxicology*. 20:73-82.
- [4] Madhyastha, M.S., I. Novaczek, R.F. Ablett, G. Johnson, M.S. Nijjar, D.E. Sims. 1991. A comparative study of uptake and release of glutamic acid kainic acid by blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Aquatic Toxicology*. 21:15-28.
- [5] Wohlgeschaffen, G.D., K.H. Mann, D.V. Subba Rao, R. Pocklington. 1992. Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. *Journal of Applied Phycology*. 4:297-310.
- [6] Huber, L. A., K. Pfaller, I. Vietor. 2003. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circulation Research*. 92:962-968.
- [7] Quilliam M.A. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. En: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D Cembella (Eds.). *Manual of Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology. Vol. 11. Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO). Paris. 247-266.

Ingeniería de Bioprocesos con dinoflagelados. Experiencias preliminares

Francisco García*, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, M^a Carmen Cerón,
El Hassan Belarbi y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

*fgarcia@ual.es; Tel. 950015303

Resumen

Los dinoflagelados marinos tóxicos son una fuente extraordinaria de toxinas de gran valor, no solo para programas de investigación toxicológica, medioambiental, química y biomédica, sino también para la producción de fármacos de diferente aplicación. Dada la fragilidad celular de estos microorganismos su cultivo masivo necesita la utilización de biorreactores con configuraciones y modos de operación específicos que eliminen o mitiguen el daño celular por exceso de turbulencia.

En este trabajo se presenta una estrategia de cultivo basada en la Ingeniería de Bioprocesos para abordar el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos. El dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* fue cultivado en biorreactores tipo tanque agitado con varios modos de operación: discontinuo, fed-batch, semicontinuo y continuo. Fueron analizadas la producción celular y de biotoxinas.

Introducción

La Ingeniería de Bioprocesos Marinos juega un papel esencial en el desarrollo y mejora de medios y condiciones de cultivo, y en el diseño y optimización de fotobiorreactores “a medida” para la producción de metabolitos de interés comercial a partir del cultivo de microalgas. La aplicación de la experiencia acumulada en este campo podría ayudar a paliar el escollo que supone el cultivo masivo de microalgas frágiles de la clase dinoflagelata productoras de biotoxinas de interés alimentario y farmacológico [1].

La *aireación y mezcla* son dos factores imprescindibles en la mayoría de fotobiorreactores destinados al cultivo de microalgas en suspensión. La aireación, porque proporciona CO₂ al medio de cultivo y la mezcla, bien sea mecánica y/o neumática, porque aumenta la disponibilidad que tienen las células de los nutrientes aportados al medio, tanto en forma gaseosa como disueltos, previniendo la limitación del crecimiento celular. A través de la mezcla se disminuyen las diferentes resistencias al transporte de materia.

El aumento de la intensidad de mezcla se consigue con una gran variedad de estrategias dependiendo del tipo de biorreactor utilizado; por ejemplo, aumentando la velocidad de agitación, modificando el tipo de

agitador, aumentando la velocidad de circulación del cultivo, utilizando tabiques deflectores y mezcladores estáticos, actuando sobre la forma de distribuir la aireación, etc. Todas estas estrategias generan una gran diversidad de campos de fuerzas de corte y fenómenos asociados a la interacción célula-burbuja en cualquier tipo de biorreactor agitado y/o aireado. El umbral de sensibilidad de los microorganismos cultivados a estos fenómenos es muy variado, es decir, interespecífico e incluso intraespecífico (dependiente de la cepa).

El problema de la agitación y mezcla toma gran relevancia cuando se trata de células frágiles porque se tiene que llegar a soluciones de compromiso entre la disminución de la velocidad de crecimiento por inhibición debida a fuerzas de corte y aumento de la velocidad de crecimiento por la mejora de las propiedades de transporte en el fotobiorreactor. La situación es más compleja cuando las células frágiles a cultivar son fotoautotróficas y requieren iluminación para su crecimiento. En este escenario, la mezcla y, por ende, la fluidodinámica adquieren una extraordinaria relevancia porque son las responsables de transportar células desde zonas menos iluminadas en el centro del fotobiorreactor hasta zonas próximas a la superficie sobradamente iluminadas.

En consecuencia, el cultivo masivo de células frágiles fotoautotróficas puede presentar una triple restricción asociada a la agitación: daño celular por fuerzas de corte, restricción de nutrientes por escasa mezcla e iluminación interna deficiente, también por insuficiencias en la mezcla. Pensamos que el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos fotoautotróficos se encuentra en esta última y compleja situación (la Fig. 1 resume este escenario). De hecho, trabajos previos demostraron que muchas especies productoras de biotoxinas son extraordinariamente sensibles a fuerzas de corte mecánicas e hidrodinámicas y a los fenómenos de turbulencia [2-5].

Sin embargo, a diferencia de otras microalgas, los dinoflagelados no han sido estudiados en profundidad desde el punto de vista de microorganismos de interés comercial, sino como microorganismos de interés ecológico y medioambiental. Por tanto, la carencia de información sobre el cultivo masivo de dinoflagelados con cierto éxito es evidente. En el trabajo que presentamos demostramos como con estrategias propias de la Ingeniería de Bioprocesos se puedan dar saltos cualitativos importantes en el área relacionada con la producción sostenible de biotoxinas.

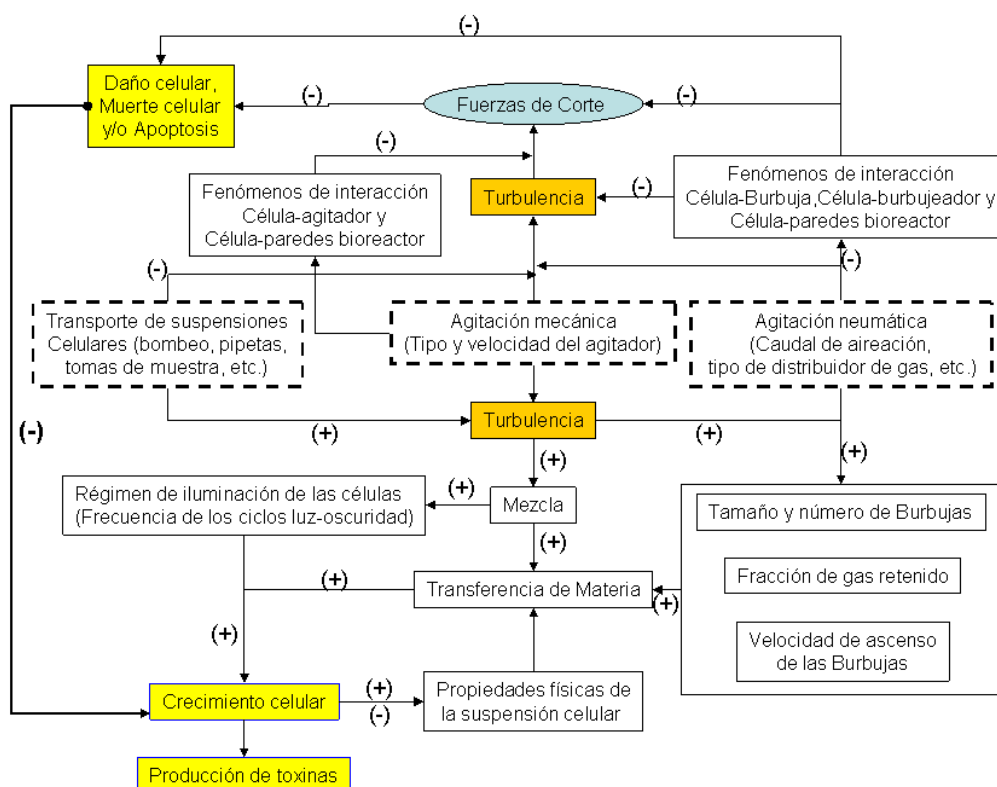


Figura 1. La turbulencia generada en los sistemas de cultivo aireados y/o agitados promueve el crecimiento celular de células robustas a través de mecanismos fácilmente identificables desde el punto de vista de la Ingeniería de Bioprocesos (efectos positivos marcados con el signo +). En el caso de células frágiles, tanto las fuerzas de corte generadas como los fenómenos de interacción célula-biorreactor debidos a la agitación y/o la aireación desencadenan complejas repuestas celulares que pueden dar lugar a daños reversibles o irreversibles en las células, lisis instantánea de células, fenómenos de adaptación y apoptosis que originan en el mejor de los casos inhibición del crecimiento y en el peor muerte celular (efectos negativos marcados con el signo -).

Materiales y métodos

El dinoflagelado modelo utilizado ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), especie productora de yessotoxinas [6-8]. La cepa fue cedida por el Dr. Franco del Centro Oceanográfico de Vigo. El cultivo se llevó a cabo en biorreactores convencionales tipo tanque agitado de 2 L de capacidad provistos de medida y control de pH, O₂, T^a, etc. Éstos fueron iluminados mediante tubos fluorescentes de luz fría (30 W), dispuestos alrededor de los vasos. La temperatura de trabajo fue 18 °C y el medio de cultivo L1. Los cultivos se desarrollaron en modo discontinuo, fed-batch, semicontinuo y continuo. Todos ellos se combinaron con la utilización de un spin-filter interno con y sin perfusión. La agitación y la aireación se acomodaron para

evitar fuerzas de corte letales. Mediante citometría de flujo (citómetro Coulter Epics XL-MCL) se determinaron en el tiempo valores de autofluorescencia de la clorofila y carotenoides y diámetro celular promedio. Se analizaron los macronutrientes principales: nitratos mediante HPLC y fosfatos espectrofotométricamente. El contenido en YTXs se determinó por HPLC de fluorescencia [6].

Resultados y discusión

El modo fed-batch y el modo continuo con spin-filter proporcionaron los mejores rendimientos (ver Figs. 2 y 3). Los valores máximos de la concentración de células y de yessotoxinas en la suspensión fueron obtenidos en modo fed-batch. Éstos fueron casi un orden de magnitud mas elevados que los publicados hasta ahora con esta especie (ver Fig. 2). Una de las conclusiones de este trabajo fue que el medio L1 era claramente deficiente en nitratos y fosfatos. Por lo que se justificaba una estrategia de adición de alícuotas de elevada concentración de estos nutrientes (flechas en la Fig. 2). Esto resulta más evidente a través de las velocidades de consumo celular de nitrato y fosfato calculadas, $2,1 \cdot 10^{-3}$ y $2,3 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol h}^{-1} \text{cél}^{-1}$, respectivamente, que fueron muy elevadas. Sin embargo, estos consumos produjeron un número muy bajo de células comparados con otras clases de microalgas, indicando que esta especie es un mal competidor en términos de utilización de nutrientes inorgánicos. La mayor producción de toxinas tuvo lugar cuando el número de células era más alto en el cultivo, manteniéndose una producción de yessotoxina por célula de alrededor de 1 pg cél^{-1} en el caso del reactor continuo, y de entre 2 y 4 pg cel^{-1} en modo fed-batch. La operación en modo continuo proporcionó concentraciones de células y de toxinas de estado estacionario más bajas que en modo fed-batch (ver Fig. 3) aunque la productividad fue mayor. La Tabla 1 muestra, a modo de resumen, los resultados obtenidos.

Los resultados preliminares en modo continuo nos permitieron demostrar que es posible cultivar dinoflagelados de forma estable en el tiempo, aunque no exenta de problemas. Se alcanzaron varios estados *quasi*-estacionarios a diferentes velocidades de dilución, aunque presentaron problemas algunos de estabilidad.

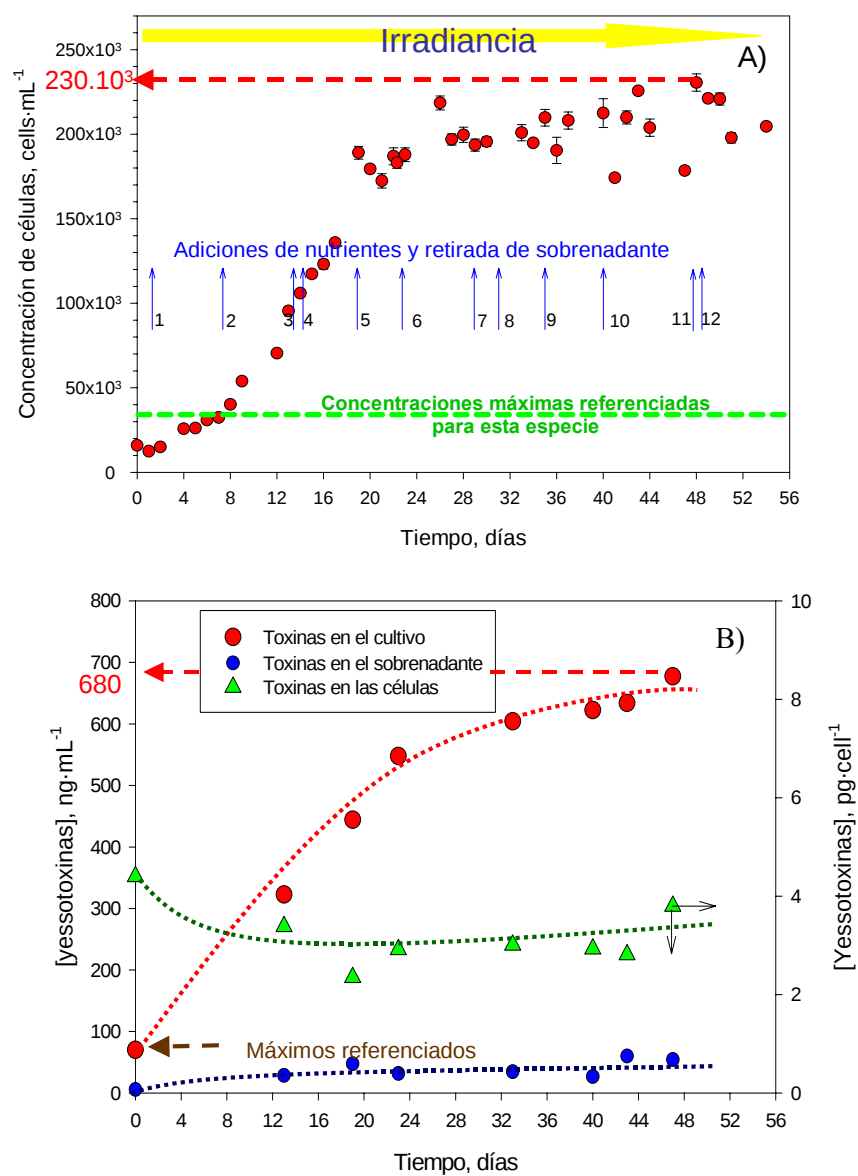


Figura 2. Cultivo Fed-Batch de perfusión con spin-filter interno. Evolución de la concentración de células A) y de toxinas B) con el tiempo de cultivo. Las flechas de Figura 2A indican adición de nutrientes.

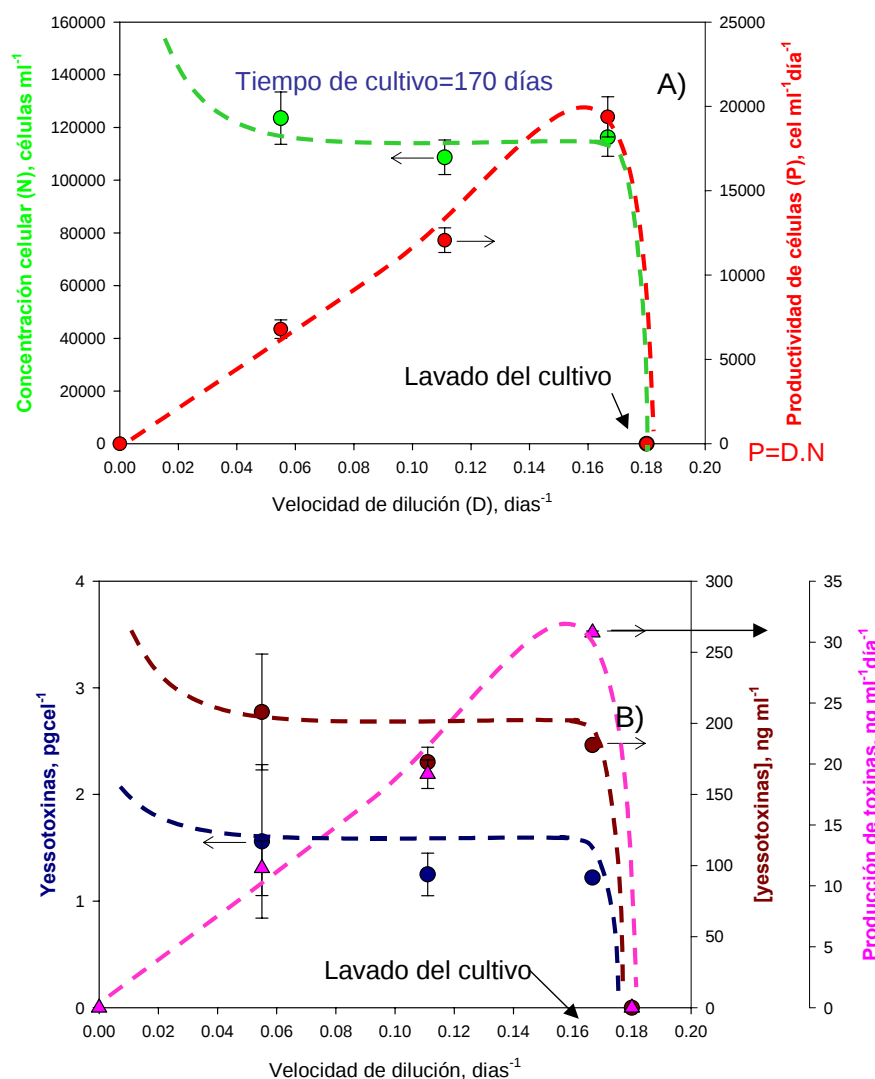


Figura 3. Cultivo continuo con spin-filter interno. A) Efecto de la velocidad de Dilución en la concentración y productividad de células en estado estacionario. B) Influencia en la concentración y producción de toxinas

	SM	PSF	CSF
Célula (pg cel ⁻¹)	4	3.57	1.5
Total cultivo (ng ml ⁻¹)	316	677	270
Productividad (µg L ⁻¹ día ⁻¹)		25	31

SM=semicontinuo sin spinfilter; PSF=Perfusión con spinfilter;
CSF=continuo con spinfilter

Tabla 1.-Valores máximos de rendimiento en yessotoxinas de los mejores modos de cultivo ensayados.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. José M. Franco y Dra. Beatriz Paz, del Centro Oceanográfico de Vigo, y a los Profesores Manuel Norte y J. Javier Fernández, del Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, por su inestimable ayuda en esta tarea del desarrollo de Bioprocesos relacionados con el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos para la producción de toxinas. Esta investigación está siendo financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-07924-C04-04), España.

Referencias

- [1] Camacho, F.G., J.J.G. Rodríguez, A.S. Mirón, M.C. García, E.H. Belarbi, Y. Chisti, E.M. Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol. Adv.* 25:176-94.
- [2] Juhl, A.R., M.I. Latz. 2002. Mechanisms of fluid shear-induced inhibition of population growth in a red-tide dinoflagellate. *Journal of Phycology*. 38:683-694.
- [3] Sullivan, J.M., E. Swift, P.L. Donag, J.E. Rines. 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two red-tide dinoflagellates. *Harmful Algae*. 2:183-199.
- [4] Sullivan, J.M., E. Swift. 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*. 39:83-94.
- [5] Berdalet, E., M. Estrada. 1993. Effects of turbulencia on several dinoflagellate species. En: Smayda, T.J., Y. Shimizu (Eds). *Effects phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Science Publishers. 737-740.
- [6] Paz, B., J.A. Vázquez, P. Riobó, J.M. Franco. 2006. Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Mar. Environ. Res.* 62:286-300.
- [7] Rodriguez, J.J.G., M.C.C. Garcia, F.G. Camacho, A.S. Miron, E.H. Belarbi, E.M. Grima. 2007. New culture approaches for Yessotoxin production from the Dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Biotechnol. Prog.* 23:339-350.
- [8] Souto, M.L., J.J. Fernández, J.M. Franco, B. Paz, L.V. Gil, M. Norte. 2005. Glycoyessotoxin A, a new yessotoxin derivative from cultures of *Protoceratium reticulatum*. *J. Nat. Prod.* 68:420-422.

Pre-validación de un método de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas.

Adriano Villar-González, María L. Rodríguez-Velasco, Luis M. Botana.

Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM),

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN),

Estación Marítima s/n, 36200 Vigo.

Resumen

Las biotoxinas marinas de origen fitoplanctónico y de carácter lipofílico pueden acumularse en diferentes tipos de moluscos bivalvos, presentando un importante riesgo para la salud pública. La legislación de la UE, a través del Reglamento (CE) nº 2074/2005, establece los métodos de ensayos reconocidos para la detección de toxinas lipofílicas, señalando como método de referencia los ensayos biológicos e indicando posibles métodos alternativos al método de referencia, entre los que se encuentra la Cromatografía de líquidos acoplada a la Espectrometría de masas (LC-MS). Este Reglamento también indica la necesidad de sustituir lo antes posible los métodos biológicos por métodos de detección alternativos que hayan sido validados conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. De acuerdo con esto, el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM) está actualmente coordinando, a nivel europeo, diversos estudios enfocados a la validación de un método de LC-MS para la determinación de toxinas lipofílicas. En el presente trabajo se describen los diferentes estudios realizados en la etapa de pre-validación del método, cuyo objetivo se centra en la optimización y estandarización de un protocolo para el análisis simultáneo de ácido ocadaico (AO) y dinofysistoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), azaspirácidos (AZAs), yesotoxinas (YTXs) y espirólidos. A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se elaboró un “Procedimiento Normalizado de Trabajo”, candidato a ser validado a través de un estudio colaborativo. Actualmente dicho procedimiento está en fase de evaluación y perfeccionamiento.

Introducción

De acuerdo con el Reglamento (CE) nº 2074/2005 [1], uno de los requisitos para que un método de LC-MS pueda llegar a sustituir al método de referencia actual para la detección de toxinas lipofílicas es que sea validado conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. Por este motivo y con el objetivo de validar un método de LC-MS para el análisis de las citadas toxinas, el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM) en colaboración con distintos Laboratorios Nacionales de Referencia diseñó un plan de trabajo a partir de las recomendaciones indicadas por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM). De acuerdo con estas indicaciones y en base a la experiencia

aportada por los distintos laboratorios en el análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS, se diseñó un protocolo preliminar para su posterior evaluación y perfeccionamiento. Como etapa previa a la validación, se realizó un estudio de prevalidación del método, el cual se estructuró en tres fases: optimización del protocolo (fase I), evaluación de la transferencia del protocolo (fase II) y estudio de precisión (fase III). El objetivo de la fase I se centró en la optimización y estandarización del protocolo. En esta fase participaron cuatro laboratorios, LCRBM y los laboratorios nacionales de referencia (LNR) de Alemania, Irlanda y Noruega, y se estructuró en los siguientes estudios: 1) estudios preliminares (evaluación parámetros cromatográficos y detección mediante MS); 2) purificación mediante extracción líquido-líquido; 3) efectos de la matriz; 4) hidrólisis; 5) necesidad de la etapa de purificación; 6) estudios sobre la etapa de evaporación; 7) efectos de la supresión/aumento de la señal y 8) precisión inicial.

Cada participante llevó a cabo los estudios propuestos para las toxinas del grupo del AO y de otro grupo de toxinas lipofílicas: LCRBM (espirólidos), Alemania (YTXs), Noruega (PTXs, AZAs y YTXs) e Irlanda (AZAs).

A partir de los resultados obtenidos en la fase I se diseñó un “Procedimiento Normalizado de Trabajo” preliminar, que fue evaluado en la fase II por el Laboratorio Nacional de Referencia de Francia, como laboratorio externo e independiente al estudio. El presente trabajo muestra las conclusiones obtenidas en las fases I y II de la prevalidación. El método se evaluó para la determinación de AO, DTX-2, PTX-2, YTX, AZA-1 y 13-desmetil-espirólido C (SPX-1) en diferentes matrices como mejillones, vieiras, almejas y ostras.

Materiales y métodos

Reactivos y materiales de referencia. Todos los disolventes y reactivos utilizados en este estudio fueron de grado HPLC o analítico. Los patrones utilizados fueron soluciones de referencia certificadas para AO, PTX-2, YTX y SPX-1 de Canadá (National Research Council) y material de referencia de AZA-1 facilitado amablemente por el Pr. Yasumoto.

Protocolo inicial. Como se comentó anteriormente, el protocolo inicial se diseñó en base a la experiencia en el análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS aportada por los distintos participantes. Este protocolo consistía en la extracción por duplicado de 2 g de cuerpo entero de molusco con metanol 100%. En la primera extracción se añade 9 mL del disolvente y se agita en vortex durante 3 minutos a la máxima velocidad. A continuación, se centrifuga a 4.500 rpm a 20°C durante 8 minutos y el sobrenadante se transfiere a un matraz aforado de 20 mL. En la segunda extracción se vuelve a añadir 9 mL de MeOH 100% y se homogeniza en ultraturrax durante 1

minuto (≥ 9.500 rpm). Tras centrifugar, se combinan los dos extractos en el matraz aforado y se enrasa a 20 mL con metanol.

En la etapa de purificación de la muestra se toman 2,5 mL del extracto y se realiza una primera extracción líquido-líquido con 2,5 mL n-hexano, agitando en vortex durante 1 min. Una vez descartada la fase de hexano, se repite el proceso con otros 2,5 mL de n-hexano. A continuación, se añade 1 mL de agua y se realiza la extracción de las toxinas lipofílicas utilizando 2,5 mL del disolvente orgánico óptimo seleccionado entre acetato de etilo, acetato de isopropilo y diclorometano. Nuevamente, la extracción se realiza por duplicado agitando en vortex a la máxima velocidad durante 1 minuto.

Determinación de AO, DTXs, AZAs, PTXs, YTXs y espirólidos. Después de combinar las fases orgánicas, el extracto resultante se evapora a sequedad (vacío o N_2) y el residuo se re-disuelve en 1 mL de metanol. Este extracto se filtra a través de $0,45\ \mu m$ y se procede al análisis mediante LC-MS mediante la inyección de 5-20 μL , en función de la sensibilidad de que se disponga.

Determinación de ésteres del grupo del AO. Para el análisis de los ésteres del grupo de AO, es necesario una etapa previa de hidrólisis alcalina para transformar este tipo de compuestos en las toxinas de las que derivan (AO, DTX-2 o DTX-1). Para ello, a partir de los 20 mL del extracto crudo se toman 2,5 mL y se añaden 313 μL de NaOH 2,5 N (100% acuoso). La mezcla se mantiene a $76^\circ C$ durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra se enfría hasta temperatura ambiente y se neutraliza con 313 μL de HCl 2,5 N. Finalmente, se realizan las etapas de purificación mediante extracción líquido-líquido y evaporación descritas anteriormente.

Condiciones cromatográficas. Para la separación de las toxinas se utiliza una columna C8 (50 mm x 2 mm, $3\ \mu m$) con una precolumna (10 mm x 2 mm, $3\ \mu m$). Las fases móviles consistían en 100% de agua con 2 mM de formiato de amonio y 50 mM de ácido fórmico en el canal A y acetonitrilo:agua (95:5) con 2 mM de formiato de amonio y 50 mM de ácido fórmico en el canal B. Los análisis se realizaron mediante elución en gradiente, comenzando con 30% a 90% de B durante 8 minutos. A continuación, se mantiene durante 3 minutos con 90% de B y finalmente se disminuye el porcentaje de B hasta el 30% en 0.5 minutos. El 30% de B se mantiene durante 2.5 minutos hasta la siguiente inyección.

Detección. Los parámetros de MS fueron optimizados individualmente por cada participante, con el objetivo de alcanzar el máximo nivel de sensibilidad. Estos parámetros dependen del tipo de instrumento utilizado.

Resultados y discusión

Fase I: Optimización del protocolo

Estudios preliminares. El objetivo de este estudio se centró en la evaluación y caracterización de los parámetros cromatográficos descritos anteriormente. Las condiciones recomendadas proporcionaron una buena separación para toda la toxinas lipofílicas excepto para la YTX. Para esta toxina, algunos participantes indicaron que los picos eran demasiado anchos y obtuvieron una pobre reproducibilidad en los tiempos de retención.

Respecto a la detección mediante MS, inicialmente no se fijaron las transiciones para llevar a cabo la detección, sino que cada participante utilizó aquellas que le proporcionaban mayor sensibilidad.

Purificación mediante extracción líquido-líquido. En este estudio se evaluó la eficacia de tres disolventes para la extracción de las toxinas lipofílicas, que fueron el acetato de etilo, el diclorometano (DCM) y el acetato de isopropilo. El DCM fue el disolvente más adecuado para la extracción de las toxinas lipofílicas, obteniéndose unos valores de recuperación entre 75% y 120% para todas las toxinas evaluadas, excepto para la YTX con la que se obtuvo una pobre recuperación.

De acuerdo con estos resultados se decidió utilizar el DCM para los siguientes estudios.

Efectos de la matriz. Para evaluar los efectos producidos por los componentes presentes en la matriz se utilizaron muestras no contaminadas de mejillón, viera y almeja a las que se le adicionaron estándar de las toxinas de interés (a niveles del límite legal), determinándose los porcentajes de recuperación en los extractos tras la purificación con hexano y tras la purificación de hexano+DCM.

En este estudio no se encontraron diferencias entre las matrices estudiadas, obteniéndose recuperaciones superiores al 70%. También se observó que la etapa de purificación hexano+DCM no mejoraba los resultados obtenidos.

Hidrólisis. En este estudio se evaluó la influencia del pH después del proceso de hidrólisis. Para ello, se utilizaron diferentes volúmenes de HCl 2,5 N para realizar la neutralización del extracto una vez hidrolizado. De los resultados obtenidos en este estudio, se concluyó que si el valor del pH del extracto después de la hidrólisis es inferior a 7, éste no va a influir en la determinación de los ésteres del grupo de las toxinas del AO.

Necesidad de la etapa de purificación. En este estudio se realizó el análisis de diferentes muestras contaminadas natural o artificialmente con toxinas lipofílicas. Los análisis se llevaron a cabo directamente después de la extracción con 100% de MeOH y después de realizar la extracción y purificación con hexano y DCM. A la vista de los resultados obtenidos en este estudio se decidió eliminar la etapa de purificación del protocolo

propuesto inicialmente. Gracias a la eliminación de esta etapa, el método propuesto es aplicable también para el análisis de YTXs.

Estudios sobre la etapa de evaporación. Este estudio se centró en la evaluación de la existencia de posibles pérdidas de toxinas durante el proceso de evaporación. Se observó que la utilización de rotavapor a 40°C no provocaba pérdidas de toxinas debido a la evaporación a sequedad del extracto.

Efectos en la supresión/aumento de la señal. Debido a la posible existencia de supresión o aumento de la señal de MS provocada por los componentes de la matriz que pueden afectar al proceso de ionización de las toxinas en la fuente de ESI, se evaluaron los factores respuesta de cada toxina ($\text{Area}_{\text{toxina}}/\text{Concentración}_{\text{toxina}}$) en MeOH 100% y en diferentes extractos de muestra blanco (mejillón y almeja) preparados según el protocolo acordado.

A pesar de observarse supresión o aumento de la señal, la exactitud de los análisis al comparar la concentración calculada de cada toxina con la concentración real siempre estuvo entre 80% y 120%.

Estudios de precisión. Finalmente, se estudió la precisión intermedia del método en dos laboratorios (LCRBM y el LNR alemán). La repetibilidad se estudio a través del análisis repetido (seis veces) de la misma muestra por el mismo operador durante tres días diferentes. Los valores de desviación estándar relativa (DER_r %) para todas las toxinas evaluadas por los dos laboratorios variaron entre 3% y 12%. Para estudiar la reproducibilidad, dos operadores distintos de cada laboratorio realizaron los análisis seis veces por día en días diferentes. En este caso los valores de DER_R (%) variaron entre el 5% y 11%. Estos resultados muestran una aceptable precisión intermedia del método para el análisis de todas las toxinas estudiadas.

Procedimiento Normalizado de Trabajo. La Tabla 1 muestra el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) preliminar elaborado a partir de los resultados obtenidos en todos los estudios descritos anteriormente (fase I).

Fase II: Evaluación de la transferencia del protocolo a un tercer laboratorio

La transferencia del PNT preliminar a un tercer laboratorio fue evaluada en la fase II del estudio por el LNR de Francia, como laboratorio externo e independiente al estudio. Para ello, el LCRBM envió a dicho laboratorio el PNT y nueve muestras de homogeneizado de cuerpo entero de distintas especies de moluscos naturalmente contaminadas con toxinas lipofílicas.

Al comparar los resultados obtenidos por el LNR-Francia y el LCRBM se observó la misma identificación de las toxinas presentes en

todas las muestras analizadas. En la determinación de los equivalentes totales de AO se obtuvo una DER (%) entre el 12% y 30%. En el caso de la cuantificación de espirólidos, ambos laboratorios coincidieron en sus resultados detectando SPX-1 a niveles inferiores a 31 µg/kg. Sin embargo se obtuvieron valores muy distintos en la cuantificación de los AZAs, mostrando una DER del 80%. La DER para la cuantificación de PTXs varió entre el 40% y 60%.

Muestra (cuerpo entero)	2 g		
Extracción	9 mL MeOH 100%, Vortex 3 min (máxima velocidad) 9 mL 100% MeOH, Ultraturrax 1 min (≥ 9500 rpm) Llevar a 20 mL		
Análisis de AO, DTXs, AZAs, PTXs, YTXs y espirólidos	Evaporar a sequedad 2,5 mL del extracto metanólico Re-disolver el residuo seco en 1 mL de MeOH 100% Filtrar 0,45µm y LC-MS análisis		
Análisis de ésteres de las toxinas DSP	<u>Hidrólisis</u> : 2,5 mL extracto metanólico + 313µL NaOH 2,5N Calentar a 76°C durante 40 min y enfriar hasta tª ambiente Neutralizar con 313µL HCl 2,5N Evaporar a sequedad el extracto hidrolizado Re-disolver el residuo seco en 1 mL de MeOH 100% Filtrar 0,45µm y LC-MS análisis		
Condiciones cromatográficas			
Flujo	0.2 mL/min		
Pre-columna	10 mm x 2 mm, 3 µm		
Columna	BDS-Hypersil C8, 50 mm x 2 mm, 3 µm		
Fase móvil	A: 100% H2O with 2 mM ammonium formate + 50 mM formic acid B: 95% ACN: 5% H2O with 2 mM ammonium formate + 50 mM formic acid		
Gradiente	Time (min)	% A	% B
	0	70	30
	8	10	90
	11	10	90
	11.5	70	30
	14	70	30

Tabla 1. Procedimiento Normalizado de Trabajo preliminar para el análisis simultáneo de AO, DTXs, AZAs, YTXs, PTXs y espirólidos mediante LC-MS.

Conclusiones

El presente estudio permitió diseñar un método para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas mediante LC-MS. La evaluación de este método por un laboratorio externo e independiente al estudio puso de manifiesto la necesidad de realizar nuevas investigaciones con el objetivo de minimizar aquellos aspectos que puedan provocar variaciones entre los

resultados de los laboratorios. Por este motivo, y en base a los resultados descritos en este trabajo, actualmente se están realizando una serie de experimentos para determinar el grado de influencia de la matriz en el análisis de estas toxinas cuando se utilizan diferentes tipos de espectrómetros de masas. Debido a que algunos expertos consideran importante fijar tanto el modo de ionización como las transiciones utilizadas para la cuantificación, también se están realizando una serie de investigaciones en este tema, con el objetivo de determinar si los cambios en el modo de ionización y las transiciones utilizadas afectan a los resultados de los análisis.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por DG SANCO (Comisión Europea, Bruselas), la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y por el proyecto STREP FOOD-CT-2004-514055 (DETECTOX).

Agradecer a INTECMAR (Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia) por facilitarnos muestras de moluscos naturalmente contaminados con toxinas lipofílicas.

Referencias

- [1] Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la comisión, de 5 de Diciembre de 2005. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 27–59.

Toxicidad de la dinoflagelada *Gambierdiscus* sp. aislada de las Islas Canarias

Amandine Caillaud^{1,2}, Elisabeth Cañete^{1,2}, Santiago Fraga³,
Elena Mallat^{1,2} y Jorge Diogène^{1,2}.

(1) IRTA Sant Carles de la Rapita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5,
43540 Sant Carles de la Ràpita.

(2) XRAq, Xarxa de Referencia en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya.

(3) Instituto Español de Oceanografía, Apdo. 1552, E-36200 Vigo.

Resumen

En este trabajo presentamos la caracterización de la toxicidad de una cepa de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias mediante la utilización de cultivos celulares de neuroblastomas Neuro-2a. Los resultados obtenidos dan una toxicidad muy elevada del extracto bruto. La utilización de un activador específico del canal de sodio (Veratridina) y de un inhibidor de la bomba de sodio potasio (Ouabaina) aplicados conjuntamente con el extracto, permite aumentar la sensibilidad de la respuesta tóxica de las células Neuro-2a ante la presencia de toxinas neurotóxicas que actúan sobre canales de sodio (como las ciguatoxinas). La diferencia de respuesta tóxica obtenida con el extracto de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias sin presencia de Ouabaina/Veratridina ($IC_{50} = 3,84$ células mL^{-1} RPMI) o con presencia de Ouabaina/Veratridina ($IC_{50} = 2,04$ células mL^{-1} RPMI) no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$) pero la respuesta no descarta la posible presencia de neurotoxinas de tipo activadoras del canal de sodio.

Introducción y generalidades

La ciguatera es una intoxicación alimentaria de tipo ictiosarco-toxismo originada por el consumo de pescado con toxinas ciguatéricas. La ciguatera se encuentra de forma endémica en zonas intertropicales del Océano Índico, Pacífico y Atlántico oeste [1]. El organismo productor de las toxinas es una dinoflagelada del género *Gambierdiscus*, identificada por primera vez en el año 1976 en Las Islas Gambier [2]. *G. toxicus* puede producir dos grupos principales de toxinas. La maitotoxina (MTX), poliéter policíclico hidrosoluble, con baja penetración a través de la pared digestiva que se elimina fácilmente y que no parece participar en los síntomas de la ciguatera. Las ciguatoxinas (CTXs), poliéteres de naturaleza lipofílica, se concentran en todos los tejidos del pescado y son responsables de los síntomas observados durante la intoxicación humana por ciguatera. El efecto principal de las CTXs a nivel fisiológico es su acción activadora de los canales de sodio voltaje-dependiente.

Diferentes formas de CTXs han sido identificadas. Las formas menos polares de las CTXs, las gambiertoxinas GTXs (directamente

detectadas en cultivos de *Gambierdiscus*), son precursores de las CTXs [3]. A lo largo de la cadena trófica se producen oxidaciones sucesivas de las formas menos polares de CTXs en formas más polares. Más de veinte formas de GTXs y CTXs han sido identificadas. La CTX del Pacífico P-CTX-1 es la forma más oxidada y más tóxica de las CTXs [4]. Las diferencias dentro de los síntomas de la ciguatera debidos a la toxicidad de las diferentes formas de CTXs y por lo tanto la afinidad para el canal Na^+ son dependientes del nivel de oxidación de la molécula. [5, 6, 7, 8, 9].

Dentro del género *Gambierdiscus* cinco especies más han sido descritas: *G. belizeanus* Faust (1995), *G. yasumotoi* Holmes (1998), *G. australes*, *G. pacificus* y *G. polynesiensis* Chinain (1999) [10]. La producción de CTXs ha sido detectada en *G. australes*, *G. pacificus* y *G. polynesiensis* [10]. No obstante, existe actualmente cierta confusión taxonómica que invita a la revisión del género [11, 12]. Ello podría explicar en parte la variación en la producción de CTXs descrita entre cepas. Igualmente, ha sido descrito que la producción de toxinas por una misma especie puede variar según varios factores como las condiciones del medio, la localización geográfica y las estaciones [13, 14, 15, 16].

Numerosos métodos han sido estudiados para garantizar la detección de la presencia de ciguatoxinas en los peces. Animales de laboratorio han sido utilizados tradicionalmente para la detección de peces tóxicos. El bioensayo ratón es el bioensayo mayoritariamente utilizado para la detección de las ciguatoxinas en carne de pescado o en extractos [17, 18]. Técnicas inmunológicas como el RIA (Radio Immunoassay) o ELISA (Enzyme Linked Immuno Absorbent) han sido desarrolladas para la detección de las CTXs [19], si bien con resultados poco probados para el caso del ELISA [20]. La utilización de técnicas de química analítica fue también aplicada a la detección de las ciguatoxinas utilizando técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC) acoplada a una detección con fluorescencia [21, 22] o por espectrometría de masas (HPLC-MS).

La utilización de cultivos celulares de mamíferos como modelo toxicológico para la detección de toxinas marinas permite detectar una actividad tóxica del extracto. Manger et al. [23, 24] han descrito un método para la detección de toxinas con actividad neurotóxica en cultivos de neuroblastomas (Neuro-2a) basado en la utilización de la ouabaina y veratridina. La ouabaina inhibe la salida del sodio intracelular bloqueando el canal Na^+ de la bomba de ATP (Bomba Na^+/K^+). La veratridina actúa sobre el canal Na^+ voltaje-dependiente manteniéndolo en posición abierta. La utilización de ouabaina y veratridina conjuntamente con el extracto estudiado permite modificar la sensibilidad de la respuesta tóxica debida a la presencia de neurotoxinas. La presencia de CTX se caracteriza por una disminución de la viabilidad de las células en cultivo (potenciando el efecto de la ouabaina y veratridina).

En 2004 se describió por primera vez una intoxicación por ciguatera en aguas del atlántico oriental, concretamente en las Islas Canarias debido al

consumo de un “Medregal Negro” (*Seriola Rivoliana*) que contenía CTXs de tipo CTX-1 del Caribe y dos toxinas mas desconocidas [25]. Contemporáneamente, una dinoflagelada del genero *Gambierdiscus* fue aislada de las costas de las Islas Canarias [26]. El presente trabajo propone una evaluación de la toxicidad *in vitro* de una cepa de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias sobre cultivos celulares de neuroblastomas Neuro-2a.

Material y métodos

Cultivos de Gambierdiscus sp. de Canarias. La cepa de *Gambierdiscus* sp. (VGO791) aislada de las Islas Canarias (proveniente de la colección de microalgas CCVIEO del IEO, Vigo) fue cultivada en medio ES [27], modificado y con salinidad de 32 P.S.U. en frascos erlenmeyer de 100 mL a 28°C bajo luz blanca a 60-80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz y oscuridad 12:12. La máxima concentración de células alcanzada en el cultivo fue de 3.127 células mL^{-1} .

Preparación del extracto bruto de Gambierdiscus sp. El cultivo recuperado fue filtrado bajo vacío utilizando un filtro GF/F (Whatman) que se conservó congelado a -20°C con metanol hasta su utilización. La extracción se procesó por sonicación (30 minutos), centrifugación (1.400 rpm), recuperación del sobrenadante de metanol y posterior filtración del extracto metanólico por Acrodisc 0,45 μm . Se repitió la extracción con metanol una segunda vez. Las fracciones metanólicas filtradas se combinaron y se evaporaron bajo nitrógeno. El extracto seco se pesó y se resuspendió en 3 mL de metanol. El peso seco del extracto obtenido fue de 1,3 mg mL^{-1} de MeOH con un equivalente de 1.042 células mL^{-1} de MeOH.

Estudio preliminar de la toxicidad sobre cultivos celulares de neuroblastoma Neuro-2a- Evaluación de la viabilidad de las células expuestas al extracto bruto: Las células de neuroblastomas Neuro-2a se cultivaron según el protocolo utilizado por Cañete *et al*, 2007 [28]. La exposición de las células al extracto de *Gambierdiscus* sp. se realizó utilizando el método de Manger [23,24] y la evaluación de la viabilidad de las células también se realizó según Cañete *et al*, 2007 [28]. Por falta de patrones de CTXs, se utilizó un patrón de brevetoxina-3 (PbTx-3) fue utilizado como control positivo de la presencia de neurotoxinas activadoras del canal a sodio para validar la respuesta del modelo celular en cuanto a la presencia de neurotoxinas [28].

Resultados

Los resultados obtenidos tras la exposición al extracto de *Gambierdiscus* sp. y del estándar de PbTx quedan expresados en las curva de viabilidad de las células en función de las concentraciones de extracto y

de la toxina. La IC₅₀ (concentración inhibidora de 50% de la viabilidad celular) del extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. obtenida fue de 4,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de medio RPMI o un equivalente de 3,84 células mL^{-1} RPMI para la toxicidad total del extracto de *Gambierdiscus* sp. En presencia de ouabaina/veratridina la IC₅₀ del extracto fue de 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RPMI para un equivalente de 1,7 células mL^{-1} RPMI. La diferencia entre las IC₅₀ con (+OV) o sin (-OV) ouabaina y veratridina no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$) pero la tendencia es a una disminución de la viabilidad de las células en presencia de los inhibidores del canal de sodio. Fig. 1.

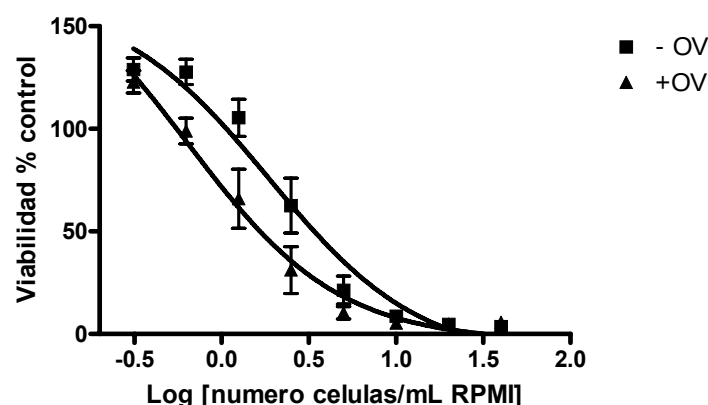


Figura 1. Curva dosis-respuesta de las células Neuro-2a expuestas a un extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. en presencia (+OV) y ausencia (-OV) de ouabaina y veratridina.

La IC₅₀ obtenida en presencia de PbTx-3 con ouabaina y veratridina fue de 24 ng mL^{-1} RPMI. La PbTx-3 no tiene efecto sobre las células Neuro-2a en ausencia de ouabaina y veratridina. La disminución de la viabilidad celular ($p < 0,05$) obtenida es característica de las neurotoxinas activadoras del canal de sodio (Fig. 2).

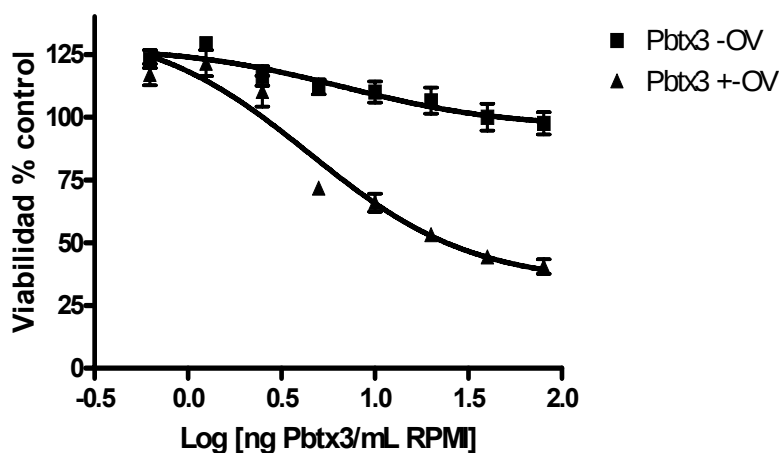


Figura 2. Curva dosis-respuesta de las células Neuro-2a expuestas a un estándar de PbTx-3 en presencia (+OV) y ausencia (-OV) de ouabaina y veratridina.

Discusión, conclusión y perspectivas

El extracto bruto de *Gambierdiscus* sp. de las Canarias produce una toxicidad muy elevada sobre las células Neuro-2a (equivalente de 3,84 células mL⁻¹). Una cepa de *Gambierdiscus* sp. aislada de Malasia produce en comparación una toxicidad sobre Neuro-2a equivalente a 16 células mL⁻¹ (datos de nuestro laboratorio). La alta toxicidad encontrada en ausencia de ouabaina y veratridina indica presencia de una potente toxina no asociada a canales de sodio. Posiblemente puede tratarse de una toxina del tipo maitotoxina (MTX) ya que ésta es mayoritaria en las cepas tóxicas de *Gambierdiscus* sp. descritas en la literatura [11,29].

Aunque los posibles indicios de presencia de CTXs no parecen ser significativos, todavía no se puede descartar la posible producción de CTXs o derivados. Se necesitan estudios complementarios como una separación de la fracción lipofílica (que retiene toxinas de tipo CTXs) de la fracción hidrofílica (MTXs) para evaluar la responsabilidad de cada fracción dentro de la toxicidad global medida tras la exposición con ouabaina y veratridina. Utilizando la P-CTX-1 como patrón, se podrá completar este estudio con análisis químico por LC-MS para detectar e identificar la posible síntesis de toxinas tipo CTX producidas por esta cepa. El cultivo estable de la cepa de *Gambierdiscus* sp. (VGO 791) podrá ser objeto de cultivos a gran escala para una producción de mayor biomasa para confirmar la posible producción de CTXs o derivados.

Agradecimientos

A Javier Fernández, de la Universidad de la Laguna, y a J. Franco del CSIC por su colaboración. Este trabajo ha sido financiado parcialmente con una beca predoctoral INIA (Ministerio Español de Educación y Ciencia).

Referencias

- [1] Lewis, R.J. 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon*. 39:97-106.
- [2] Yasumoto, T., A. Inoue, R. Bagnis, M. Garcon. 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43:69-74.
- [3] Lewis, R.J., M. Sellin, M.A. Poli, R.S. Norton, J.K. MacLeod, M.M. Sheil. 1991. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*. 29:1115-1127.
- [4] Lehane, L., R.J. Lewis. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*. 61:91-125.
- [5] Lewis, R.J., M.Y. Chaloupka, N.C. Gillespie, M.J. Holmes. 1988. An analysis of the human response to ciguatera in Australia. En: *Proceedings 6th International Coral Reef Symposium*, 1988, August 8-12. Townsville, Australia. 3:67-72.
- [6] Murata, M., A.-M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, T. Yasumoto. 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 112:4380-4386.
- [7] Yasumoto, T., M. Murata. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93:1897-1909.
- [8] Lewis, R.J. 1994. Impact of a validated, cost-effective screen for ciguateric fish. *Mem. Queensl. Mus.* 34:549-553.

- [9] Legrand, A.-M., C.J. Lotte. 1994. Detection of ciguatoxic fish by using the binding property of ciguatoxins to voltage-dependent sodium channels. *Mem. Queensl. Mus.* 34: 576.
- [10] Chinain, M., M.A. Faust, S. Pauillac. 1999. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. novel, *G. australes*, sp. novel, and *G. polynesiensis*, sp. novel. *J. Phycol.* 35:1282-1296.
- [11] Tester P.A., Faust M.A., Vandersea M.W., Kibler S.R., Chinain M., Holmes M.J., Holland W.C., Litaker R.W., 2006. Does *Gambierdiscus toxicus* type material exist? *XIIe Internacional Conference on Harmful Algae*, Septiembre 2006.
- [12] Richlen, M.D., Morton S.L., Barber P.H., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) *Harmful Algae* (2008), doi:10.1016/j.hal.2007.12.020 (in press).
- [13] Bomber, J.W., R.R.L. Guillard, W.G. Nelson. 1988. Roles of temperatures, salinity, and light in seasonality, growth, and ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, Dinophyceae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 115: 53-65.
- [14] Tosteson, T.R., D.L. Ballantine, C.G. Tosteson, V. Hensley, A.T. Bardales. 1989. Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl. Environ. Health Perspect.* 108(Suppl.1):133-141.
- [15] Holmes, M.J., R.J. Lewis, M.A. Poli, N.C. Gillespie. 1991. Strain dependent production of ciguatoxin precursors (Gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon.* 29:761-775.
- [16] Micouin, L., M. Chinain, P. Asin, A.-M. Legrand. 1992. Toxicity of French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* in cultures. *Bull. Soc. Path. Exot.* 85:474-477.
- [17] Barrer, A.H., P.J. Scheuer, S. Sasaki, P. Helfrich, C.M.B. Alender. 1960. Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 90:770-787.
- [18] Lewis, R.J. 2003. Detection of ciguatoxins associated with ciguatera fish poisoning. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cambella (Eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides. UNESCO. France. 267-277.
- [19] Hokama, Y., A.M. Osugi, S.A.A. Honda, M.K. Marsuo. 1985. Monoclonal antibodies in the detection of ciguatoxina and other toxic polyethers in fish tissues by a rapid poke stick test. En: *Proceedings 5th International Coral Reef Congress*. Antenne Museum-Ephe, Moorea, French Polynesia. 449-456.
- [20] Dickey, R.W., H.R. Granade, F.D. McClure. 1994. Evaluation of a solid-phase immunobed assay for detection of ciguatera-related biotoxins in caribbean finfish. *Memoirs of the Queensland Museum.* 34:481-488.
- [21] Lewis, R.J., M. Sellin. 1992. Multiple ciguatoxins in the flesh of fishes. *Toxicon.* 30:915-919.
- [22] Lewis, R.J., M. Sellin. 1993. Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon.* 31:1333-1336.
- [23] Manger, R.L., L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, Y. Hokama, R.W. Dickey, H.R. Granade, R.J. Lewis, T. Yasumoto, M. Wekell. 1995. Detection of sodium channel toxins : directly cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC Int.* 78:521-527.
- [24] Manger, R.L., L.S. Leja, S.Y. Lee, J.M. Hungerford, M. Wekell. 1997. Assessment of marine toxins by cell bioassay. En: Shahidi, F., Y. Jones, D.D. Kitts (Eds.) *Seafood Safety, Processing, and Biotechnology*. Technomic Publishing. Lancaster, Basel. 11-16.
- [25] Perez-Arellano, J.-L., P.O. Luzardo, A.P. Brito, M.H. Cabrera, M. Zumbado, C. Carranza, A. Angel-Moreno, R.W. Dickey, L.D. Boada. 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerging Infectious Diseases.* 11-12:1981-1982.
- [26] Fraga, S., Riobó P., Diogène J., Paz B., Franco J.M.. 2004. Toxic and potentially toxic benthic dinoflagellates observed in Macaronesia (NE Atlantic Archipelagos) *XIe International Conference on Harmful Algae*, Cape Town 2004.
- [27] Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Wanabe, A., A. Hattori (Eds.) *Culture and Collection of Algae*. US-Japanese Conference, Hakone.

- [28] Cañete, E., A. Caillaud, J. Diogène. 2008. Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas. En: Gilabert, J. (Ed.) Avances y Tendencias Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas (Actas de la IX Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Cartagena 7-10 Mayo 2007). pp.: 271-275.
- [29] Holmes, M.J., R.J. Lewis, N.C. Gallespie. 1992. Toxicity of Australian and French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) grown in culture: Characterization of a new type of maïtotoxina. *Toxicon*. 28:1159-1172
- [28] Holmes, M.J., R.J. Lewis, N.C. Gallespie. 1992. Toxicity of Australian and French Polynesian strains of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) grown in culture: Characterization of a new type of maïtotoxina. *Toxicon*. 28:1159-1172.

Ácido Belizeánico, un nuevo derivado del ácido okadaico

Antonio H. Daranas^{1,2}, Patricia G. Cruz¹, Manuel Norte¹
y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorganica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Tenerife

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

Resumen

En el marco de nuestro programa de búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de origen marino, hemos estudiado el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, a partir del cual se encontró el ácido belizeánico. Este es un nuevo derivado del ácido okadaico, del que puede considerarse un precursor de interés. Utilizando fundamentalmente técnicas de resonancia magnética nuclear se determinó su estructura y mediante la utilización de diferentes técnicas de modelización molecular se ha estudiado su conformación en disolución. Es interesante el hecho de que este metabolito también presenta una potente actividad inhibidora de la proteína fosfatasa 2A pese a las diferencias estructurales que presenta con el ácido okadaico.

Materiales y métodos

Como primera etapa, se realizaron cultivos monoclonales del dinoflagelado *P. belizeanum* a gran escala (1.000L). Estos cultivos se llevaron a cabo en tanques de 80 L a una temperatura de 21°C en un medio Guillard K utilizando un fotoperiodo de 16:8 (luz:oscuridad). Las células se recogieron por centrifugación a 7.000 rpm y posteriormente fueron extraídas en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente en acetona, que fue eliminada por evaporación a vacío para rendir un extracto de 21 g. A continuación, el extracto se purificó por cromatografías de exclusión molecular y de fase reversa (MeOH:H₂O y CH₃CN:H₂O).

El ácido belizeánico presentó un espectro de masas con una m/z 847.4820 [C₄₄H₇₂O₁₄+Na]⁺ correspondiente a la siguiente fórmula molecular C₄₄H₇₂O₁₄. La estructura de este nuevo metabolito se determinó fundamentalmente utilizando espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono y bidimensional. El análisis de los experimentos COSY, TOCSY, HSQC y HMBC permitió establecer conectividades entre los fragmentos protonados de la molécula, así como la diferente naturaleza de sus carbonos.

Resultados y discusión

Llegados a este punto se propone para este compuesto una estructura en la que aparecen dos regiones, C-1/C-15 y C-22/C-38, que coinciden con las regiones equivalentes en el ácido okadaico. Sin embargo, la zona C-16/C-21 presenta diferencias, ya que los anillos C y D característicos del ácido okadaico no se encuentran en este compuesto, teniendo en su lugar una cadena abierta con dos alcoholes secundarios en las posiciones C-16 y C-19, así como sobre el metino del anillo C-23.

La estereoquímica de esta molécula se asignó en base a las señales observadas en el experimento ROESY. Este estudio nos llevó a una situación configuracional equivalente a la de ácido okadaico en todos aquellos centros que se mantienen inalterados. Pero, en el caso de los carbonos C-16 y C-19 no ha sido posible determinar su configuración debido a la falta de diastereotopía en los metilenos adyacentes.

Una vez concluido el estudio estructural del ácido belizeánico, y debido a la relación existente entre la conformación que adoptan este tipo de moléculas y su actividad, se inició un estudio conformacional con este metabolito. A su vez se intentó resolver la estereoquímica de los centros quirales, C-16 y C-19. Como punto de partida para abordar este problema se tomaron los cuatro posibles isómeros 16S*19S*, 16S*19R*, 16R*19S* y 16R*19R*, para así posteriormente comparar los resultados teóricos con los datos obtenidos de distintos experimentos espectroscópicos.

En el caso del ácido belizeánico las búsquedas conformacionales se realizaron sin ningún tipo de restricción. Fue posteriormente, en el análisis de estos resultados, cuando se tuvieron en cuenta las restricciones experimentales. El programa que se utilizó para realizar los estudios computacionales fue MacroModel 8.5. Nuevamente fue de la RMN de donde se obtuvieron los datos experimentales que nos sirvieron para desechar aquellas estructuras resultantes de los estudios teóricos que no se ajustaran a estos valores. Esta información se obtuvo básicamente del RMN¹H, TOCSY y ROESY. En los dos primeros experimentos se midieron constantes de acoplamiento, mientras que en el tercero se integraron los ROEs que se transformaron en distancias interprotónicas.

Con todas las búsquedas conformacionales y minimizaciones finalizadas se pasó a analizar las estructuras resultantes de acuerdo a los datos experimentales. Para ello en primer lugar se intentó llevar a cabo un estudio similar a los realizados por Snyder y col. y Nikiforovich y col., que se basan en la “*deconvolución*” de los datos de RMN (intensidad de las integrales de los ROEs y constantes de acoplamiento ³JH-H) para obtener poblaciones conformacionales que sean capaces de explicar los datos experimentales. Por un lado Snyder y col. utilizan el programa NAMFIS, (NMR Analysis of Molecular Flexibility in Solution), mientras que Nikiforovich y col. aplican una aproximación estadística basada en la *t* de Student. Nosotros, utilizando como ejemplo estos trabajos, realizamos combinaciones estadísticas calculando la correspondiente desviación cuadrática media (RMSD). Para ello, las estructuras resultantes de la

búsqueda conformacional se agruparon con el programa XCluster (MacroModel 8.5), quedando un total de diez familias conformacionales. Seguidamente, utilizando el programa Mathematica se generaron combinaciones estadísticas que incluyeran a estas diez familias.

Por último se utilizaron las restricciones de distancias interprotónicas provenientes del experimento ROESY. A partir de estos datos se calculó la desviación cuadrática media para las violaciones de distancia de los confórmeros que quedaron para cada uno de los isómeros, resultando que en los cuatro casos el confórmero que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el mismo, con un valor de RMSD de 0.20 Å. Estas estructuras se representan en la Fig. 1.

A continuación, para cada isómero, se calculó la estructura promedio de la dinámica. Obteniendo de este modo una información equivalente a las medidas experimentales, ya que las distancias obtenidas a partir del ROESY son un promedio de los posibles confórmeros en disolución, y lo mismo ocurre con las constantes de acoplamiento. Por lo tanto, se midieron las distancias entre los protones así como de los ángulos diedros, en las estructuras promedio, de los que se tenía información experimental.

Si nos fijamos únicamente en los valores de RMSD de los distintos isómeros del ácido belizeánico no es posible discernir entre ninguno de ellos ya que las diferencias con respecto a los datos experimentales son similares para todos los casos. Aunque, si atendemos a la distancia entre H-14 y H-16 se pueden apreciar diferencias entre los isómeros **16-S*** y **16-R***, siendo la distancia en el caso **16-S*** la más cercana a los datos experimentales. A su vez, si tenemos en cuenta los ángulos diedros, se observa que en el caso H-15 C-15 C-16 H-16 los valores son diferentes para los isómeros **16-S*** y **16-R***, ya que en los isómeros **16S*** nos encontramos con disposiciones *anti*, mientras que para el **16R*** los ángulos se corresponden con disposiciones *gauche*, y aunque J_{15-16} tiene un valor experimental de 6,60 Hz, que podría generar dudas en torno a esta disposición, también es cierto que en el caso del AO esta constante es de aproximadamente 7 Hz y se corresponde con una disposición *anti*. Por lo tanto, si tenemos en cuenta estos datos, podemos proponer que nos encontramos ante alguno de los isómeros con estereoquímica **16S***. Sin embargo, para el carbono C-19 no es posible seleccionar entre ninguna de las dos configuraciones debido a la falta de datos experimentales en torno a este centro.

Conclusión

Por lo tanto, finalizado el estudio de modelización con los cuatro isómeros del ácido belizeánico, **16S*19S***, **16S*19R***, **16R*19S*** y **16R*19R***, se puede proponer para el metino C-16 una configuración *S**, no pudiéndose resolver la situación en el caso del centro quiral C-19. De este modo, aunque no se pudo obtener la configuración relativa de C-19 sí que se pudo llegar a la disposición espacial que esta molécula adopta en disolución, ya que como se comentó anteriormente parece que la quiralidad de estos centros no afecta a las preferencias conformacionales de la molécula.

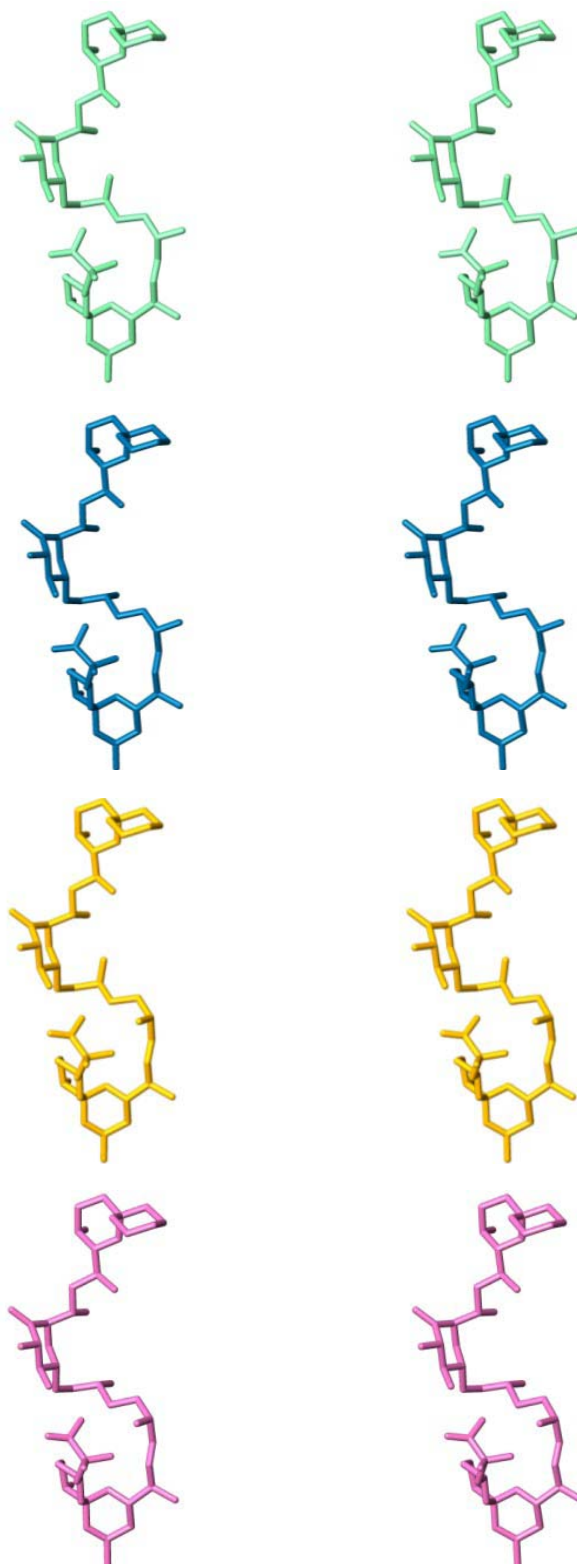


Figura 1.- Representación estereoscópica del conformero que mejor se ajustó para cada isómero. La estructura verde es el 16*S**19*S**, la azul el 16*S**19*R**, la naranja se corresponde con el 16*R**19*S** y la rosada con el 16*R**19*R**.

Ácido 19-*epi*-Okadaiko, un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A

Patricia G. Cruz¹, Antonio H. Daranas^{1,2}, Manuel Norte¹
y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorganica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Tenerife

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

El ácido Okadaico (AO) es un poliéter producido por dinoflagelados del género *Prorocentrum* y *Dinophysis* que ha ocasionado un gran impacto en diferentes aspectos como la salud pública, el control de alimentos, la farmacología o la industria pesquera [1].

Este metabolito se aisló inicialmente de una esponja marina [2] y fue caracterizado como el principal agente responsable del síndrome diarreico DSP (diarrhetic shellfish poisoning) [3] así como de ser un potente promotor de tumores [4]. Posteriormente se descubrió su mecanismo de acción, el cual implicaba una inhibición selectiva de las proteínas fosfatasa (PPs) [5,6]. Este hecho involucró a estas enzimas a numerosas investigaciones celulares y bioquímicas [7], demostrando el importante papel que tienen estas enzimas en la regulación de distintos procesos celulares como el metabolismo, crecimiento celular o apoptosis, entre otros. Estos resultados han llevado a muchos laboratorios a desarrollar la síntesis completa del AO [8]. En estos momentos en que se están llevando a cabo estudios estructurales con PP1 y PP2A, el descubrimiento de nuevos inhibidores y el estudio de sus conformaciones en disolución es una herramienta muy importante para profundizar en el modo de unión proteína-ligando [9]. En este trabajo, nosotros aportamos el aislamiento, estudio conformacional y actividad farmacológica de un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A, el ácido 19-*epi*-Okadaico (19-*epi*-AO).

Se realizaron cultivos a gran escala de *P. belizeanum* durante 45 días usando medio Guillard K a 23 °C, con ciclos 16:8 luz:oscuridad en tanques de 80 L. Una vez extraídas las células se sometieron a sucesivas cromatografías hasta aislar 70 mg de AO y 1 mg de la nueva toxina 19-*epi*-AO. La fórmula molecular se determinó de acuerdo a su espectro de masas, que presentó un ion a m/z 827.4576 correspondiente a $[C_{44}H_{68}O_{13}+Na]^+$, idéntica a la del AO. El análisis de los datos de RMN nos llevó a una estructura plana idéntica a la del AO, aunque se podían observar diferencias significativas en los desplazamientos de las señales de 1H y ^{13}C en el fragmento C15-C24. Un análisis cualitativo del experimento ROESY nos indicó que nos encontrábamos ante un epímero del AO en el carbono C19, el ácido 19-*epi*-okadaico [10] (Fig. 1).

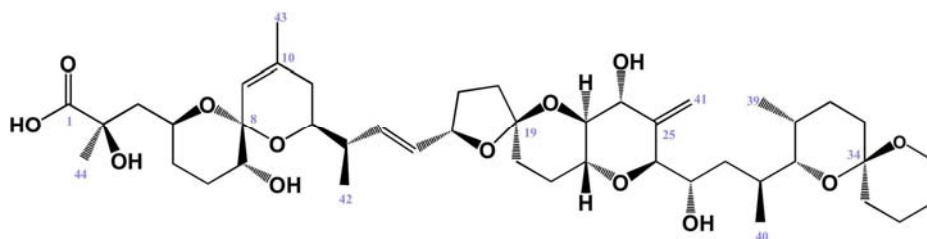


Figura 1. Estructura del ácido 19-*epi*-okadaico.

La conformación del 19-*epi*-AO se determinó en una disolución de MeOD mediante búsquedas conformacionales de MonteCarlo, utilizando las restricciones correspondientes 39 distancias interprotónicas obtenidas de experimentos ROESY, así como 7 ángulos diedros obtenidos a partir de las correspondientes constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$ medidas en un COSY-DQF sensible a la fase. Se realizaron búsquedas conformacionales en cuatro situaciones distintas, utilizando los campos de fuerza MM3* [11] y MMFF94s [12], implementados por MacroMolDel [13], combinados con una constante dieléctrica de 32,7 (equivalente a la del metanol) y con el modelo solvatado GBSA [14]. Los conformeros resultantes se minimizaron con el algoritmo FMNR, salvando las estructuras con una energía de 25 KJ por encima del mínimo global [15]. De este estudio se obtuvo una única familia conformacional, cuya estructura promedio se muestra en la Fig. 2. El resultado obtenido de la búsqueda conformacional se validó con una dinámica molecular, que mostró que aunque la molécula se mantiene dentro de una misma familia conformacional, presenta una ligera flexibilidad en el fragmento C1-C4. Este resultado se puede explicar por la ausencia del puente de hidrógeno característico del AO entre el ácido carboxílico C1 y el hidroxilo en C24, que no se puede formar en el nuevo metabolito ya que debido al cambio configuracional ambos grupo se encuentran en distintas caras de la molécula. La presencia de este puente de hidrógeno se consideraba la clave para que el AO mantuviera su disposición de pseudomacrociclo, sin embargo, en este nuevo compuesto hemos observado que esto no es necesario.

Se ensayó la actividad biológica de este nuevo compuesto frente a fosfatasas del tipo PP1 y PP2A [16,17], y se observó que el 19-*epi*-AO inhibe la PP2A con un $IC_{50} = 0.47 \pm 0.04$ nM, un valor equivalente al del AO. Sin embargo, la actividad inhibitoria del 19-*epi*-AO frente a PP1 presentó un $IC_{50} = 465 \pm 52$ nM, aproximadamente diez veces menos que el AO.

Los resultados obtenidos son importantes desde un punto de vista del análisis de las interacciones entre la proteína y el ligando, ya que se pueden sacar conclusiones estructurales importantes para el diseño de inhibidores específicos de PP1 y PP2A.

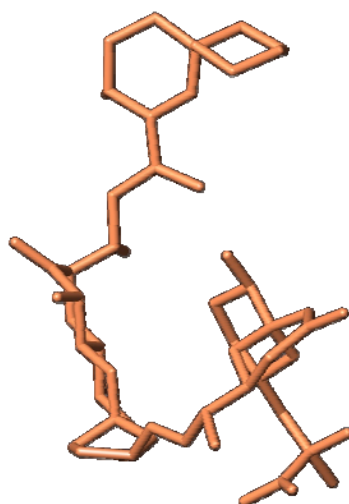


Figura 2. Conformación del ácido 19-*epi*-okadaico en disolución.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero a: MEC (AGL2005-07294-C04-01); MCYT-FSE (Programa Ramón y Cajal, MLS) y ICIC (PGC). La cepa de *P. belizeanum* fue cedida por el IEO (Vigo), cortesía de S. Fraga.

Referencias

- [1] Daranas, A.H., M. Norte, J.J. Fernández. 2001. *Toxicon* 39:1101- 1132.
- [2] Yasumoto, T., M. Murata, M., Y., Oshima, M. Sano, G. K. Matsumoto, J. Clardy. 1985. *Tetrahedron*. 41:1019-1025.
- [3] Suganuma, M., H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojiva, K. Wakamatsu, K. Yamada, T. Sugimura. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:1768-1771.
- [4] Biolojan, C., A. Takai. 1988. *Biochem. J.* 256:283-290.
- [5] McCluskey, A., T.R. Sim, J.A. Sakoff. 2002. *J. Med. Chem.* 45:1151-1175.
- [6] Fernández, J.J., M.L. Cadenas, M.L. Souto, M.M. Trujillo, M. Norte. 2002. *Curr. Med. Chem.* 9:229-262.
- [7] Daranas, A.H., J.J. Fernández, M. Norte, J.A. Gavín, B. Suárez-Gómez, M.L. Souto. 2004. *Chem. Rec.* 4:1-9.
- [8] Forsyth, C.J.; Sabes, S. F.; Urbanek, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8381-8382.
- [9] Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Morales, E. Q.; Norte, M.; Gavín, J. A. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 10-3.
- [10] Cruz, P. G.; Hernández Daranas, A.; Fernández, J. J.; Norte, M. *Organic Letters* 2007, 9, 3045-048.
- [11] Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8551-8559.
- [12] Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* 1996, 17, 490-519.
- [13] Mohamadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* 1990, 11, 440-467.
- [14] Still, W. C. T.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6127-129.
- [15] Thepchatri, P.; Cicero, D. O.; Monteagudo, E.; Ghosh, A. K.; Cornett, B.; Weeks, E. R.; Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12838-12846.
- [16] Vieytes, J. M.; Fontal, O. I.; Leira, F.; Baptista de Sousa, J. M. V.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* 1997, 248, 258-264.
- [17] McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1712-1722.

Auto-asociación del ácido okadaico como vía de entrada a las células.

Antonio H. Daranas^{1,2}, Patricia G. Cruz¹, Alberto Hernández Creus³,
Manuel Norte¹ y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Tenerife

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

(3) Departamento de Química-Física, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

Resumen

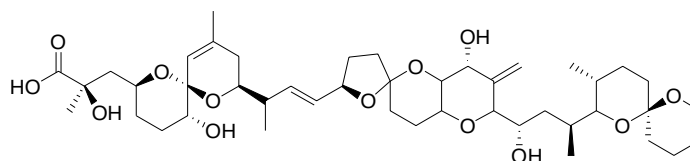
El ácido okadaico (OA), una toxina de naturaleza políeter producida por dinoflagelados, fue el primer inhibidor natural de proteínas fosfatasa que actúan sobre los residuos de serina y treonina, y que juegan un papel fundamental en la regulación de muchos procesos esenciales en las células. Usando técnicas de "scanning tunneling microscopy (STM)" se puede observar claramente la auto-asociación que sufre dicha toxina, y que parece crucial para su transporte a través de las membranas celulares [1,2].

Una de las toxinas marinas de distribución mundial, y que causa graves trastornos tanto desde el punto de vista sanitario como socioeconómico, es el ácido okadacio 1 (OA). Sustancia cuyo origen se encuentra en los dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* y que produce los síntomas del síndrome diarreico cuando pasa a la cadena trófica a través de marisco contaminado. Estas toxinas cobran una extraordinaria importancia ya que son potentes inhibidores selectivos de las proteínas fosfatasa de tipo 1 y 2A y que las convierte en extraordinarias herramientas farmacológicas para estudiar como se regulan la mayoría de los procesos intracelulares. A pesar de que han sido ampliamente estudiadas desde el punto de vista estructural y biosintético, y que como se ha mencionado, se utilizan a diario como material indispensable en la mayoría de los laboratorios de farmacología, se conoce muy poco de cómo es realmente el mecanismo mediante el cual son capaces de atravesar las membranas biológicas y penetrar en el interior de las células vivas [3].

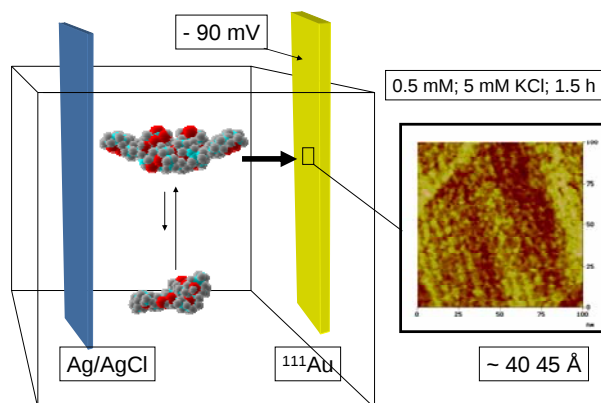
Hace relativamente poco tiempo en nuestro laboratorio describimos la habilidad que tienen este tipo de sustancias para formar estructuras capaces de albergar un catión metálico, en este caso potasio, y formar dímeros relativamente estables [4,5].

Mediante el uso de STM hemos conseguido establecer cuales son las condiciones propicias para la formación del complejo dimérico con potasio y poderlo observar mediante adsorción sobre monocapas de ¹¹¹Au (Fig. 1) [6,7]. Utilizando esta tecnología de observación y un modelo sencillo de membrana formado por una bicapa lipídica de fosfatidil colina, hemos conseguido proponer una hipótesis razonable de cómo este tipo de toxinas

penetran al interior de la células vivas y ejercen su acción donde la forma dimérica que alberga un catión potasio juega un factor fundamental.



Ácido Okadaico 1 (OA)



Bibliografía

- [1] Daranas, A.H., M. Norte, J.J. Fernández. 2001. Toxic Marine Microalgae. *Toxicon*. 39:1101-1132.
- [2] Bialojan, C., A. Takai. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256:283-290.
- [3] Fernández, J.J., M.L. Cadenas, M.L. Souto, M.M. Trujillo, M. Norte. 2002. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr. Med. Chem.* 9:229-262.
- [4] Norte, M., J.J. Fernández, M.L. Souto, J.A. Gavín, M.L. Cadenas, P. Auxina. 1988. Complexation of okadaic acid: a preliminary study. *Bioorg. Med. Chem. Letters*. 8:1007-1012.
- [5] Daranas, A.H., J.J. Fernández, E.Q. Morales, M. Norte, J.A. Gavín. 2004. Self-association of okadaic acid upon complexation with potassium ion. *J. Med. Chem.* 47:10-13.
- [6] Steinem, C., A. Janshoff, W.P. Ulrich, M. Sieber, H.J. Galla. 1996. Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. *Biochim. Biophys. Acta*. 1279:169-180.
- [7] Favero, G., L. Campanella, A. D'Annibale, R. Santicci, T. Ferri. 2003. Mixed hybrid bilayer lipid membrane incorporating valinomycin: improvements in preparation and functioning. *Microchemical J.* 74:141-148.

Análisis de microcistinas. Últimos avances analíticos

Cintia Flores, Josep Rivera y Josep Caixach

Laboratori d'Espectrometria de Masses, Dept. d'Ecotecnologies, IIQAB-CSIC,
C/Jordi Girona 18, 08034 Barcelona

En las últimas décadas, las cianobacterias han vuelto a atraer la atención debido a su presencia cada vez más frecuente en aguas superficiales. En aguas eutrofizadas y en condiciones favorables para su crecimiento se observa una proliferación masiva (afloramiento o *bloom*) de cianobacterias de modo similar a los *blooms* de algas marinas conocidos como mareas rojas. Estos *blooms* suelen aparecer de forma periódica debido a que las cianobacterias producen esporas capaces de permanecer varios meses e incluso años en los sedimentos. La aparición de estos *blooms* supone un problema importante para la calidad del agua, no sólo por los problemas de gusto y olor asociados a las cianobacterias, sino porque ciertas especies son capaces de producir toxinas. Las microcistinas son una familia de más de setenta péptidos hepatotóxicos producidos por diferentes géneros de cianobacterias (*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix-Oscillatoria* y *Nostoc*). Se acepta a priori que con la muerte de la cianobacteria se produce la lisis de sus células y las microcistinas son liberadas al agua. Consciente de ello, la OMS publicó en 1998 un valor guía provisional de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para la microcistina-LR (MC-LR). En este contexto el “R.D. 140/2003 por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano” recoge este mismo valor para las microcistinas, sin especificar para cual/cuales microcistinas o si es un valor total. En la Fig. 1 se muestra la estructura de estos compuestos y en particular de las microcistinas más tóxicas y frecuentes (MC-LR, RR e YR). Todo esto ha provocado un gran aumento del interés sobre la presencia de estos analitos en aguas de abastecimiento, haciendo necesaria la puesta a punto de una metodología analítica fiable que permita su análisis.

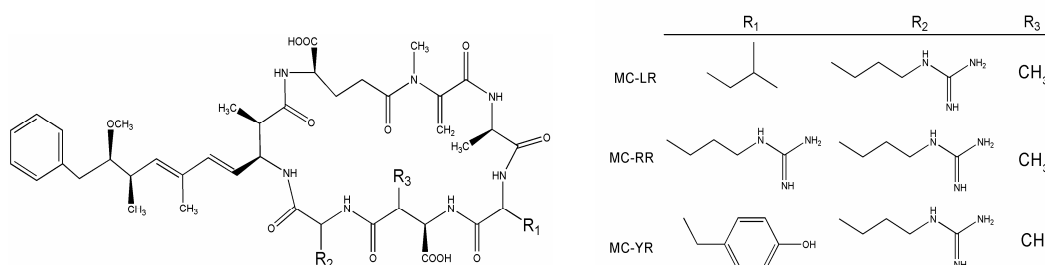


Figura 1. Estructura química de las microcistinas.

En nuestro laboratorio se ha realizado el análisis cualitativo y cuantitativo de las diferentes variantes de microcistina presentes en *blooms* de cianobacterias observadas desde 1998 en aguas continentales de diferentes puntos de la geografía española [1]. En una primera fase del trabajo se puso a punto un método para la determinación de microcistinas por HPLC/UV. Sin embargo, la falta de especificidad de la detección UV, dificulta la identificación de estos compuestos en presencia de interferencias procedentes de la materia orgánica natural del agua. Este inconveniente también es propio de las técnicas biológicas de screening más utilizadas para la detección de microcistinas, el inmunoensayo (ELISA) y el ensayo de inhibición de la protein fosfatasa (PPA). La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC/MS) permite la separación, identificación y determinación cuantitativa de las diferentes variantes de microcistinas aisladas y caracterizadas. Por ello, en una segunda fase se optimizó el análisis de microcistinas por LC/ESI-MS [2]. Finalmente se ha puesto a punto su análisis por cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS) [3] para aumentar la especificidad, selectividad y sensibilidad del método analítico. En este trabajo se presenta una comparativa de los resultados obtenidos con cuatro instrumentos diferentes triple cuadrupolo (QqQ) de las casas comerciales habituales en espectrometría de masas (Applied Biosystems, Thermo Electron Corporation, Varian y Waters Micromass MS Technologies). Se han comparado las especificaciones y parámetros de calidad de los cuatro equipos para el análisis de los compuestos objeto de este estudio. Encontrando diferencias significativas en los resultados obtenidos debido a las diferencias existentes entre los QqQ (fuentes de ionización electrospray, geometría de los analizadores de masa cuadrupolares, disposición de la celda de colisión y gas de colisión utilizado).

Actualmente, se está trabajando en la automatización del método de extracción en fase sólida (SPE) on-line acoplado a LC/ESI-MS/MS con el sistema Environmental Quantitation (EQUAN) de Thermo Fisher Scientific. Este sistema consiste en: un inyector automático (HTC PAL de CTC Analytics); dos bombas de líquidos (Surveyor LC Pump Plus y Surveyor MS Pump Plus de Thermo Fisher Scientific); dos columnas, una de pre-concentración para la SPE y una analítica acoplada al triple cuadrupolo TSQ Quantum; y dos válvulas de 6 puertos. En las Figs. 2(a) y 2(b) se puede ver un esquema del sistema y una foto del equipo montado en nuestro laboratorio. Con esta metodología se ha conseguido reducir el volumen de agua a extraer hasta 1 mL, disminuyendo consecuentemente el tiempo de análisis y obteniendo unos límites de detección inferiores a 14 ng L^{-1} para todos los analitos estudiados (nodularina, MC-LR, RR e YR).

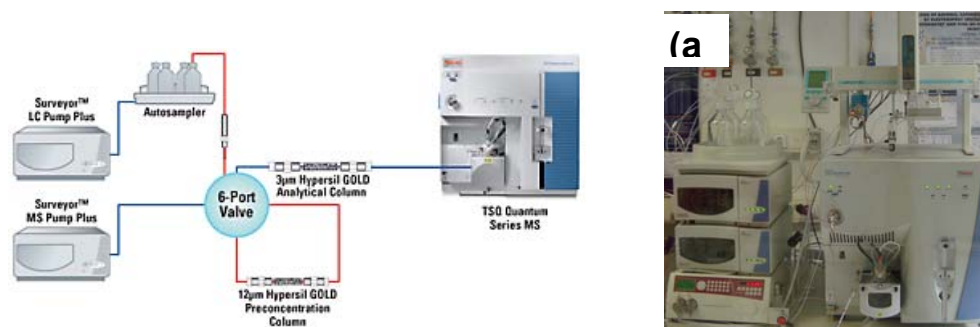


Figura 2. Sistema SPE on-line EQUAN acoplado a LC/ESI-MS/MS.

Agradecimientos

Se agradece a Thermo Fisher Scientific por facilitar la disponibilidad de un sistema de SPE on-line EQUAN en nuestro laboratorio.

Referencias

- [1] Barco, M., C. Flores, J. Rivera, J. Caixach. 2004. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix* (*Oscillatoria*) *rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon*. 44: 881-886.
- [2] Barco, M., J. Rivera, J. Caixach. 2003. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1020:103-111.
- [3] Flores, C., J. Rivera, J. Caixach, 2004. Electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry for the analysis of multiple environmental pollutants in water samples. 21st LC/MS Montreux Symposium, 10-12 November 2004, Montreux, Switzerland.

Aparición de mutantes resistentes a cobre en la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa*: implicaciones en el uso de cobre como alguicida

Fernando Marv, Mónica Rouco, Victoria López Rodas y Eduardo Costas.
COVEMI. Control Veterinario de Microorganismos. Facultad de Veterinaria,
Departamento de Producción animal, Universidad Complutense de Madrid.
Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040. Madrid

Resumen

La proliferación masiva de cianobacterias tóxicas en embalses de abastecimiento supone un riesgo para la salud pública. Para el control de estos blooms se realizan tratamientos con alguicidas como el sulfato de cobre. Actualmente se desconoce el efecto de los tratamientos masivos con alguicidas sobre la dinmica de las poblaciones de cianobacterias a largo plazo. Este trabajo es una revisión sobre la adaptación de las cianobacterias a dosis letales de sulfato de cobre, usando como microorganismo experimental *Microcystis aeruginosa*. Mediante un análisis de fluctuación, demostramos que las células resistentes a sulfato de cobre aparecen gracias a una mutación espontánea que ocurre al azar antes de la exposición al cobre. La frecuencia de aparición de la mutación que permite el paso de células sensibles a células resistentes es de $1,76 \cdot 10^{-6}$ mutantes por división celular. Las células resistentes tienen una tasa de crecimiento menor que las células sensibles en ausencia de cobre, sin embargo son las únicas capaces de crecer en concentraciones mayores a $5,8 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre.

Introducción

Los fenómenos de crecimiento masivo de cianobacterias tóxicas han sido descritos en diversas partes del mundo [1]. Este crecimiento masivo supone un serio riesgo para la salud pública si sucede en aguas que el ser humano consume [2]. El sulfato de cobre es uno de los alguicidas más usados para reducir la carga de microalgas productoras de biotoxinas en embalses de abastecimiento [3]. El ión cprico (Cu^{2+}) liberado a altas concentraciones tiene diferentes efectos sobre las microalgas: inhibición de la fijación de CO_2 , inhibición de la actividad del fotosistema II [4], inhibición de la asimilación de nitrato y síntesis de nitrato reductasa [5], además de cambios en el volumen celular [6]. También es capaz de provocar lisis celular, y por tanto liberación de toxinas al medio [7]. Por este motivo es aconsejable que los tratamientos con cobre se apliquen antes de alcanzar una elevada concentración de microalgas tóxicas [1,8].

Actualmente se desconocen los efectos a largo plazo de los tratamientos con sulfato de cobre en los embalses de abastecimiento y, en particular, los efectos de tratamientos repetidos sobre poblaciones de cianobacterias tóxicas. Estos cambios pueden incluir la selección de

determinados genotipos y la aparición de células resistentes al cobre dentro de la población de microalgas tóxicas.

Este trabajo es una revisión sobre cuál es el mecanismo que permite la adaptación de *Microcystis aeruginosa* a dosis letales de sulfato de cobre, tema sobre el que nuestro grupo ha estado trabajando recientemente [9].

Material y métodos

Microorganismos experimentales y condiciones de cultivo. Los experimentos se realizaron con la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* (Kützinger), cepa MaM1 de la colección de microalgas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Esta cepa fue aislada de un embalse de abastecimiento (La Minilla, Sevilla, España) que nunca fue tratado con cobre. Antes de empezar los experimentos, el cultivo de MaM1 fue reclonado a partir de una sola célula para disminuir al máximo la variabilidad genética. La cianobacteria se cultivó en las condiciones más axénicas posibles en frascos de cultivo celular (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) con 20 ml de medio BG-11 a pH 7,4 (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany), 20°C e iluminación continua con tubos fluorescentes a un PAR de 60 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *M. aeruginosa* se mantuvo en cultivo equilibrado [10] mediante la transferencia de un inóculo a medio fresco cada 20 días.

Aparición de células resistentes. Las células resistentes se obtuvieron por medio del análisis de fluctuación de Luria y Delbrück, modificado para cultivos líquidos de microalgas por López-Rodas, 2001 [11] y Costas, 2001 [12]. Este método permite diferenciar si las células resistentes aparecen gracias a una mutación espontánea que tiene lugar antes de la exposición al sulfato de cobre (mecanismo de adaptación preselectivo), o si la adaptación es consecuencia de un cambio fisiológico o específico en respuesta al sulfato de cobre (mecanismo de adaptación postselectivo).

El análisis de fluctuación consta de dos partes. En la primera (set 1) cada cultivo es inoculado con muy pocas células sensibles ($N_0 \approx 100$ células), una cantidad suficientemente pequeña para asegurar la ausencia de mutantes resistentes. Se deja que estas células se dividan en condiciones no selectivas hasta alcanzar un determinado número ($N_t \approx 10^5$ células) y en este momento se añade el medio selectivo (sulfato de cobre) a una concentración letal. En el set 2 se fundan alícuotas ($N_t \approx 10^5$ células) procedentes de la misma población parental que las células del set 1, en medio con la misma concentración de sulfato de cobre que en el set 1. Ambos sets se mantienen en condiciones selectivas el tiempo suficiente para que si existen células resistentes estas puedan crecer. Al final del experimento se determina el número de células resistentes que hay en cada uno de los cultivos. En el set 1, si las células resistentes aparecen por una adaptación fisiológica o un mecanismo de mutación post-selectivo, la varianza del número de células por cultivo será baja (por tanto $\text{varianza}/\text{media} \approx 1$) ya que todas las células

tienen la misma probabilidad de desarrollar resistencia. Por el contrario, si las células resistentes aparecen por una mutación preselectiva, la varianza de células resistentes por cultivo será muy alta (varianza/media > 1) porque las mutaciones preselectivas aparecen al azar antes de la selección. Independientemente del mecanismo de aparición de los resistentes, la varianza esperada en el set 2 será baja (si el experimento se realiza correctamente). Por tanto, similar relación varianza/media entre ambos sets significa que las células resistentes aparecen por una mutación postselectiva o una adaptación fisiológica. Si hay diferencia entre esta relación, (relación varianza/media) y además es significativamente mayor en el set 1 que en el set 2, las células resistentes aparecen por una mutación preselectiva.

El experimento se realizó en placas de 96 pocillos. En el set 1 se inoculó en 198 pocillos una cantidad inicial de $N_0 \approx 10^2$ células sensibles de *Microcystis aeruginosa*. Estas células crecieron en condiciones no selectivas y axénicas. Una vez que los cultivos alcanzaron la cantidad de $N_t \approx 10^5$ células se suplementaron con el medio selectivo (sulfato de cobre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, preparado en agua destilada) de modo que el ión cúprico (Cu^{2+}) quedó a una concentración de 10 μM . En el set 2 del experimento se inoculó $N_t \approx 10^5$ de *M. aeruginosa* sensible, procedentes de la misma población parental, en 198 pocillos de placas de 96 pocillos, con medio fresco a una concentración de Cu^{2+} de 10 μM . Ambos sets se fundaron simultáneamente. Tras 30 días de incubación, se determinó la proliferación celular en cada uno de los pocillos usando un microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany). El número de células resistentes en cada uno de los pocillos fue determinado por dos personas de manera independiente, usando un hemocitómetro (double Neubauer, ruling, Fortuna W.G. Co., Wertheim, Germany).

Con los datos experimentales se estimó la tasa de mutación (μ) a través de la siguiente ecuación:

$$P_0 = e^{-\mu (N_t - N_0)}, \text{ Luria y Delbrück [13]}$$

donde P_0 es la proporción de cultivos del set 1 en los que no aparecen células mutantes resistentes, μ es la tasa de mutación, N_0 es el número de células iniciales y N_t el número de células finales.

Caracterización de los mutantes resistentes al cobre. Una vez aisladas, las células resistentes fueron cultivadas durante 60 días. Para la caracterización fenotípica se fundaron cultivos con $N_0 = 5 \cdot 10^4$ células resistentes y sensibles y fueron mantenidas en ausencia de sulfato de cobre durante 4 días. Tras este periodo, se fundaron distintos cultivos de células resistentes y sensibles a diferentes concentraciones de sulfato de cobre: 1; 1,8; 3,2; 5,8; y 10,4 μM . Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones para células sensibles y resistentes. Además se fundaron 6 cultivos control (sin sulfato de cobre). Se estimó la tasa de crecimiento de

células resistentes y sensibles en presencia de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre a través del recuento de las células con un hemocitómetro.

El parámetro de tasa de crecimiento maltusiano se calculó a través de la siguiente fórmula [14]:

$$N_t = N_0 e^{m \cdot t}$$

donde N_0 es el número inicial de células, N_t es el número final de células y t corresponde a 5 días.

Resultados y discusión

Al tratar los cultivos del set 1 con 10 μM de Cu^{2+} la densidad celular se redujo drásticamente a los pocos días debido a la lisis de las células sensibles por efecto del cobre. Sin embargo, tras cuatro semanas de incubación, en los cultivos en los que había células resistentes al cobre aumentó la densidad celular (Tabla 1). En el set 2 se observó crecimiento de células resistentes en todos los cultivos tras 4 semanas de incubación (Tabla 1).

Analizando la relación varianza/media, deducimos que las células resistentes se originan a partir de una mutación espontánea que se produce, en el caso del set 1, en el tiempo en que los cultivos pasan de 10^2 a 10^5 células [15]. La relación varianza/media del set 1 fue mucho mayor que en el set 2 (Tabla 1). La tasa de mutación estimada para la adaptación al ión cúprico de *M. aeruginosa* fue de $1,76 \cdot 10^{-6}$ mutantes por división celular, dos órdenes de magnitud mayor que la estimada por Klug [16].

	Set1	Set2
Número de cultivos	198	198
Número de cultivos sin células resistentes	166	0
Número de cultivos con células resistentes	32	198
Varianza/Media	> 50	1
Tasa de mutación (mutaciones por división celular)	$1,76 \cdot 10^{-6}$	

Tabla 1. Resultados del análisis de fluctuación.

La relación dosis-efecto de sulfato de cobre muestra distintos patrones para células resistentes y sensibles. En ausencia de sulfato de

cobre, el parámetro Maltusiano de Fitness para células resistentes es un 20% menor que para las sensibles. En presencia de sulfato de cobre varía según la concentración. A bajas concentraciones (entre 1 y 1,8 μM) la tasa de crecimiento de células resistentes es significativamente menor que la de células sensibles. A las concentraciones de sulfato de cobre de entre 3,2 y 10,5 μM las células resistentes muestran su tasa de crecimiento más alta, mientras que en las células sensibles el crecimiento se inhibe por completo.

El fenómeno de aparición de células mutantes resistentes al cobre es muy interesante a la hora de establecer un tratamiento en embalses de abastecimiento. En una población de *Microcystis aeruginosa* en medio no selectivo existen células resistentes al cobre que aparecen con una frecuencia muy baja por una mutación espontánea. Estos mutantes tienen una tasa de crecimiento mucho menor que las células sensibles en medio no selectivo. Por esta razón, los mutantes resistentes serán eliminados de la población por procesos de selección natural. La proporción de mutantes que se mantiene en la población puede ser determinada como el equilibrio entre la tasa de mutación y la tasa de eliminación por selección:

$$\mu (1-q) = q (1-s),$$

donde μ es la tasa de mutación, q es la frecuencia alélica del mutante resistente al cobre y s es el coeficiente de selección del mutante [14,17]. En el caso del ión cúprico, se mantienen alrededor de 9 mutantes resistentes por millón de células.

En este trabajo se ha utilizado la concentración de sulfato de cobre recomendada para el control de proliferaciones masivas de cianobacterias en embalses de abastecimiento, la cual destruye sin problema las células sensibles al superar sus posibilidades de adaptación fisiológica. Sin embargo, las células con resistencia al sulfato de cobre son capaces de proliferar. Por ello en los embalses de abastecimiento, los tratamientos repetidos con sulfato de cobre pueden seleccionar la presencia de genotipos resistentes de *Microcystis aeruginosa*, volviendo totalmente ineficaces estos tratamientos.

Agradecimientos

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

Referencias

- [1] Carmichael, W.W. 1992. A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-green algae) and their Toxins. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development. US Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.

- [2] Codd, G.A., C.J. Ward, S.G. Bell. 1997. Cyanobacterial toxins: Occurrence, models of action, health effects and exposure routes. En: Seiler J.P., E. Vilanova (Eds). *Applied toxicology: approaches through basic science. Archives of toxicology*, Suppl. 19. Springer. Berlin. 399-410.
- [3] Hudrey, S., S. Burch, M. Burch, M. Drikas, R. Greorgy. 1999. Remedial measures. En: Chorus, I., J. Bartram (Eds). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Routledge. London. 275-312.
- [4] Pandey, P.K., C.B. Singh. 1992. Cu uptake in a cyanobacterium: fate of selected photochemical reactions. *Curr. Microbiol.* 24:35-9.
- [5] Harrison, W.G.A., R.W. Eppley, E.H. Renger. 1977. Phytoplankton nitrogen metabolism, nitrogen budgets and observation on copper toxicity: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27:44-57.
- [6] Sorentino, C. 1979. The effects of heavy metal on phytoplankton- a review. *Phykos (Inst Ocenogr d'Alger, Alger- Bourse)*. 18:149-61.
- [7] Kenefick, S.L., S.E. Hrudey, H.G. Peterson, E.E. Prepas. 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water. Sci. Technol.* 27:433-40.
- [8] Hullebusch, E.V., V. Deluchat, P.M. Chazal, M. Baudu. 2002. Environmental impact of two successive chemical treatments in a small shallow eutrophied lake: Part II. Case of copper sulphate. *Environ. Pollut.* 120:627-34.
- [9] Garcia-Villada, L., M. Rico, M. Altamirano, L. Sánchez-Martin, V. Lopez-Rodas, E. Costas. 2004. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algaecide. *Water Res.* 38:2207-2213.
- [10] Cooper, S. 1991. *Bacterial growth and division. Biochemistry and regulation of prokaryotic and eukaryotic division cycles*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, London.
- [11] López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur J. Phycol.* 2001. 36: 179-90.
- [12] Costas, E., E. Carrillo, L.M. Ferrero, M. Agrelo, L. García-Villada, J. Juste, V. López-Rodas. 2001. Mutations of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* under lethal doses of 3-(3-4- dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) herbicide. *Phycologia*. 40:391-8.
- [13] Luria, S., M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28:491-511.
- [14] Crow, J.F., M. Kimura. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Roll. New York.
- [15] Lea, D.E., C.A. Coulson. 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J. Genet.* 49:264-85.
- [16] Klug, W., M.R. Cummings. 2003. *Concepts of genetics*. 7th ed. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, NJ.
- [17] Spiess, E.B. 1989. *Genes in populations*. 2nd ed. Wiley. New York.



PROGRAMA

Lunes 7 de Mayo de 2007

09:30-10:30	Inscripción y recogida de documentación. Instalación de Posters.
10:30-10:45	Apertura de la Reunión por el Excmo. Vicerrector de Investigación de la Universidad Politécnica de Cartagena Dr. José Antonio Franco Leemhuis.
10:45-11:10	Sesión de Apertura Modulación de la dinámica de HABs por la turbulencia de pequeña escala. <i>Elisa Berdalet y Marta Estrada.</i>
11:10 – 11:45	Pausa – Café
11:45 - 12:00	Fitoplancton tóxico y/o nocivo en las Rías Gallegas en los años 2003 a 2006. <i>Yolanda Pazos, Angeles Moroño y M^a Dolores Doval.</i>
12:00 - 12:15	Evolución del fitoplancton tóxico en Andalucía en el periodo 2003-2006. <i>David Jaén, Luz Mamán, Raúl Fernández e I. Márquez.</i>
12:15 - 12:30	Monitorização de PSP na costa portuguesa através de espécies indicadoras <i>Paulo Vale, Susana Sousa Gomes, Maria João Botelho, Susana Margarida Rodrigues.</i>
12:30 - 12:45	Resultados del programa de seguimiento de fitoplancton tóxico y biotoxinas en las zonas de producción de bivalvos de Cataluña: años 2003-2006 y primer trimestre del 2007. <i>Margarita Fernández Tejedor, Maximino Delgado, Magda Vila, Nagore Sampedro, Jordi Camp, Dolores Furones y Jorge Diogène.</i>
12:45 - 13:00	Seguimiento y plan de vigilancia de fitoplancton tóxico en las costas de Águilas (Murcia) en verano de 2006. <i>Javier Gilabert, Elisa Gómez, Antonio Hernández y M^a José Herrera, Javier Tudela, M^a José García y Carolina Gutiérrez.</i>
13:00 – 13:15	Brote con clínica respiratoria en la provincia de Almería por posible exposición a microalgas. <i>Pilar Barroso, P. Rueda, T. Parrón, P. Marín y J. Guillén.</i>
13:15 – 13:30	Informe sobre el programa GEOHAB y otras actividades relacionadas con el programa HAB de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO. <i>Beatriz Reguera y Mónica Lion.</i>
13:30 – 16:00	Almuerzo
16:00 – 16:30	Presentación de la propuesta de “Creación de una red temática de Proliferaciones Algales Nocivas a nivel nacional” <i>Esther Garcés, Santiago Fraga, Gotzon Basterretxea y Jordi Camp.</i>
16:30 – 18:00	Foro discusión I. Normativa Europea Agua y monitorización de especies de fitoplancton tóxico. Sistemas de detección de toxinas y límites legales de toxicidad. Recientes evidencias de nuevas toxinas en el Mediterráneo: Palitoxina y Espirólidos.
18:00 - 20:00	Sesión de Posters.

Martes 8 de Mayo 2007

- 09:30 – 09:45 Fitoplancton potencialmente tóxico o nocivo en las aguas del Puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental).
Carolina Assadi, Vicente Tasso y Manuel García Carrascosa.
- 09:45 – 10:00 Proliferación de *Skeletonema tropicum* Cleve (Bacillariophyceae) en el puerto de Valencia (Mediterráneo Occidental).
Carolina Assadi, Vicente Tasso y Manuel García Carrascosa.
- 10:00 - 10:15 Seguimiento del fitoplancton en el estuario del río Nervión. Identificación de especies potencialmente tóxicas.
Emma Orive, Aitor Laza y Sergio Seoane.
- 10:15 – 10:30 Avaliação do risco de exposição a toxinas DSP ao longo da costa portuguesa por LC-MS: años 2003 a 2006.
Paulo Vale, Susana Margarida Rodrigues, Maria João Botelho, Susana Sousa Gomes.
- 10:30 – 10:45 Evolución de los episodios tóxicos detectados en las zonas de producción de moluscos en la costa gallega entre los años 2003 y 2006. Seguimiento anual.
J. Correa, A. Vidal, M. Goicoechea, C. Salgado, F. Arévalo.
- 10:45 – 11:00 Ecossistema costeiro de Aveiro (Portugal): Proliferações de *Gymnodinium catenatum* e detecção de toxinas PSP
M.J. Botelho, T. Vidal, S. Palma, S.S. Gomes, S.M. Rodrigues, P. Vale, M.G. Vilarinho, M.T. Moita.
- 11:00 – 11:45 Pausa - Café
- 11:45 – 12:00 Programa de control de biotoxinas en la costa andaluza en el período 2003-2006: Observaciones sobre el comportamiento de distintas especies ante episodios tóxicos tipo PSP.
M. A. Ocaña, M. Gordillo, L. Mamán, L. Fernández e I. Márquez.
- 12:00 – 12:15 Capas finas de *Pseudo-nitzschia* spp y distribución de *Dinophysis acuminata* durante un ciclo de afloramiento/hundimiento en la Ría de Pontevedra (Galicia).
Lourdes Velo-Suárez, Sonsoles Gonzalez-Gil, Isabel Ramilo, Patrick Gentien, Michele Lunven, Liam Fernand, Robin Raine y Beatriz Reguera.
- 12:15 – 12:30 Presencia de especies tóxicas de fitoplancton en la evaluación del estado ecológico de las masas de agua costeras de las Islas Baleares.
Margarita Puigserver y Gabriel Moyá.
- 12:30 – 12:45 *Gymnodinium chlorophorum* causante de proliferaciones de altas biomásas en aguas recreativas de las islas Baleares (veranos 2004-2006).
Hassina Illoul, Mercedes Masó, Albert Reñé y Silvia Anglés.
- 12:45 – 13:00 Resonancia en puertos y su efecto sobre las proliferaciones de *Alexandrium minutum*. El caso de Arenys de Mar.
Gotzon Basterretxea, Antoni Jordi, Esther Garcés, Sílvia Anglès, Benjamín Casas y Kees van Lenning.
- 13:00 – 13:15 Una propuesta para clarificar taxonómicamente el complejo de especies *Alexandrium tamarense/catenella/fundyense*.
Santiago Fraga, Nagore Sampedro, Rosa I. Figueroa, Isabel Bravo, José M. Franco, Antonella Penna, Isabel Ramilo y Amelia Fernández-Villamarín.
- 13:15 – 16:00 Almuerzo
- 16:00 – 18:30 Travesía en barco por el puerto de Cartagena y visita al Fuerte de Navidad.

Miércoles 9 de Mayo 2007

- 09:30 – 09:45 Desarrollo de sondas para la detección de *Pseudo-nitzschia delicatissima* en la costa Catalana, España: estudios preliminares.
Laurence M. Elandaloussi, Roger A. Venail, Sonia Quijano-Scheggia, Margarita Fernández-Tejedor, Esther Garcés, Jordi Camp, Jorge Diogene, Karl Andree.
- 09:45 – 10:00 Ingeniería de Bioprocesos con dinoflagelados. Experiencias preliminares.
Francisco García, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón, Hassan El Belarbi y Emilio Molina.
- 10:00 – 10:15 Daño celular por fuerzas de corte en cultivos de dinoflagelados tóxicos.
Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón, Hassan El Belarbi, Francisco García y Emilio Molina
- 10:15 – 10:30 Effects of Bacillamide and related compounds on algal growth.
C. Churro, V. Figueira, S. Paulino, E. Alverca, P. Pereira, A. Lobo, Susana Franca.
- 10:30 – 10:45 Adaptación, azar y contingencia histórica en la evolución de *Prorocentrum triestinum* bajo condiciones simuladas de Cambio Global.
Antonio Flores Moya, Eduardo Costas y Victoria López-Rodas.
- 10:45 – 11:00 Proliferación masiva de cianobacterias en el embalse de Ullibarri-Gamboa.
Laura Muro, Salomé Ortiz de Landaluce, Nuria Cifuentes, Araceli Vara y Eduardo Costas.
- 11:00 – 11:45 Pausa - Café
- 11:45 – 12:00 Caracterización morfológica, molecular y estudio de la compatibilidad sexual en *Pseudo-nitzschia delicatissima*.
Sonia Quijano-Scheggia, Esther Garcés, N. Lundhom y Jordi Camp.
- 12:00 – 12:15 Detección, cuantificación y seguimiento de proliferaciones de fitoplancton mediante LISST (Laser in situ Scattering Transmissometry).
Sílvia Anglès, Antoni Jordi, Esther Garcés, Mercedes Masó y Gotzon Basterretxea.
- 12:15 – 12:30 Quistes de dinoflagelados potencialmente tóxicos durante una extracción de sedimento en la ría de Muros (Galicia, NO España) y discusión de su posible impacto en las Proliferaciones Algales Nocivas de la zona.
Isabel Bravo, Rosa I. Figueroa y Eduardo López.
- 12:30 – 12:45 Análisis de microcistinas. Últimos avances analíticos.
Cintia Flores, Josep Rivera y Josep Caixach.
- 12:45 – 13:00 Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas
Elisabeth Cañete, Amandine Caillaud y Jorge Diogène.
- 13:00 – 13:15 Evidencia de yesotoxina en mejillones de la bahía de Alfacs.
J. Diogène, B. Paz, M. Fernández, E. Mallat, E. Cañete, A. Caillaud, L. Elandaloussi, P. de la Iglesia, A. G. Cabado, J. Lago, J. Vieites y J. Franco.
- 13:15 – 13:30 Pre-validación de un método de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas.
Adriano Villar-González, María L. Rodríguez-Velasco y Luis M. Botana.
- 13:30 – 16:00 Almuerzo
- 16:00 – 16:15 Producción de espiróridos por tres cepas de *Alexandrium peruvianum* aisladas del puerto de Palamós (Gerona).
José Franco, Amelia Fernández, Pilar Riobó, Beatriz Paz, Gemita Pizarro, Rosa Figueroa e Isabel Bravo
- 16:15 – 16:30 Toxicidad de la dinoflagelada *Gambierdiscus* sp. aislada de las Islas Canarias.
A. Caillaud, E. Cañete, S. Fraga, E. Mallat y J. Diogène.

- 16:30 – 16:45 Ácido Belizeanico, un nuevo derivado del ácido Okadaico.
Antonio H. Daranas, Patricia G. Cruz, José J. Fernández Castro y Manuel Norte.
- 16:45 – 17:00 Un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A, el ácido 19-epi-okadaico.
Patricia G. Cruz, Antonio H. Daranas, José J. Fernández y Manuel Norte.
- 17:00 – 17:15 Auto-asociación del ácido okadaico, como vía de entrada a las células
Antonio Hernández Daranas, Patricia G. Cruz, Alberto Hernández, Manuel Norte y José J. Fernández.
- 17:15 – 17:30 Asociación correlacional entre el consumo de moluscos y el cáncer colorrectal en España: Los niveles legales de toxinas DSP no son seguros para la salud.
Juan Martínez, Victoria López-Rodas, Emilia Maneiro, Macarena Navarro y Eduardo Costas.
- 17:35 – 17:45 Nuevas herramientas que ofrece el proyecto MarCoast para complementar los sistemas de monitorización de mareas rojas (HABs).
Marina Martínez y Araceli Pi Figueroa.
- 17:45 – 18:00 Los proyectos DINOPHYSIS GALICIA y HABIT: Objetivos y primeros resultados.
Beatriz Reguera, Lourdes Velo-Suárez, Sonsoles Gonzalez-Gil, Laura Escalera, Yolanda Pazos, Angeles Moroño, Maria Dolores Doval, Gemita Pizarro y J.M. Franco.
- 18:00 – 18:30 Pausa Café
- 18:30 – 18:45 Actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas
María L. Rodríguez-Velasco, Begoña Ben-Gigirey, Adriano Villar-González y Luis M. Botana.
- 18:45 – 19:00 Acción estratégica de la CA de Galicia para la mitigación de los efectos de los episodios tóxicos.
Juan Blanco.
- 19:00 – 20:30 Foro de discusión II.
Desarrollo y validación de métodos analíticos y de ensayos funcionales para la identificación de toxinas. Detección de metabolitos y derivados de toxinas.

Jueves 10 de Mayo 2007

- 09:30 – 12:00 Foro de discusión III.
Presentación de conclusiones de la IX Reunión Ibérica.
Discusión y redacción de un borrador de propuesta de “Red temática de Proliferaciones Algales Nocivas a nivel nacional”.

Posters

1. Monitorização de iessotoxinas em mexilhão na baía de Lisboa.
Susana Sousa Gomes, Sofia Palma, Maria João Botelho, Teresa Moita y Paulo Vale.
2. Mortandades en Masa Producidas por Cianobacterias Tóxicas en el Parque Nacional de Doñana.
Pilar Lanzarot, Nieves Perdígones, Mónica Rouco, Fernando Marvá, Eduardo Costas y Victoria López-Rodas.
3. Aparición de mutantes resistentes a cobre en la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa*: implicaciones en el uso de cobre como alguicida.
Fernando Marvá, Mónica Rouco, Nieves Perdígones, Victoria López Rodas y Eduardo Costas.
4. Cytological changes induced by cyanobacterial microcystin-LR in mammalian Vero cells.
M. Andrade, E. Alverca, E. Dias, P. Pereira.
5. Análisis morfológico, molecular y contenido de toxinas de *Dinophysis cf ovum*, registrado en las Rías Baixas en mayo de 2005.
Nicolás Raho, Gemita Pizarro, Laura Escalera, Beatriz Reguera e Irma Marín.
6. Identificación y localización de bacterias asociadas al dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum* mediante TSA-FISH.
Lucía Palacios e Irma Marín.
7. ¿Es la frecuencia e intensidad de proliferaciones algales nocivas un buen indicador ecológico de calidad de aguas marinas costeras?.
Albert Reñé, Magda Vila, Laura Arin, Nagore Sampedro, Eva Flo y Jordi Camp
8. Algunos dinoflagelados bentónicos canarios, tóxicos y no tóxicos
Santiago Fraga, Pilar Riobó, Beatriz Paz y José M. Franco.
9. Estimación de incertidumbre de recuentos celulares de *Dinophysis acuminata* por el método Uthermöhl: Resultado de un ejercicio de intercalibración interlaboratorio.
Yolanda Pazos, Luz Mamán y Maximino Delgado.
10. Primera detección de *Alexandrium andersoni* (Dinoflagelado) en la costa catalana.
Nagore Sampedro, Margarita Fernández, Esther Garcés, Kees van Lenning, Nicolas Touzet, Santiago Fraga, Jorge Diogène y Jordi Camp.
11. Modelo mecanístico para el crecimiento de dinoflagelados tóxicos. Caso de *Protoceratium reticulatum*.
Francisco García, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón, Hassan El Belarbi y Emilio Molina.
12. Estudio de la influencia del contenido de macronutrientes del medio en el crecimiento del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*.
Asterio Sánchez, Juan J. Gallardo, M^a Carmen Cerón, Hassan El Belarbi, Francisco García y Emilio Molina.
13. Estudio fisiológico de *Dinophysis* spp. en poblaciones naturales durante un periodo de upwelling/downwelling en la Ría de Pontevedra (Galicia).
Sonsoles González-Gil, Lourdes Velo-Suárez, Isabel Ramilo y Beatriz Reguera
14. Purificación de cultivos mediante separación de células con citometría de flujo.
Javier Gilabert, Isabel Rodríguez Carbajal y Sil-lá Abad.
15. Fitoplancton potencialmente tóxico en los puertos deportivos del Mar Menor.
Javier Gilabert y Leonor Andúa.
16. Fitoplancton tóxico en la costa sur de Murcia (SO Mar Mediterráneo).
Nieves Bouza y Marina Aboal.
17. Análisis de la ventana de crecimiento óptimo para *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* en las Rías Baixas Gallegas durante el 2006.
Laura Escalera, Yolanda Pazos, Ángeles Moroño, M. Dolores Doval y Beatriz Reguera.
18. Producción y perfil de yessotoxinas de cepas de *Protoceratium reticulatum* procedentes de Galicia.
Beatriz Paz, Pilar Riobó, Laura Escalera y José M. Franco.

19. Identificación y caracterización por LC-MS de derivados del ácido okadaico en cultivos de *Prorocentrum belizeanum*.
Beatriz Paz, Antonio H. Daranas, Patricia G. Cruz, José M. Franco, José G. Napolitano, Manuel Norte y José J. Fernández.
20. Estudio de ostreocinas en cultivos de *Ostreopsis ovata*.
Humberto J. Domínguez, José J. Fernández, M. Norte, José M. Franco, P. Riobó, Fernando Gutiérrez, y María L. Souto.
21. Disminución del contenido en ácido domoico en vieiras (*Pecten maximus*) mediante un proceso fácilmente aplicable en la industria transformadora.
Jorge Lago, Iago Valverde, Juan M. Vieites y Ana G. Cabado.
22. Caracterización de la respuesta citotóxica de la pectenotoxina-2 (PTX-2) en dos modelos celulares humanos: células de neuroblastoma y células Caco-2.
Iago Valverde, Jorge Lago, Juan M. Vieites y Ana G. Cabado.
23. Distribución celular del ácido okadaico en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*.
Araceli Escudeiro, Elena Martín y Juan Blanco.
24. Estudio de la distribución intracelular y ligamiento de la toxina ASP en la glándula digestiva de *Pecten maximus*.
Aida Mauriz y Juan Blanco.
25. Estudio sobre la evolución de toxinas PSP en cultivos intensivos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*)
M. Gordillo, M. A. Ocaña, L. Mamán, L. Fernández e I. Márquez.
26. Estudio preliminar del efecto de la cerulenina y aminoácidos en cultivos de *Prorocentrum lima*.
Tamara Vilches, Antonio Hernández Daranas, José J. Fernández, Manuel Norte, Beatriz Paz y José M. Franco.
27. Validación Europea de un método fluorimétrico para la detección de toxinas diarreicas en molusco
H. Smienk, L. Mata, E. Domínguez, L. Botana, M.L. Rodríguez-Velasco.

