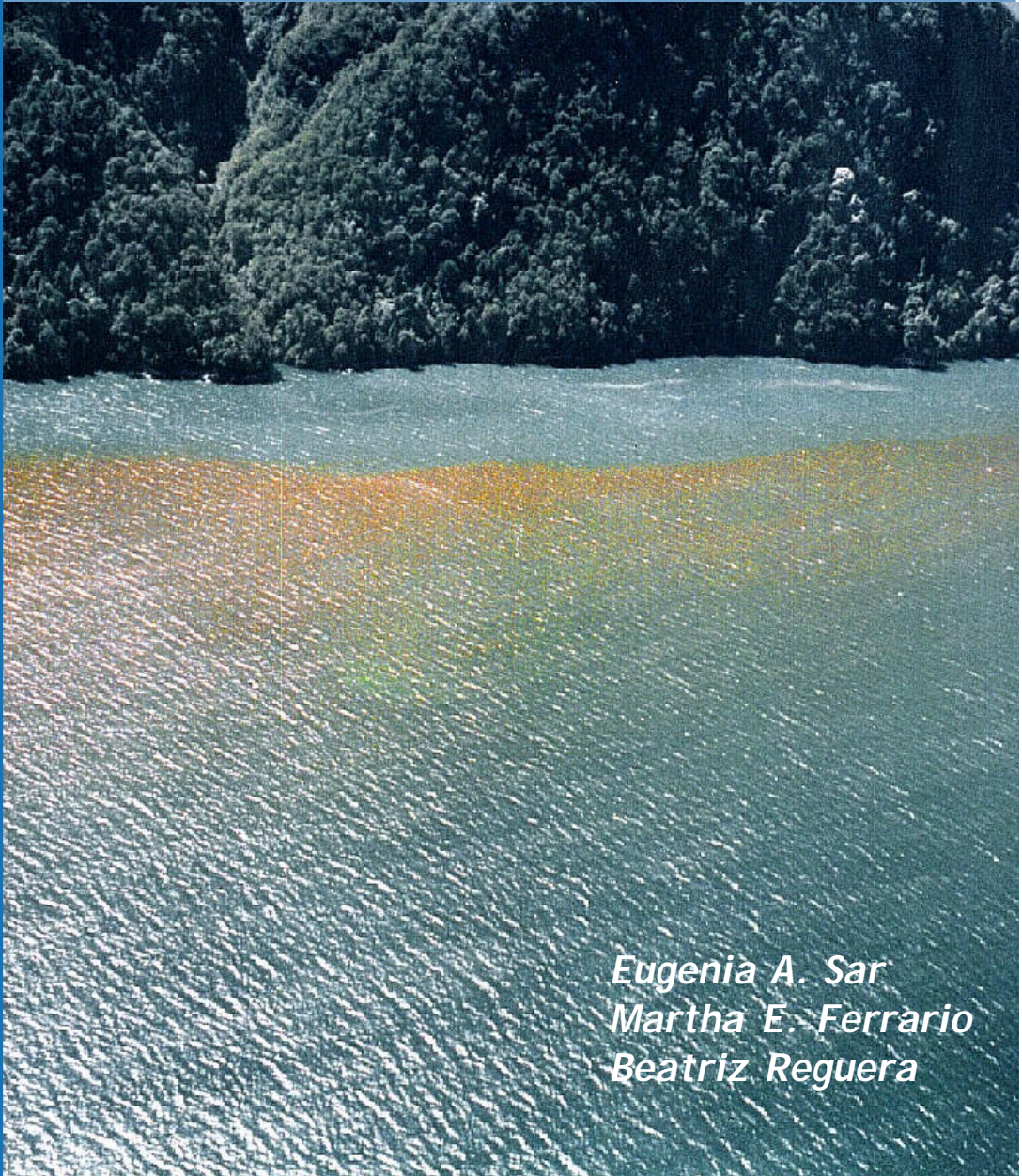
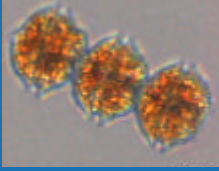
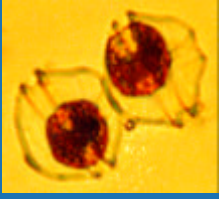


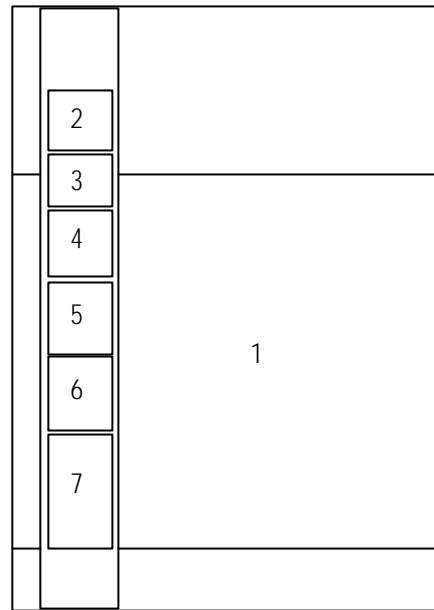
FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN EL CONO SUR AMERICANO



*Eugenia A. Sar
Martha E. Ferrario
Beatriz Reguera*

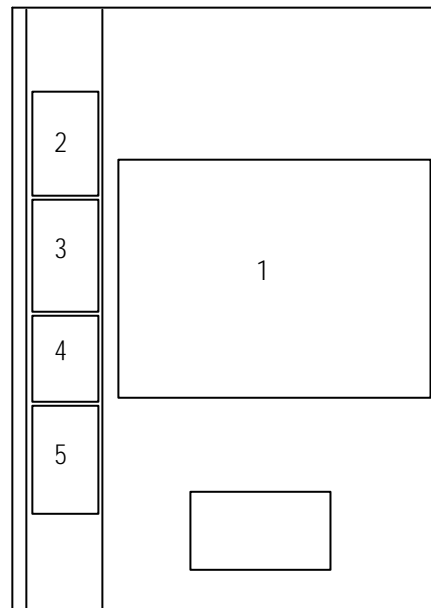
Cubierta. «Marea Café» en Península de Huequi (X Región, Chile)(1); dinoflagelados tóxicos del Cono Sur productores de PSP: *Alexandrium tamarense* (2); *Alexandrium catenella* (3) y *Gymnodinium catenatum* (4); dinoflagelados productores de DSP: *Dinophysis acuta* (5); *Dinophysis cf acuminata* (6) y *Dinophysis caudata* (7).

Fotos 1, 3, 5 y 7 de Alejandro Clément (*Plancton Andino S.A.*, Puerto Montt, Chile). Fotos 2,4 y 6 de Silvia Méndez (DINARA, Montevideo, Uruguay).



Contracubierta: Módulo de granja de cultivo de salmónidos en Puerto Aysén (XI Región, Chile) (1); diatomeas formadoras de densas floraciones (no tóxicas) que pueden causar pérdida de apetito o mortandades en los salmónidos en cultivo: *Chaetoceros convolutus* (2), *Skeletonema costatum* (3) y *Leptocylindrus minimus* (4); *Pseudonitzschia cf australis* (5), productora de toxina amnésica.

Foto 1 de Verónica Muñoz (*Salmones Antártica S.A.*, Puerto Aysén, Chile); Fotos 2-5 de Alejandro Clément (*Plancton Andino S.A.*, Puerto Montt, Chile)





UNESCO



FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN EL CONO SUR AMERICANO

*Eugenia A. Sar
Martha E. Ferrario
Beatriz Reguera*

Con fines bibliográficos este documento debe ser citado como:

Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano
E.A. Sar, M.E. Ferrario y B. Reguera (Eds.)
Instituto Español de Oceanografía, 2002.

Primera edición: mayo 2002

© Instituto Español de Oceanografía, 2002
Avenida de Brasil, 31. 28020 Madrid - España
Teléfono: 91 417 54 11
Fax: 91 597 47 70

Impreso en:
Obradoiro Gráfico S.L.
Polígono do Rebullón, 52-D
Mos, Pontevedra - España
Teléfono: 986 486 130
Fax: 986 486 044

NIPO: 406-02-001-9
ISBN: 84-95877-01-5
Depósito legal: VG-418-2002
P.V.P.: 40 euros

El IEO autoriza la reproducción y difusión total o parcial de este documento por cualquier medio, sin más limitación que citar su procedencia.

PREFACIO

A lo largo de las últimas décadas, el problema de las proliferaciones o floraciones algales nocivas ha adquirido una posición preeminente dentro de las prioridades científicas y ha recibido una creciente atención de los medios de comunicación. No se trata de un fenómeno nuevo; existen relatos históricos de varios siglos de antigüedad que describen observaciones atribuibles a episodios de microalgas tóxicas; por otra parte, como se explica en varios de los capítulos de esta obra, las floraciones algales nocivas pueden aparecer de modo recurrente en lugares poco o nada afectados por la acción humana. Sin embargo, como se indica en el primer capítulo del libro, es innegable que la creciente explotación del medio costero por el hombre ha dado lugar a un incremento del número de episodios algales nocivos registrados y puede haber contribuido a extensiones de la distribución geográfica o aumentos de la intensidad de estos episodios.

La obra que tengo el placer de presentar representa una contribución modélica a la integración de conocimientos sobre las floraciones algales nocivas. Se trata de uno de los raros ejemplos actuales de producción científica en castellano en que un grupo altamente cualificado de contribuyentes reúne información de primera mano, sin tener que esperar a una traducción, generalmente tardía, a partir de otras lenguas. Se añade a este mérito el que los temas que aborda el libro, que van desde la recopilación histórica hasta la detallada descripción de metodología analítica, estén redactados en un lenguaje llano e intencionadamente alejado de complicaciones terminológicas.

Observará el público lector que, en el párrafo anterior, he escrito “contribuyentes”, como hizo E. Balech en el prólogo al Manual de Métodos Ficológicos editado en 1995, otra excelente aportación a la literatura científica en castellano. He obviado así la tentación de utilizar una expresión políticamente correcta al estilo de “autores/as”; no habrá escapado a nadie el detalle de que, incluidas las editoras, más de la mitad de las personas firmantes son investigadoras.

Uno de los objetivos del presente volumen, para el que se prevé una amplia distribución, es el de llegar a un amplio grupo de posibles usuarios y llenar así una necesidad importante de intercambio de conocimientos. A primera vista, esta obra cubre en parte un terreno parecido al del Manual sobre Microalgas Marinas Nocivas de la COI (UNESCO); no obstante, ejerce una función claramente complementaria en relación con la problemática de las floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. Las secciones introductorias recogen experiencia acumulada a través de años de trabajo en el marco de las Rías Gallegas y de las actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas y el Centro COI-IEO de Vigo. Los capítulos regionales sintetizan una valiosa información científica, con muchos resultados y datos que hasta ahora se encontraban sepultados en literatura más o menos gris, informes restringidos y comunicaciones orales. Por otra parte, hay que destacar la actualización de metodología para análisis y bioensayos y el aporte de información taxonómica especialmente dedicada a los organismos observados en la zona.

Quisiera terminar felicitando a todos los que han contribuido a esta publicación, que honra la colección del IEO. Estoy segura de que representará una referencia obligada para estudiosos, gestores y todos los interesados en proliferaciones algales nocivas.

Marta Estrada

PRÓLOGO

Las Floraciones Algaes Nocivas pueden producir impactos drásticos sobre los recursos pesqueros y la salud pública, por lo que el estudio de la problemática vinculada a estos fenómenos ha adquirido una gran relevancia. El incremento de las investigaciones en este campo del conocimiento tuvo como consecuencia el endurecimiento progresivo de los controles impuesto por la normativa internacional para detección de toxinas en mariscos y ello redundó en la necesidad de establecer mayor cantidad de programas de monitoreo de microalgas tóxicas y ficotoxinas. Ante esta evidencia y ante la falta de un texto que compendiará los avances que se produjeron sobre floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano, decidimos realizar la tarea de preparar una obra que reuniera la información necesaria para abordar la temática desde diferentes perspectivas. Esta idea fue expuesta ante la comunidad científica sudamericana en ocasión de realizarse en Mar del Plata el segundo Taller sobre Floraciones Algaes Nocivas de Sudamérica, auspiciado por la Comisión Oceanográfica Internacional, y recibió una muy buena acogida. Alentadas en el propósito de concretar el proyecto decidimos acudir a investigadores de nuestra región y expertos de otras partes del mundo en las diferentes disciplinas vinculadas al tema y plasmar el texto en español. El lector podrá encontrar en la primera parte información sistematizada sobre cómo implementar un programa de monitoreo de microalgas tóxicas, sobre las principales ficotoxinas de origen fitoplanctónico y sobre las metodologías más adecuadas para detección, identificación y cuantificación de estas toxinas. En la segunda parte se abordan aspectos taxonómicos de los diferentes grupos de microalgas implicados en episodios de toxicidad, dinoflagelados tecados y atecados, diatomeas y fitoflagelados. La tercera parte está dedicada al análisis de episodios de toxicidad sucedidos en el Cono Sur Americano, al análisis del impacto económico y social que alguno de ellos han producido y a la reseña de los programas de investigación que se encuentran en curso en nuestra región. En la última parte está compendiada la información sobre organizaciones internacionales y regionales relacionadas con programas y actividades sobre floraciones algales nocivas. Nos esperamos pensar que investigadores de universidades, institutos de enseñanza superior, servicios de sanidad y empresas vinculadas a la acuicultura, docentes y alumnos de postgrado y pregrado, encontrarán en este compendio la información que necesiten para desarrollar sus tareas. Si esto sucediera, el esfuerzo de todos los que creyeron en nuestro proyecto, autores participantes y autoridades del Instituto Español de Oceanografía y de la Comisión Oceanográfica Internacional, y el nuestro propio, habrá tenido sentido.

Las Editoras

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

PREFACIO	5
<i>Marta Estrada</i>	
PRÓLOGO	7
ÍNDICE DE CAPÍTULOS	9
AGRADECIMIENTOS	11
LISTADO DE AUTORES	13
LISTADO DE REVISORES	16
PARTE I. SEGUIMIENTO DE MICROALGAS NOCIVAS Y ANÁLISIS DE FICOTOXINAS	17
Capítulo 1: Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas	19
<i>Beatriz Reguera</i>	
Capítulo 2: Principales toxinas de origen fitoplanctónico: identificación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	55
<i>Néstor Lagos</i>	
Capítulo 3: Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas	77
<i>M. Luisa Fernández, Aúrea Míguez, Emiliano Cacho, Ana Martínez, Jorge Diogéne & Takeshi Yasumoto</i>	
PARTE II. TAXONOMÍA	121
Capítulo 4: Dinoflagelados tóxicos del Cono Sur Americano	123
<i>Enrique Balech</i>	
Capítulo 5: Dinoflagelados atecados potencialmente toxígenos en el Cono Sur Americano	145
<i>Jacob Larsen</i>	
Capítulo 6: Fitoflagelados potencialmente toxígenos en el Cono Sur Americano	155
<i>Ojvind Moestrup</i>	
Capítulo 7: Diatomeas potencialmente toxígenas del Cono Sur Americano	167
<i>Martha E. Ferrario, Eugenia A Sar & Silvia E. Sala</i>	

PARTE III. EPISODIOS REGIONALES: ANTECEDENTES, PROYECTOS DE SEGUIMIENTO E INVESTIGACIONES EN CURSO	195
Capítulo 8: Episodios de algas nocivas en la Patagonia Argentina	197
<i>Norma Santinelli, Viviana Sastre & José L. Esteves</i>	
Capítulo 9: El proyecto «Marea Roja» del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)	209
<i>José I. Carreto, Rut Akselman, Hugo Benavides, Nora G. Montoya & Rubén Negri</i>	
Capítulo 10: Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso	217
<i>Clarisse Odebrecht, Sandra M.F.O. Azevedo, Virginia M.T. Garcia, Vera L.M. Huszar, Valeria F. Magalhaes, Mariângela Menezes, Luís A.O. Proença, Leonardo R. Rörig, Denise R. Tenenbaum, M. Celia Villac & João S. Yunes</i>	
Capítulo 11: <i>Alexandrium catenella</i> y veneno paralizante de los mariscos en Chile	235
<i>Leonardo Guzmán, Hernán Pacheco, Gemita Pizarro & César Alarcón</i>	
Capítulo 12: Impacto económico de las floraciones de microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de veneno amnésico de los mariscos	257
<i>Benjamín A. Suárez-Isla, Américo López, Cristián Hernández, Alejandro Clément & Leonardo Guzmán</i>	
Capítulo 13: Floraciones algales nocivas en Uruguay: antecedentes, proyectos en curso y revisión de resultados	269
<i>Silvia Méndez & Graciela Ferrari</i>	
PARTE IV. INSTITUCIONES RELACIONADAS CON LAS FLORACIONES ALGALES NOCIVAS	289
Capítulo 14: Organizaciones internacionales y regionales relacionadas con programas y actividades sobre floraciones algales nocivas	291
<i>Henrik Enevoldsen & Ángeles Aguilera</i>	
ÍNDICE TAXONÓMICO	307

AGRADECIMIENTOS

Las editoras desean expresar su agradecimiento a las personas que con su apoyo y colaboración hicieron posible la elaboración, edición y producción de este libro.

A Marcela Álvarez, quien fuera Directora Provincial de Pesca de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, y Héctor Lahitte, quien se desempeñara como Director del Área Biológica de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por el apoyo que consiguieron de sus Instituciones para iniciar nuestro proyecto de elaborar un texto en español sobre floraciones algales nocivas del Cono Sur Americano.

A Álvaro Fernández, Director del Instituto Español de Oceanografía (IEO), Eduardo López-Jamar, Subdirector de Investigación y Presidente del Comité Asesor de Publicaciones del IEO, y Alberto González-Garcés, Director del Centro Oceanográfico de Vigo del IEO, por apoyar con entusiasmo la publicación de esta obra como una monografía del Instituto, haciendo efectiva, una vez más, la colaboración cultural de España con los países de Iberoamérica. A Rafael Robles, anterior Director del IEO y actual responsable del programa COPEMED (FAO), que siempre apoyó, predicando con el ejemplo, la cooperación con los países del otro lado del Atlántico.

A Marta Estrada, del Instituto de Ciencias del Mar (CSIC, Barcelona, España), que distinguió nuestra labor prologando este texto y a los científicos mencionados en la *Lista de Revisores* que colaboraron eficazmente en la revisión técnica de los trabajos que el texto contiene.

A Nora Galván y Nilda Malacalza, por la ayuda que nos brindaron en la labor de gestión y organización durante los primeros estadios de preparación del libro.

A Mónica Lion, responsable del *Centro COI-IEO Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas* (Vigo, España) por prestar el apoyo entusiasta del Centro, y a Cristina Sexto, secretaria del mismo, por las innumerables horas dedicadas con ilusión y esmero al montaje de este libro.

A Enrique Balech, por haber accedido a nuestro pedido de colaboración con la generosidad que siempre lo caracterizó, a pesar de estar pasando por momentos difíciles de su vida.

Finalmente queremos agradecer a todos y cada uno de los autores de los capítulos de este libro por haber creído que éramos capaces de concretar nuestro proyecto y habérselo hecho posible con su participación desinteresada.

LISTADO DE AUTORES

Ángeles Aguilera

COI-IEO Centro Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas. Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apdo. 1552. 36280 Vigo, España.

Rut Akselman

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

César Alarcón

Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

Sandra M.F.O. Azevedo

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco H, Rio de Janeiro, RJ, 21949-590, Brasil.

Enrique Balech

Casilla de Correo 64, 7630 Necochea, Buenos Aires, Argentina.

Hugo Benavides

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

Emiliano Cacho

Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas, Estación Marítima s/n, Aptdo. 90, 36208 Vigo, España.

José I. Carreto

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

Alejandro Clément

Plancton Andino Ltda. Casilla 823, Puerto Montt, Chile.

Jorge Diogéne

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Centro de Acuicultura, Apartado de Correos 200, 43540 - Sant Carles de la Ràpita (Tarragona), España.

Henrik O. Enevoldsen

IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca.

José Luis Esteves

Laboratorio de Hidrobiología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia. Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas. Centro Nacional Patagónico. CONICET. 9100 Trelew, Chubut, Argentina.

M. Luisa Fernández

Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas, Estación Marítima s/n, Aptdo. 90, 36208 Vigo, España.

Graciela Ferrari

Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Constituyente 1497, (CP11200), Montevideo, Uruguay.

Martha E. Ferrario

Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

Virginia M.T. Garcia

Fundação Universidad Federal do Rio Grande. Caixa Postal 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil.

Leonardo Guzmán

Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

Cristián Hernández

Invertec IGT, Román Díaz 1271, Santiago, Chile.

Vera L.M. Huszar

Museu Nacional, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 21940-540, Brasil.

Néstor Lagos

Laboratorio de Bioquímica de Membrana, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70005, Santiago, Chile.

Jacob Larsen

IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca.

Américo López

Laboratorio de Toxinas Marinas, Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Independencia 1027, Casilla 70005. Santiago 6530499, Chile.

Valeria F. Magalhaes

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco H, Rio de Janeiro, RJ, 21949-590, Brasil.

Ana Martínez

Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas, Estación Marítima s/n, Aptdo. 90, 36208 Vigo, España.

Silvia Méndez

Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Constituyente 1497, (CP11200), Montevideo, Uruguay.

Mariângela Menezes

Museu Nacional, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 21940-540, Brasil.

Áurea Míguez

Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas, Estación Marítima s/n, Aptdo. 90, 36208 Vigo, España.

Øjvind Moestrup

University of Copenhagen, Botanical Institute, Øster Farimagsgade 2 D, DK - 1353 Copenhagen K, Dinamarca.

Nora Montoya

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

Rubén Negri

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

Clarisse Odebrecht

Fundação Universidad Federal do Rio Grande. Caixa Postal 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil.

Hernán Pacheco

Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

Gemita Pizarro

Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

Luís A.O. Proença

Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Terra e do Mar, Caixa Postal 360, Itajaí, SC, 88302-202, Brasil.

Beatriz Reguera

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36280 Vigo, España.

Leonardo R. Rörig

Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Terra e do Mar, Caixa Postal 360, Itajaí, SC, 88302-202, Brasil.

Silvia E. Sala

Departamento Científico Ficológia, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

Norma Santinelli

Laboratorio de Hidrobiología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia. Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas. Centro Nacional Patagónico. CONICET. 9100 Trelew, Chubut, Argentina.

Eugenia A. Sar

Departamento Científico Ficológia, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

Viviana Sastre

Laboratorio de Hidrobiología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia. Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas. Centro Nacional Patagónico. CONICET. 9100 Trelew, Chubut, Argentina.

Benjamín A. Suárez Isla

Laboratorio de Toxinas Marinas, Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Av. Independencia 1027, Casilla 70005. Santiago 6530499, Chile.

Denise R. Tenenbaum

Instituto de Biología, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco A, Rio de Janeiro, RJ, 21949-900, Brasil. y Departamento de Oceanografía, Instituto de Geociências, Universidad do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, sala 4020 E, Rio de Janeiro, RJ, 20550-900, Brasil.

Maria Célia Villac

Instituto de Biología, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco A, Rio de Janeiro, RJ, 21949-900, Brasil.

João S. Yunes

Fundação Universidad Federal do Rio Grande. Caixa Postal 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil.

Takeshi Yasumoto

Japan Food Research Laboratories, 6-11-10 Nagayama, Tama-Shi 206-0025, Japón.

LISTADO DE REVISORES**M. Josephe Chretiennot-Dinet**

Observatoire Oceanologique de Banyuls. Laboratoire Arago. UMR 7621, B.P. 44. Banyuls sur Mer 66651, Francia

M^a Luisa Fernández

Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas. Apto. 90, 36271 Vigo, España.

Martha E. Ferrario

Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

Santiago Fraga

Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apto 1552, 36280 Vigo, España.

José M. Franco

Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC). Eduardo Cabello, 6. 36080 Vigo, España.

Silvia Méndez

Instituto Nacional de Pesca. Constituyente 1497, CP11200, Montevideo, Uruguay.

Yolanda Pazos

Centro de Control da Calidade do Medio Mariño. Peirao de Vilaxoán s/n. Villagarcía de Arosa, Pontevedra 36611, España.

Beatriz Reguera

Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apto 1552, 36280 Vigo, España.

Eugenia A. Sar

Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

Alicia Seltzes

Cátedra de Fisiopatología. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Mercedes Vieytes

Facultad de Veterinaria, Departamento de Fisiología. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo 27002, España.

Timothy Wyatt

Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Eduardo Cabello, 6, 36208 Vigo, España.

**PARTE I. SEGUIMIENTO DE MICROALGAS
NOCIVAS Y ANÁLISIS DE FICOTOXINAS**

CAPÍTULO 1: ESTABLECIMIENTO DE UN PROGRAMA DE SEGUIMIENTO DE MICROALGAS TOXICAS

BEATRIZ REGUERA

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36280 Vigo, España.

INTRODUCCION	21
MAREAS ROJAS INOCUAS/NOCIVAS/TÓXICAS Y OTROS EPISODIOS DE MICROALGAS TÓXICAS	22
FLORACIONES ALGALES NOCIVAS Y EPISODIOS DE MICROALGAS TÓXICAS EN EL CONO SUR AMERICANO	25
OBJETIVOS DE LOS PROGRAMAS DE SEGUIMIENTO DE MICROALGAS TÓXICAS: IDENTIFICACION DE PRIORIDADES	28
Objetivos Prioritarios del Seguimiento	29
1.1 Protección de la Salud Pública	29
1.2 Protección de los cultivos de peces y del mercado de moluscos bivalvos u otros recursos: alerta temprana de los episodios.	32
1.2.1 PROTECCIÓN DE LOS CULTIVOS DE PECES	32
1.2.2 PROTECCIÓN DE LAS EXPLOTACIONES DE MOLUSCOS	32
1.2.3 PROTECCIÓN DE OTROS RECURSOS MARISQUEROS	34
1.3 Adquisición de poder de predicción sobre los episodios tóxicos	34
IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AGENTES DE EPISODIOS TÓXICOS: TEST DE TOXICIDAD	37
1. Análisis de los mariscos	37
2. Análisis de toxicidad del fitoplancton	38
3. Aislamiento y cultivo de especies sospechosas. Determinación de su perfil de toxinas	39
4. Comparación de los resultados de determinación de toxinas	39
MÉTODOS DE MUESTREO DE FITOPLANCTON	40
Cubos y Mallas	41
Redes de Plancton	41
Botellas oceanográficas	42
Mangueras	42
MUESTREO DE MICROALGAS BENTÓNICAS	44
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS, ALMACENAMIENTO Y PROCESADO DE LOS DA- TOS	44
Análisis Cualitativo de las Muestras de Red	44
Análisis Cuantitativo de las Muestras	45

Almacenamiento de los Datos y Análisis de Resultados	45
DISEÑO DE LA RED DE MUESTREO DE FITOPLANCTON/DATOS AMBIENTALES	46
USO DE TECNOLOGÍAS AVANZADAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	47
Muestreadores Continuos y Boyas Oceanográficas	47
Sensores Remotos	47
Sondas Moleculares y Celulares	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXO I	53

ESTABLECIMIENTO DE UN PROGRAMA DE SEGUIMIENTO DE MICROALGAS TOXICAS

BEATRIZ REGUERA

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36280 Vigo, España.

INTRODUCCION

Las floraciones algales, en sentido estricto, o «mareas rojas» son discoloraciones del agua visibles a simple vista y debidas a proliferaciones de microorganismos planctónicos pigmentados (microalgas, ciliados, bacterias) que alcanzan concentraciones del orden de $10^6 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fig. 1). En sentido amplio, el término «Floraciones Algales Nocivas» (en inglés «Harmful Algal Blooms» o su acrónimo HAB) ha sido acuñado por la COI (Comisión Oceanográfica Intergubernamental) de la UNESCO para designar las apariciones de un heterogéneo grupo de microorganismos que son percibidas como dañinas por el hombre por sus efectos adversos en la salud humana, en las explotaciones de acuicultura y turísticas de zonas costeras y en las poblaciones naturales de organismos marinos. Si bien el término se inspiró en las manchas de dinoflagelados planctónicos, hoy día se aplica a cualquier población microalgal, ya sea planctónica o bentónica, incluso aunque las concentraciones celulares no sean muy elevadas, siempre y cuando su aparición conlleve un efecto nocivo. «Floraciones de Algas Nocivas» (FAN en Sudamérica), pues, no es un término científico, sino un término operativo que es hoy día ampliamente aceptado por la comunidad de científicos y por los gestores sanitarios y medioambientales. El mismo término se empleó para denominar el programa internacional de la COI, aprobado por el Panel Intergubernamental sobre Floraciones de Algas Nocivas (IPHAB) en junio de 1992 (Anónimo, 1992).

En las dos últimas décadas hemos sido testigos de un incremento *aparente*, en intensidad, duración y distribución geográfica, de las FAN. Debemos decir que el incremento es aparente, pues para probar con rigor científico que el incremento es real, se requieren series históricas de datos de fitoplancton y de condiciones ambientales de las que se dispone en muy pocas partes del mundo. Con frecuencia se asocia la «primera aparición» de una especie tóxica en



Fig. 1. Marea roja de *Noctiluca scintillans* desarrollada en las costas de San Sebastián (Golfo de Vizcaya, España) en mayo de 1988 tras un período de intensas lluvias (Foto cedida por J. Urrutia, Servicio de Investigación Oceanográfica del País Vasco).

una región del mundo con la aparición de un evento excepcionalmente virulento. Se ignora, en estos casos, la posibilidad de que la misma especie existiera con anterioridad en niveles moderados no asociados a eventos tóxicos, o en concentraciones que hubieran conferido a los mariscos niveles moderados o bajos de toxinas que habrían pasado desapercibidos al no existir programas de vigilancia. Los datos de regiones que disponen de una serie histórica de observaciones (10-50 años) confirman que puede haber una

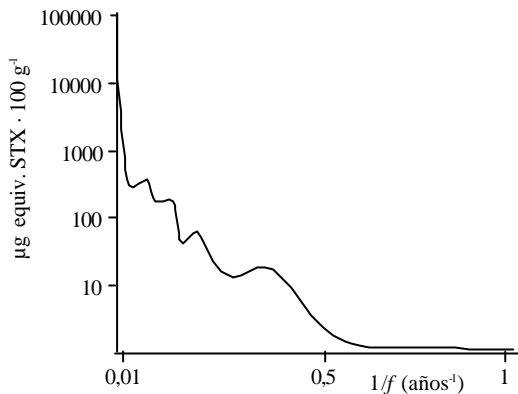


Fig. 2. Posible relación empírica entre la intensidad de los episodios tóxicos (I en $\mu\text{g equiv. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y la inversa de su frecuencia ($1/f$ en años $^{-1}$).

relación de uno o varios órdenes de magnitud entre el número de eventos en los que se detecta la presencia de especies tóxicas en cantidades muy bajas (niveles de toxinas detectables por HPLC) y aquellos en los que las concentraciones son suficientes para conferir niveles de toxinas detectables por bioensayos de ratón ($\geq 38 \text{ mg equiv. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne en el caso de toxina paralizante); y a su vez entre el número de estos últimos y el de episodios excepcionales acompañados de víctimas humanas. La relación entre virulencia de los episodios y su frecuencia podría representarse gráficamente como una curva polimodal (Fig. 2) similar a las empleadas para representar la frecuencia y magnitud de terremotos.

En la era de la información, la creciente sensibilización de la opinión pública ante temas ecológicos y sanitarios, el efecto halo de los medios de comunicación, y la exigencia de controles cada vez más rígidos impuestos por la ley, tales como las directivas europeas (Council EC, 1991, 1997, 2002) y las de la Agencia para los Alimentos y las Drogas (FDA) en Estados Unidos, para detectar la presencia de toxinas en los mariscos, han contribuido a poner en evidencia eventos tóxicos que probablemente existían desde antaño y pasaron desapercibidos. El símil del canario enjaulado, empleado en las galerías mineras como «bioensayo» para detectar la presencia de emanaciones de gases tóxicos, es fácilmente extrapolable a los episodios de algas nocivas que causan la muerte de peces: la presencia de los vertebrados, en ambos ejemplos, pone en evidencia un peligro que ya existía. En algunas partes del mundo los primeros registros de FAN han aparecido tras la instalación de cultivos de peces y en otras, con la llegada a la zona de un fitoplanctólogo experto en FAN, o con la pue-

ta en marcha de un programa de vigilancia del medio costero. Pero nadie cuestiona que hay una creciente presión antropogénica sobre el litoral. Además de la propia presión demográfica, el desarrollo de la acuicultura y del sector turístico; aportes de tipo agropecuario, urbano e industrial; dragados y otras obras de ingeniería portuaria; transportes de aguas de lastre de los barcos en recorridos cada vez más rápidos de un extremo a otro del planeta, etc., y que todos estos factores influyen en la composición del fitoplancton, pueden favorecer el desarrollo masivo de especies oportunistas capaces de acarrear problemas diversos por exceso de biomasa (eutrofización, distrofia, etc.), y en algunos casos propiciar el incremento en intensidad y/o duración de las proliferaciones de algunas especies de microalgas tóxicas.

MAREAS ROJAS INOCUAS/NOCIVAS/ TÓXICAS Y OTROS EPISODIOS DE MICROALGAS TÓXICAS

Las *mareas rojas* son discoloraciones (alocromías *sensu* Balech) del agua del mar causadas por elevadas concentraciones de microorganismos planctónicos pigmentados. Cuando confieren al agua una tonalidad rojiza, se emplea el término de origen griego *hemotalasia*. Estas manchas son inofensivas en la mayor parte de los casos si se dan en zonas con una buena tasa de renovación de agua, o en zonas no dedicadas a la producción marisquera o a la piscicultura, pero son consideradas como muy nocivas en zonas turísticas y pueden crear alarma social innecesaria si las autoridades sanitarias y los consumidores no están bien informados. Tal fue el caso con la espectacular mancha de *Noctiluca scintillans* en mayo de 1988, formada en las costas de San Sebastián (País Vasco, costa Cantábrica española) (Fig. 1) tras intensas lluvias, que colapsó la venta de pescado y otros productos marinos en la ciudad durante una semana. No obstante, una floración de idéntica composición podría resultar nociva si apareciera en una zona de escasa circulación, o dedicada a cultivos de peces en jaulas.

Las *mareas rojas tóxicas* son discoloraciones de microalgas productoras de potentes venenos o toxinas endocelulares. Se trata de *mareas rojas ictiotóxicas* si liberan al medio exotoxinas con propiedades hemolíticas o neurotóxicas, que causan mortandades de peces y otros organismos marinos, como ocurre con las floraciones de *Prymnesium* (Moestrup, este volumen), *Chrysochromulina polyplepis* (Dahl

et al., 1989) y *Karenia mikimotoi* (Gentien & Arzul, 1990).

Algunas microalgas producen toxinas tan potentes, que pueden resultar dañinas aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas que discoloren el agua. Bastan unos pocos cientos (o miles, según la especie) de células por litro para que los mariscos adquieran niveles de toxinas que sobrepasan los límites legales establecidos como nivel de regulación. Definiremos como **episodios de microalgas tóxicas** aquellos eventos en los que la presencia de microalgas en concentraciones moderadas (no causantes de discoloraciones) confieren niveles de toxinas a los moluscos tales que pueden constituir un peligro para la salud, y obligan a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización. Los mariscos tóxicos pueden transmitir estas sustancias a niveles superiores de la cadena trófica, actuando como vectores que dan lugar a los tristemente célebres síndromes de «intoxicación por marisco», que afectan a los vertebrados y al hombre. En la Fig. 3 se presenta un esquema de los niveles de concentración celular de microalgas tóxicas planctónicas a partir de los cuales se comienzan a detectar toxinas en los mariscos sin que este suceso se vea necesariamente acompañado de discoloraciones.

Los síndromes tóxicos más conocidos causados por microalgas son la «Intoxicación Paralizante por Marisco» (*Paralytic Shellfish Poisoning* = PSP), la «Intoxicación Diarreica por Marisco» (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* = DSP), la «Intoxicación Amnésica por Marisco» (*Amnesic Shellfish Poisoning* = ASP) y la «Intoxicación Neurotóxica por Marisco» (*Neurotoxic Shellfish Poisoning* = NSP). En el Cono Sur se emplean a menudo los acrónimos que se refieren a las toxinas causantes de los distintos síndromes: VPM/TPM (Veneno o Toxina Paralizante de Marisco, o molusco), VDM/TDM (Veneno o Toxina Diarreica de Marisco, o molusco) y VAM/TAM (Veneno o Toxina Amnésica de Marisco, o molusco). Aunque los acrónimos anglosajones (PSP, DSP, ASP etc) resultan a veces poco precisos, pues se emplean para designar tanto a los síndromes como a las toxinas que los ocasionan, quizás convendría que todos los utilizáramos mientras no se acuerde una terminología única entre los iberoamericanos. En la terminología popular se confunden con frecuencia los distintos términos. En Galicia (España), la prensa local habla de que hay «marea roja» o «purga de mar», aunque no haya rastro de discoloración en el

agua, cada vez que se prohíbe la comercialización de moluscos en alguna zona de la costa por haberse detectado niveles de toxinas en los moluscos que los convierten en no aptos para el consumo humano.

Un buen ejemplo de episodio de microalga tóxica, que puede provocar el síndrome con bajas concentraciones celulares ($10^2 - 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) lo constituyen los episodios de DSP asociados a la ocurrencia de concentraciones moderadas de dinoflagelados del género *Dinophysis* (Reguera *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1998). Además de los moluscos, las toxinas microalgales pueden ser acumuladas por el zooplancton (Maneiro *et al.*, 2000) y en niveles subletales en las vísceras de peces planctívoros. La posterior transferencia de niveles subletales de toxinas, a través de pequeños organismos pelágicos, a niveles superiores de la red trófica puede causar mortandades de mamíferos marinos, como fue el caso de las muertes de leones marinos tras ingerir alimento portador de toxinas amnésicas (Scholin *et al.*, 2000).

Algunos episodios se podrían ajustar a más de una de las definiciones anteriores. Así, las intensas floraciones de *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve* = *Ptychodiscus brevis*) en el Golfo de México son mortíferas de peces; simultáneamente, las brevetoxinas contenidas en las células son acumuladas por los mariscos, causando NSP; además, las células y/o los productos excretados por éstas, son dispersados en el aerosol formado con el batir de las olas en la línea de playa, causando irritación en las vías respiratorias de las personas que lo inhalan. Las floraciones de *Alexandrium minutum* son agentes de episodios de PSP. Pero no sólo las microalgas, sino también el medio donde se desarrollan puede

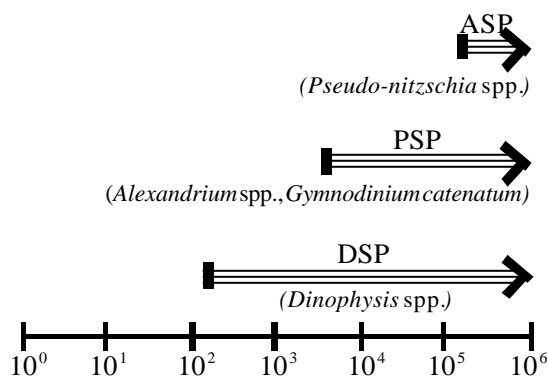


Fig. 3. Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.

resultar tóxico. Se ha demostrado que el filtrado de los cultivos de *A. minutum* inhibe el crecimiento de otros flagelados (Blanco & Campos, 1988), y es tóxico para el copépodo *Euterpina acutifrons* (Bagoien *et al.*, 1996) y para *Artemia salina* (Lush & Hallegraef, 1996), así como para las fases larvares y juveniles de algunos peces (Lush *et al.*, 1998). Estos últimos autores encontraron que la actividad de los «bloqueadores del canal de sodio» (SCB) era más del doble en el filtrado del cultivo que en el interior de las propias células de *A. minutum*. Durante una floración de esta especie en Alejandría (Egipto), la ciudad que le dió el nombre, se registraron mortandades de peces del medio natural y de los del acuario de la ciudad, que utilizaba agua de mar filtrada del medio circundante (Halim & Labib, 1996).

En ocasiones, pueden ocurrir **intoxicaciones de origen desconocido**, es decir, presencia de toxinas en los moluscos que no se pueden asociar con la presencia de especies tóxicas conocidas en el plancton. Algunas de estas incógnitas han podido ser resueltas *a posteriori* con la mejora de las técnicas analíticas de separación e identificación de nuevos compuestos, como el caso de la intoxicación por azaspirácidos (AZP, recientemente regulado en una directiva de la UE) en los bivalvos irlandeses, que se ha relacionado con grandes dinoflagelados heterótrofos del género *Protoperdinium* (Yasumoto, datos no publ.). En otras ocasiones podemos oír hablar de **intoxicaciones de origen bentónico**, si se sospecha que la fuente de toxicidad es un organismo que vive en el fondo marino o adherido a sustratos sólidos, como es el caso de los dinoflagelados bentónicos del género *Prorocentrum*, productores de toxinas diarreas, o los del género *Ostreopsis*, productores de toxinas neurotóxicas o hemolíticas (como la palytoxina), o los quistes de dinoflagelados planctónicos. La Ciguatera, síndrome tóxico que se da tan sólo en regiones tropicales con arrecifes coralinos, es un caso especial de intoxicación de origen bentónico que se transmite por los peces que han ingerido materia vegetal sobre la que crecen dinoflagelados bentónicos tales como *Gambierdiscus toxicus*. Otro caso especial es el de *Pfiesteria piscicida* (Burkholder *et al.*, 1992), dinoflagelado de complejo ciclo vital polimórfico, que causa muertes masivas de peces y afecta a los humanos que inhalan el spray formado alrededor de sus tanques de cultivo.

Existen, por último, **mareas rojas nocivas**, es decir, mareas rojas de microalgas no tóxicas pero que

pueden causar daños a los organismos marinos o perjuicios socioeconómicos. En general, cualquier especie fitoplanctónica que alcance densidades formadoras de manchas constituye un peligro potencial para los peces cultivados en jaulas flotantes o para los organismos bentónicos si:

- posee apéndices espinosos, como *Dictyocha speculum* y algunas especies de *Chaetoceros* del grupo Phaeoceros, que erosionan físicamente e irritan las agallas de los peces, aumentando el riesgo de infecciones patógenas;
- segrega sustancias mucilaginosas (como las floraciones de *Phaeocystis* spp., *Gymnodinium impudicum*) que vuelven viscosa al agua de mar y afectan al sistema filtrador/branquial de los organismos, u ocasionan acumulaciones de espuma en las playas;
- alcanza densidades tan elevadas que puede hacer variar bruscamente los niveles de oxígeno disuelto o el pH del medio; o por su elevada biomasa compete por los nutrientes y hace disminuir la penetración de luz, afectando negativamente a los productores primarios bentónicos;
- no es consumida por los herbívoros y al morir libera niveles importantes de amonio, o causa fermentaciones en el fondo.

Un buen ejemplo de marea roja nociva son las espectaculares manchas de *Noctiluca scintillans* (Fig. 1), que pueden crear alarma social y afectar al sector turístico aunque no haya ningún daño real asociado. Sin embargo, manchas de la inocua *Noctiluca* han causado mortandades de peces cultivados en Japón al desarrollarse en zonas poco dinámicas y liberar altos niveles de amonio al decaer la floración. Las floraciones de *Coscinodiscus wailesii* agotan los nutrientes del medio, causan una disminución de la transparencia y constituyen una amenaza para los cultivos de la macroalga *Porphyra* sp. («nori») en Japón, y en la fase de declive y sedimentación se han asociado a necrosis de corales en regiones tropicales. El «mare sporco» italiano, una ingente producción de fitoplancton con gran secreción de compuestos mucilaginosos (Herndl, 1992), causó pérdidas millonarias en el sector turístico de las costas de Emilia Romagna (noroeste del Mar Adriático) en 1989, y produjo atascos en las agallas de los peces y daños a la flora y fauna silvestre. El color pardo-verdoso de las manchas, totalmente inocuas, del pequeño dinoflagelado *Alexandrium taylorii* en algunas playas de Cataluña (España), en el Mediterráneo occi-

dental (Garcés *et al.*, 1998), es interpretado (erróneamente) por los turistas como una señal de contaminación y de aportes de aguas residuales; el abandono de las playas con manchas por los visitantes estivales causa así importantes pérdidas de ingresos a los pequeños hoteles de la zona. Las floraciones de *Chaetoceros concavicornis* han provocado mortandades de poblaciones naturales o de salmones en jaulas en la costa noroeste de Estados Unidos por la fricción mecánica de las setas espinosas de esta diatomea, que irritan las agallas, provocan segregación de mucus y acarrear hipoxia en la sangre de los peces (Bell, 1961; Rensel, 1993).

La experiencia de los últimos 15 años nos enseña que no se debe considerar nunca cerrada la lista de especies potencialmente tóxicas/nocivas de una región. El episodio de *Chrysochromulina polylepis* («algas asesinas») en Escandinavia (Dahl *et al.*, 1989; Underdahl *et al.*, 1989), los brotes de intoxicación amnésica (ASP) en Canadá (Bates *et al.*, 1989), y las espectaculares mortandades de peces causadas por proliferaciones de *Pfiesteria piscicida* en Chesapeake Bay (EEUU) (Burkholder *et al.*, 1992) constituyen buenos ejemplos de especies cuya peligrosidad no se puso de manifiesto hasta hace poco más de una década a pesar de tener lugar en regiones del mundo con una larga historia previa de estudios fitoplanctónicos. A finales de la década de los 90, y en paralelo con grandes avances tecnológicos para la separación y cuantificación de toxinas, hemos sido sorprendidos con la identificación del dinoflagelado *Gonyaulax grindleyi* (= *Protoceratium reticulatum*) como productor de yesotoxinas (Satake *et al.*, 1997; MacKenzie *et al.*, 1998) y de *Alexandrium ostendfeldii* como productor de un nuevo grupo de toxinas, los espirólidos (Cembella *et al.*, 1998). Los azaspirácidos, otro nuevo grupo de toxinas polietéreas detectadas en moluscos irlandeses, se localizaron finalmente en el interior de grandes dinoflagelados heterótrofos del género *Protoperdinium*, como *P. crassipes* y *P. depressum* (Yasumoto, datos no publ.). Se desconoce si son producidos por estos dinoflagelados o si por el contrario se trata de una acumulación de toxinas procedentes de una presa no identificada. La presencia de ácido okadaico en los mejillones de Nueva Escocia (Canadá) no se ha podido correlacionar con las poblaciones de *Dinophysis* spp., y Lawrence *et al.* (1998, 2000) han presentado evidencias que sugieren que el agente de esta toxicidad es el dinoflagelado bentónico

Prorocentrum lima, que crece como epífito en macroalgas asociadas a las cuerdas de batea, y puede ser ingerido por los mejillones al ponerse en suspensión en la columna de agua en períodos de fuerte turbulencia. La descripción reciente de nuevas toxinas polietéreas, causantes de episodios que se clasificaban como de «toxicidad de origen desconocido» ha dado lugar, finalmente, a una profunda modificación (Council EC, 2002) de la vaga y difusa Directiva 91/492 (Council EC, 1991) en lo referente a toxinas «diarreicas».

FLORACIONES ALGALES NOCIVAS Y EPISODIOS DE MICROALGAS TÓXICAS EN EL CONO SUR AMERICANO

Los problemas más graves de origen ficotóxico acaecidos en el Cono Sur, desde el punto de vista de las autoridades sanitarias y pesqueras, pertenecen a los definidos como «episodios de microalgas tóxicas», es decir, eventos en los que, sin alcanzarse necesariamente concentraciones que colorearan el agua, han causado graves intoxicaciones humanas y prolongadas prohibiciones a la extracción y comercialización de los moluscos. Les siguen en gravedad las floraciones de microalgas mortíferas que han causado ingentes pérdidas económicas a los cultivadores de salmón. Y aunque las cianobacterias de aguas continentales no constituyen un objeto de estudio en este volumen, no hay que olvidar el grave suceso de Caruaru (Brasil), donde numerosos pacientes renales sometidos a diálisis murieron de intoxicación por sustancias hepatotóxicas segregadas por cianobacterias que habían desarrollado densas floraciones en los embalses de agua (Jochimsen *et al.*, 1998).

Las mareas rojas en el Cono Sur Americano, al igual que en otras regiones del mundo, se han citado al menos desde la época de las grandes campañas oceanográficas del siglo XIX. Avaria (1979), en su revisión de episodios en las costas chilenas, cita las observaciones de Sir Charles Darwin, quien a bordo del B.O. «Beagle» observó «franjas de agua color fango, que vistas al microscopio bullían de pequeños animáculos», posteriormente interpretados por Hart, en 1943, como *Mesodinium rubrum*. Hoy día sabemos que los frentes marinos, las células de circulación de Langmuir y otras zonas de convergencias constituyen lugares óptimos para la acumulación de organismos planctónicos nadadores que de esta forma originan manchas y franjas que colorean el mar.

Tabla 1: Principales especies microalgales asociadas con la aparición de eventos tóxicos en el Cono Sur Americano (Información tomada de Anónimo 1994, 1995 y de los otros capítulos de este volumen).

	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	COMENTARIOS
PSP	<i>Alexandrium catenella</i>	Sur de Chile (Regiones X-XII) Canal de Beagle	Principal agente de episodios de PSP en Chile. Causante de víctimas humanas
	<i>Alexandrium tamarense</i>	Argentina (costa Marplatense y Patagonia) y Uruguay.	Principal agente de PSP en Argentina y Uruguay. Causante de víctimas humanas.
	<i>Alexandrium fraterculus</i>	Sur de Brasil, estuario de La Plata	Sospechoso de causar episodios PSP en Uruguay. Toxicidad no demostrada
	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Sur de Brasil, Uruguay, norte de Argentina	Agente de episodios moderados de PSP en Uruguay y Argentina
DSP	<i>Dinophysis acuta</i>	Región de los fiordos chilenos	Principal agente de DSP en Chile
	<i>Dinophysis acuminata</i>	Todo el Cono Sur	Asociado con episodios de DSP en Uruguay, y con presencia de toxinas diarreicas en Brasil y norte de Argentina
	<i>Dinophysis caudata</i>	Sur de Brasil, Uruguay	Asociado con presencia de toxinas diarreicas en Brasil y Uruguay
ASP	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	Chile, norte de Argentina	Agente de episodios ASP en Chile; asociado con presencia de toxinas ASP en Argentina
	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Todo el Cono Sur	Toxinas detectadas en cultivos de cepas chilenas
Mortandad de Organismos Marinos	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Fiordos chilenos	Muertes masivas de salmones en Chile
	<i>Karenia cf mikimotoi</i>		
	<i>Fibrocapsa japonica</i>	Sur de Brasil	Mortandad de peces
Microcistinas y Hepatotoxinas	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Aguas continentales y lagunas costeras de Brasil	Muertes humanas. Intoxicación de organismos marinos.
	<i>Synechocystis aquatilis</i>	Sur de Brasil	Mortandad de peces

Por ello, abundan las citas de manchas de dinoflagelados (*Prorocentrum micans*, *Noctiluca* spp.) y ciliados (*Mesodinium rubrum*) observadas durante campañas oceanográficas en la región de afloramiento (surgencia) del Perú y norte de Chile, y en zonas frontales de la plataforma Argentina. No existen pruebas de que estas mareas rojas fueran tóxicas, pero en ocasiones se han asociado con las «arribazones» de peces muertos (por causas desconocidas) en playas de la región del Callao (Perú).

Carreto & Benavides (1993) citaron la existencia de archivos históricos en Argentina que mencionan mortandades en las poblaciones indígenas de Ushuaia, causadas por consumo de mariscos, desde 1886. En el sur de Chile se comenta que los patagones y mapuches realizaban auténticos «bioensayos» con sus gatos, o que observaban si las aves marinas estaban consumiendo moluscos antes de atreverse a hacer lo propio.

En la Tabla 1 se presenta una lista de las principales especies de microalgas nocivas en el Cono Sur. Estas especies han sido identificadas, en algunos casos, como los agentes inequívocos de los eventos tóxicos. En otros casos, su proliferación ha sido asociada con la ocurrencia de un evento tóxico, pero queda pendiente la demostración inequívoca de su toxicidad tras el aislamiento de las cepas, establecimiento de cultivos monoalgales y posterior análisis de los extractos celulares.

Los primeros casos de víctimas humanas registrados en tiempos recientes, presumiblemente por PSP, se dieron en 1970 (Avaria, 1979) y en 1972, año en que estos brotes tóxicos se asociaron a la ocurrencia de *Alexandrium* (= *Gonyaulax*) *catenella* en la región de Magallanes de la Patagonia chilena (Guzmán & Campodonico, 1975). A partir de 1980 comienzan los informes de virulentos episodios de PSP asociados a la ocurrencia de *Alexandrium tamarense* (= *Gonyaulax tamarensis/excavata*) en las costas de la Patagonia Argentina, donde se registraron valores de 50000 µg equiv. STX · 100 g⁻¹ de carne (Carreto *et al.*, 1981). A partir de esta fecha, *A. tamarense* parece haber expandido su área de distribución a toda la plataforma continental argentina (Carreto *et al.*, 1985, 1993, 1998), donde es el causante de episodios de PSP en primavera (octubre-diciembre). En 1991 ocurrió un episodio de PSP, asociado a una proliferación de *A. catenella*, en el que se alcanzaron concentraciones récord de hasta 127200 µg equiv. STX · 100 g⁻¹ de carne en el Canal de Beagle (Carreto & Benavides, 1993; Benavides *et al.*, 1995). Estos extraordinarios niveles de PSP parecen haber remitido en los últimos años en Magallanes (Guzmán *et al.*, este volumen), pero datos recientes parecen indicar cambios mesoescales en la distribución de *A. catenella*. Los principales focos de toxicidad tipo PSP asociados con esta especie se han desplazado hacia el norte, afectando a Aysén (XI Región) a partir de 1995 (Tocornal, datos no publ.) y más recientemente a Los Lagos (X Región), la zona de mayor producción marisquera y de cultivos marinos de Chile, que no conocía estos episodios (Clément, datos no publ.). *Gymnodinium catenatum*, agente de episodios PSP en Galicia y Portugal (NE Atlántico), en la costa Pacífica Centroamericana, y en Tasmania, ha sido señalado como el agente de episodios PSP en las costas de Uruguay (Méndez *et al.*, 1993a, 1993b), y de moderados episodios otoñales de PSP en las costas marplatenses (Akselman *et al.*, 1998). Recientemente ha sido iden-

tificado como agente de PSP en Santa Catarina, en la costa sur de Brasil (Proença *et al.*, en prensa). *Alexandrium tamarense* también se cita como especie asociadas a la ocurrencia de saxitoxinas en Uruguay y sur de Brasil, pero el carácter tóxico de *Alexandrium fraterculus* en la misma zona no ha podido ser demostrado.

Las primeras intoxicaciones de tipo diarreico, en la X Región chilena, se observaron en 1970 y 1971 (comun. pers. de J. Hermosilla, citado en Guzmán & Campodonico, 1975). Los científicos chilenos fueron los pioneros en asociar una densa floración de *Dinophysis* spp. con la ocurrencia de desórdenes gastrointestinales en los consumidores locales de Puerto Montt, cuando aún no había sido descrito el síndrome de intoxicación diarreica por bivalvo (Yasumoto *et al.*, 1978), ni se había identificado a *Dinophysis fortii* como el agente de estos episodios. Las distintas especies de *Dinophysis*, potenciales productores de toxina diarreica, están bien representadas en todo el Cono Sur. Tras el informe de Guzmán & Campodonico (1975), *Dinophysis acuta* ha sido señalada repetidas veces como el agente de episodios de DSP en la X región chilena (Lembeye *et al.*, 1981 y 1993). Curiosamente *Dinophysis acuminata*, asociada a episodios diarreicos en Uruguay (Méndez *et al.*, 1993 b) y Brasil (Proença *et al.*, en prensa), y principal agente de episodios de DSP en la costa Atlántica europea, no parece conferir toxicidad a los bivalvos en la X Región chilena, ni siquiera durante episodios en los que se registraron concentraciones inusualmente altas (18×10^4 cel · l⁻¹) de esta especie (Clément *et al.*, 1994).

Las diatomeas *Pseudo-nitzschia multi-series* (Ferrario *et al.*, 1999) y *P. australis* (Negri & Inza, 1998; Ferrario *et al.*, 1999) han sido registradas y descritas en la costa norte de Argentina. *P. australis* también ha sido citada en el sur de Chile (Clément, 1995; Suárez *et al.*, este volumen). En años recientes se ha detectado ácido domoico en los bivalvos en Brasil (Proença & Oliveira, 1999), Chile (Suárez *et al.*, este volumen) y Argentina (Carreto *et al.*, este volumen), si bien no siempre las concentraciones detectadas alcanzaron los niveles de regulación.

El flagelado ictiotóxico *Heterosigma akashiwo* («marea café») causó una catástrofe en la próspera industria salmonera de Chile en 1988 (Clément & Lembeye, 1993), causando pérdidas superiores a 2000 t de salmón. Recientemente, una floración de *Gymnodinium* sp. ha vuelto a causar estragos en

esa región (Clément *et al.*, 1999). En diversas ocasiones se han citado floraciones de *Gymnodinium*/*Gyrodinium* spp. asociadas a irritaciones de las vías respiratorias de bañistas en Brasil (Odebrecht *et al.*, este volumen), pero las especies causante de estos trastornos no han sido aún debidamente identificadas. Un buen ejemplo de mareas rojas no tóxicas pero potencialmente nocivas, lo constituyen las floraciones de algunas diatomeas, como *Leptocylindrus minimus* y *Chaetoceros convolutus*, que han causado mortandades en los cultivos de salmón en la X Región chilena (Clément & Lembeye, 1993; Clément, 1994).

En aguas de la plataforma argentina se ha confirmado la transferencia de niveles subletales de toxinas paralizantes a distintos eslabones de la cadena trófica pelágica, tales como el microplancton heterótrofo (Carreto *et al.*, 1986) y peces (Carreto *et al.*, 1993; Montoya *et al.*, 1998), así como casos de mortandades de caballa por estas toxinas (Montoya *et al.*, 1995). Recientemente también se ha observado presencia de toxina amnésica en las anchoítas (Carreto *et al.*, este volumen). Otra observación de interés es la presencia de toxinas PSP en moluscos gasterópodos, como el caracol *Zidona dufresnei* (Carreto *et al.*, 1996), y el «loco» (*Concholepas concholepas*), que lo adquieren tras preñar otros bivalvos vectores de las toxinas.

De la anterior revisión se deduce que ya existe un conocimiento razonable, en gran parte del Cono Sur, sobre la identidad de las principales especies causantes de los distintos síndromes tóxicos y eventos nocivos, su época de aparición, y las zonas de máxima incidencia de los impactos negativos de las floraciones. No obstante, existen aún regiones con alto riesgo de aparición de brotes tóxicos en la Patagonia argentina (Santinelli *et al.*, este volumen), y el sur de Chile (Guzmán *et al.*, este volumen) sobre las que no existe información disponible; en otras sería deseable potenciar las iniciativas de divulgación del problema a la población, para erradicar los casos de desgracias humanas, y aumentar la frecuencia espacio-temporal de los muestreos para optimizar la explotación de los recursos de interés comercial, agilizando las aperturas y cierres de extracción de los moluscos afectados por las toxinas. En los últimos años se han intensificado los programas de seguimiento de microalgas nocivas y ficotoxinas en distintas regiones del Cono Sur, o se han creado programas nuevos, como ha sido el caso en las costas de

Santa Catarina, al sur de Brasil. La introducción de la miticultura en esta región, como alternativa a las pesquerías artesanales, ha exigido el aumento de medidas de control (Proença & Rörig, 1995; Proença *et al.*, 1997). Este incipiente programa de seguimiento ya ha informado de la existencia de niveles moderados de PSP, DSP y ASP en los mariscos, que si bien no alcanzan la virulencia de los registrados en el extremo sur del continente, podrían causar malestares subletales a los consumidores y afectar a la comercialización legal del producto si se alcanzan niveles de toxinas superiores a los niveles regulatorios. En otros países, como Chile y Perú, las exigencias de los importadores (Unión Europea y otros) han conducido a una notable intensificación de los controles de toxinas en los mariscos, y a la aplicación de métodos estándares y establecimiento de niveles regulatorios. Por todo lo expuesto, es previsible que la lista de especies tóxicas y su incidencia en la salud pública y/o en las pesquerías y cultivos marinos del Cono Sur aumenten en los años venideros.

OBJETIVOS DE LOS PROGRAMAS DE SEGUIMIENTO DE MICROALGAS TÓXICAS: IDENTIFICACION DE PRIORIDADES

Antes de establecer un programa de seguimiento de microalgas tóxicas/nocivas es necesario un esfuerzo inicial de sentido común para diseñar un programa que responda a las demandas sociales de la región objeto de estudio y que sea realizable con los medios materiales y recursos humanos disponibles. Las preguntas que se deben plantear con este propósito son:

1. *¿Cuál es el objetivo prioritario del programa de seguimiento?*
 - 1.1. Proteger la salud pública: establecer un sistema de control de ficotoxinas en productos destinados al consumo humano.
 - 1.2. Proteger los cultivos de peces y el mercado de los productos marisqueros: constituir una red de alerta temprana de los episodios tóxico/nocivos.
 - 1.3. Adquirir una capacidad de predicción de la iniciación, duración y desaparición de los episodios.
2. *¿De que recursos se dispone?*

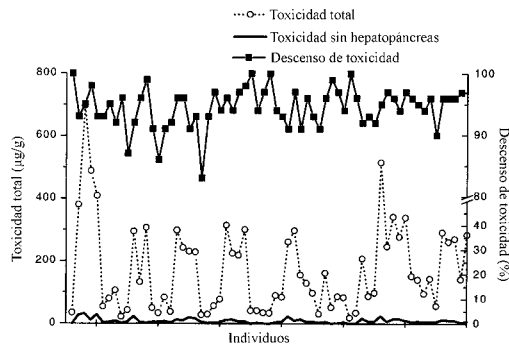


Fig. 4. Variación individual del contenido de toxina amnésica en 65 vieiras de las Rías Gallegas. Porcentaje de descenso de toxicidad en individuos sin hepatopáncreas (Arévalo *et al.*, 1998).

2.1. Embarcación de muestreo y equipamiento científico.

2.2. Personal científico, técnicos y auxiliares.

2.3. Presupuesto inicial y de mantenimiento.

Objetivos Prioritarios del Seguimiento

1.1 Protección de la Salud Pública

Parece obvio que la prioridad número uno de un programa de seguimiento de fitoplancton tóxico, en cualquier región del mundo, es la protección de la salud pública, máxime si existen antecedentes de episodios especialmente intensos que hubieran ocasionado víctimas fatales, como los casos ya mencionados de PSP en el extremo sur de Argentina y Chile. Las autoridades sanitarias deben, pues, asumir como una prioridad la protección de la salud pública mediante el control de la salubridad de los productos marinos destinados al mercado, o de los que se recogen para consumo privado con fines no comerciales. Las zonas costeras con tradición de consumo de marisco silvestre se deben considerar como zonas de riesgo si no existen controles sanitarios. La consecución de este objetivo básico se obtiene mediante el establecimiento de un simple programa de seguimiento de la presencia de ficotoxinas en los bivalvos, mediante bioensayos de ratón (PSP, DSP) o análisis químicos (ASP), aplicando los métodos estándares y estableciendo niveles regulatorios (Fernández & Diogéne, este volumen).

El diseño de la red de muestreo se hará según el recurso a explotar y su distribución. Cualquier producto marino que sea tradicionalmente consumido por la población local o exportado, y que sea susceptible de adquirir toxina, debe ser controlado. Así, en algu-

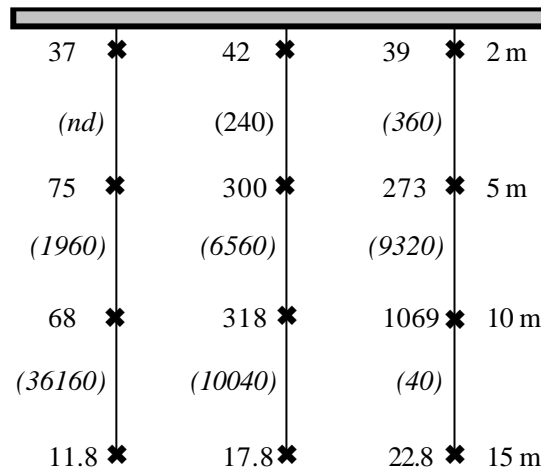


Fig. 5. Distribución vertical heterogénea del contenido de toxinas (μg equiv. STX $\cdot 100\text{g}^{-1}$ de carne) en cuatro profundidades (2, 5, 10 y 15 m) de una cuerda de batea de mejillón de las rías gallegas en tres muestreos semanales sucesivos durante un episodio de PSP causado por *Gymnodinium catenatum* (entre paréntesis, y en cursiva, la concentración en $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en muestras integradas de manguera a 0-5, 5-10 y 10-15 m) en el verano de 1988 (Martínez *et al.*, 1991) (nd = no detectado).

nos países/regiones se consumen moluscos gasterópodos no filtradores pero que pueden ramonear sobre tapices de microalgas bentónicas tóxicas que crecen en las rocas, o caracoles carnívoros que ingieren bivalvos con niveles preocupantes de toxinas. No hay tradición de consumo de erizos de mar en Andalucía (España), pero este producto se recolecta y exporta a Francia, donde los consideran un manjar. Los erizos pueden ramonear sobre microalgas bentónicas tóxicas, y por ello, este producto se somete a controles de presencia de toxinas de origen bentónico (ver National Reports, Spain, en Anónimo, 2001).

En el diseño de una red de muestreo de ficotoxinas son factores importantes a considerar:

- El tamaño de la muestra, que debe ser representativa de la población, ya que puede haber una gran variabilidad entre individuos, o entre rangos de edad de la población (White *et al.*, 1993; Arévalo *et al.*, 1998; ver Fig. 4).
- Si se trata de bivalvos cultivados en cuerdas colgantes de bateas u otro soporte vertical, es esencial tomar muestras a distintas profundidades, pues la heterogénea distribución vertical del fitoplancton tóxico puede verse reflejada en grandes diferencias de contenido de toxinas en los bivalvos de

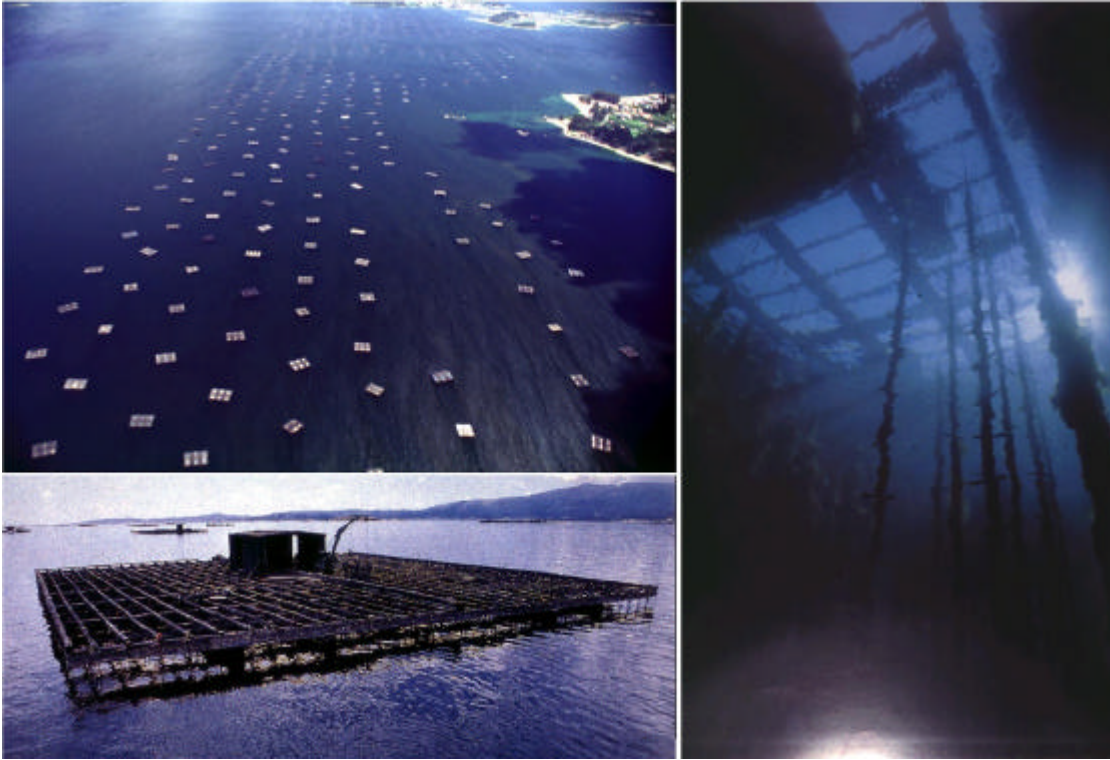


Fig. 6. Cultivo de mejillón en las Rías Gallegas, zona de intensa producción (25×10^4 t anuales), lo que justifica grandes inversiones en programas de seguimiento de fitoplancton tóxico y ficotoxinas. Izda. arriba: Vista aérea de una zona de bateas en la Ría de Arosa Izda. abajo: Batea tradicional de mejillones; Dcha.: Fotografía submarina de las cuerdas de batea cargadas de mejillones. (Fotografías del «Centro de Control do Medio Mariño» de la Xunta de Galicia)

una misma estación de muestreo (Martínez *et al.*, 1991; ver Fig. 5).

- El número de puntos de muestreo, distribución espacial de las estaciones y frecuencia temporal de muestreo se planeará de acuerdo con la heterogeneidad espacio-temporal de las variables oceanográficas en el área de distribución del recurso.
- Los mejillones (*Mytilus* spp.), por su voracidad, suelen escogerse como bivalvo «centinela» porque acumulan, antes que otros filtradores, toxinas por encima del nivel de regulación. Pero una vez detectado el brote tóxico, los análisis habrán de aplicarse a las distintas especies destinadas a consumo humano, ya que la dinámica de intoxicación y detoxificación de los bivalvos presenta una gran variabilidad específica, y durante episodios tóxicos intensos se registran niveles elevados de toxina en prácticamente todos los organismos de la red trófica local (Shumway, 1994).

- Los recursos económicos disponibles para organizar la red de muestreo y el costo del recurso a proteger.

Así, en una pequeña bahía, ría o fiordo, donde la producción de un recurso es muy moderada, el balance entre el análisis de riesgos y la relación Costo/Beneficio puede aconsejar cerrar la extracción de marisco en toda la zona tan pronto como se detecten niveles de toxinas por encima de los niveles regulatorios en algún punto de muestreo. El bajo costo de la producción puede incluso justificar el mantener prohibida la extracción de marisco, y detener los controles de biotoxinas, durante toda la temporada de máximo riesgo de aparición de brotes tóxicos. Por el contrario, en zonas de intensa producción, como es el caso de los cultivos de mejillón en bateas de las Rías Bajas gallegas (Fig. 6), la magnitud del producto extraído (250 000 t anuales) justifica el control de toxinas en múltiples estaciones, con frecuencias de hasta 2-3 veces por semana en la época de mayor incidencia de brotes tóxicos, y el mantenimiento de

zonas «abiertas» y zonas «cerradas» a la extracción dentro de una misma ría, de acuerdo con los datos de toxicidad obtenidos (Mariño *et al.*, 1998). Una cifra razonable puede ser dedicar a la investigación y protección del recurso una cantidad equivalente al 1-2% de su valor de primera venta.

Los episodios de ASP parecen constituir una excepción al caso general de detección de toxinas en los mitílidos flotantes antes que en recursos de fondo. En más de una ocasión se han detectado niveles altos de ASP en los bivalvos del fondo antes de que se detectara en los mejillones. Para explicar esta excepción se pueden considerar distintas hipótesis:

- a) La fuente de toxicidad es una diatomea bentónica no identificada aún como agente tóxico en la localidad (recientemente se ha descrito una diatomea bentónica, *Nitzschia navis-varingica*, productora de ácido domoico en aguas vietnamitas (Kotaki *et al.*, 2000);
- b) Las especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de toxinas presentan su máximo de densidad celular en capas profundas de la columna de agua (por fenómenos de hundimiento, germinación de esporas, agregaciones etc.) no exploradas en los muestreos rutinarios;
- c) Los bivalvos de fondo adquieren la toxicidad por ingestión de paquetes fecales de copépodos u otros organismos filtradores que predaron una floración de *Pseudo-nitzschia* sp.

Las diferencias específicas en la cinética de incorporación y eliminación de toxinas por los bivalvos condujo a Bricelj & Shumway (1998) a clasificar a los bivalvos en «detoxificadores rápidos» (por ej., el mejillón) y «detoxificadores lentos» (por ej., las vieiras). Así pues, la viera (*Pecten maximus*) parece presentar una elevada afinidad por el ácido domoico, y una vez adquiridos niveles de toxinas por encima del nivel regulatorio, puede requerir meses y meses para su eliminación. Este problema ha colapsado las explotaciones de viera de Escocia y de Galicia (ver National Reports en Anónimo, 2001).

Cuando aún no se ha establecido un programa de vigilancia, es de gran ayuda consultar datos epidemiológicos previos, en los registros hospitalarios de la zona, de cuadros clínicos que pudieran interpretarse como intoxicaciones por consumo de mariscos. El examen cuidadoso de estos datos pue-

de permitir la identificación de «zonas rojas» o áreas de máximo riesgo, donde, por causas hidrográficas y/o topográficas, el marisco tiene más probabilidades de volverse tóxico. Es precisamente en estas zonas donde se deben ubicar las «estaciones primarias» del programa de seguimiento, es decir, aquellas muestradas con más frecuencia por ser las que primero avisan. Estas estaciones se deberán suplementar con un número apropiado de «estaciones secundarias» durante la época de máximo riesgo de incidencia de brotes tóxicos, de la que quizás también se encuentren indicios tras el examen de los registros médicos.

Un tema poco controlado en la mayoría de los países es el de salubridad de los moluscos recolectados con fines no comerciales. Merece mención aparte la «Protección Sanitaria del Turista». Es habitual cuando un viajero europeo solicita el visado para viajar a numerosos países ecuatoriales o tropicales, la exigencia de determinadas vacunas o preventivos contra la malaria, tifus, cólera y otras epidemias de origen terrestre. Pero hasta la fecha, nadie advierte a los viajeros de los peligros a que se expone si se le ocurre consumir marisco silvestre, recogido por su cuenta o por otros particulares, que no haya sido sometido a controles sanitarios. En estos casos, a la desgracia humana habría que añadir el impacto negativo en la imagen del país y sus efectos en el turismo. Por ello en zonas de alto riesgo es fundamental el desarrollo de campañas informativas para la población del propio país, como las que se llevan a cabo en la región de Magallanes (Chile), así como para los visitantes a través de embajadas, operadores turísticos, etc. Además de estas iniciativas, es muy operativa la colocación de carteles indicando la prohibición de recolectar mariscos so riesgo de intoxicación, así como de penalización a los posibles infractores. Esta ha sido la práctica habitual en el estado de Maine (EE UU), y en la costa noreste del Reino Unido, ambas regiones expuestas a episodios estacionales de PSP asociados a floraciones de *Alexandrium* spp. Si los riesgos de intoxicación por consumo de mariscos recogidos para el propio consumo se dieran en zonas de poblaciones indígenas iletradas, habría que considerar la preparación de carteles con iconos universales. Un buen ejemplo de programa encaminado a proteger la salud de los consumidores indígenas de mariscos potencialmente tóxicos es el neozelandés «Programa de seguimiento de biotoxinas marinas en marisco recolectado con fines no comerciales» (Hay *et al.*, 2000). El gobierno de este país tuvo en cuenta

la tradición de elevado consumo de marisco por los grupos de la etnia maorí y otras minorías de origen asiático. El principal objetivo del programa era contribuir a que estas minorías alcancen una esperanza de vida similar a la de la población de origen anglosajón.

1.2 Protección de los cultivos de peces y del mercado de moluscos bivalvos u otros recursos: alerta temprana de los episodios.

Una vez asegurada la protección de la salud pública, la siguiente prioridad debería ser la protección de los recursos explotados y su mercado. Si la producción de mariscos (bancos naturales o cultivados) de una región tuviera como principal destino la exportación, los países importadores son con frecuencia los que exigen que se lleve a cabo un control de la presencia de toxinas en estos productos. Incluso pueden exigir que los laboratorios de control acrediten la calidad de sus datos, para lo cual habrán de soportar rigurosas inspecciones sobre la trazabilidad de los resultados de sus análisis. Por desgracia, no es inusual en algunos países la existencia de eficientes programas de control sanitario de los productos marinos destinados a la exportación, que conviven con una ausencia total de control sanitario en los productos dedicados al consumo nacional.

1.2.1 PROTECCIÓN DE LOS CULTIVOS DE PECES

Si el recurso a proteger son cultivos intensivos de peces, como en el caso de salmones estabulados en jaulas flotantes, es esencial el establecimiento de un programa de seguimiento de las poblaciones fitoplanctónicas. Los piscicultores podrían ver arruinada su explotación, en cuestión de días o incluso horas, si no establecen un sistema de alerta temprana de la presencia de especies mortíferas. Además de las especies ictiotóxicas conocidas, tales como *Heterosigma akashiwo*, *Gymnodinium (=Karenia) mikimotoi*, *Gymnodinium* spp., hay que considerar otras especies que aunque no producen toxinas pueden causar la muerte de los peces si alcanzan elevadas biomásas. Aparte de las especies ya mencionadas en la página 23, especies aparentemente libres de sospecha, como la diatomea *Leptocylindrus minimus*, han sido asociadas a mortandades de salmónidos en la X Región de Chile (Clément, 1994; Clément & Lembeye 1993).

Las floraciones de algunas especies productoras de PSP pueden causar problemas adicionales en las

granjas de cultivo intensivo de peces y crustáceos, como los ya mencionados de *Alexandrium minutum*, que afectan tanto a la producción masiva de alimento planctónico, como a las propias larvas y juveniles. En Tumbes (Perú), se han citado mortandades de larvas y postlarvas de langostinos en las plantas de cultivo coincidiendo con la aparición de manchas de flagelados cerca de la toma de agua de los tanques (Anónimo, 1995).

Una vez conocidas las especies problema y su distribución, basados en la propia experiencia o en lo acontecido en otras partes del mundo, la detección precoz y «alerta temprana» sobre la presencia de especies planctónicas potencialmente nocivas permite diseñar planes de contingencia y aplicar estrategias de mitigación, tales como el descenso de las jaulas de peces a profundidades que eviten las manchas de organismos nocivos; arrastre de las jaulas a zonas más seguras; bombeos de agua para formar «cortinas de protección»; cosecha forzada de la producción; protección de los reproductores y los «smolts», etc. Así, durante el grave episodio en 1988 de las «algas asesinas» en Escandinavia, se pudo salvar la vida de muchos salmones cultivados trasladando las jaulas a zonas interiores de los fiordos. Al estudiar la distribución de *Chrysochromulina polylepis* en relación con las variables hidrográficas, y con el apoyo de imágenes satelitales, se comprobó que los máximos celulares se localizaban en aguas más cálidas con salinidad aproximada de 20 psu, por lo que la estrategia adoptada fue el traslado de las jaulas de peces a aguas de menor salinidad (Dahl *et al.*, 1989).

1.2.2 PROTECCIÓN DE LAS EXPLOTACIONES DE MOLUSCOS

Las especies productoras de ficotoxinas (PSP, DSP, ASP) no les causan ningún daño aparente a los bivalvos por lo que el sistema de control ha de evitar que el producto se coseche y comercialice conteniendo concentraciones de toxinas superiores al nivel de regulación. El control básico para evitar esto último coincidirá con el establecido para proteger la salud humana. Si además el programa se complementa con un seguimiento de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas, ello permitirá un sistema de «alerta o aviso temprano» al sector marisquero y a las autoridades sanitarias y pesqueras al detectarse su presencia a bajas concentraciones en relación con la población fitoplanctónica global. También permitirá predecir tiempos de detoxificación

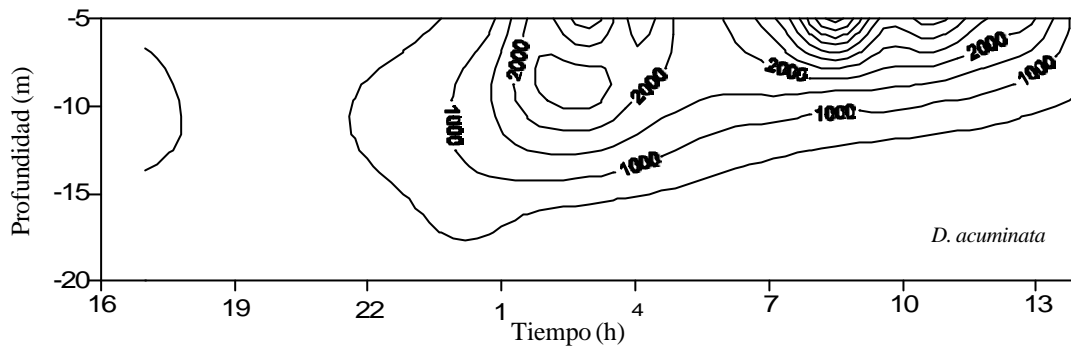


Fig. 7. Heterogeneidad vertical observada en la distribución espacio-temporal de *Dinophysis acuminata* en una estación fija de la Ría de Pontevedra, durante un muestreo intensivo de 24 h en junio de 1994 (Reguera *et al.*, 1996).

del marisco a partir del momento en que dejen de detectarse las especies nocivas (siempre y cuando conozcamos otros factores ambientales que influyen en este complejo proceso).

Los mariscadores podrán extraer el producto y almacenarlo antes de que adquiera niveles de toxinas superiores al límite legal; si el elevado precio del producto compensa el esfuerzo, podrán reubicarlo en zonas de menos riesgo. Si además el sector extractivo se encuentra organizado en cooperativas u otras sociedades, se pueden fijar turnos de extracción, de forma que los productores de zonas de mayor riesgo planeen la cosecha de sus productos en las épocas libres de riesgo, y las zonas que raras veces se ven afectadas por presencia de toxina, se reserven para los momentos peores. El objetivo colectivo en este caso sería que no quede nunca desabastecido el mercado de los productos autóctonos, pues de lo contrario los sectores secundarios (industrias conserveras, de congelación, y de procesado de marisco en general) emplearán marisco de importación, creando malestar entre sus propios paisanos.

En ningún caso la detección precoz de células potencialmente tóxicas puede sustituir a los análisis de detección de toxinas, ni éstos últimos se pueden interrumpir cuando desaparecen las células tóxicas del medio. Las razones, a la luz de los conocimientos actuales, son contundentes:

- Una misma especie microalgal puede presentar cepas tóxicas en una región y cepas no tóxicas en otra. Así, *Dinophysis norvegica* es uno de los principales agente de DSP en Suecia y Noruega, mientras que no se ha podido nunca detectar derivados del ácido okadaico en los análisis cromatográficos de densos concentrados de esta especie en Nueva Escocia (Canadá).

- Pueden ocurrir episodios tóxicos causados por especies que nunca antes habían sido citadas como tóxicas. Ej: la producción de yesotoxinas por *Protoceratium reticulatum* en Nueva Zelanda (MacKenzie *et al.*, 1998); la detección de ácido domoico en la diatomea bentónica *Navicula navis-varingica*.
- La mejora de las técnicas analíticas está revelando «toxinas emergentes» en especies que eran «viejas conocidas», como por ej. los registros recientes de derivados de las pectenotoxinas en *D. fortii* del Adriático (Draisci *et al.*, 1996) y Japón (Suzuki *et al.*, 1998), y en *D. acuta* de Nueva Zelanda (Daiguji *et al.*, 1998).
- La misma especie, en la misma localidad, puede presentar una gran variabilidad, de hasta 2 órdenes de magnitud, en el contenido de toxina por célula. La variabilidad se debe tanto a factores genéticos (cepas muy tóxicas o poco tóxicas), como al efecto de los factores ambientales en la producción y acumulación de toxina por célula. En el primer caso, la proporción de las distintas cepas durante un brote tóxico será un factor decisivo para determinar la virulencia del evento. En el segundo caso, las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, cantidad y proporción relativa de nutrientes, etapas del crecimiento poblacional, etc.) afectan a la tasa de división y producción de toxinas; una población natural de microalgas puede tener niveles de toxinas que escapan a los límites de detección en las fases iniciales de la floración y los factores que ralentizan la tasa de división celular (ej. bajas temperaturas) pueden contribuir a un aumento de la acumulación de toxinas por célula. La división celular en cierto modo diluye la cantidad de toxina por célula, y puede que ello explique que los episodios de PSP con toxicidades record se han registrado en

regiones de aguas muy frías del planeta, como Alaska (Hall, 1982) y Patagonia (Carreto *et al.*, 1985; Benavides *et al.*, 1995).

- La intoxicación de los bivalvos depende en parte de la concentración de toxina por célula, pero sobre todo, de la proporción entre la biomasa de las células tóxicas y el total de alimento disponible (otras células fitoplanctónicas, bacterias, seston, etc.) ya que de ello dependerá la tasa de filtración (Blanco *et al.*, 1995). Además hay que considerar el efecto de los factores ambientales y su estabilidad en la propia fisiología del bivalvo;
- Los microalgas flageladas (y algunas diatomeas vacuoladas) pueden mostrar acusadas heterogeneidades en su microdistribución espacial, tanto en la vertical (agregación en capas finas), como en la horizontal, formando con frecuencia manchas o agregados en zonas concretas de una localidad (Fig. 7). Esta distribución varía a su vez con el tiempo, merced a la actividad fisiológica de las microalgas y su interacción con los factores hidrodinámicos (mareas, frentes, etc.). Para expresar gráficamente su representatividad estadística, una toma de muestra de fitoplancton en una estación sería comparable a un muestreo de distribución de nubes, movidas por el viento, en un punto fijo.
- Por último, conviene recordar que los muestreos de fitoplancton en los programas de seguimiento nunca tendrán una frecuencia espacio-temporal suficientemente como para detectar episodios puntuales, de corta duración, que permiten la exposición de los bivalvos a concentraciones elevadas de células tóxicas (ej: advección de células alóctonas tras un brusco cambio del régimen de vientos; agregación de células en una microzona en un momento determinado...). Por ello, la concentración de toxinas en los bivalvos será siempre un dato más fiable que las concentraciones de células potencialmente tóxicas, ya que los filtradores actúan como «biointegradores» o registradores continuos de las células que han discurrido por su localidad entre dos muestreos sucesivos, mientras que los datos de distribución de fitoplancton son discontinuos y discretos.

1.2.3 PROTECCIÓN DE OTROS RECURSOS

MARISQUEROS

En algunas regiones, la explotación de moluscos gasterópodos no filtradores - tales como la oreja de mar (*Haliotis tuberculata*), el caracol atigrado de

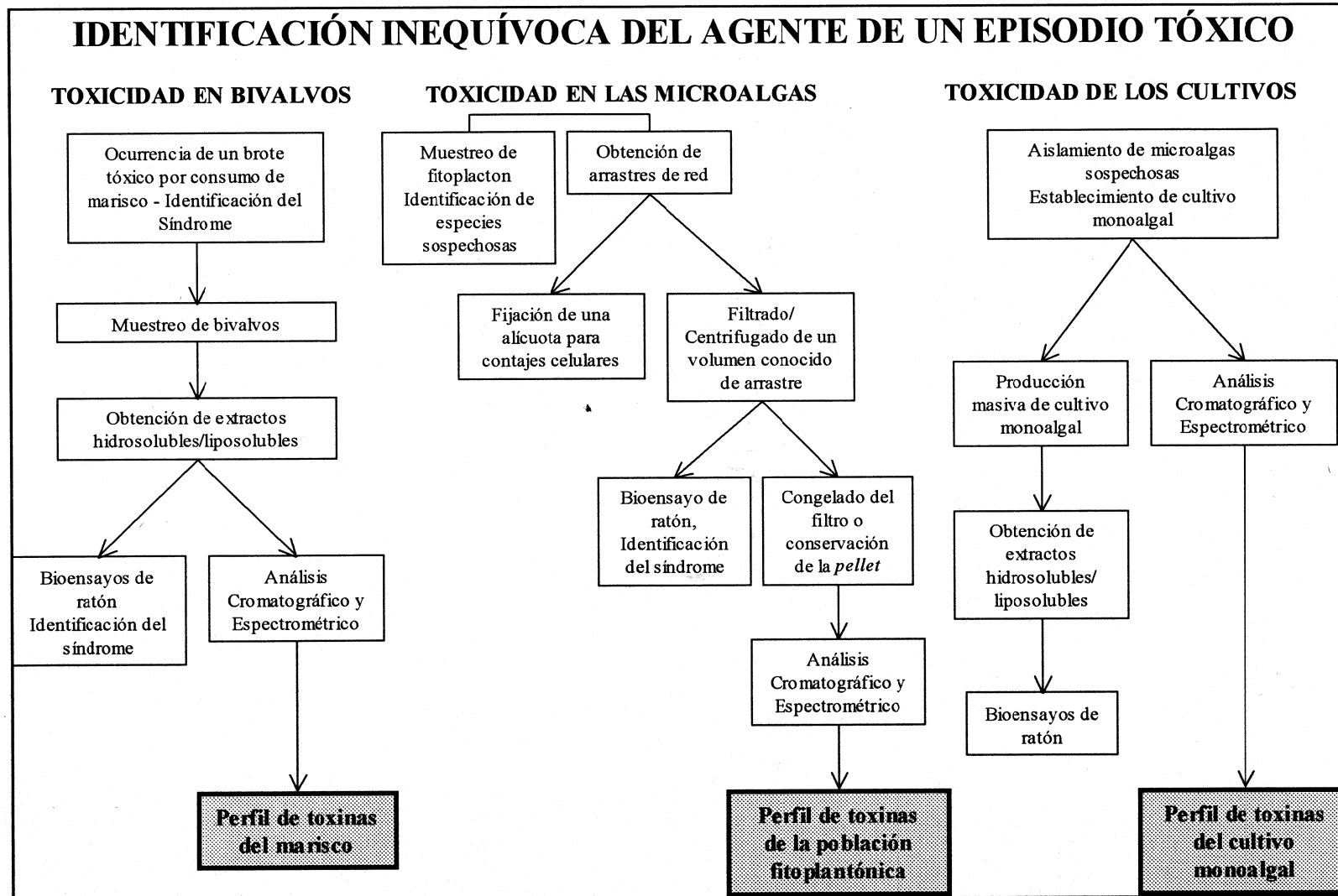
Argentina (*Zidona dufresnei*) y las lapas- o de erizos, como el *Paracentrotus lividus* en Francia, puede constituir el principal recurso a proteger. Estos gasterópodos o equinodermos no son filtradores, sino que «ramonean» la película de microalgas y materia orgánica que cubre macroalgas y sustratos rocosos. En cuanto a los caracoles marinos carnívoros, su principal sustento pueden ser otros organismos marinos con contenido tóxico o sus cadáveres. La comercialización de estos recursos deberá ser regulada siguiendo controles sanitarios análogos a los que se aplican a los moluscos bivalvos. El seguimiento en este caso deberá centrarse no tanto en las poblaciones fitoplanctónicas, como en las microalgas bentónicas u otras fuentes nutricionales que constituyan su principal sustento.

En regiones tropicales y arrecifes coralinos el dinoflagelado bentónico *Gambierdiscus toxicus* es el principal agente de la Intoxicación Ciguatérica de Pescado (CFP = Ciguatera Fish Poisoning). Precisamente un caracol marino, conocido en Cuba como «Cigua» (*Turbo pica*), fue el que le dio el nombre al síndrome que afectaba a colonizadores europeos en las Antillas y la Polinesia. No parece probable que exista riesgo de intoxicación ciguatérica en el Cono Sur (excepto quizás en regiones septentrionales de Brasil), ni hay antecedentes que lo avalen. Pero sí existen especies de dinoflagelados bentónicos, como *Prorocentrum lima* (productores de toxinas diarreicas) y posiblemente especies del género *Ostreopsis* y *Amphidinium* (productores de toxinas hemolíticas), ampliamente distribuidos en aguas templadas, que podrían ser miembros habituales de la flora fitobentónica en el Cono Sur y ocasionalmente afectar a algunos de sus recursos explotados.

1.3 Adquisición de poder de predicción sobre los episodios tóxicos

El objetivo último de un programa de seguimiento, satisfechas las demandas anteriores de protección de la salud pública y de los recursos cultivados, es adquirir una cierta capacidad de predicción sobre el desarrollo local o acumulación y sobre la persistencia de las especies potencialmente tóxicas, que permita a las autoridades y a los sectores productivos adelantarse a los acontecimientos. Una vez establecido un programa de muestreo periódico de presencia de toxinas en los bivalvos y de fitoplancton potencialmente tóxico en el medio, e identificadas las especies responsables de los episodios tóxicos (con-

Fig. 8. Esquema de los pasos que se deben seguir para identificar de forma inequívoca las especies causantes de brotes tóxicos en una localidad.



secución de objetivos 1.1 y 1.2), el siguiente paso es hacer una evaluación de los resultados del muestreo de fitoplancton y datos ambientales que permita describir la aparición, desarrollo y desaparición de las floraciones en relación con la meteorología y las condiciones oceanográficas. Los resultados esperables a corto plazo (3-5 años) serán:

- Descripción de los ciclos de sucesión fitoplanctónica estacional y anual.
- Identificación inequívoca y caracterización biológica de las especies agentes de episodios tóxicos.
- Identificación de los factores oceanográficos clave (pulsos de afloramiento, períodos de relajación, aportes fluviales, intensidad y duración de la estratificación térmica y/o halina de la columna de agua, etc.) que controlan la dominancia de distintas especies fitoplanctónicas y/o la aparición de las especies problema en una localidad.
- Localización y mapeado de zonas de alto riesgo de ocurrencia de episodios tóxicos y de zonas relativamente seguras.

Tras alcanzar estos objetivos parciales, ya se estará en condiciones de acometer objetivos más específicos centrados en una especie «diana». El tamaño de la población de células de una especie es el resultado de un equilibrio dinámico entre las ganancias (germinación de quistes o esporas, división celular, advección de poblaciones alóctonas por causas físicas) y las pérdidas celulares (enquistamiento o formación de esporas, dispersión física, hundimiento, pastoreo por el zooplancton...), y de las interacciones de los organismos (comportamiento) con su ambiente. Es decir, el tamaño que alcance la población de la especie de interés dependerá de factores intrínsecos inherentes a los propios organismos, de factores extrínsecos determinados por procesos oceanográficos (físicos químicos y biológicos), y de las interacciones peculiares de cada especie con estos procesos. Por ello, la consecución de una capacidad de predicción de los episodios requiere un enfoque *multidisciplinar* y *multiescalar* del problema:

Multidisciplinar, pues será necesaria un trabajo de cooperación entre modelizadores, oceanógrafos físicos y químicos, y biólogos (taxónomos, ecólogos, etc.).

Multiescalar, pues habrá que planear los estudios con la misma diversidad de escalas de tiempo (diaria, estacional, interanual) y de espacio (microescala, mesoescala, escala global) que la de

las escalas que influyen en los procesos físicos, químicos y biológicos.

Todo este esfuerzo requerirá una buena coordinación entre los expertos e instituciones implicadas y una colaboración estrecha entre los programas de seguimiento y los proyectos específicos de investigación, que basándose en hipótesis o modelos diseñados para la zona, se centrarán en el estudio de determinados procesos, y de especies «diana» (sin ignorar a los organismos acompañantes).

Una pregunta fundamental a contestar es saber si la proliferación de microalgas tóxicas resulta de un crecimiento *in situ*, o si por el contrario se trata de poblaciones alóctonas concentradas en la región por causas físicas.

Si se trata de crecimiento *in situ* en una bahía o ensenada confinada y con elevado tiempo de residencia del agua, el estudio se simplifica, y deberá centrarse en un conocimiento profundo de la autoecología de la especie problema. Los principales tópicos se encaminarán a resolver las siguientes interrogantes:

- Si se trata de especies conocidas como formadoras de quistes, ¿Cuál es el factor detonante (temperatura, fotoperíodo, etc.) que dispara la germinación de quistes?; Si no hay conocimiento de que produzca quistes ¿Está siempre presente en el medio, o muestra una clara estacionalidad anual?
- ¿Qué fuentes nutricionales estimulan su crecimiento? ¿De dónde proceden?
- ¿Cómo se distribuyen las células en relación con las propiedades físicas de la columna de agua? ¿Se agregan en las zonas de discontinuidad (termoclinas, haloclinas, picnoclinas)? ¿Migran verticalmente?
- Una vez alcanzadas las concentraciones máximas ¿Qué factores determinan el declive de la floración?

Por el contrario, en sistemas muy dinámicos, con elevado intercambio de las aguas costeras con las aguas de la plataforma (rías, estuarios de ríos caudalosos, zonas de intensas mareas...), será esencial el conocimiento de los mecanismos de transporte de las masas de agua donde se localiza la especie problema:

- Pulsos de afloramiento o hundimiento y su magnitud; relación con la dirección e intensidad del viento.
- Transporte de masas de agua paralelo a la costa y/o perpendicular a la costa: factores que lo determinan y su posible estacionalidad.
- Zonas de convergencia o frentes (de marea, de afloramiento, de encuentro de distintas masas de agua).

Poder predecir con fiabilidad las condiciones bajo las cuales se alcanzarán determinadas concentraciones de un organismo puede parecer una utopía. Dada la estrecha relación de los procesos biológicos con los factores meteorológicos, las predicciones de corto término estarán limitadas por la exactitud de la predicción meteorológica; la variabilidad interanual, a su vez, estará ligada a la capacidad de predicción de cambios climáticos a medio plazo. Pero a medida que se recopile la información un año tras otro, con datos de calidad controlada, los expertos podrán sorprenderse de la predictibilidad de determinados episodios en su región si llegan a identificar el factor dominante que desencadena las proliferaciones de determinadas especies.

IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES AGENTES DE EPISODIOS TÓXICOS: TEST DE TOXICIDAD

En las etapas iniciales de un programa de seguimiento, una de las cuestiones primordiales es identificar de forma inequívoca las especies agentes de episodios tóxicos recurrentes en la región, pues en ellas deberá centrarse la atención de los expertos. El conocimiento de las especies agentes de brotes tóxicos en otras partes del mundo es un punto de partida imprescindible, pero dada la variabilidad intraespecífica que se observa en el contenido de toxinas de las microalgas (cepas muy tóxicas, cepas poco tóxicas, e incluso cepas no tóxicas dentro de una misma especie), cada región debe obtener información propia del perfil tóxico de sus especies problema y de los rangos de variabilidad que pueden presentar en el contenido de toxina por célula.

En la Fig. 8 se presenta un esquema de los pasos de rigor que se deben seguir para identificar de forma inequívoca las especies causantes de brotes tóxicos en una localidad. En algunos casos puede que no se disponga de medios materiales o de personal especializado para desarrollar todos los pasos, pero conviene entonces llegar hasta donde sea posible, y sa-

ber cómo se deben almacenar las muestras de fitoplancton fijado y material tóxico congelado (filtros o centrifugados de arrastres planctónicos, bivalvos, etc.) para resolverlo con la colaboración de otros expertos.

1. Análisis de los mariscos

1.1 Ocurrencia de un brote tóxico por consumo de marisco.

Cuando se tienen noticias de la ocurrencia de un brote tóxico que se sospecha ha sido causado por ingestión de marisco, se recabará toda la información posible sobre los síntomas médicos de las personas afectadas. Estos síntomas podrán arrojar luces sobre la naturaleza del grupo de toxinas implicado. Si los pacientes son sometidos a lavado gástrico, su contenido estomacal puede ser una valiosa fuente de información, máxime si no se pudieran conseguir muestras del marisco causante del problema. Si se identifica la fuente de la intoxicación alimentaria, se tomarán muestras para su análisis.

1.2 Preparación de extractos y desarrollo de bioensayos.

Se prepararán extractos de las vísceras o de todo el tejido blando del molusco: extractos hidrosolubles si se sospecha que el síndrome es causado por toxinas PSP o ASP, y extractos liposolubles si se sospecha que son toxinas del grupo diarreico DSP u otras toxinas polietéreas. Si no se tuviera idea del tipo de toxinas que se espera encontrar, se dividirá la muestra en dos submuestras y se prepararán extractos de los dos tipos. A continuación se realizarán los bioensayos de ratón, siguiendo los métodos estándar (ver cap. 3 de este volumen) y se procederá a la identificación del tipo de síndrome.

1.3 Análisis de toxinas por métodos cromatográficos y/o espectrométricos.

Los bioensayos de ratón proporcionan información sobre el efecto biológico de las toxinas pero no sobre su naturaleza química. La descripción de las técnicas a emplear para los análisis cromatográficos de toxinas PSP, DSP y ASP se describen con detalle en el capítulo 2. Estos análisis nos permitirán obtener el perfil de toxinas causantes del síndrome, siempre y cuando se trate de toxinas conocidas y de las que se dispone de patrones puros. Análisis posteriores mediante espectrometría de masas (MS) acoplado al cromatógrafo permitirán confirmar inequívocamente

la naturaleza química de los compuestos tóxicos. El análisis por MS será imprescindible cuando aparezcan cromatogramas con picos desconocidos que pudieran corresponder a toxinas «nuevas», de las que no se dispone de patrones puros y que presentan un comportamiento cromatográfico no comparable a los previamente descritos. Incluso si se obtuvieran picos cromatográficos de igual comportamiento que los patrones puros, es conveniente, por prudencia, aplicar análisis por MS a las muestras cuando se registran toxinas conocidas en especies que no hubieran sido registradas previamente como productoras de las mismas.

2. Análisis de toxicidad del fitoplancton

2.1 Muestreo de poblaciones fitoplanctónicas e identificación de especies sospechosas de producir toxinas.

Para la identificación de las especies sospechosas, se recomienda realizar un arrastre vertical (u oblicuo) con una red de plancton de 10-20 μm de apertura de malla. Es esencial que el arrastre se transporte en buenas condiciones hasta el laboratorio, ya que la identificación preliminar de diversos grupos microalgales requiere la observación de las células vivas (sin fijar) y su comportamiento natatorio. Parte de este arrastre se empleará para obtener muestras fijadas. Si no se sabe a ciencia cierta ni siquiera el grupo microalgal (diatomea, dinoflagelado desnudo, pequeño flagelado, etc.) al que pertenece la especie problema, se recomienda fijar una alícuota con formol neutro, otra alícuota con lugol ácido, una tercera alícuota con glutaraldehído y otra alícuota mantenerla *in vivo*.

2.2 Realización de un arrastre de red para obtener abundante biomasa fitoplanctónica para análisis de toxinas.

Para este fin, es recomendable emplear una red de plancton de mayores dimensiones que las empleadas para obtener muestras con fines de identificación de especies, y con un colector de PVC cilíndrico, cerrado pero con fondo desmontable o con un grifo o llave para facilitar la recolección de material. De esta forma el material filtrado se mantiene suspendido en agua de mar, y se minimizan las roturas de células. Si el material recolectado se va a analizar por HPLC, basta con filtrar/centrifugar 10-50 ml de este arrastre (según su densidad). Pero si se va a testar mediante bioensayo de ratón, será necesaria

una mayor biomasa de fitoplancton. Los pasos a seguir en el procedimiento incluyen:

- Tomar y fijar una muestra de este arrastre para identificación y cuantificación de las especies fitoplanctónicas presentes y posterior cálculo del contenido total en el volumen de arrastre filtrado.
- Medir el volumen del arrastre, y filtrar (filtros de fibra de vidrio, de 0.7 ó 1.2 μm de poro, pretratado a 400 °C durante 6 h) o centrifugar el arrastre.
- Etiquetar (lugar, fecha, ml filtrados, tamaño de malla) y congelar el filtro (en una placa petri de plástico o recipiente similar) o el *pellet* (en el propio tubo de centrifuga) hasta el momento del análisis. Si se quiere recoger mucha biomasa, filtrar el mayor volumen posible del concentrado obtenido del arrastre de red, a través de una malla de 10-20 μm , y recoger el material con ayuda de una espátula de acero inoxidable.
- Preparación de extractos liposolubles y/o hidrosolubles de los filtros, o de los *pellets* obtenidos de los arrastres concentrados (tal como se explica en los capítulos 2 y 3).

2.3 Determinación de toxinas (bioensayos, análisis cromatográfico) contenidas en el extracto del paso anterior y confirmación del origen fitoplanctónico de la toxicidad.

En el paso 2.2 se puede fraccionar el arrastre, es decir, se pueden seleccionar, mediante mallas o filtros, distintos rangos de talla, con lo cual se podría determinar en qué fracción o rango de tallas del fitoplancton se encuentra el organismo tóxico.

El análisis de toxinas, en extractos de arrastres de red de la población fitoplanctónica total, se ha empleado a menudo, sobre todo cuando se sospecha que el agente productor de las toxinas es una especie de la que no se han podido establecer cultivos, como es el caso de las *Dinophysis* spp. productoras de toxinas diarreicas. El procedimiento habitual en estos casos consiste en dividir el contenido total de toxinas, determinadas en el extracto del filtro o *pellet*, entre el número de células de la especie supuestamente tóxica presente en el arrastre calculada teniendo en cuenta el volumen total de arrastre filtrado/centrifugado, y la concentración de la especie obtenida en el conteo de la alícuota. Pero esta práctica conlleva una carga de error difícil de evaluar, ya que:

- Se asume que existe una sólo especie (o género, si no se identifica a nivel de especie) potencial-

mente tóxica en el arrastre multiespecífico. Podría haber dinoflagelados heterótrofos/mixótrofos, u organismos microzooplanctónicos que hubieran ingerido previamente células tóxicas, con lo que sobreestimaríamos el contenido de toxina por célula de microalga tóxica.

Los resultados de los análisis cromatográficos de extractos de arrastres de red no son tan claros como los obtenidos con cultivos monoalgales debido al efecto matriz del material acompañante, que llevaría a subestimar el contenido de toxinas por célula. Por otro lado, los arrastres densos constituyen un material muy lábil. Si el filtrado o centrifugado no se realizan inmediatamente, hay que evitar que el arrastre esté demasiado concentrado, y mantenerlo refrigerado, ya que numerosas células pueden romperse y liberar su contenido al medio.

En cualquier caso, el análisis de toxinas de los arrastres permitirá confirmar si la fuente de toxinas se encuentra en el plancton. De lo contrario, existe la posibilidad de que la toxicidad hubiera sido causada por un organismo que ya no estaba presente en la columna de agua en el momento del muestreo, o incluso puede tratarse de una toxicidad de origen bentónico.

3. Aislamiento y cultivo de especies sospechosas. Determinación de su perfil de toxinas

3.1. Aislamiento de células planctónicas mediante micromanipulación capilar, y establecimiento de cultivos monoalgales. En el Anexo I se resume el material necesario y la técnica de aislamiento de células mediante pipeta microcapilar.

3.2. Escalado del cultivo hasta alcanzar mayores volúmenes; concentrado de células y obtención de extractos para hacer bioensayos o análisis cromatográficos.

3.3. Determinación del perfil de toxinas de la especie microalgal cultivada.

4. Comparación de los resultados de determinación de toxinas

Una vez completado los distintos pasos de los apartados 1 y 2, se puede establecer qué tipo de toxinas tienen los bivalvos, y si éstas son similares a las determinadas en el fitoplancton presente en el momento de muestreo. Se recomienda utilizar como

bivalvo al mejillón pues, al menos durante los primeros días, suele presentar un perfil de toxinas prácticamente igual al de las células tóxicas ingeridas. Además, se trata de un organismo de amplia distribución, bajo precio y elevada tasa de filtración e intoxicación. Los bivalvos transforman enzimáticamente las toxinas ingeridas, y en algunas especies ocurre con más rapidez, y los cambios son más intensos (Oshima *et al.*, 1990). El estudio de estas transformaciones debería hacerse posteriormente alimentando a los bivalvos explotados de la zona con cultivos monoalgales de la especie tóxica, y estudiando la variación del perfil tóxico del bivalvo en el período de «detoxificación»

Finalizados los pasos del apartado 3, y si el cultivo monoalgal da un perfil tóxico comparable al de los bivalvos y al del arrastre planctónico, sólo entonces se podrá decir con rigor científico que la especie en estudio y bajo sospecha es la responsable de la presencia de esas toxinas en los bivalvos. De lo contrario, si no se pueden probar las sospechas, conviene ser prudentes y limitarse a escribir que “*la presencia de unas determinadas toxinas en los bivalvos de una localidad específica, se asocia con la ocurrencia de una especie concreta*» o “*se sospecha que la especie X es la responsable de la presencia de toxinas T en la localidad Y*”.

Precauciones a considerar:

- La especie agente del episodio tóxico puede no ser la especie dominante en el fitoplancton, sino una especie minoritaria. Ej: episodios de DSP a bajas concentraciones de *Dinophysis* spp. en poblaciones dominadas por *Prorocentrum micans* o por diatomeas.
- La especie tóxica podría no estar presente en el plancton cuando se realizó el muestreo; el bivalvo pudo haber adquirido la toxicidad tras filtrar poblaciones previas ya desaparecidas;
- Podríamos caer en el error de culpar a otra especie dinoflagelada heterótrofa o mixótrofa que se alimentó de la especie tóxica. Ej: presencia de saxitoxinas en poblaciones del dinoflagelado heterótrofo *Polykrikos schwartzii* tras preñar una floración de *Alexandrium tamarense* en la plataforma argentina (Carreto *et al.*, 1986)

El test de toxicidad expuesto requiere disponer de cultivos monoalgales establecidos. Desgraciadamente hasta el momento no se han conseguido en el

caso de especies del género *Dinophysis*. Yasumoto *et al.* (1980), en el trabajo decisivo en el que identificaron a *Dinophysis fortii* como el agente de episodios diarreicos en Japón, emplearon sucesivos fraccionamientos de arrastres de red hasta obtener muestras que estaban constituidas casi al 100% por esta especie, y observaron que el contenido de toxinas diarreicas en los extractos era directamente proporcional a la cantidad de células de *D. fortii* presentes. En trabajos posteriores, los perfiles de toxinas y contenidos de toxina por célula en *Dinophysis* spp. se han obtenido mediante aislamiento, por micromanipulación, de cientos (o incluso miles) de células, una a una, en momentos de abundancia en el medio natural a partir de concentrados de poblaciones naturales (Lee *et al.* 1989; Fernández *et al.*, 2001). Las células aisladas, siguiendo un protocolo similar a los primeros pasos del Anexo I, se concentran primero en pequeños filtros, o se introducen directamente en metanol, procediéndose después a la obtención de extractos como en el caso de células procedentes de cultivos o de arrastres fitoplanctónicos. El empleo de columnas capilares para los análisis cromatográficos (μ HPLC) puede permitir el análisis de muestras conteniendo un número reducido (50-100) de células, como los llevados a cabo por James *et al.* (1999) con células de *Dinophysis acuta* en Irlanda, en los que obtuvo buenos resultados a partir de muestras de 50 células. Los grandes avances tecnológicos recientes en los sofisticados análisis de sistemas de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un espectrógrafo de masas (LC-MS) permitirán a partir de ahora, cada vez con más frecuencia, el análisis de toxinas de una especie a partir de muestras compuestas por un pequeño número de células aisladas de las poblaciones naturales por micromanipulación.

MÉTODOS DE MUESTREO DE FITOPLANCTON

Por muy escasos que sean los medios disponibles, siempre será posible planificar una forma sencilla de muestrear el fitoplancton para su identificación cualitativa (redes) y cuantitativa (botellas oceanográficas, mangueras, cubos, etc.). Tanto si el muestreo es llevado a cabo por el personal del sistema de control, como si se realiza en colaboración con los mariscadores o acuicultores, es necesario tener preparado un *kit* que incluya redes, colectores, recipientes etiquetados, fijadores, y cajas o neveras

portátiles para el transporte de las muestras hasta el laboratorio. En países con intensa acuicultura y bancos naturales de bivalvos cada vez con más frecuencia se entrena al personal del sector involucrado, para que mediante sistemas sencillos de recogida de muestras y microscopios de campo sean capaces de dar los pasos iniciales, o de complementar la labor de los expertos, siempre y cuando se trate de detectar especies de fácil identificación.

La elección de los fijadores y el almacenamiento adecuado para cada tipo de muestras han sido revisados en los manuales de Sournia (1978) y Alveal *et al.* (1995). Los fijadores más empleados son el formol neutro (sustancia bastante tóxica que se debe manipular con precaución) y el lugol ácido. Nos limitaremos aquí a recordar que no hay un fijador óptimo para todas las especies problema: los flagelados desnudos se deforman y dañan con el formol, llegando a reventarse las células más delicadas; en las muestras de lugol almacenadas largo tiempo se deterioran las estructuras silíceas de las diatomeas y la contaminación bacteriana es más fácil. Deberá decidirse cuál es el fijador más apropiado para el tipo de muestras de cada región, o para los objetivos del trabajo, pero lo más recomendable es tomar submuestras que se fijarán con formol neutro y lugol respectivamente. Si se quieren observar muestras al microscopio electrónico, se deberá tomar una tercera alícuota que se fijará con glutaraldehído. A partir de estos tres tipos de muestras fijadas se podrán llevar a cabo posteriores identificaciones, tras tratamientos previos si fuera necesario (hipoclorito o calcoflúor para observación de placas celulósicas de dinoflagelados, limpieza con ácido de frústulos de diatomeas, etc.), tanto mediante microscopía óptica como mediante microscopía electrónica.

Es muy importante poder organizar una pequeña colección de muestras fitoplanctónicas de arrastres de red, fijadas y etiquetadas, almacenadas en pequeños tubos y concentrando o centrifugando la muestra si fuera preciso para ahorrar espacio. Ello permitirá «revisitar el pasado» en el caso de muestras que no se pudieron identificar debidamente en su momento, si se quiere pedir ayuda a otros expertos; o cuando se quiere analizar detalladamente un género al que no se le dio importancia previa por no haberse establecido aún su carácter tóxico (por ej., lo sucedido con especies del género *Pseudo-nitzschia*).



Fig. 9. Izquierda: sonda CTD sujeta por el torno oceanográfico a punto de ser lanzada. Centro: pequeña red de plancton de 10 μm de apertura de malla, con aro de sujeción y colector de PVC. Derecha: botella oceanográfica de 5 l, sujeta por el torno oceanográfico (Fotos de M. Lion tomadas a bordo del B/O "J.M. Navaz", en la Ría de Vigo, durante el "V Curso COI-AECI-IEO sobre Fitoplancton Tóxico y Ficotoxinas", junio de 2001).

Cubos y Mallas

El muestreo de fitoplancton más sencillo consiste en recoger agua superficial con un cubo u otro recipiente cerrado desde un muelle o embarcadero. En zonas de aguas poco profundas y bien mezcladas, este método, tan primitivo en apariencia, puede ser suficiente para la detección precoz de especies problema si se concentra la muestra (5-50 l) a través de mallas de 10-20 μm . Las especies desnudas pueden deformarse con la manipulación del concentrado, por lo que éste debe hacerse con delicadeza, preferiblemente manteniendo el cilindro de filtrado dentro de otro cerrado para que las células no sufran presión contra el fondo de malla, ni se queden secas en ningún momento. Si la red es de 10-20 μm de apertura de malla, y se mide el volumen filtrado, este método permite realizar un análisis cuantitativo bastante fiable de las células grandes (> 40 μm). Alternativamente, se pueden fijar muestras del agua del cubo, sin concentrar, y sedimentarlas en columnas de sedimentación para su posterior identificación y contaje al microscopio invertido mediante el método de Utermöhl (1931). Una tercera posibilidad sería centrifugar un volumen conocido de la muestra del cubo, y eliminar la mayor parte del sobrenadante.

Redes de Plancton

Las redes de plancton troncocónicas, de mayor o menor tamaño (según la riqueza fitoplanctónica del lugar) constituyen el método más tradicional de muestreo (Fig. 9). Para la detección de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas se utilizan redes muy finas, de 20 μm , o mejor aún de 10 μm , de apertura de malla. La muestra no es adecuada para análisis cuantitativo (incluso aunque se estimara el volumen filtrado con un flujómetro), ya que se pierden numerosas células de pequeño tamaño, y la eficiencia de filtrado disminuye en proporción inversa a la concentración de fitoplancton, o se ve alterada por la presencia de mucílagos. Pero la gran cantidad de agua filtrada mediante un simple arrastre vertical en la zona fótica, podrá permitir la detección de especies que suelen ser poco abundantes (Ej.: *Dinophysis* spp.), o de otras especies potencialmente tóxicas (Ej.: *Alexandrium* spp.) que se encuentran en los estadios iniciales de desarrollo de la floración, en concentraciones inferiores al límite de detección mediante la técnica de Utermöhl (20-40 cel · l⁻¹ si se emplean columnas de sedimentación de 25-50 ml).

Hay que evitar los arrastres horizontales u oblicuos, que muestrean tan sólo ciertas capas de la columna de agua. El arrastre debe ser vertical, y dejando hundir la red hasta la profundidad donde se pue-

dan encontrar organismos fitoplanctónicos. De lo contrario, se podría perder información de la presencia de especies concretas, en elevadas concentraciones, agregadas en capas finas de la columna de agua.

Es muy aconsejable mantener una alícuota de la muestra de arrastre sin fijar para su observación microscópica *in vivo* tan pronto como se llegue al laboratorio, ya que hay especies desnudas cuya identificación es casi imposible de otra manera. Las muestras se mantendrán en frascos de vidrio y en contenedor isoterma portátil. Si la coloración del arrastre denotara una elevada concentración de plancton, se diluirá la muestra con agua de la misma estación hasta que adquiera una tonalidad muy ligera. En el caso de manchas, se puede tomar directamente la muestra, sin red, pero conviene diluir con agua más clara de otra profundidad si se pretende que las células lleguen vivas al laboratorio. Si por otra parte se observa una concentración muy elevada de organismos zooplanctónicos, conviene pasar la muestra por una malla de 150 µm para eliminar a los grandes filtradores (si bien corremos entonces el riesgo de perder dinoflagelados de gran tamaño, como *Noctiluca scintillans*, o las cadenas largas de algunos *Alexandrium* spp. y *Gymnodinium* spp.).

Las redes se enjuagarán con agua dulce tras su uso, añadiendo un poco de detergente neutro de laboratorio si fuera preciso. De lo contrario, la malla se irá obstruyendo paulatinamente, y perderá eficiencia de filtrado. En el caso de redes pequeñas que tengan los poros obstruidos, se consiguen excelentes resultados con un baño de ultrasonidos durante 1-2 min. No se recomienda el uso de soportes o aros metálicos, que acortan la vida de la red por problemas de corrosión, resultando muy satisfactorios los soportes de PVC y la sujeción con fuertes hilos de algodón graso o de nylon. El colector puede ser un cilindro de PVC, con fondo cerrado con una tapa desenroscable o acabada en grifo, que causará menos fricción a las células que en el caso de colectores con fondo de red sujeta con arandelas metálicas.

Botellas oceanográficas

Las botellas oceanográficas, de tamaños variables entre 1 y 5 l (Fig. 9) constituyen el método más fiable para la obtención de muestras destinadas a análisis cuantitativo del fitoplancton de una determinada profundidad. Se deben tomar muestras a tantas profundidades como sea necesario según la profundidad

y las características de la columna de agua (aguas mezcladas o estratificadas) en el punto de muestreo. En estaciones someras (hasta 6-8 m) y de aguas bien mezcladas, puede ser suficiente con una muestra a 1-2 m de la superficie y otra a 1-2 m del fondo. En aguas más profundas y con estratificación térmica y/o halina, serán necesarios muchos más puntos de muestreo, a intervalos de 3-5 m, dentro de la zona fótica. Cuanto más pequeños sean los intervalos, mejor será la imagen que obtengamos de la distribución de las distintas especies en relación con la distribución de las características físicas (T, S, etc.), químicas (macronutrientes, materia orgánica disuelta, etc.) y biológicas (pigmentos, organismos acompañantes) en la columna de agua. No obstante, hay que calcular de forma realista la cantidad de muestras que puede analizar el personal dedicado a la observación microscópica, pues lo más importante, en los programas de seguimiento, es obtener una información fiable en el tiempo más corto posible. Además, nada deprime más a un experto, en los comienzos de un programa de seguimiento, que observar cómo se le acumulan las muestras sin que le alcance el tiempo para analizarlas.

Algunas especies de dinoflagelados presentan una distribución vertical muy heterogénea, agregándose en altas densidades en capas muy finas (de unos pocos cm a 1 m) de la columna de agua, y variando su distribución a lo largo del día en respuesta a ritmos circadianos o a comportamientos asociados con la reproducción sexual. En estos casos, un muestreo de botella desafortunado puede evitar precisamente la zona de agregación o de densidad máxima, y se obtendrá una información poco real de la distribución y abundancia del organismo. Por ello, en un programa de seguimiento de especies potencialmente tóxicas, los muestreos de botellas deberán ser siempre complementados con información de arrastres de red.

Mangueras

Este sencillo método de muestreo, basado en una manguera desmontable en varios tramos (Fig. 10), fue descrito por Lindahl (1986) y su aplicación fue recomendada por el «Grupo de Trabajo sobre Fitoplancton y Gestión de sus Efectos» del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES), para los muestreos rutinarios en programas de seguimiento de especies fitoplanctónicas nocivas. El muestreador se prepara con tramos de manguera de PVC de jardinería, de 1.5-3 cm de diámetro, del lar-

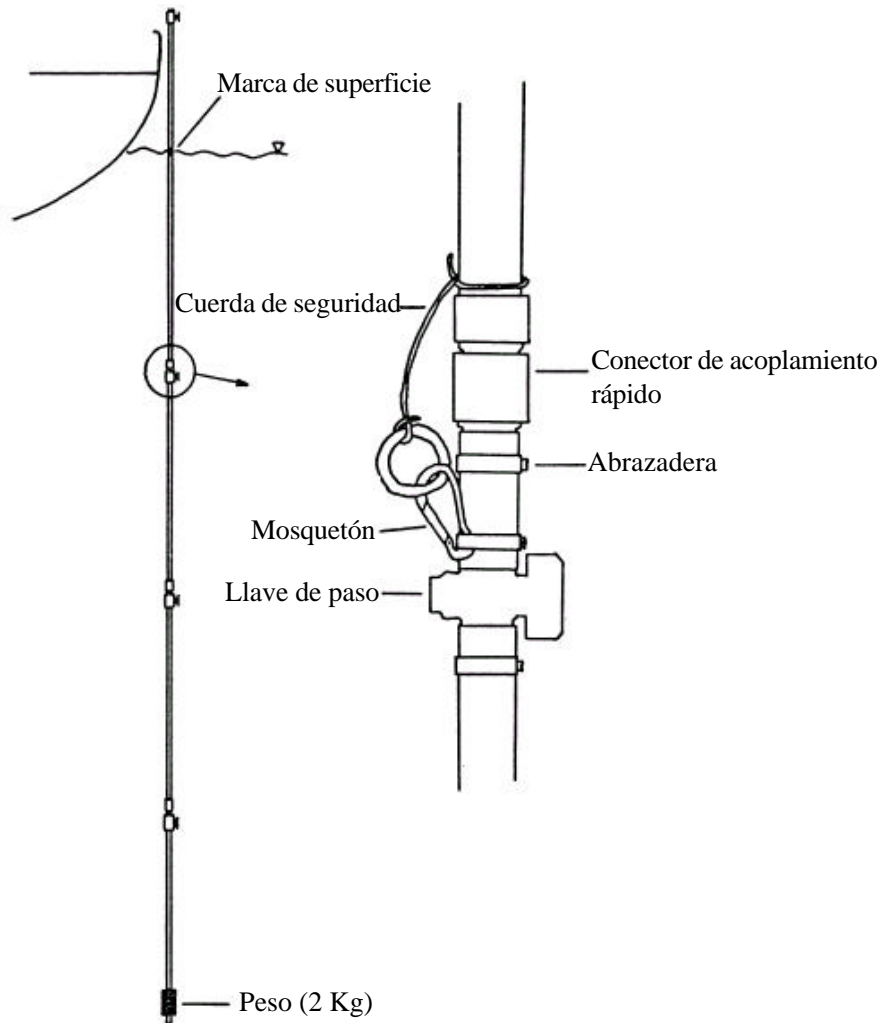


Fig. 10. Manguera de PVC compuesta por tres tramos acoplados (y desmontables), de 5 m cada uno, con llaves de paso que permiten obtener una muestra integrada (0-15 m), o tres muestras integradas (0-5, 5-10, 10-15 m) (Lindahl, 1986).

go deseado (1-5 m), unidos con válvulas de acoplamiento y llaves o grifos. El largo total de la manguera no debería superar los 15-20 m. Es preciso colocar un lastre, cerca de la boca inferior del sistema, cuidando que no obstruya la libre circulación de agua por la manguera, y asegurarse de que ésta se sumerje en el agua lentamente y en posición vertical. De lo contrario, los tramos de manguera muestreados no coincidirán con la profundidad esperada. El tramo superior de la manguera tendrá un largo igual al intervalo superior de la columna de agua muestreado, más la distancia comprendida entre la superficie del mar y la cubierta del barco. Se hará una marca en la parte de la manguera que debe coincidir con la superficie del mar al descenderla. Cuando se ha dejado bajar la manguera, verticalmente, hasta llegar a la mar-

ca de superficie, se cierra el grifo superior, y se sube toda la manguera a bordo. El muestreo con manguera es sencillo, económico, y presenta interesantes ventajas para los programas de seguimiento: a) Se obtiene una muestra integrada de la columna de agua, que permite análisis cuantitativos de los organismos fitoplanctónicos. b) reduce considerablemente el número de muestras a analizar, pudiéndose muestrear un mayor número de estaciones con el mismo esfuerzo; c) Proporciona una información aceptable, desde el punto de vista de la población, en el intervalo muestreado, que puede ser filtrada por los bivalvos; c) Si la manguera se divide en varios tramos (por ej., tramos de 5 m de longitud) fáciles de desacoplar, se puede obtener información adicional sobre distribución vertical del fitoplancton en los intervalos de la

columna de agua correspondientes a la longitud de los tramos de manguera (0-5m; 5-10m; 10-15m en el caso del ejemplo anterior) lo cual es esencial si se muestrean dinoflagelados tóxicos con tendencia a agregarse en capas finas. La principal desventaja estriba en que no se obtiene una buena resolución de la distribución vertical de los organismos y que, en condiciones de mar agitada, es difícil conseguir que la manguera descienda perfectamente vertical.

La manguera se desciende con cuidado con todos los grifos abiertos, para permitir el libre flujo de la columna de agua. Cuando la marca del tramo superior de la manguera alcanza la superficie del agua, se cierra el grifo superior, lo cual hará que el agua quede retenida por la fuerza hidrostática ejercida por las paredes de la manguera. Se recupera la manguera con cuidado, y una vez en la cubierta de la embarcación: a) Se vacía el contenido de la manguera en un recipiente tras abrir el grifo superior (obtención de una única muestra de la columna de agua) ó b) Se cierra cada grifo a medida que van llegando a cubierta, y se desacoplan los distintos tramos de manguera, los cuales se vaciarán en recipientes separados, debidamente marcados. En este caso obtendremos varias muestras integradas correspondientes a distintos intervalos (por ej. a 0-5m, 5-10m, 10-15m) de profundidad de la columna de agua.

Los recipientes deben ser lo suficientemente amplios como para permitir la mezcla de la muestra antes de tomar submuestras para distintos fines. Una vez vaciado el contenido (o contenidos) de la manguera (o los tramos de manguera) en los respectivos recipientes, se toma una alícuota en frasco de vidrio etiquetado y se fija inmediatamente con lugol u otro fijador elegido. Conviene tener los distintos cubos donde se recoge el agua de las distintos tramos de manguera bien rotulados y colocados en orden para evitar confusiones en la toma de alícuotas. En algunos casos puede interesar la toma de muestra de manguera por duplicado: tras el primer lance, se toma la muestra integrada de toda la columna de agua, y tras el segundo lance se toma una muestra por cada segmento acoplado. De esta forma, una vez analizada la muestra integrada, y según el resultado obtenido, se puede tomar la decisión de analizar o no los tramos separados para determinar en qué rango de profundidad se encontraba la concentración máxima de la especie potencialmente tóxica.

MUESTREO DE MICROALGAS BENTÓNICAS

Si se detectara toxicidad en invertebrados ramoneadores, como algunos moluscos gasterópodos o equinodermos, sería necesario considerar el muestreo rutinario de las poblaciones de microalgas bentónicas que constituyen su alimento. Los procedimientos a seguir son análogos a los de un programa de seguimiento de fitoplancton y factores ambientales, excepto en lo que concierne a la toma de muestra de las microalgas, que se realiza de la siguiente manera:

- . Tomar una muestra de macroalgas u otro posible sustrato de las microalgas. La forma óptima consiste en tomar la muestra mediante inmersión o buceo, si no es en la zona intermareal, rodeando el sustrato con una bolsa antes de removerla o arrancarla para que no se pierda material adherido;
- . Suspender la macroalga o sustrato en agua de mar filtrada en un contenedor cerrado, y agitar fuertemente para conseguir que se desprendan las microalgas adheridas;
- . Prefiltrar el agua por malla de 150 μm para eliminar detritus y organismos de gran tamaño, y analizar las microalgas en la fracción inferior a 150 μm .
- . Si se quieren obtener resultados cuantitativos, se pesará la porción de macroalga, y se medirá el volumen de agua en el que se agita, así como el volumen final si se procede a concentrar la muestra, o
- . Rascar con una espátula la película formada encima del alga, y observarla directamente al microscopio. La concentración de microalga se expresará en relación al peso de macroalga que le servía de sustrato, o en relación a una unidad de superficie si se trata de un sustrato inerte.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS, ALMACENAMIENTO Y PROCESADO DE LOS DATOS.

Una vez tomadas las muestras de campo (arrastre de red, botellas o mangueras...), los pasos a seguir en el laboratorio serán:

Análisis Cualitativo de las Muestras de Red

Se observarán al microscopio óptico, a ser posible en vivo, las muestras de arrastre, y se hará un

listado de las especies presentes. En caso de detectarse presencia de *Alexandrium* spp. u otros dinoflagelados tecados sospechosos, se harán tinciones con el fluorocromo calcoflúor (Fritz & Triemer, 1985) para observación de placas al microscopio de epifluorescencia. Si no se dispone de este último, se harán disecciones de la cubierta celular tras tratamiento de la muestra con solución de hipoclorito sódico. El análisis cualitativo de la muestra de red es esencial en programas de seguimiento de especies potencialmente nocivas, ya que permite:

- Registrar especies de interés que se encuentran en concentraciones inferiores a los niveles de detección ($10 - 40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de los análisis cuantitativos con cámaras de sedimentación;
- Detección inmediata de advecciones rápidas de densas poblaciones de organismos nocivos, lo que puede dar lugar a tomar decisiones urgentes, tal como el «cierre cautelar» de la extracción de bivalvos, sin esperar a los resultados de los análisis;
- Observar *in vivo* la morfología y comportamiento natatorio de flagelados desnudos difíciles de identificar en muestras fijadas;
- Permite manipulaciones y tratamientos, necesarios para la identificación taxonómica de ciertas especies, imposibles de llevar a cabo en los individuos sedimentados en las cámaras.

Análisis Cuantitativo de las Muestras

El método más aceptado es el de Utermöhl (1931), que requiere la sedimentación de muestras en columnas, simples o compuestas, unidas a una cámara de sedimentación. Homogenizar bien la muestra, volteándola con suavidad, antes de verter el agua en la columna. El tiempo de sedimentación, en horas (dependiente del volumen de las columnas estándar) se calcula multiplicando por 3 la altura de la columna en centímetros. Así, en el caso de columnas de 50 ml (8 cm de altura), el tiempo de sedimentación será 24 h.

Es imprescindible hacer un recorrido de todo el fondo de la cámara, a 100 aumentos, para la enumeración de dinoflagelados de gran tamaño que pueden estar presentes en baja concentración ($100-200 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), pero aún así resultar nocivos, como es el caso con especies del género *Dinophysis*. Para el conteo de células abundantes, será necesario recorrer 1 o varios transectos diametrales a 400 aumentos. En el caso de pequeños flagelados, puede ser suficiente contar varias superficies cuadradas (marcadas en el

objetivo, y que aparecen en el enfoque para tomar fotografías) en varios puntos de la cámara. Para poner un ejemplo gráfico de los errores que se pueden cometer en esta etapa, imaginemos una cámara de sedimentación, acoplada a una columna de 25 ml, en la que sólo hay una célula de *Dinophysis acuta* situada en el centro de la circunferencia. El examen de todo el fondo de la cámara dará un resultado de $40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Por el contrario, el análisis de un experto que sólo recorre un diámetro a 400 X, dará una concentración de $\approx 3800 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$! (este valor varía según el diámetro del transecto).

Los fundamentos estadísticos para la determinación del tamaño de la submuestra a contar están ampliamente discutidos en Sournia (1978) y en Alveal *et al.* (1995). Algunos laboratorios podrían no disponer de microscopios invertidos o de las cámaras de sedimentación y columnas (bastante caras) necesarias para aplicar el método de Utermöhl, pero podrán aplicar otros métodos alternativos de concentración de la muestra (centrifugación, sedimentación en probetas y eliminación de agua por sifonado, etc.).

Si bien se emplean ampliamente otro tipo de cámaras de conteo, como las Sedgewick-Rafter, que se llenan con 1 ml de volumen y requieren por lo general la concentración previa de la muestra, hay que señalar que los fondos gruesos de estas cámaras (de vidrio o de plástico) no permiten una visión tan nítida de las células como en el caso de las cámaras de sedimentación al microscopio invertido, o en el de muestras colocadas en un portaobjetos cubiertas con un cubreobjetos de vidrio fino que se examinan en un microscopio normal.

Almacenamiento de los Datos y Análisis de Resultados

El almacenamiento eficiente de los datos obtenidos de cada muestra en las modernas bases de datos u hojas de cálculo (ACCESS, EXCEL etc.), facilita enormemente el futuro análisis científico de los datos, así como la preparación de informes periódicos para las autoridades sanitarias y pesqueras y el sector marisquero-acuicultor, que son los usuarios inmediatos de los resultados del seguimiento. Cada laboratorio de control tendrá diseñado su estadillo de análisis de muestras, separando las especies en grupos, y aplicando los factores de conversión a los recuentos de concentración celular, de forma que se automatice la gestión de los datos con la ayuda de *soft-*

ware diseñados para ello. Los factores de conversión consideran el volumen de muestra sedimentado/concentrado, el aumento utilizado y el área de barrido observada.

Si los medios lo permiten, la creación de páginas web con representación gráfica de los resultados en mapas de la región, resultan muy atractivos y didácticos. En el caso de laboratorios que trabajan redes de muestreo muy amplias, con buen apoyo técnico, es de rigor que al menos un científico se responsabilice de realizar revisiones y depuraciones periódicas de los datos. Tan pronto como estén disponibles los resultados (1 o pocos días después del muestreo), se procederá a su disseminación entre los sectores sociales que son los destinatarios directos del programa: autoridades sanitarias y pesqueras, asociaciones de maricultores, grupos de investigación, etc. El éxito final de un programa de seguimiento dependerá de la premura y eficiencia con que se proceda en este paso final.

Con los datos de fitoplancton y de las variables oceanográficas procedentes de distintas estaciones y profundidades a lo largo del año, procederemos a hacer representaciones gráficas (perfiles verticales, distribuciones horizontales, sucesiones anuales, etc.) que nos permitirán obtener una primera interpretación cualitativa de los resultados, y adquirir una imagen de la distribución de las especies de interés en relación con ciertas estructuras hidrográficas, zonas y épocas del año. Existen excelentes programas informáticos, como el *Surfer* y el *Origin*, que permiten interpolaciones de los datos originales y la producción de imágenes tridimensionales, curvas de niveles de cualquier variable oceanográfica, etc. Po-

dremos así crear modelos conceptuales sobre la dinámica de los episodios de microalgas nocivas en la región. Los análisis multifactoriales, para los que también existen potentes softwares en el mercado (SPSS, BMDP, etc.) nos permitirán obtener relaciones cuantitativas entre las variables físicas y las biológicas, y estimar el peso de los distintos factores ambientales en el desencadenamiento de los episodios.

DISEÑO DE LA RED DE MUESTREO DE FITOPLANCTON/DATOS AMBIENTALES

Una vez identificados los objetivos prioritarios del programa de seguimiento, comprendido el esfuerzo que requieren las distintas actividades y considerando los recursos humanos y materiales disponibles, se procederá a ajustar la red de muestreo rutinario y su distribución espacio-temporal.

La elección de los puntos de muestreo se hará en base a las características hidrográficas del área donde se encuentran los recursos a vigilar. Así, en una ría larga y estrecha, puede ser suficiente con el muestreo de varias estaciones situadas en un transecto perpendicular a la costa que irá de las partes más internas y salobres hasta la parte externa o plataforma. Si se trata de una amplia línea de costa, será necesario muestrear estaciones en transectos perpendiculares a la costa, así como en distintos puntos a lo largo de la costa, es decir, diseñar una red bidimensional de estaciones de muestreo. En cualquier caso, el objetivo último del muestreo será identificar los mecanismos físicos que fuerzan el transporte de las distintas masas de agua en las que se localizan determinadas especies, o el desarrollo de estructuras oceanográficas concretas (picnoclinas,

Tabla 2. Parámetros básicos a determinara en un programa de seguimiento (o monitoreo) de fitoplancton nocivo.

Físicos	Químicos	Biológicos
Datos Meteorológicos: Vientos: velocidad y dirección Precipitaciones ($l \cdot m^{-2}$ o mm) Insolación (horas de sol) Fotoperíodo (horas de luz y oscuridad)	Salinidad (perfil vertical) Nutrientes inorgánicos: · Nitratos · Fosfatos · Amonio Silicatos	Fitoplancton: · Análisis cualitativo (muestras de red) · Análisis cuantitativo (especies tóxicas y especies acompañantes)
Temperatura del agua: perfil vertical Transparencia/Turbidez	Clorofilas ($\mu g \cdot l^{-1}$) (Perfil vertical)	

remolinos, etc.) que favorecen su proliferación *in situ* o su retención hasta ser transportadas a zonas de cultivo en procesos de advección. El diseñador del programa deberá tener en cuenta la meteorología local, los vientos dominantes, las corrientes costeras y las características topográficas. La distribución óptima de las estaciones en relación con las corrientes costeras dominantes se discute de forma clara y didáctica en Franks (1995).

La frecuencia temporal del muestreo de fitoplancton ha de ser al menos semanal. Obviamente, estos muestreos semanales nos presentan una imagen estática de procesos muy dinámicos que varían en escalas de tiempo de días e incluso horas, y que requerirían del uso de muestreadores continuos, como las boyas oceanográficas, para su correcta descripción. En la Tabla 2 se presenta una lista de los parámetros básicos a estimar en un programa de seguimiento de fitoplancton y calidad del medio marino. Ya se discutió sobre el material a emplear en el muestreo de fitoplancton. Las técnicas convencionales para contaje de muestras de fitoplancton, determinación de oxígeno disuelto y nutrientes, etc. han sido excelentemente descritas en diversos manuales de la UNESCO (Sournia, 1978; Hallegraeff *et al.*, 1995) que constituyen clásicos imprescindibles de oceanografía biológica. En un laboratorio con escaso personal especializado, la estimación de esta lista de variables es alcanzable si se dispone de instrumentación moderna, como los autoanalizadores *Technicon* para análisis de nutrientes, y las sondas CTD (conductivity, transmittance, depth) (Fig. 9), que permiten obtener en tiempo real perfiles de distribución vertical de temperatura, salinidad, fluorescencia *in vivo*, pH, y oxígeno disuelto. Cualquiera que sea el método utilizado, la calibración periódica es un requisito indispensable para asegurar la calidad de los datos. Si resultara imposible adquirir un CTD, habría que aplicar técnicas más tradicionales y laboriosas tras la toma de muestras de agua, con botellas oceanográficas (con termómetros de inversión) para determinación de salinidad, oxígeno disuelto, nutrientes y pH. El sencillo Disco de Secchi se usa ampliamente, aún hoy día, para medir la transparencia y dar la alerta temprana sobre aumento de biomasa fitoplanctónica que pudiera poner en peligro los cultivos de peces.

USO DE TECNOLOGÍAS AVANZADAS Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Muestreadores Continuos y Boyas Oceanográficas

Los avances tecnológicos de las últimas décadas en el campo de la electrónica, la óptica y la acústica han permitido el desarrollo de sofisticados sensores (CTDs, correntímetros, sensores remotos) de datos físicos y químicos (temperatura, salinidad, pH, fluorescencia, etc.) y la subsiguiente automatización del registro y análisis de datos. De esta forma se pueden recopilar cantidades ingentes de datos oceanográficos físicos y químicos, y obtener mapas *quasi* sinópticos de la distribución de distintas propiedades. Las boyas oceanográficas, acopladas a ordenadores en tierra, permiten la obtención automática de datos continuos o semicontinuos de propiedades físicas y químicas en tiempo real.

Sensores Remotos

Las imágenes de satélite suministran información sinóptica, en tiempo real, sobre distribución de temperatura y de pigmentos fotosintéticos en una amplia superficie. Entre sus inconvenientes podemos citar:

- Dificultad en la obtención de imágenes cuando está el cielo cubierto de nubes;
- Se obtiene información de una capa muy superficial del mar, con lo cual son indetectables las proliferaciones subsuperficiales de microalgas;
- No proporciona información de interés sobre componentes minoritarios del fitoplancton, como son a menudo las especies agentes de episodios diarreicos o paralizantes.

No obstante, las imágenes de satélite pueden ser muy útiles en el caso de proliferaciones microalgales que forman densas manchas superficiales en áreas extensas, como es el caso durante las floraciones de *Karenia brevis* en el Golfo de Méjico. La obtención de series temporales de imágenes permitirá en estos casos hacer un seguimiento, en tiempo real, del transporte de la mancha por las masas de agua. Así, durante las floraciones de *Chrysochromulina polylepis* (las «algas asesinas») de 1988 en Escandinavia, el seguimiento de las manchas por satélite cuando se distribuían por la costa sueca, permitió dar una alerta temprana a los salmoneros noruegos.

Si las floraciones de determinadas especies ya han sido asociadas con la llegada de ciertas masas de agua, o de ciertas corrientes costeras, las imágenes de distribución de temperatura pueden permitir hacer un seguimiento de la aproximación de esas aguas a las zonas de cultivo y predecir el riesgo. Así, en las Rías Bajas gallegas, la entrada de agua más cálida oceánica en otoño, al final de la época de afloramiento, puede ir asociada con advecciones de poblaciones de *Gymnodinium catenatum*, agente de episodios PSP (Fraga *et al.*, 1988), o con la intensificación de los episodios diarreicos causados por *Dinophysis acuta* (Reguera *et al.*, 1996). En las imágenes de satélite se distingue con facilidad el agua fría aflorada, de color más blanquecino, del agua oceánica más oscura. Las imágenes de satélite son utilizadas por el Centro de Control del Medio Marino (Xunta de Galicia) para hacer predicciones de la evolución de los ciclos de afloramiento-relajación-hundimiento una vez que se conoce la ecología de las especies problema. Incluso se planean muestreos oportunistas de las aguas de la plataforma con ayuda de los helicópteros de inspección costera (Pazos *et al.*, 1999; Sordo *et al.*, 2001). Si bien la información de imágenes de satélite se aplica hoy día como un apoyo que suministra información mesoescalar de datos meteorológicos y oceanográficos, existen numerosas investigaciones en curso para obtener mejoras tecnológicas entre las que cabría citar:

- Obtención de algoritmos que permitan relacionar datos de color con los pigmentos de una especie concreta (siempre y cuando esta especie se encuentre en concentraciones elevadas);
- Mayor poder de penetración, de forma que se obtenga información de la distribución de variables en capas subsuperficiales del mar.

Sondas Moleculares y Celulares

La identificación precisa de algunas especies de dinoflagelados tecados requiere preparaciones laboriosas o tinciones con calcoflúor para observación de las placas tecales; la de especies de *Pseudo-nitzschia*, requiere preparaciones y observaciones de microscopía electrónica. Estas labores pueden suponer una dura carga para los expertos que realizan análisis rutinarios en programas de seguimiento, y en cualquier caso, los taxónomos podrán identificar con precisión las células tratadas y manipuladas del arrastre de red, pero no las sedimentadas y mezcladas con otras especies parecidas del mismo género en el

fondo de las cámaras de sedimentación. El empleo de sondas celulares (anticuerpos, lectinas) o moleculares, que reaccionan con las especies problema dando una respuesta fluorescente detectable, supondría una enorme ayuda para la identificación y conteo. No obstante, la aplicación de estas técnicas, aún en fase de validación, requiere la inversión previa de un trabajo considerable de aislamiento de distintas cepas; cultivo, secuenciación de DNA y producción de sondas contra las especies diana teniendo en cuenta su variabilidad genética. Así pues, las sondas preparadas para identificar la *Pseudo-nitzschia australis* de California podrían quizás no ser válidas para identificar algunas o ninguna de las cepas de la misma especie de la costa chilena. Además, una vez disponibles los anticuerpos o sondas que reaccionan con las cepas de una especie descritas para una zona, siempre es posible que surjan nuevas cepas, por mutaciones genéticas, o por introducciones de organismos alóctonos, que no serán reconocidos por los kits disponibles. Tampoco podemos olvidar que las células de la misma especie o incluso de la misma cepa, pueden resultar tóxicas o no en distintos momentos de su ciclo. Por ello, el uso de sondas celulares o moleculares puede constituir una valiosa herramienta de trabajo que apoye o simplifique la labor de identificación de especies, pero siempre deberá ser complementada con observaciones microscópicas y con análisis de toxinas en los bivalvos.

El uso de sondas moleculares se encuentra hoy en día en fase de validación. Es necesario estudiar la reacción de las sondas, preparadas a partir de cultivos de laboratorio, frente a las poblaciones naturales. Entre los problemas a resolver se pueden citar: a) reacción de un anticuerpo monoclonal con otras especies próximas; b) variación de la intensidad de la respuesta fluorescente según el estado fisiológico de las células, lo cual afectaría a la cuantificación de las muestras; c) reacción de las sondas con productos de degradación de las células diana, *pellets* del zooplancton con células sin digerir, etc. El gran reto para los oceanógrafos es conseguir la clasificación automática de material biológico (concentración de organismos planctónicos, tamaño, o incluso identidad de los mismos), para obtener información biológica en la misma escala de tiempo que la información física y química. Para ello ha de hacer frente a la variabilidad natural, morfológica y bioquímica, de los organismos (Culverhouse *et al.*, 1996). Para la identificación «automática» de especies microalgales nocivas, son prometedoras las investigaciones en curso

sobre sondas moleculares o sobre clasificadores mediante sistemas ópticos de inteligencia artificial (redes neurales) que añadidos a los sistemas de boya con ordenador acoplado, permitirían detectar desde tierra, de forma instantánea, la aparición de especies problema en distintas estaciones y/o profundidades de la columna de agua. No hay que olvidar que estos grandes avances nos informarán sobre qué organismo está presente, pero no sobre su contenido de toxinas. El instrumento perfecto sería aquél que combinara la detección morfológica o genética del organismo, en continuo, con el uso de sondas que reaccionaran con las toxinas contenidas en las células. Ya hay expertos trabajando por conseguir este objetivo, pero es obvio que el refinamiento de esta alta tecnología y su aplicación rutinaria en investigación y programas de seguimiento precisará aún de años de desarrollo y validación en condiciones de campo. En cualquier caso, estas técnicas constituirán valiosos apoyos pero nunca podrán substituir la valiosa labor de los taxónomos convencionales.

Mi agradecimiento a Yolanda Pazos por su crítica constructiva y por la revisión minuciosa de este artículo.

BIBLIOGRAFIA

- Akselman, R., J.I. Carreto & N.G. Montoya, 1998. *Gymnodinium catenatum* and autumn toxicity in northern shelf waters of Argentina. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 122-123.
- Alveal, K., M.E. Ferrario, E.C. Oliveira & E. Sar, 1995. Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Chile, 863 pp.
- Anónimo, 1992. Panel Intergubernamental COI-FAO sobre Floraciones de Algas Nocivas (IOC-FAO/IPHAB-I/3), París, 23-25 de junio de 1992. Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO. Informes de los Órganos Rectores y de los Órganos Subsidiarios Principales, 62 pp.
- Anónimo, 1994. COI- Primer Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algas Nocivas en Sudamérica. COI, UNESCO. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101.
- Anónimo, 1995. COI- Segundo Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algas Nocivas en Sudamérica. COI, UNESCO. Informes de Reuniones de Trabajo N° 123.
- Anónimo, 2001. Report of the ICES/IOC Working Group on Harmful Algal Blooms Dynamics. International Council for the Exploration of the Sea, C.M./C:04, Ref. ACME.
- Arévalo, F.F., M. Bermúdez de la Puente & C. Salgado, 1998. ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 499-502.
- Avaria, S., 1979. Red tides off the coast of Chile. In Taylor, D.L. & H.H. Seliger (eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier, Amsterdam: 161-164.
- Bagoien, E., A. Miranda, B. Reguera & J.M. Franco, 1996. Effects of two PSP-producing dinoflagellates on the harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons* Norman. Mar. Biol. 126: 361-369.
- Bates, S.S., C.J. Bird, A.S.W. De Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. Mcculloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci 46: 1203-1215.
- Bell, G.R., 1961. Penetration of spines from a marine diatom into the gill tissue of lingcod (*Ophion elongatus*). Nature 192: 279-280.
- Benavides, H., L. Prado, S. Díaz & J.I. Carreto, 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-LeBaut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris: 113-119.
- Blanco, J. & M.J. Campos, 1988. The effect of water conditioned by a PSP producing dinoflagellate on the growth of four algal species used as food for invertebrates. Aquaculture 68: 289-298.
- Blanco, J., M.L. Fernández, J. Mariño, B. Reguera, A. Míguez, J. Maneiro, E. Cacho & A. Martínez, 1995. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-LeBaut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris: 777-782.
- Blanco, J., A. Moroño, Y. Pazos, J. Maneiro & J. Mariño, 1998. Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 204-207.
- Bricelj, V.M. & S.E. Shumway, 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. Rev. Fish. Sci. 6(4): 315-383.
- Burkholder, J.M., E.J. Noga, C.W. Hobbs, H.B. Jr. Glasgow & S.A. Smith, 1992. New "phantom" dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. Nature 358:407-410.
- Carreto, J.I. & H. R. Benavides, 1993. World record of PSP in Southern Argentina. Harmful Algae News 5, IOC of

- UNESCO: 2.
- Carreto, J.I., H.R. Benavides, R.M. Negri & P.D. Glorioso, 1986. Toxic red tide in the Argentine Sea: phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. *J. Plankton Res.* 8 (1): 15-28.
- Carreto, J.I., C. Elbusto, H. Sancho, M.O. Carignan, A.D. Cucchi Colleoni, S.G. de Marco & A. Fernández, 1993. An exploratory analysis of the Mar del Plata toxicity areas (1980-1990). In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 377-382.
- Carreto, J.I., C. Elbusto, H. Sancho, M.O. Carignan, T. Yasumoto & Y. Oshima, 1996. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profiles of marine snails, mussels and an *Alexandrium tamarense* isolate from the Mar del Plata coast (Argentina). *Rev. Invest. Des. Pesq.* 10: 101-107.
- Carreto, J.I., M.L. Lasta, R.M. Negri & H.R. Benavides, 1981. Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el Mar Argentino. *Contr. INIDEP* 399, 55 pp.
- Carreto, J.I., N. Montoya, A.D. Cucchi Colleoni & R. Akselman, 1998. *Alexandrium tamarense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine Sea: a retrospective view. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 131-134.
- Carreto, J.I., R.M. Negri, H.R. Benavides & R. Akselman, 1985. Toxic dinoflagellate blooms in the Argentine Sea. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 147-152.
- Cembella, A.D., M.A. Quilliam, N.I. Lewis, A.G. Bauder & J.L.C. Wright, 1998. Identifying the planktonic origin and distribution on spirulides in coastal Nova Scotian waters. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 481-484.
- Clément, A., 1994. Harmful blooms of *Leptocylindrus minimus* in Southern Chile. *Harmful Algae News* 8, IOC of UNESCO: 1.
- Clément, A. & G. Lembeye, 1993. Phytoplankton monitoring programme in the fish farm region of the South of Chile. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 223-228.
- Clément, A., G. Lembeye, P. Lassus & C. Le Baut, 1994. Bloom superficial no tóxico de *Dinophysis* cf. *acuminata* en el fiordo de Reloncavi. Resúmenes de las XIV Jornadas de Ciencias del Mar/ I Jornada Chilena de Salmonicultura, mayo de 1994: 83.
- Clément, A., 1995. Manejo y perspectivas futuras de las floraciones algales nocivas en Chile. In COI-Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo Nº 101, Anexo 3: 20-27.
- Clément, A., M. Seguel & G. Arzul, 1999. Fish kill in Chile associated with a bloom of *Gymnodinium* sp. *Harmful Algal News* 19, IOC of UNESCO: 5-6.
- Council of the European Communities, 1991. Council Directive 91/492/EEC of 15 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Communities* L268: 1-14.
- Council of the European Communities, 1997. Council Directive 97/61/EEC of 20 October 1997 that modifies the Annex of Directive 91/492/EEC that lays down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. *Off. J. Eur. Communities* L295: 35-36.
- Council of the European Communities, 2002. Decisión de la Comisión 2002/225/CE de 15 de marzo de 2002, por la que se establecen normas detalladas para la aplicación de la Directiva 91/492/CEE del Consejo. *Off. J. Eur. Communities* L75: 62-64.
- Culverhouse, P., R. Williams & B. Reguera, 1996. Workshop on automatic categorization of marine biological material for ecosystem research and monitoring. University of Plymouth, United Kingdom, 80 pp.
- Dahl, E., O. Lindahl, E. Paasche & J. Throndsen, 1989. The *Chrysochromulina polylepis* bloom in Scandinavian waters during spring 1988. In Cosper, E.M., M. Bricelj & E.J. Carpenter (eds.), *Novel Phytoplankton Blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms*. Springer-Verlag, Berlin: 383-405.
- Daiguji, M., M. Satake, K.J. James, A. Bishop, L. MacKenzie, H. Naoki & T. Yasumoto, 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem. Lett.*: 653-654.
- Draisci R., L. Lucentini, L. Giannetti, P. Boria & R. Poletti, 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34 (8): 923-935.
- Fernández, M.L., B. Reguera, I. Ramilo & A. Martínez, 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch, (eds.), *Harmful Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 360-363.
- Ferrario, M.E., E.A. Sar, C. Castaños & F. Hinz, 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68 (1-2): 131-147.
- Fraga, S., D.M. Anderson, I. Bravo, B. Reguera, K. Steidinger & C.M. Yentsch, 1988. Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ría de Vigo, Spain. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 27: 349-361.
- Franks, P.J.S., 1995. Sampling techniques and strategies for coastal phytoplankton blooms. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), *Manual on*

- Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33, UNESCO: 25-44.
- Fritz L. & R.E. Triemer, 1985. A rapid simple technique utilizing Calcofluor White M2r for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21: 662-664.
- Garcés, E., M. Delgado, M. Masó & J. Camp, 1998. Life history and *in situ* growth rate of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae, Pyrrophyta). *J. Phycol.* 34: 880-887.
- Gentien, P. & G. Arzul, 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 70: 571-581.
- Guzmán, L. & I. Campodonico, 1975. Marea roja en la Región de Magallanes. *Publ. Inst. Pat. Ser. Mon.* 9, 44 pp.
- Halim, Y. & W. Labib, 1996. First recorded toxic *Alexandrium minutum* Halim bloom. *Harmful Algae News* 14, IOC of UNESCO: 2.
- Hall, S., 1982. Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the northeast Pacific. Ph.D. Thesis. University of Alaska Fairbanks, 196 pp.
- Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella, 1995. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33, UNESCO, 551 pp.
- Hay, B.E., C.M. Grant & D-J. McCoubrey, 2000. A review of the marine biotoxin monitoring programme for non-commercially harvested shellfish. Part 1: Technical Report. A report prepared for the NZ Ministry of Health by AquaBio Consultants Ltd. NZ, 224 pp.
- Herndl, G.J., 1992. Marine snow in the northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem. *Mar. Microb. Food Webs* 6: 149-172.
- James, K.J., A.G. Bishop, B.M. Healy, C. Roden, I.R. Sherlock, M. Twohig, R. Draisci, L. Giannetti & L. Lucentini, 1999. Efficient isolation of the rare diarrhoeic shellfish toxin, *Dinophysistoxin-2*, from marine phytoplankton. *Toxicon* 37: 343-357.
- Jochimsen, E.M., W.W. Carmichael, J. An, D.M. Cardo, S.T. Cookson, C.E.M. Holmes, B.C. Antunes, D.A. Melo Filho, T.M. Lyra, V.S.T. Barreto, S.M.F.O. Azevedo & W.R. Jarvis, 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl. J. Med.* 338 (13): 873-878.
- Kotaki, Y., K. Koike, M. Yoshida, C-V. Thuoc, N.T. Minh Huyen, N.C. Hoi, Y. Fukuyo & M. Kodama. 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *J. Phycol.* 36 (6): 1057-1060.
- Lawrence, J.E., A.G. Bauder, M.A. Quilliam, & A.D. Cembella, 1998. *Prorocentrum lima*, a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 78-79.
- Lawrence, J.E., J. Grant, M.A. Quilliam, A.G. Bauder & A.D. Cembella, 2000. Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 147-154.
- 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.
- Lembeye, G., I. Campodonico, L. Guzmán & C. Kiguel, 1981. Intoxicaciones por consumo de mariscos del Estero de Reloncavi (X Región), Chile (1970-1980). Resúmenes de las Jornadas de Ciencias del Mar, Montemar (Chile), agosto de 1981: 42.
- Lembeye, G., T. Yasumoto, J. Zhao & R. Fernández, 1993. DSP outbreak in Chilean fiords. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 525-529.
- Lindahl, O., 1986. A dividable hose for phytoplankton sampling. In Report of the Working Group on phytoplankton and management of their effects. International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1986/L:26, Annex 3, 3pp.
- Lush, G.J. & G.M. Hallegraeff, 1996. High toxic potential of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* to *Artemia* larvae. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 389-392.
- Lush, G.J., G.M. Hallegraeff, & B.L. Munday, 1998. Histopathological effects in juvenile greenback flounder, *Rhombosolea taparina* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 609-610.
- MacKenzie, L., P. Truman, M. Satake, T. Yasumoto, J. Adamson, D. Mountfort & D. White, 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 74-77.
- Maneiro, I., M. Frangópulos, C. Guisande, M.L. Fernández, B. Reguera & I. Riveiro, 2000. Zooplankton as a potential transmission vector of Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins through the food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 155-163.
- Mariño, J., J. Maneiro & J. Blanco, 1998. The harmful algae monitoring programme of Galicia: good value for money. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 229-232.
- Martínez A., B. Reguera, M.L. Fernández, A. Míguez & E. Cacho, 1991. Spatial distribution of PSP toxicity in the mussel rafts of the Galician Rías (NW Spain): some management strategies. In Fremy, J.M. (ed.), *Actes du Colloque sur les Biotoxines Marines*. C.N.E.V.A., Paris: 211-216.
- Méndez, S., 1993a. Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results (1990-1991). In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms*

- in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 287-291.
- Méndez, S., A. Brazeiro, G. Ferrari, D. Medina & G. Inocente, 1993b. Mareas Rojas en El Uruguay: Programa de control y actualización de resultados. Inf. Tec. INAPE 46, 31 pp.
- Montoya, N.G., R. Akselman, M. Pájaro, R. Perrotta & J.I. Carreto, 1995. Mortalidad de caballa (*Scomber japonicus*) en la plataforma bonaerense (Mar Argentino) asociada a un florecimiento del dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense*. Rev. Invest. Des. Pesq. 11: 145-152.
- Montoya, N.G., M. I. Reyero, R. Akselman, J.M. Franco & J.I. Carreto, 1998. Paralytic shellfish toxins in the anchovy *Engraulis anchoita* from the Argentinian coasts. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 72-73.
- Negri, R.M. & D. Inza, 1998. Some potentially toxic species of *Pseudo-nitzschia* in the Argentine Sea (35°-39°S). In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernandez & T. Wyatt (eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 84-85.
- Oshima, Y., H. Sugino, M. Itakura, M. Hirota & T. Yasumoto, 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In Granéli, E., B. Sundström, L. Edler & D.M. Anderson (eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York: 391-396.
- Pazos, Y. & J. Maneiro, 1999. Algal bloom detection, monitoring and prediction in the Galician Rías (NW Spain). In Catena, G. & E. Funari (eds.), Algal bloom detection, monitoring and prediction. 3rd Workshop on Public Health. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 95 pp
- Proença, L.A. & G. F. Oliveira, 1999. Análise de ácido domoico em moluscos cultivados no litoral de Santa Catarina. Notas Técnicas da FACIMAR, Itajaí: 3
- Proença, L.A.O. & L.R. Rörig, 1995. Mussel production and toxic algal blooms in Santa Catarina State, southern Brazil. Harmful Algae News 12/13, IOC of UNESCO: 5.
- Proença, L.A.O., L.R. Rörig, M. Silva, S. Guimaraes & N. Lagos, 1997. PSP outbreak in Brazil. Harmful Algae News 16, IOC of UNESCO: 1, 3.
- Proença, L.A.O., M.S. Tamanaha & N. P. Souza, 2001. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. Atlântica 23: 59-65.
- Reguera, B., I. Bravo, C. Marcaillou-Le Baut, P. Masselin, M.L. Fernández, A. Míguez & A. Martínez, 1993. Monitoring of *Dinophysis* spp. and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). In Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 553-558.
- Reguera, B., I. Bravo, H. MacCall & M.I. Reyero, 1996. Phased cell division and other biological observations on *Dinophysis* spp. populations during *in situ* cell cycle studies. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 257-260.
- Rensel, J.E., 1993. Severe blood hypoxia of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) exposed to the marine diatom *Chaetoceros concavicornis*. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 625-630.
- Satake, M., A.L. MacKenzie & T. Yasumoto, 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. Nat. Toxins 5: 164-167.
- Scholin, C., F. Gulland, G.J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F.P. Chavez, J. Cordaro, R. DeLong, A. De Vogelaere, J. Harvey, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L.J. Lowenstine, R. Marin, P.E. Miller, W.A. McLellan, P.D.R. Moeller, C.L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. Silver, T. Spraker, V. Trainer & F.M. Van Dolah, 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. Nature 403: 80-83.
- Shumway, S.E., 1994. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. Rev. Fish. Sci. 3 (1): 1-31.
- Sordo, I., E.D. Barton, J.M. Cotos & Y. Pazos, 2001. An inshore poleward current in the NW of the Iberian Peninsula detected from satellite images and its relation with *G. catenatum* and *D. acuminata* blooms in the Galician Rías. Estuar. Coast and Shelf. Sci. 53: 787-799.
- Sournia, A., 1978. Phytoplankton Manual. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology 6, 337 pp.
- Suzuki T., T. Mitsuya, H. Matsubara & M. Yamasaki, 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 scallop. J. Chromatog. A. 815: 155-160.
- Underdahl, B., O.M. Skulberg, E. Dahl & T. Aune, 1989. Disastrous bloom of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae) in Norwegian coastal waters 1988 - Mortality in marine biota. Ambio 18: 265-270.
- Utermöhl, H., 1931. Neue wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 5: 567-596.
- White, A.W., S.E. Shumway, J. Nassif & D.K. Whittaker, 1993. Variation in levels of paralytic shellfish toxins among individual shellfish. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 441-446.
- 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.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, W. Sugawara, Y. Fukuyo, H. Oguri, T. Igarashi & N. Fujita, 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46: 1405-1411.

ANEXO I.

AISLAMIENTOS CELULARES POR MICROMANIPULACIÓN

AISLAMIENTO DE CÉLULAS PLANCTÓNICAS PARA ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS MONOALGALES

El material de partida óptimo para el aislamiento de microalgas y posterior establecimiento de cultivos es una muestra de agua de mar tomada con un cubo (si es muestra de superficie) o con una botella oceanográfica. Se desaconsejan los arrastres de red, porque las células sufren roces físicos, agitaciones y magulladuras que se pueden evitar partiendo de una muestra de agua no concentrada. Por supuesto, existen especies muy resistentes que serán fáciles de aislar y cultivar incluso a partir de arrastres de red.

Material y Método

- Pipetas Pasteur o pipetas microcapilares estériles que se han afinado previamente al fuego hasta conseguir un orificio de entrada de tamaño ligeramente superior al de las células que se pretenden aislar. Al cortar la punta estirada al fuego, evitar que queden aristas cortantes. Si las hubiera, cortar la boca del capilar con un cortador de diamante similar al empleado por los relojeros; alternativamente, cortar con un movimiento rápido sujetando con ambas manos el extremo a partir, y “sellar” las aristas mediante una rápida pasada por la llama (procurando que no se cierre la punta)
 - Portaobjetos de vidrio, o varias cámaras de sedimentación, o cámaras de contaje tipo Sedgewick Rafter.
 - Agua de mar filtrada (0.22 μm) y esterilizada.
 - Microplacas de cultivos celulares, con pocillos de 0.2 ml (96 pocillos distribuidos en rectángulos de 8 filas por 12 columnas), rellenos con medio de cultivo.
 - Cilindro de PVC con fondo cubierto de red (10-20 μm), otro cilindro de PVC de mayor diámetro y fondo cerrado y un tubo flexible de plástico o de silicona de 50 cm (o más) de largo y varios mm de diámetro para sifonar el agua de mar hacia fuera de los dos cilindros superpuestos durante el proceso de filtración inversa.
1. Se concentra, por filtración inversa, la muestra de agua de mar tomada con botella oceanográfica, manguera u otro contenedor (este paso puede evitarse si la especie a aislar se encontrara en concentración elevada ($> 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) (Fig.1).
 2. Se depositan 1-2 gotas de la muestra concentrada en un portaobjetos de vidrio, y dos ó tres gotas, separadas, de agua de mar filtrada y esterilizada. Alternativamente, se puede trabajar con varias cámaras de sedimentación o varias cámaras Sedgewick-Rafter: una en la que se deposita la muestra de agua de mar concentrada con los organismos a aislar, y las otras en las que se vierte agua de mar filtrada y esterilizada para los lavados sucesivos.
 3. Se aíslan las células o cadenas de la especie de interés, una por una, al microscopio invertido mediante pipeta microcapilar; se transfieren a la gota de agua (o cámara) contigua de agua de mar estéril para ser lavadas de material acompañante. Se repite esta operación 2-3 veces para asegurar que las células o cadenas aisladas estén libres de contaminantes.
 4. Se colocan las células o cadenas aisladas, en pocillos de cámaras de cultivo de tejidos con medio de enriquecimiento preparado con agua de mar filtrada y esterilizada de la zona de muestreo. Cada pocillo tiene sus coordenadas (letra de la fila y número de la columna), por lo que resulta sencillo hacer un seguimiento diario, anotado en un cuaderno, de la evolución de la célula/cadena inoculada en cada pocillo. Se incuban las cámaras bajo condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo lo más próximo posible a las condiciones ambientales donde se encontraba el organismo. Algunas especies sólo se consiguen aislar y cultivar cuando se incuba un grupo (no una sola) de células en cada pocillo.
 5. En un determinado número de pocillos (según la habilidad del aislador y la delicadeza del organismo a aislar) se observará división celular y aumento del número de células del alga de interés sin que se observen contaminantes. Cuando se

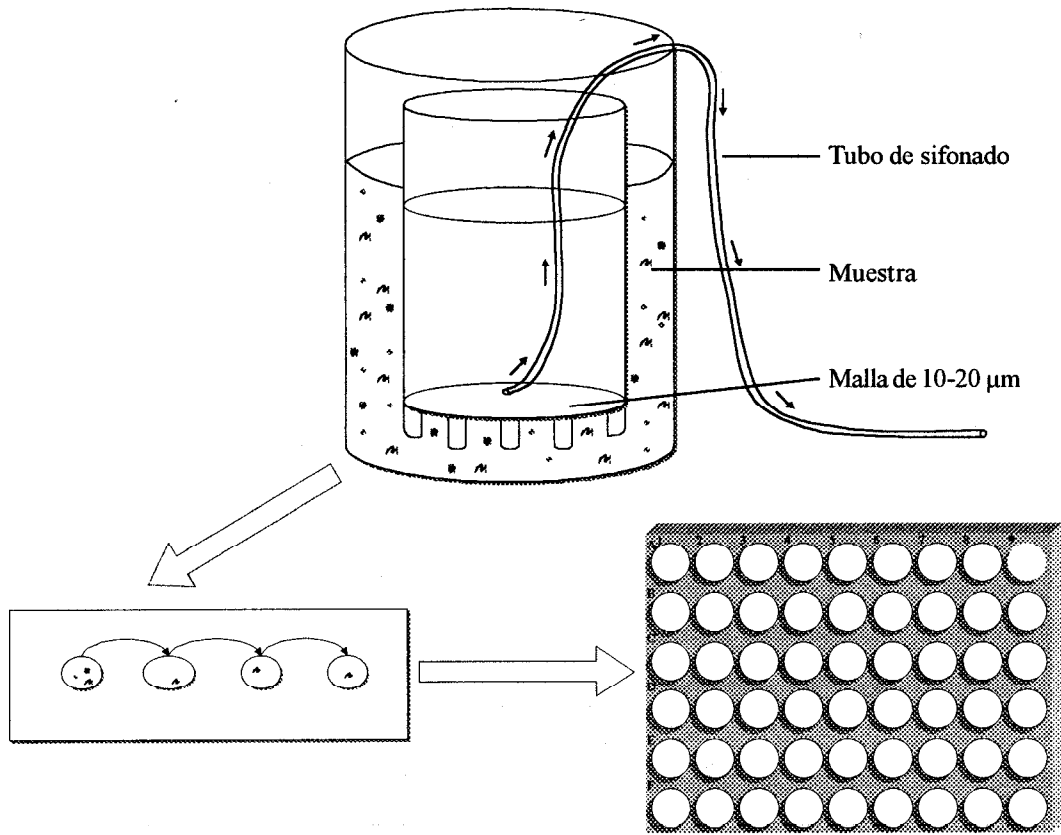


Fig. 1. Ilustraciones de: la filtración inversa; el aislamiento de células de una gota de muestra de agua de mar (concentrada o no) y posteriores transferencias a nuevas gotas de agua de mar filtrada y estéril; cámara de cultivo celular.

alcance un número de 25-100 células (depende del tamaño de la microalga), se transferirá el contenido de un pocillo a un pequeño tubo de ensayo o matraz con 5-10 ml de medio de cultivo. El paso siguiente será transferir el cultivo monoalgal conseguido del pequeño tubo a otro de tamaño medio (30-50 ml) como los que normalmente se emplean en las colecciones de cultivo.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MICROALGALES PARA ANÁLISIS DE TOXINAS POR HPLC-MS

Se siguen los mismos pasos que en los puntos 1-2-3 de la sección anterior. Pero para análisis de toxinas no es necesario tratar las células con tanta delicadeza, pudiéndose partir de arrastres de red o concentrados de laboratorio menos cuidadosos. No obstante, hay que asegurarse de que las células que se aíslan estén enteras y sanas, es decir, que no hayan sufrido roturas de la pared

celular, o que no se trate de células viejas o mal mantenidas que podrían haber goteado al exterior buena parte de su contenido citoplasmático.

Tras aislar y «lavar» las células 2-3 veces, se pasan finalmente a un pequeño tubo con agua de mar filtrada y esterilizada, antes de ser finalmente filtradas por filtro de fibra de vidrio, de pequeño tamaño (1-2 cm) y previamente tratado a 400 °C durante 6 h para eliminar contaminantes orgánicos que interfieren con la posterior extracción y análisis cromatográfico. El pequeño filtro con las células retenidas se dobla cuidadosamente con ayuda de unas pinzas y se introduce en un tubo eppendorf de 1.5-2 ml, se etiqueta y se congela a -30 °C hasta el momento de análisis.

Alternativamente, algunos expertos prefieren centrifugar las células aisladas y resuspender la «pellet» en un tubillo con el solvente empleado para la extracción, o introducir directamente las células en pequeños tubillos diseñados especialmente para los análisis de HPLC-MS.

**CAPÍTULO 2: PRINCIPALES TOXINAS DE ORIGEN
FITOPLANCTÓNICO: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION
(HPLC)**

NÉSTOR LAGOS

Laboratorio de Bioquímica de Membrana, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile. Casilla 70005, Santiago, Chile.

INTRODUCCIÓN	57
VENENO PARALIZANTE DE MOLUSCO (VPM)	58
TOXINAS DEL VPM.....	58
ESPECIES PRODUCTORAS DE TOXINAS DEL VPM	58
TOXICOLOGÍA	59
MÉTODO DE HPLC CON DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS PRESENTES EN EL VPM.....	59
A. Preparación de extracto de moluscos (bivalvos, gasterópodos y crustáceos)	59
B. Preparación de extractos de muestras de fitoplancton (silvestre o en cultivo)	60
C. Equipo Cromatográfico (HPLC)	60
D. Condiciones de la corrida cromatográfica (Oshima, 1995)	60
APLICACIONES	61
NIVELES REGULATORIOS PARA VPM	63
VENENO DIARREICO DE MOLUSCO (VDM)	63
TOXINAS DEL VDM.....	64
ESPECIES PRODUCTORAS DE TOXINAS DEL VDM	64
TOXICOLOGÍA	64
MÉTODO POR HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETEC- CIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS PRESENTES EN EL VDM.....	65
A. Extracción de toxinas del VDM de muestras de moluscos para ser inyectadas en el HPLC.....	65
B. Derivatización de estándares con ADAM	65
C. Derivatización de extractos de muestras con ADAM	66
D. Limpieza de estándares y muestras derivatizadas con ADAM, usando Sep-Pack.....	66
E. Preparación de extractos de muestras de fitoplancton (silvestre o en cultivo)	66
F. Equipo Cromatográfico (HPLC)	66
G. Condiciones de la corrida cromatográfica para VDM	67
APLICACIONES	67
NIVELES REGULATORIOS DEL VDM	68
VENENO AMNÉSICO DE MOLUSCO (VAM)	68
TOXINAS DEL VAM.....	69

TOXICOLOGÍA	69
MÉTODO DE HPLC PARA LA DETECCIÓN DE LAS TOXINAS DEL VAM.....	70
MÉTODO DE HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA	70
A. Extracción de toxinas del VAM de muestras de moluscos para HPLC	70
B. Cuantificación de ácido domoico por HPLC con detección UV	70
MÉTODO DE HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE	70
A. Derivatización de estándares o extractos con FMOC-Cl	70
B. Extractos de muestras de fitoplancton	71
C. Equipo Cromatográfico (HPLC)	71
D. Condiciones de la corrida cromatográfica	71
APLICACIONES	72
NIVELES REGULATORIOS DEL VAM	72
BIBLIOGRAFÍA	72

PRINCIPALES TOXINAS DE ORIGEN FITOPLANCTÓNICO: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

NÉSTOR LAGOS

Laboratorio de Bioquímica de Membrana, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile. Casilla 70005, Santiago, Chile.

INTRODUCCION

En los últimos veinte años, los fenómenos denominados Floraciones de Algas Nocivas (FAN) han cobrado una connotación alarmante a nivel mundial, debido al aparente incremento de la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de estos episodios. Entre los efectos más negativos de las FANs se encuentran las intoxicaciones masivas de organismos marinos y personas por consumo de productos marinos (moluscos o peces) contaminados con las toxinas generadas por dinoflagelados o diatomeas (Epstein *et al.*, 1993; Hallegraeff, 1993; Anderson, 1994; Yasumoto *et al.*, 1995).

Los principales grupos de venenos microalgales, descritos hasta la fecha y que afectan directamente al hombre son: Veneno Paralizante de Molusco (VPM), Veneno Diarreico de Molusco (VDM), Veneno Amnésico de Molusco (VAM), Ciguatera o Veneno Ciguatérico de Pescado (VCP), Veneno Neurotóxico (VN), y Microcistinas, éstas últimas producidas por algas verde-azuladas (cianobacterias) en aguas salobres y lacustres (Yasumoto & Murata, 1993).

El método estándar aplicado para la detección de toxinas es el bioensayo de ratón. Este método, de indiscutible valor para el control sanitario y la protección de los consumidores (ya que estudia la respuesta en un ser vivo), es poco específico, tiene baja sensibilidad, mala reproducibilidad interlaboratorios, es semicuantitativo, y requiere del mantenimiento de grandes reservas de ratones. Además, es un método que requiere el sacrificio de animales, lo que despierta las iras de las sociedades protectoras de animales. Por ello, y dado el impacto socioeconómico de los eventos tóxicos, se está trabajando intensamente en el desarrollo de ensayos alternativos

(enzimáticos, citotóxicos) para la detección y cuantificación de ficotoxinas.

Entre las técnicas analíticas avanzadas, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC = High Performance Liquid Chromatography), aplicada a la identificación y cuantificación de las ficotoxinas, es una tecnología de gran sensibilidad, precisión y reproducibilidad, que permite obtener información sobre la composición cualitativa y cuantitativa («perfil») de los complejos tóxicos. Esta técnica analítica es de amplio uso en la separación, purificación y aislamiento de compuestos químicos y bioquímicos, y es la que presenta mayor cantidad de aplicaciones para el más amplio espectro de análisis cuantitativos de productos naturales, fármacos, compuestos químicos y bioquímicos, y por supuesto, de todo tipo de toxinas. Debido a la gran variedad de detectores (visible, ultravioleta, fluorescencia, conductividad, índice de refracción, contador de radiactividad, quimioluminiscencia y masas) desarrollados por la industria fabricante de estos equipos, es posible detectar cualquier sustancia, incluso las que son opacas en el espectro visible y ultravioleta, como es el caso de las toxinas del VPM y VDM. Además, con esta técnica se tiene a disposición la gran cantidad de aplicaciones, ya desarrolladas, de la cromatografía líquida, lo que permite separar prácticamente cualquier compuesto, a partir de diferentes mezclas y cuantificarlo, en una corrida de no más de 25 minutos (Fallon *et al.*, 1987).

Mención aparte debe hacerse del HPLC acoplado en línea con un detector de espectroscopía de masas (HPLC-MS). Este instrumento está considerado como el método de análisis más riguroso y reciente para determinar la identidad de una sustancia y su estado de pureza. Las posibles aplicaciones del HPLC-MS para los estudios de ficotoxinas cons-

tituyen un capítulo aparte. Básicamente, identifica cada sustancia por su masa, indicando el peso del ion molecular de cada una de ellas, y en el caso que tratamos, el peso molecular de cada toxina o sus derivados (Quilliam, 1998).

Dada la extensión del tema, este capítulo se enfocará a la cuantificación de los tres grupos de venenos (VPM, VDM y VAM), relacionados con las ficotoxinas marinas que se han descrito con más frecuencia y/o que ejercen un mayor impacto socioeconómico en diversas áreas geográficas del Cono Sur Americano.

VENENO PARALIZANTE DE MOLUSCO (VPM)

Entre las ficotoxinas, el VPM constituye la principal amenaza para la salud pública en América Latina. También es el responsable de las mayores pérdidas económicas en la industria conservera de molusco a nivel regional. Desde el punto de vista técnico, la cuantificación de las toxinas de este grupo es un desafío interesante debido a su complejidad, ya que presenta el mayor número de derivados químicos (Oshima *et al.*, 1989; Yasumoto & Murata, 1993; Oshima, 1995; Lagos *et al.*, 1996; Onodera *et al.*, 1997). Además, este grupo de toxinas es el que presenta la más amplia distribución en Sudamérica, tanto en las costas del Pacífico (Guzmán *et al.*, 1975; Lagos *et al.*, 1996; Compagnon *et al.*, 1998), incluyendo los fiordos australes (Benavides *et al.*, 1995; Lagos *et al.*, 1996; Lagos, 1998), como en las del Atlántico (Carreto *et al.*, 1993; Carreto *et al.*, 1996; Andrinolo *et al.*, 1999; Proença *et al.*, 1997, 1999). Recientemente se ha detectado presencia de VPM en

cianobacterias de aguas lacustres en Brasil, lo que constituye el primer reporte sobre presencia de toxinas paralizantes en cianobacterias en Sudamérica (Lagos *et al.*, 1999).

TOXINAS DEL VPM

Las toxinas que conforman el VPM están básicamente constituidas por un núcleo tetrahidropurínico. Todas ellas son análogas a la Saxitoxina (STX), la primera tipificada y la más estudiada de estas toxinas (Fig. 1). Se han descrito más de 26 derivados de la STX (Oshima *et al.*, 1989; Oshima, 1995; Onodera *et al.*, 1997). Estas toxinas se pueden dividir en tres grupos dependiendo de la carga neta que presentan a pH neutro, característica que permite además su separación cromatográfica. Así, podemos hablar del grupo de las saxitoxinas (STXs), que presentan carga neta 2⁺ (STX, neoSTX, dcSTX, dcneoSTX, doSTX); el grupo de las Gonyaulatoxinas (GTXs), formado por las GTXs 1-6, B1 = GTX5 y B2 = GTX6, y por las decarbamoil-Gonyaulatoxinas (dcGTXs), las cuales presentan una carga neta 1⁺; y por último, el grupo de las sulfocarbamoil-saxitoxinas (C1-C4), las cuales presentan carga neta 0 (Fig. 1).

ESPECIES PRODUCTORAS DE TOXINAS DEL VPM

La contaminación de moluscos por toxinas del VPM en el Cono Sur Americano aparece asociada a floraciones de dinoflagelados pertenecientes a los géneros *Alexandrium* y *Gymnodinium* (ver capítulos 4 y 5). En Chile tan sólo se ha descrito una especie asociada al VPM, *Alexandrium catenella*. Esta especie es la responsable de la contaminación por VPM

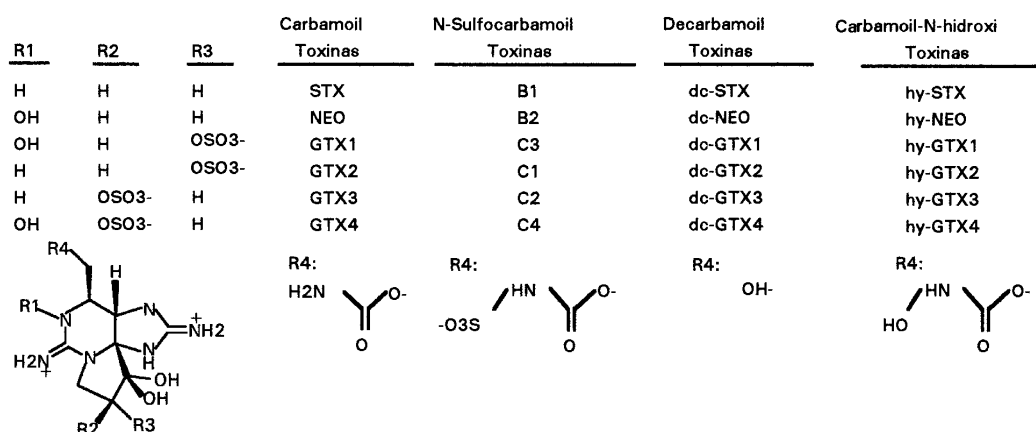


Fig. 1. Estructura de las toxinas presentes en el VPM.

en las regiones australes de nuestro país (Guzmán & Lembeye, 1975; Lembeye *et al.*, 1975; Lagos *et al.*, 1996). En los últimos años, se han presentado evidencias que indican la existencia de bacterias, asociadas a estos dinoflagelados, que también participan en las síntesis de algunas de estas toxinas (Kodama *et al.*, 1988; Franca *et al.*, 1996; Alvito *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito el aislamiento de una bacteria, productora de toxinas del VPM, a partir de una cepa chilena de *A. catenella* mantenida en cultivo no axénico. Esta bacteria se está tipificando y aún no ha sido clasificada (Alvito *et al.*, 1997). Por último, es importante destacar la reciente identificación de toxinas paralizantes en la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en Brasil, lo que constituye el primer reporte de cianobacterias productoras de toxinas del VPM en aguas lacustres de Sudamérica (Lagos *et al.*, 1999). La presencia de cianobacterias tóxicas supone una amenaza adicional para la salud pública. El agua potable debería ser controlada permanentemente, para evitar casos de intoxicaciones masivas como las ocurridas recientemente en Caruaru, Estado de Pernambuco, Brasil, donde, de 110 personas intoxicadas, 70 murieron a consecuencia de un florecimiento asociado a cianobacterias (Azevedo, 1996; Carmichael, 1996).

TOXICOLOGÍA

El mecanismo de acción de las toxinas del VPM está muy bien descrito a nivel molecular. Su receptor farmacológico es la proteína intrínseca de membrana conocida como el Canal de Sodio dependiente de voltaje, que es el que inicia la despolarización en las células excitables. Las toxinas del VPM actúan uniéndose reversiblemente, con altísima afinidad (en concentraciones de $1 \cdot 10^{-9}$ M), a su sitio de unión en el canal de sodio, bloqueando el paso de iones sodio hacia el interior de la célula (Henderson *et al.*, 1973; Strichartz, 1984; Moczydlowski *et al.*, 1984; Moczydlowski, 1987). De esta manera, a nivel fisiológico, se produce la interrupción de la transmisión neuromuscular, generándose, en el caso de los mamíferos, una parálisis respiratoria por bloqueo de la contracción de los músculos responsables de la respiración (Kao *et al.*, 1966; Guo *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1990; Long *et al.*, 1990).

Las toxinas del VPM, debido a sus características estructurales (sustituciones en sus radicales) presentan también diferentes afinidades por su receptor. Esto se refleja en la variedad de la potencia en su

efecto inhibitorio de la transmisión neuromuscular. Por esta razón, cada una de estas toxinas presenta una toxicidad específica característica, expresada en Unidades Ratón (MU, mouse units) por μmol de toxina (MU/ μmol). Esta toxicidad específica, determinada para cada toxina pura (Oshima, 1995), permite transformar las unidades de masa (cantidad neta de toxina medida por cualquier método analítico, incluido el HPLC) en una toxicidad equivalente en MU, de tal manera que se puede calcular la toxicidad de una muestra de molusco y expresarla en unidades equivalentes.

MÉTODO DE HPLC CON DERIVATIZACIÓN POST-COLUMNA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS PRESENTES EN EL VPM

Desde 1983 se han descrito al menos cuatro métodos para la cuantificación de toxinas del VPM mediante HPLC (Sullivan & Iwaoka, 1983; Sullivan *et al.*, 1985; Oshima *et al.*, 1989; Franco & Fernández, 1993; Thielert *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1995; Oshima, 1995). Entre estos métodos, uno de los más aceptados y utilizados hoy día es el descrito por Oshima (1995), que es el que se usa rutinariamente en nuestro laboratorio (Lagos *et al.*, 1996), y que describiremos a continuación.

A. Preparación de extracto de moluscos (bivalvos, gasterópodos y crustáceos)

1. Pesar 100 gramos de carne de molusco, desconchada, previamente lavados con agua fría, escurridos y secados con papel absorbente. Picar la carne y agregar 100 ml de HCl 0.1 N. Homogenizar en licuadora y llevar a un volumen final de 200 ml con HCl 0.1 N; ajustar el pH entre 3-4.
2. Extraer en baño María (cuando la temperatura de la mezcla llegue a 85 °C, mantener agitando durante 5 min). Enfriar con agua de la llave y después con hielo. Esta mezcla se filtra en papel Whatman # 1 o se centrifuga, a 4000 rpm, durante 5 min.
3. Si se aplica el bioensayo de ratón, se inyecta intraperitonealmente 1 ml de este sobrenadante a 3 ratones de 20 g y se toma el tiempo de supervivencia de éstos (ver capítulo 3).
4. Para los análisis por HPLC, al sobrenadante hay que hacerle una limpieza adicional. Se toman 2

ml y se pasan a través de un cartucho Sep-Pack C₁₈ (WATERS) previamente activado con metanol y equilibrado con agua.

5. Se eliminan los primeros 1.5 ml y se recolectan los 0.5 ml finales, los cuales se colocan directamente en un microtubo-filtro (peso molecular de exclusión de 5000 daltons, ultrafree C3GC, Millipore) y se centrifuga a 8000 rpm durante 2 min.
6. De este ultrafiltrado, se inyectan tan sólo 10 µl en la columna del cromatógrafo, para la separación y cuantificación de las toxinas.

Dada la alta sensibilidad del método y su capacidad de separación e identificación, es el más recomendado para cuantificar las toxinas y determinar el perfil toxicológico de pequeñas muestras de fitoplancton, sean éstas colectadas en ambientes naturales o provenientes de cultivos en condiciones controladas de laboratorio.

B. Preparación de extractos de muestras de fitoplancton (silvestre o en cultivo)

1. Tomar la muestra de plancton, raspando con una espátula la superficie de la red de plancton utilizada en la recolección de la muestra.
2. Pesar el contenido del raspado en un tubo cónico de 12 ml previamente tarado. Es importante tomar una muestra previa para recuento de células y así posteriormente se pueden expresar los resultados como contenido de toxina por célula.
3. Usar 0.5-1 g de plancton húmedo. Agregarle 1 ml de HCl 0.01N frío y 2 ml de mezcla de cloroformo/metanol (1:1, v/v) previamente preparada. Agitar en vórtex durante 30 s, sonicar en sonicador de baño durante 30 s, esperar 30 s y volver a sonicar.
4. Centrifugar a baja velocidad (2.000 rpm) durante 5 min y separar las fases. La fase acuosa, que contiene las toxinas, se guarda en hielo. Se vuelve a extraer la fase orgánica con 0.5 ml de HCl 0.01 N y se repite todo el proceso. Se juntan las fases acuosas, y se evapora el resto de cloroformo/metanol, al baño María a 50 °C, aproximadamente durante 2 min, agregando nitrógeno gas.
5. Llevar a un volumen final de 2 ml con agua bidestilada. Tomar una alícuota de 200 µl y filtrar

en un microtubo-filtro con un peso molecular de exclusión de 5000 daltons (ultrafree C3GC, Millipore), centrifugando a 8000 rpm durante 2 min.

6. Se inyectan 10 o 20 µl del ultrafiltrado anterior a la columna para la separación y cuantificación de las toxinas por HPLC. En el caso de fitoplancton de cultivo, se toma una alícuota que contenga aproximadamente 5000 células, se centrifuga a 4000 rpm durante 5 min, y al pellet celular obtenido se le aplica el mismo procedimiento de extracción descrito anteriormente para muestras de plancton silvestre.

C. Equipo Cromatográfico (HPLC)

La técnica se desarrolla en condiciones isocráticas, con derivatización postcolumna y detección fluorescente en línea. Se registra la información directamente en un ordenador, usando una interfase y un programa para ambiente Windows, que permite el registro de los cromatogramas, integración de áreas de los picos aislados (toxinas), representación gráfica y tratamiento de datos para presentaciones y publicaciones (Class-CR10, Shimadzu).

El equipo de HPLC está compuesto por una bomba de pistón de alta presión (Shimadzu LC-10AD) con un inyector Rheodyne 7725i (loop 20 µl), una columna de Sílica C8 fase reversa (Inertsil GL Science, Supelco o Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5 µm), una bomba de dos cabezales para agregar el agente oxidante y el ácido necesarios para la derivatización postcolumna, una cámara de reacción postcolumna con un baño u horno de temperatura controlada (65 °C), y un detector Fluorescente (Shimadzu RF-551). La figura 2 muestra un esquema de la conexión de las partes que forman el equipo de cuantificación de toxinas del VPM.

D. Condiciones de la corrida cromatográfica (Oshima, 1995)

1. Columna: Fase reversa, Sílica C8 (150 x 4.6 mm, 5 µm)
2. Fases Móviles: Velocidad de Flujo, 0.7 ml/min.
 - Para separar el grupo C1-C4: 1 mM tetrabutilamonio fosfato, pH 5.8 (con ac. acético).
 - Para separar el grupo de las Gonyaulatoxinas: 2 mM 1-heptasulfonato de sodio en 10 mM fosfato de amonio, pH 7.1.

- Para separar el grupo de las Saxitoxinas (STX, neoSTX, dcSTX): 2 mM 1-heptasulfonato de sodio en 30 mM fosfato de amonio, pH 7.1 en 5% acetonitrilo.
- 3. Agente Oxidante: Flujo = 0.4 ml/min. Ácido periódico 7 mM en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 9.
- 4. Cámara de reacción de postcolumna: coil de 10 m (0.5 mm i.d.) a 65 °C.
- 5. Agente acidificante: Flujo = 0.3 ml/min 500 mM ac. acético.
- 6. Detección: Fluorescente, Ex. 330 nm; Em. 390 nm.

La concentración de las toxinas se determina comparando las áreas de los picos detectados en la muestra, con las áreas de los picos de los estándares analíticos de cada toxina. Tan sólo cuatro de los estándares analíticos para estas toxinas se encuentran comercialmente disponibles. Nuestro laboratorio puede proveer estándares certificados de las 10 toxinas más importantes y generalmente presentes en las muestras de moluscos y dinoflagelados (Lagos *et al.*, 1996), en mezclas listas para ser usadas e inyectadas al HPLC para cada grupo de toxinas. Estas mezclas son estables durante más de un año si se

guardan en el congelador de un refrigerador doméstico común. Se suministran, 10 µl de cada mezcla disuelta y lista para ser inyectadas. La venta está a cargo de una central de costo del Laboratorio de Bioquímica de Membrana, de la Facultad de Medicina (Universidad de Chile).

APLICACIONES

Como todo método cromatográfico de HPLC, los parámetros a medir son:

- Tiempos de Retención (Rt), que son característicos de cada toxina y la identifican, determinados bajo las mismas condiciones de corrida (fase móvil) y con la misma columna (fase estacionaria).
- Área integral de fluorescencia de cada pico, la cual corresponde a la cantidad, en masa, de cada toxina o compuesto. Así pues, esta técnica es un análisis químico y no un ensayo.

En la figura 3 se muestran cromatogramas típicos de corridas rutinarias de estándares para el grupo de las Gonyaulatoxinas, Sulfocarbamoil-saxitoxinas (C1-C4) y las STXs. Las cantidades de cada toxina en la mezcla inyectada en esta corrida, dadas en el orden de elución de la columna, son: GTX4 = 5.2 pmoles; GTX1 = 15.2 pmoles; GTX5 = 7.0 pmoles; GTX3 = 1.5 pmoles; GTX2 = 4.4 pmoles; neoSTX =

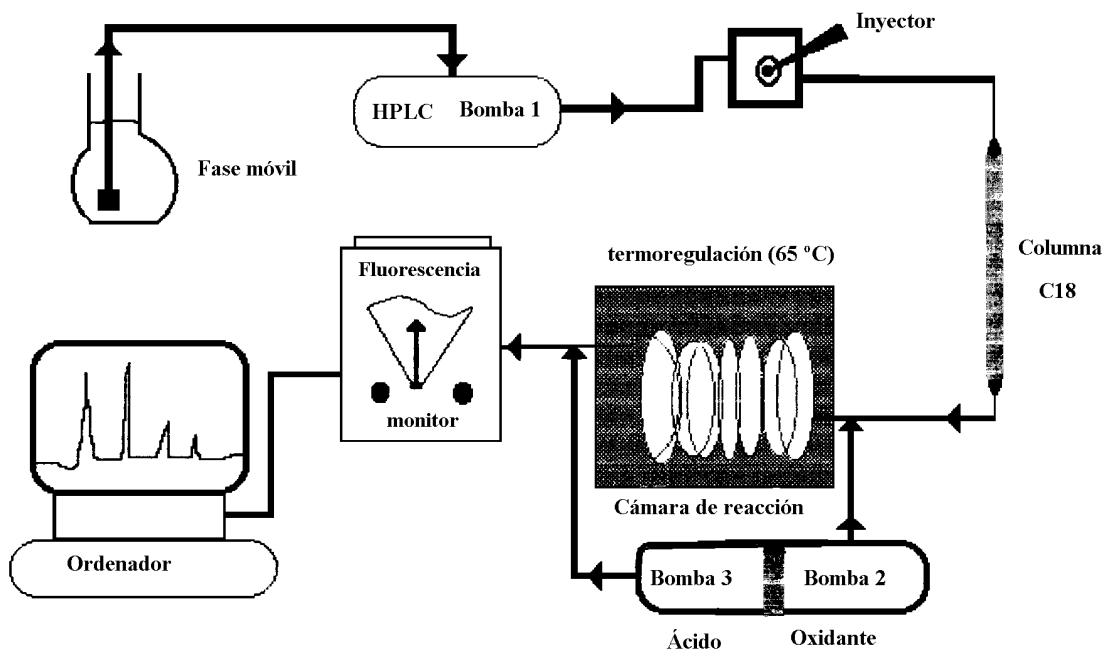


Fig. 2. Esquema ilustrativo del equipo de HPLC-FLD necesario para cuantificar toxinas presentes en el VPM, utilizando la técnica de derivatización postcolumna.

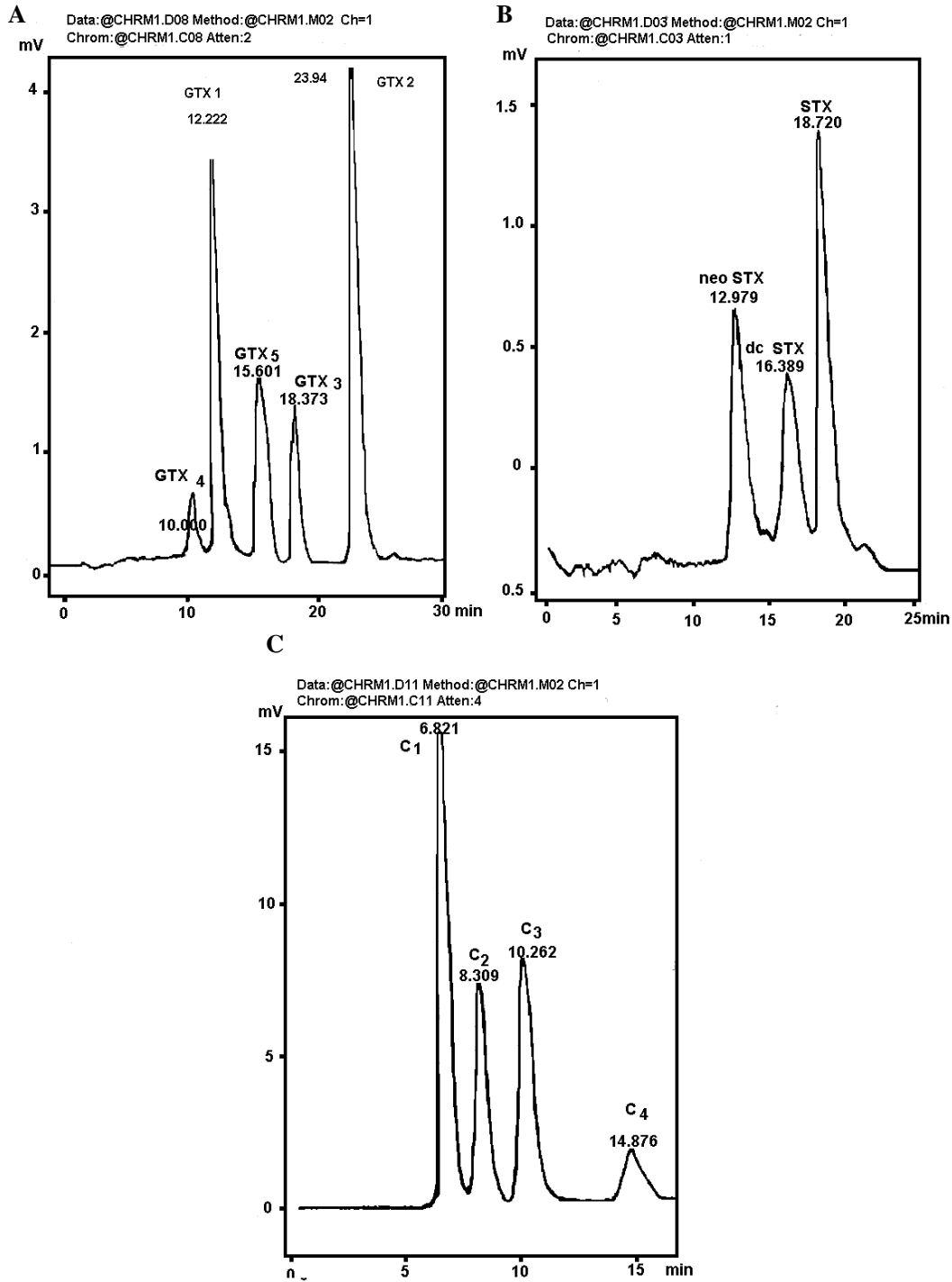


Fig. 3. Cromatogramas típicos de las corridas que presentan las toxinas más comunes del VPM: A: GTXs; B: STXs; y C: C1-C4.

9.77 pmoles; dcSTX = 2.65 pmoles; neoSTX = 4.5 pmoles. En el caso de la mezcla de C1-C4 son: C1= 5.56 pmoles; C2= 1.44 pmoles; C3= 9.06 pmoles y C4= 2.04 pmoles. Estos valores ilustran muy bien la sensibilidad del método (del orden de 150 fmoles). Conociendo el R_t de las toxinas estándares es posi-

ble identificar las toxinas en la muestra analizada (nunca varían en márgenes mayores de 50-100 min), y como se conoce la cantidad de toxina estándar y su área integrada, es posible calcular la cantidad de toxina en la muestra a partir de su área integrada correspondiente.

En la figura 4 se muestra un ejemplo del perfil de toxinas obtenido de la hoja de cálculo utilizada en nuestro laboratorio, donde sólo hay que agregar, para cada muestra, las áreas integrales de los estándares y de las toxinas presentes en la muestra analizada. Calculando la suma de todas las toxinas detectadas, y considerando la toxicidad específica de cada una, se calcula la Toxicidad Total de la muestra obteniendo una cantidad equivalente y comparable al bioensayo ratón (Sommer & Meyer, 1937). Adicionalmente, en esta misma hoja se representa gráficamente el porcentaje molar (moles %) de cada toxina, lo que indica el aporte de cada una de ella a la muestra. Esto se denomina el perfil toxicológico, el cual es característico de cada especie de dinoflagelado, cianobacteria y bacteria productora de VPM, o incluso de cada clon de una misma especie (Fig. 4).

En las especies estudiadas de dinoflagelados normalmente, los perfiles toxicológicos descritos presentan no más de 8 toxinas (Oshima, 1995; Lagos *et al.*, 1996), pero los extractos de moluscos pueden presentar hasta 12 toxinas (Oshima *et al.*, 1989; Oshima 1995; Lagos *et al.*, 1996; Compagnon *et al.*, 1998). Por otro lado, las especies de bacterias propuestas como presuntas productoras de toxinas del VPM (Kodama *et al.*, 1988; Franca *et al.*, 1996; Alvito *et al.*, 1997) y las cianobacterias presentan perfiles muy simples de 2 a 4 de estas toxinas (Mahmoot & Carmichael, 1986; Onodera *et al.*, 1996; Onodera *et al.*, 1997; Lagos *et al.*, 1999).

NIVELES REGULATORIOS PARA VPM

Máximo aceptable para el consumo humano: 80 µg de STX equivalente por 100 g de carne de molusco.

VENENO DIARREICO DE MOLUSCO (VDM)

El primer estudio sobre las toxinas presentes en el VDM fue realizado por el Prof. T. Yasumoto de la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón). Él y su grupo identificaron estas toxinas como las responsables

de una intoxicación masiva por consumo de bivalvos filtradores ocurrida en 1976 en el noreste del Japón (Yasumoto *et al.*, 1979, 1980). Aunque en rigor esta intoxicación ocurrida en Japón fué la primera en la que se asoció el VDM a poblaciones de *Dinophysis* spp., existían informaciones previas sobre intoxicaciones similares ocurridas en Holanda en 1960 (Kat, 1979). Esto es sorprendente, pues hasta esta fecha no se habían descrito intoxicaciones masivas del tipo VDM, a pesar de que las especies de microalgas productoras de estas toxinas han estado siempre presentes en muestras de plancton marino y de que tienen una distribución global (Hallegraeff, 1993), incluido el Cono Sur Americano (Zhao *et al.*, 1993; Proença *et al.*, 1998).

Actualmente se acepta que el problema epidemiológico asociado al VDM es uno de los más importantes a nivel mundial dada la amplia distribución de las especies del fitoplancton que generan estas toxinas. Sin embargo debido a que no es un tóxico letal, y a que sus síntomas y molestias (fácilmente confundibles con una gastroenteritis bacteriana) se terminan a los dos o tres días, se dispone apenas de registros epidemiológicos de intoxicaciones por VDM. En Europa, Japón, Australia, Nueva Zelanda y Chile es, con frecuencia, el problema más importante relacionado con intoxicaciones y pérdidas eco-

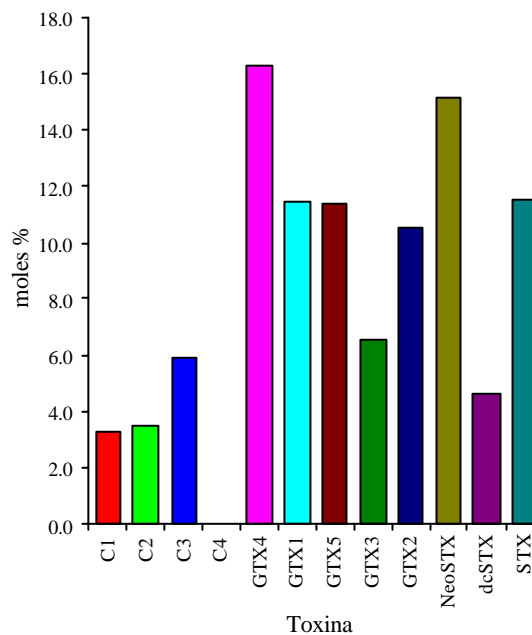


Fig. 4. Perfil toxicológico del análisis por HPLC de toxinas del VPM presentes en un extracto de bivalvo filtrador.

nómicas producto de FANs. Adicionalmente, las toxinas del VDM presentan una mayor dificultad de detección y cuantificación por su carácter hidrofóbico, obligando al uso de solventes orgánicos y a una química más compleja.

El método de HPLC con derivatización precolumna para análisis de toxinas del VDM, permite la separación y cuantificación de las toxinas del complejo para las que se dispone de patrones puros y técnicas estandarizadas. A nivel regulatorio, se están desarrollando nuevos métodos de detección para estas toxinas, alternativos al bioensayo de ratón, siendo el ensayo de inhibición enzimática de Proteína Fosfatasa 2A (Tubaro *et al.*, 1996; Vieytes *et al.*, 1997) uno de los más promisorios para la detección del ácido okadaico y sus derivados.

TOXINAS DEL VDM

Inicialmente las intoxicaciones con VDM se asociaron a varios grupos de toxinas liposolubles (Yasumoto *et al.*, 1989), que incluyen poliéteres, como el ácido okadaico (AO), Dinofisistoxina 1 (DTX1) (Murata *et al.*, 1982), y las Dinofisistoxina 2 (DTX2) y Dinofisistoxina 3 (DTX3) descritas en bivalvos filtradores de Irlanda, España, Portugal y Japón (Hu *et al.*, 1992; Yasumoto *et al.*, 1985; Fernández *et al.*, 1996; Vale & Sampayo, 1999). Los otros dos grupos de toxinas asociadas al VDM son las lactonas polietéreas macrocíclicas conocidas como Pectenotoxinas (Yasumoto *et al.*, 1985; Murata *et al.*, 1986) y los poliéteres fusionados conocidos como Yessotoxinas (Murata *et al.*, 1987). Existe hoy día una gran controversia sobre el mantenimiento de estos tres grupos de toxinas bajo las mismas siglas, ya que tan sólo el AO y sus relacionados (Fig. 5) producen un efecto estrictamente diarreico, siendo este síntoma el que caracteriza el síndrome. El tema fue muy debatido en una mesa redonda, «Re-evaluating DSP», durante la VIII Conferencia Internacional de Algas Nocivas celebrada en Vigo (España) en 1997.

ESPECIES PRODUCTORAS DE TOXINAS DEL VDM

La contaminación de moluscos con las toxinas del VDM es ocasionada por florecimientos de algas nocivas pertenecientes a los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Yasumoto & Murata, 1993). En Chile se ha identificado a *Dinophysis acuta* como la principal especie responsable de la contaminación con VDM en las regiones australes de nuestro país

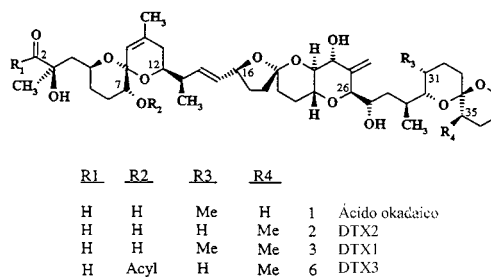


Fig. 5. Estructura del ácido okadaico y toxinas relacionadas, que forman parte del VDM.

(Muñoz *et al.*, 1992; Lembeye *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1993), si bien hay otras especies, *D. acuminatay* *D. rotundata*, que podrían contribuir a estos eventos (Muñoz *et al.*, 1992). Recientemente, en el sur de Brasil se ha descrito por primera vez la presencia de AO en muestras de hepatopáncreas del bivalvo *Perna perna*, asociándose su toxicidad a la presencia de *Dinophysis caudata* (Proença *et al.*, 1998).

TOXICOLOGÍA

El mecanismo de acción del AO y relacionados no está del todo dilucidado, al margen de que se hayan encontrado a nivel molecular sus receptores farmacológicos, como lo son la Proteína Fosfatasa 1 y 2A. Ambas enzimas son inhibidas por el AO en el rango de 100 nM y 10 nM respectivamente (Bialojan & Takai, 1988). Esta inhibición ha sido correlacionada con inflamaciones del intestino y producción de diarrea (Hamano *et al.*, 1986; Terao *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1990). Se han presentado evidencias que muestran al AO como responsable del aumento de la permeabilidad paracelular en células epiteliales humanas en cultivo (Tripuraneni *et al.*, 1997).

Es importante destacar que, debido a la acción inhibitoria sobre las proteínas fosfatasas, enzimas claves de varias vías metabólicas (Cohen, 1989) y a su efecto intracelular de producción de hiperfosforilación de enzimas y proteínas regulatorias, estas toxinas producen una amplia variedad de efectos secundarios, entre los que se incluye la capacidad de actuar como potentes promotores de tumores (Fujiki *et al.*, 1988; Suganuma *et al.*, 1988). Actualmente se considera que estas toxinas pueden constituir una amenaza para la salud incluso a niveles moderados, que escapen a los límites de detección de técnicas poco apropiadas, por su acumulación en el tejido hepático.

MÉTODO POR HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS TOXINAS PRESENTES EN EL VDM

Debido a que el ácido okadaico y sus derivados prácticamente no absorben a las longitudes de ondas del espectro visible y ultravioleta, todos los métodos desarrollados para la cuantificación de las toxinas presentes en el VDM utilizan la técnica de derivatización precolumna, ligando un cromóforo a la función carboxilo de estos compuestos. De preferencia el cromóforo utilizado es fluorescente, para aumentar la sensibilidad del método, formando así un éster fluorescente. El primer cromóforo descrito fue el 9-antrildiazometano (ADAM) (Lee *et al.*, 1987). Otros reactivos de derivatización también han sido descritos en publicaciones posteriores (Allenmark *et al.*, 1990; Luckas, 1992; Dickey *et al.*, 1993; Marr *et al.*, 1994) pero hasta ahora ninguno ha presentado una selectividad y sensibilidad equivalentes a la del ADAM, por lo cual es el más frecuentemente utilizado (Quilliam, 1995). En nuestro laboratorio utilizamos básicamente este procedimiento, que describiremos a continuación, incluyendo variantes en la extracción, limpieza de los extractos y del complejo derivatizado, en la corrida de HPLC y en el uso de la columna de fase reversa. Todas estas modificaciones deben ser consideradas como una mezcla entre el método descrito originalmente por Lee *et al.* (1987) y posteriormente modificado por Quilliam (1995).

A. Extracción de toxinas del VDM de muestras de moluscos para ser inyectadas en el HPLC

1. Se homogeniza 1 g de hepatopancreas, limpio con agua, escurrido y secado en papel absorbente, con 4 ml de metanol al 80% utilizando un Biohomogenizer (M 133/2280) ESGE (BIOSPEC Products, Inc.) durante 30 s, dos veces, con intervalos de 30 s.
2. Se sonica 30 s en baño sonicador dos veces con 30 s de intervalo.
3. Se centrifuga a 2500 rpm durante 5 min.
4. Se toman 2.5 ml del sobrenadante y se le agregan 2.5 ml de éter de petróleo (EP), agitando con vórtex.
5. Se centrifuga a 2500 rpm durante 3 min para se-

parar fases, descartándose la fase del EP.

6. A la fase inferior (metanólica) se le añaden otros 2.5 ml de EP y se repite el punto 5.
7. A la fase metanólica resultante se le agregan: 1 ml de ácido acético al 0.2% y 4 ml de diclorometano 100% (CH₂CL₂), y luego se agita en vórtex.
8. Se centrifuga a 2500 rpm durante 3 min y se guarda la fase del diclorometano (inferior). No descartar la fase superior, ya que ésta se vuelve a extraer.
9. La fase acuosa (fase superior) se reextrae con 4 ml de diclorometano repitiendo el punto 8.
10. Se juntan las dos fases de diclorometano y se completa hasta 10 ml con el mismo solvente.
11. Se toma 1 ml y se coloca en frascos ámbar; luego se evapora hasta sequedad a 40 °C (al baño maría o en placa caliente) en corriente de nitrógeno gaseoso.
12. A este material seco se le agregan 200 µl de solución ADAM al 0.1%, recién preparada, y se incuba por una hora a 25 °C en la obscuridad.

B. Derivatización de estándares con ADAM

1. Se prepara una solución de ADAM al 0.1% disolviendo 0.5 mg de ADAM. Se pesa en tubo ámbar previamente tarado. Agregar a esta cantidad 100 µl de acetona (pa) y 400 µl de metanol (pa), y guardar a -20 °C.
2. Se preparan los estándares de AO y de DTX1 disolviendo 1 mg en 2 ml de acetato de etilo (pa); se fracciona pipeteando 4 µl de la solución de tal manera que queden 2 µg de toxina estándar por tubo ámbar; se evapora el solvente a sequedad a 40 °C (placa caliente) y en corriente de nitrógeno gaseoso. Los tubitos se guardan bien cerrados a -20 °C.
3. A los 2 µg de AO o DTX1 secos se le agregan 100 µl de la solución de ADAM al 0.1% (preparada en el mismo día según el punto 1); se agita suavemente y se deja reaccionar durante una hora en la obscuridad a 25 °C. Se seca a 40 °C bajo corriente de nitrógeno y se limpia a través de un cartucho Sep-Pak (Silica cartridges, Waters, Millipore).

C. Derivatización de extractos de muestras con ADAM

1. Se procede de la misma forma que con los estándares, pero utilizando el doble de cantidad de solución ADAM al 0.1%. Es decir, se agregan 200 μ l de solución para realizar la derivatización.
2. Se seca finalmente la muestra a 40 °C en corriente de nitrógeno gaseoso para su posterior limpieza por Sep-Pak.

D. Limpieza de estándares y muestras derivatizadas con ADAM, usando Sep-Pack

1. La muestra derivatizada y secada en corriente de nitrógeno, se disuelve en 200 μ l de diclorometano/hexano (1:1). Éstos se aplican a un Sep-Pack seco de sílica de 690 mg. El Sep-Pack debe estar acoplado a una jeringa de vidrio de 10 ml sin émbolo. La muestra se aplica en el centro del Sep-Pack. Luego se lavan las paredes de la jeringa con 200 μ l del mismo solvente, dos veces.
2. Se agregan al Sep-Pack 5 ml de diclorometano/hexano (1:1), que se aplican con el émbolo. Se descartan los eluidos. Este solvente sirve para distribuir la muestra aplicada. Es importante, primero, desconectar el Sep-Pack de la jeringa, y segundo, sacar el émbolo y volver a conectar la jeringa al Sep-Pack. Esto se debe realizar cada vez que se agrega un solvente en el Sep-Pack.
3. A continuación se agregan al Sep-Pack 5 ml de diclorometano. Se vuelve a descartar el eluido (sirve para lavar el ADAM-AO y derivados que quedan unidos a la resina del Sep-Pack).
4. Se eluye con 10 ml de diclorometano/metanol (1:1) y se colecta el eluido en un frasco de 30 ml para conectar en el evaporizador rotatorio a 40 °C. Evaporar a sequedad.
5. Se disuelve el residuo en 1 ml de metanol, se coloca en un frasco ámbar etiquetado y se inyectan 10 μ l de esta muestra en el HPLC (0.02 μ g AO o DTX-1). Esta cantidad es reflejo de la sensibilidad del método, en el rango de 10 pg, para estándares. Sin embargo esta sensibilidad disminuye en muestras de extractos de moluscos debido al «efecto matriz», que varía según cada muestra y tipo de marisco. La sensibilidad puede llegar a 1-10 ng \cdot g⁻¹ de hepatopáncreas.

E. Preparación de extractos de muestras de fitoplancton (silvestre o en cultivo)

Se toma la muestra de plancton como se describió anteriormente para muestras de VPM. A esta muestra, se le agregan 1 ml de HCl 0.01 N frío y 2 ml de mezcla de Cloroformo/Metanol (1:1, v/v) previamente preparada. Agitar en vórtex durante 30 s, sonicar en sonicador de baño durante 30 s, hacer una pausa de 30 s y volver a sonicar. Centrifugar a baja velocidad 2500 rpm durante 5 min, y separar las fases. La fase orgánica, que contiene las toxinas, se guarda en hielo. Volver a extraer la fase acuosa con 0.5 ml de mezcla cloroformo/metanol (1:1) y se repite todo el proceso. Se juntan las fases orgánicas, se evapora la mezcla cloroformo/metanol, al baño maría a 50 °C, agregando nitrógeno gaseoso o evaporando en evaporador centrífugo. A este extracto seco se agregan 100 μ l de solución ADAM al 0.1%, y se incuba durante una hora; se limpia por Sep-Pack y se inyectan 10 o 20 μ l a la columna para ser separado y cuantificado por HPLC. En el caso de fitoplancton de cultivos, tomar una alícuota que contenga aproximadamente 10⁵ células, centrifugar a 4000 rpm durante 5 min y aplicar al pellet celular el mismo procedimiento de extracción descrito anteriormente para muestras de plancton natural.

F. Equipo Cromatográfico (HPLC)

La técnica descrita se desarrolla en condiciones isocráticas, con derivatización pre-columna y detección fluorescente en línea, registrando directamente en un cromatointegrador (C-R6A, Shimadzu) para el cálculo de áreas. Éste permite el registro del cromatograma y entrega los tiempos de retención e integración de áreas de los picos aislados (toxinas).

El equipo de HPLC está compuesto por una bomba de pistón de alta presión (LC-10AS, Shimadzu) con un inyector Rheodyne 7725i (loop de 20 μ l), una columna de Sílica C18 fase reversa (Supelcosil LC, SUPELCO, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) y un detector Fluorescente (RF-551 o RF-535, Shimadzu). La figura 6 muestra un esquema de la conexión de las partes que forman el equipo de cuantificación de toxinas del VDM.

En el caso de la DTX3, debido a su alta lipofilidad, no es posible analizarla directamente por HPLC derivatizada con ADAM. Para poder cuantificarla, es necesario primero hidrolizar la DTX3, sacándole el ácido graso de la posición R2 y transfor-

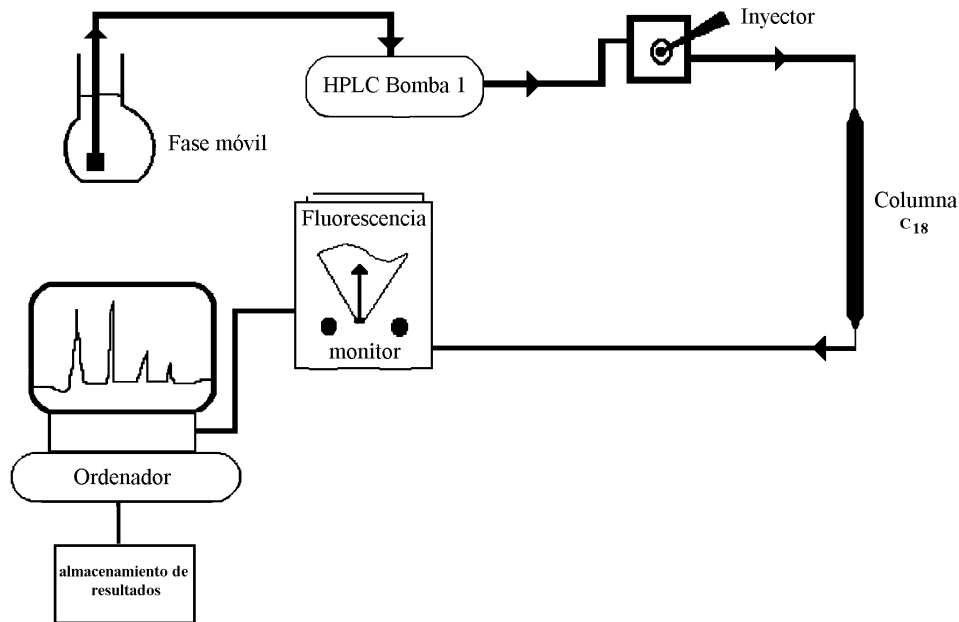


Fig. 6. Esquema ilustrativo del equipo de HPLC-FLD necesario para cuantificar toxinas presentes en el VDM, utilizando la técnica de derivatización pre-columna.

mándola en un derivado de AO menos lipófilo (Ver Fig. 5).

La concentración de las toxinas se determinan comparando las áreas de los picos de cada toxina derivatizada en las muestras con las áreas de los picos de los estándares analíticos derivatizados de cada toxina. El AO y la DTX1 se encuentran comercialmente disponibles.

G. Condiciones de la corrida cromatográfica para VDM

1. Columna: Fase reversa, Supelcosil LC (C18) 4.6 x 250 mm, 5 μ m.
2. Fase Móvil: Elución isocrática con acetonitrilo/metanol/agua 8:1:1, a temperatura ambiente, equilibrada 30 min con la fase móvil con velocidad de flujo de 1 ml/min.
3. Detección: Por fluorescencia, longitud de onda de excitación 365 nm; de emisión 415 nm.
4. Lavar la columna al finalizar el trabajo con metanol puro durante 20 min. Guardar la columna en metanol al 70%.

Debido a la alta sensibilidad del método, es posible cuantificar las toxinas y determinar el perfil toxicológico de muestras de fitoplancton, sean éstas

colectadas en ambientes naturales o provenientes de cultivos en condiciones controladas de laboratorio. Esta técnica es la única que permite conocer la composición de las toxinas presentes en el VDM.

APLICACIONES

Al igual que en la técnica usada para las toxinas del VPM, los parámetros a medir son:

- Tiempos de Retención (Rt)
- Área integral de fluorescencia de cada pico. Ésta última corresponde a la cantidad en MASA de cada toxina esterificada con ADAM. Por esta razón esta técnica es un análisis químico y no un ensayo.

La figura 7 muestra un cromatograma típico de una corrida que presenta la cuantificación de AO y DTX1, ambos derivatizados con ADAM, presentes en un extracto de hepatopáncreas del bivalvo *Aulacomya ater*. El registro corresponde al cromatograma original obtenido por el cromatointegrador.

De forma análoga es posible medir la presencia de estas toxinas en muestras de microalgas en cultivo o en poblaciones naturales. Utilizando la técnica de extracción descrita anteriormente, fue posible medir la presencia de AO y DTX1 en muestras de

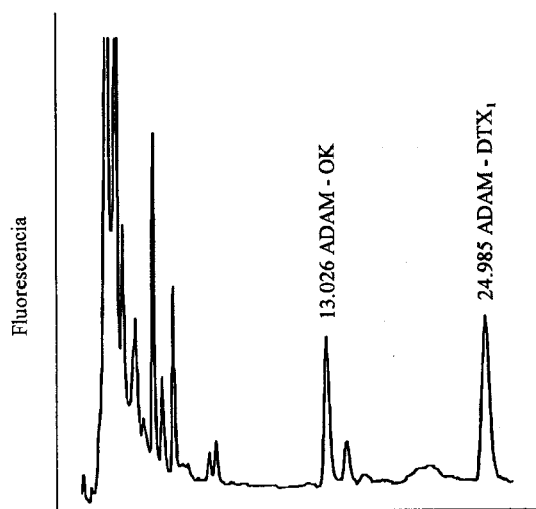


Fig. 7. Cromatograma típico de las corridas que presentan las toxinas mas comunes del VDM, Ac. Okadaico y Dinofisistoxina 1 (DTX-1) en una muestra de bivalvo filtrador (registrada con cromatointegrador).

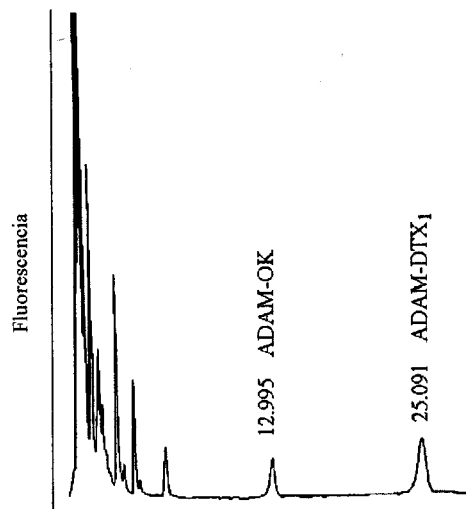


Fig. 8. Cromatograma típico de la corrida que presentan extractos de *P. lima* en cultivo, que contienen AO y DTX-1 (registros originales con cromatointegrador).

Prorocentrum lima en cultivo, obtenidos en nuestro laboratorio (Fig. 8). Los registros corresponden a cromatogramas originales provenientes de un cromatointegrador indicando la potencialidad de la técnica.

(1982). Se trata de un aminoácido que pertenece al grupo de los Kainatos, los cuales manifiestan su toxicidad homologando el efecto del neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central, el ácido glutámico.

NIVELES REGULATORIOS DEL VDM

Máximo nivel de VDM aceptable para el consumo humano en Canadá y Japón, $2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de hepatopáncreas de molusco.

VENENO AMNÉSICO DE MOLUSCO (VAM)

Las toxinas presentes en el VAM fueron conocidas mundialmente después de una intoxicación masiva por consumo de moluscos, ocurrida en 1987 en la costa este del Canadá (Isla Prince Edward) (Perl *et al.*, 1987). Este problema de salud pública llevó a la comunidad científica canadiense a investigar la toxina responsable de la intoxicación, distinta de las conocidas hasta esa fecha. Finalmente, se identificó al ácido domoico (AD), hoy conocido como el principal componente del VAM, como el agente de estos episodios (Wright *et al.*, 1989).

El ácido domoico, como entidad química, ya había sido registrado en la literatura, pues había sido purificado a partir de una macroalga roja denominada *Chondria armata* (Takemoto & Daigo, 1958). Su estructura química fue descrita por Ohfume & Tomita

(1982). Dos años después de ocurrida la intoxicación al este de Canadá, se identificó al agente responsable. Para sorpresa de muchos, no se trataba de un dinoflagelado, sino de una diatomea, *Pseudo-nitzshia pungens* f. *multiseriis*. Esta cepa fue aislada y puesta en cultivo. Se observó que producía 1-20 pg de AD por célula (Subba Rao *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1989). Este hallazgo fue muy importante, pues hasta esa fecha se creía que los dinoflagelados eran las únicas microalgas productoras de ficotoxinas.

El caso canadiense fue sorprendente no sólo por ser el primero, sino porque además ha sido el más tóxico que ha ocurrido hasta la fecha, alcanzando niveles de 900 a 1000 $\mu\text{g AD} \cdot \text{g}^{-1}$ de carne comestible. Estos niveles, además de ser altísimos, fueron fundamentales para la detección y descubrimiento de esta nueva ficotoxina. También resulta sorprendente constatar que hasta épocas recientes (1987) no se detectara una intoxicación por VAM de este tipo, considerando que las especies productoras de AD, al igual que las especies de dinoflagelados que producen VDM y VPM, han estado siempre presentes en el fitoplancton y presentan una distribución global (Hallegraeff, 1993).

El episodio canadiense podría haberse considerado como un caso aislado. Sin embargo a fines del verano de 1991 ocurrió en la bahía de Monterey, cerca de San Francisco (California), una mortandad inexplicable de pelícanos y cormoranes. Posteriormente se identificó al AD como la ficotoxina responsable de las intoxicaciones masivas, y a la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* como la microalga asociada a esta intoxicación (Fritz *et al.*, 1992; Work *et al.*, 1993; Buck *et al.*, 1992; Garrison *et al.*, 1992). Se identificó como vector de la toxina a las anchovetas, presa habitual de las aves intoxicadas, que presentaron un contenido de hasta $100 \mu\text{g AD} \cdot \text{g}^{-1}$ de carne.

En Octubre de 1991, se observaron síntomas de intoxicación por AD cuando se realizaban bioensayos de ratón con extractos de muestras de navajuela (*Siliqua patula*) colectadas en la costa de Oregón (EE UU). El análisis posterior por HPLC demostró que las muestras tenían niveles de aproximadamente $100 \mu\text{g AD} \cdot \text{g}^{-1}$ de carne (Loscutt, 1992). Posteriores muestreos del programa de monitoreo revelaron que esta toxina se encontraba distribuida desde el norte de California hasta las costas del estado de Washington. Después de estos episodios tóxicos, se produjo una alerta sobre el problema, tanto en Esta-

dos Unidos como en el resto mundo. Se reportaron especies del género *Pseudo-nitzschia* productoras de AD en el Golfo de México (Dickey *et al.*, 1992), Dinamarca, Nueva Zelanda y en varios países europeos.

TOXINAS DEL VAM

Sin duda el componente principal y mayoritario del VAM es el AD. Sin embargo se han descritos por lo menos 6 isoformas (isómeros A-F) del domoico, denominados isodomoicos, que aparecen en extractos de las distintas especies de microalgas aisladas (Fig. 9). No todos presentan la misma toxicidad en el bioensayo de ratón, y tan sólo los isómeros D y F son tan tóxicos como el AD (Wright *et al.*, 1990; Hampson *et al.*, 1992).

TOXICOLOGÍA

El mecanismo de acción fisiológica de esta toxina, al igual que en el caso de las toxinas paralizantes, se encuentra totalmente dilucidado. El efector molecular del AD es el receptor del ácido glutámico acoplado al canal de calcio en la membrana de las neuronas del sistema nervioso central. El AD es un agonista del receptor de glutamato y se une con mayor afinidad al receptor de glutamato sensible a quisqualato (quisqualate type) (Takemoto, 1978; Stewart *et al.*, 1990; Hampson *et al.*, 1992). La acción del AD al unirse a este receptor, se traduce en un sostenido aumento de iones calcio (Ca^{+2}) en el citosol de la neurona, lo que conduce finalmente a la muerte neuronal. Así pues, el AD es un amino ácido análogo de un neurotransmisor excitatorio, por lo tanto, es una neurotoxina cuya acción se localiza en el sistema nervioso central. Por su acción también se asemeja a otra toxina producida por plantas, el ácido kaínico (Hampson & Wenthold, 1988). Sin embargo el AD produce una respuesta fisiológica tres veces más potente que el ácido kaínico y cien veces más potente que el ácido glutámico, por lo que es mucho más destructivo a nivel neuronal (Briscoe *et al.*, 1975, 1976; Coyle, 1983). El daño neuronal producido se localiza en las neuronas del hipocampo, en la corteza cerebral, y está asociado con la pérdida de memoria (Sutherland *et al.*, 1990; Teitelbaum, *et al.*, 1990; Petrie *et al.*, 1991).

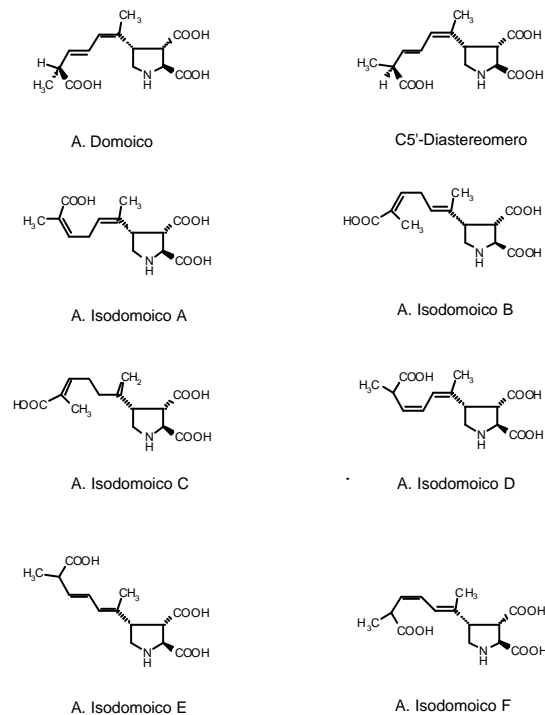


Fig. 9. Componentes del veneno amnésico. Isómeros del ácido domoico.

MÉTODO DE HPLC PARA LA DETECCIÓN DE LAS TOXINAS DEL VAM

El método más usado para la detección y cuantificación de AD es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esto se debe fundamentalmente a que el bioensayo de ratón presenta una sensibilidad (donde se comienzan a observar síntomas) de aproximadamente $40 \mu\text{g AD} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso húmedo de carne de marisco. Esta concentración es el doble de la aceptada como nivel de regulación, $20 \mu\text{g AD} \cdot \text{g}^{-1}$ de carne, a partir de lo cual se recomienda prohibir la recolección y consumo de moluscos.

Desde que se desarrolló el primer método para detección de AD (Quilliam *et al.*, 1989), se han descrito más de doce procedimientos diferentes para HPLC. La mayoría aplica la detección por ultravioleta (UV), aprovechando que el AD presenta una buena absorción a 242 nm. Sin embargo, también se han descrito métodos de detección fluorescente, utilizando derivatización pre-columna con el cromóforo 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl). Este último presenta una mayor sensibilidad ($15 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$, Pocklington *et al.*, 1990) que el de detección por UV. Sin embargo, si se utiliza como detector un arreglo de diodo, la sensibilidad del método por UV mejora notablemente, acercándose mucho a la sensibilidad del método de derivatización pre-columna.

Es importante destacar que el método con detección al UV, tanto por su simpleza como por su sensibilidad (1000 veces más sensible que los niveles de regulación), es el método más utilizado y normalmente requerido para la detección de AD en moluscos.

MÉTODO DE HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA

En nuestro laboratorio, este es el método empleado con más frecuencia para seguimientos y para análisis preliminares. A continuación se describe la técnica, incluyendo los pasos de la extracción, la corrida del HPLC y el uso de la columna de fase reversa.

A. Extracción de toxinas del VAM de muestras de moluscos para HPLC

1. Se homogenizan 10 g de carne de molusco, lavados, escurridos y secados con papel absorbente, con 8 ml de metanol al 50%, utilizando un Biohomogenizer (M 133/2280) ESGE (BIOSPEC

Products, Inc.). Se homogeniza durante 30 s, dos veces, con un intervalo de 30 s.

2. Se sonica 30 s en baño sonicador, dos veces, con 30 s de intervalo.
3. Se centrifuga a 2500 rpm durante 5 min.
4. Tomar 2.5 ml del sobrenadante (corresponde a 1/4 de la muestra), agregarle 2.5 ml de éter de petróleo (EP), y agitar con vórtex.
5. Se centrifuga a 2500 rpm durante 3 min para separar las fases, y se descarta la fase del EP.
6. A la fase inferior se le vuelve a agregar 2.5 ml de EP y se repite el punto 5.
7. La fase metanólica (fase inferior) resultante se concentra a un cuarto del volumen original con un vaporizador centrífugo (Savant, SC 210 A) y se inyectan 10 o 20 μl en la columna cromatográfica.

B. Cuantificación de ácido domoico por HPLC con detección UV

1. Columna: Supelcosil LC (C18) 4.6 x 250 mm, 5 μm , a temperatura ambiente, equilibrada 45 min con la fase móvil.
2. Elución isocrática con acetonitrilo/agua 12:88 v/v, acidificada con 5 ml de H_3PO_4 500 mM, pH 2.5-3.0, previamente desgasificado sonicando con vacío parcial. La corrida se realiza a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La detección se realiza por UV a 242 nm. Se recomienda un detector de arreglo de diodos, realizando espectros entre 220 y 300 nm para identificar el ácido domoico.
3. Lavar la columna al finalizar el trabajo con 50 ml de metanol al 50%. Guardar la columna en metanol al 50%.

MÉTODO DE HPLC CON DERIVATIZACIÓN PRE-COLUMNA Y DETECCIÓN FLUORESCENTE

A. Derivatización de estándares o extractos con FMOC-Cl

Este procedimiento, 50-100 veces más sensible, se recomienda para muestras de fitoplancton. Aquí indicaremos como se realiza en nuestro laboratorio la técnica de Pocklington *et al.* (1990).

1. Se prepara una solución de FMOC-Cl (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) 11.5 mM. Se disuelven 30 mg de FMOC-Cl en 10 ml de acetonitrilo. Se divide en fracciones de 2 ml en viales con tapa de rosca hermética y se guardan en atmósfera de nitrógeno en desecador a -20 °C.
2. Se prepara un tampón borato 1 M, pH 6.2; se disuelven 2 g de ácido ortobórico (BH₃O₃) en 25 ml de agua desionizada y desmineralizada, se ajusta a pH 6.2 con hidróxido de sodio (OH Na) 1M y se lleva a un volumen final de 30 ml.
3. Reacción de derivatización: En un tubo de vidrio de 5 ml, muy bien lavado y seco, se mezclan a temperatura ambiente 200 µl de estándares o extracto de muestra y 50 µl de tampón (pH 6.2). Como estándar interno se puede emplear también ácido dihidrokaínico (10 µl de una solución 100 µg · ml⁻¹ en acetonitrilo al 10% (DHKA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Finalmente se agregan 250 µl del cromóforo FMOC-Cl. Mezclar con vórtex, esperar 50 s y agregar 500 µl de etil acetato; mezclar en vórtex, y volver a esperar 50 s. Se producen dos fases; remover la de arriba (fase orgánica) y eliminar. Volver a lavar con 500 µl de etil acetato, mezclar con vórtex, esperar 30 s por la formación de fases, y descartar la fase orgánica. Inyectar 10-20 µl de la fase acuosa al HPLC.

B. Extractos de muestras de fitoplancton

Se toma la muestra de plancton utilizando una red de 20 µm de apertura de malla y se obtiene el material pasando suavemente una espátula por la superficie de la red utilizada. Se pesa el plancton obtenido en un tubo cónico de 12 ml previamente tarado. Es importante obtener al mismo tiempo una muestra con botella para recuento de células. De esta forma se puede, posteriormente, expresar los resultados por célula. Se utilizan 0.5 g de plancton húmedo o el equivalente a 2 · 10⁵ células si la muestra es natural, o 1-5 · 10⁵ células filtradas de cultivo. Se emplean filtros de 0.22 µm y se agregan, al pellet celular o a los filtros, 3 ml de metanol al 50%. Agitar en vórtex durante 30 s, sonicar en sonicador de baño 30 s, esperar 30 s y volver a sonicar. Centrifugar a baja velocidad, 4000 rpm durante 5 min, y separar el sobrenadante. Repetir la extracción del pellet con 2 ml, y luego juntar los sobrenadantes obtenidos.

Extraer la fase metanólica con 3 ml de cloroformo;

agregar además 2 ml de agua para hacer fases, tan sólo si fuese necesario. Se juntan las fases acuosas, se evapora de la fase acuosa los restos de cloroformo/metanol al baño maría a 50 °C, agregando nitrógeno gaseoso o evaporando en vaporizador centrífugo. No se evapora a sequedad. Este extracto acuoso es el que se utiliza para la derivatización.

C. Equipo Cromatográfico (HPLC)

La técnica se desarrolla en condiciones isocráticas, con derivatización pre-columna y detección fluorescente en línea. Los datos se registran directamente en un computador para obtención del cromatograma y el cálculo de áreas. Esto permite el registro de los tiempos de retención y la integración de las áreas de los picos aislados que corresponden a las toxinas.

El equipo de HPLC está compuesto por una bomba de pistón de alta presión (LC-10AS, Shimadzu) con un inyector Rheodyne 7725i (loop 20 µl), una columna de Sílica C18 fase reversa (Supelcosil LC, SUPELCO, 250 x 4.6 mm, 5 µm) y un detector Fluorescente (RF-551 o RF-535, Shimadzu).

D. Condiciones de la corrida cromatográfica

1. Columna: Fase reversa, Sílica C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm (Supelcosil LC, SUPELCO)
2. Fase Móvil: Velocidad de flujo de 1 ml · min⁻¹.

Las condiciones para la separación de ácido domoico son:

Isocrático: Realizar a temperatura ambiente. Acetonitrilo: Agua (4:6 v/v) + 0.1% Trifluor acético (TFA) en agua.

Gradiente lineal: Recomendable a 50 °C. Bomba A = 0.1% Trifluor acético (TFA) en agua. Bomba B = acetonitrilo + 0.1% Trifluor acético (TFA) en agua.

- Programa de Gradiente. Iniciar 100% A. Después de equilibrar el sistema (20 min), llevar desde 0-5 min a 30% B, en 15 min (desde 5-20 min) llevar desde 30% a 50% B, luego llevar a 100% B en 4 min (de 20 a 24 min), mantener durante 2 min en 100% B, luego volver en gradiente a 100% A en 3 min (de 26 a 29 min). Finalmente dejar 15 min en 100% A para equilibrar y volver a inyectar.

3. Detección: Fluorescente, Excitación 264 nm, Emi-

sión 313 nm.

APLICACIONES

Al igual que con la técnica usada para las toxinas del VPM y VDM, los parámetros a medir son:

Tiempos de Retención (Rt)

Área integral de fluorescencia de cada pico, la cual corresponde a la cantidad en masa de cada toxina derivatizada con FMOC-Cl. Por esta razón esta técnica es un análisis químico y no un ensayo. En el caso de la detección directa al UV, la absorción está directamente asociada a la cantidad en masa de ácido domoico. En el de fluorescencia la masa se relaciona a la fluorescencia emitida por el cromóforo unido al AD en una relación equimolar.

La figura 10 muestra un cromatograma típico de una corrida que presenta la cuantificación de la toxina AD en un extracto del bivalvo filtrador *Mytilus edulis* (chorito o mejillón). La detección de la toxina se realizó utilizando el método de absorbancia a 242 nm. En esta muestra sólo se detectó AD, que se corresponde con el pico que presenta un tiempo de retención de 18.90 min. La cantidad de AD detectada es de 30 ng.

El cromatograma corresponde al registro original obtenido con la conexión directa del detector UV con una interfase y un computador.

En forma análoga es posible medir la presencia de esta toxina en muestras de microalgas en cultivo o de poblaciones naturales colectadas en muestras

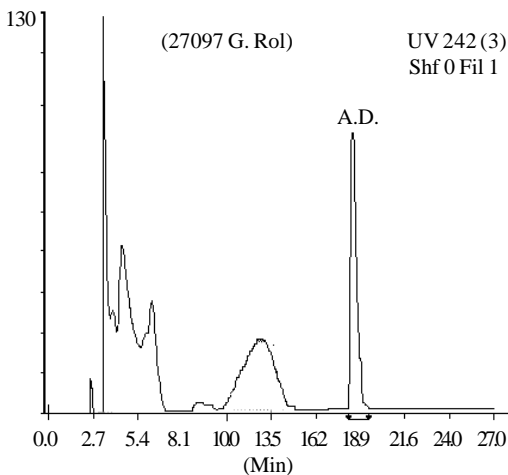


Fig. 10. Cromatograma de separación de ácido domoico. Método de absorbancia a 242 nm

Supelcosil LC 18 (250 x 4,6 mm ; 5 µm)
Acet : water (12/88), pH 2,5 ; 1 ml/min ; 242 nm
sensibilidad 30-50 ng safe limits 20 µg D.A./g shellfish

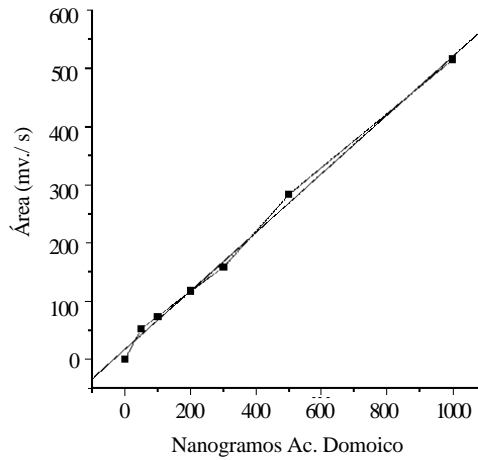


Fig. 11. Curva de calibración para cuantificación del ácido domoico por HPLC.

de agua, para lo cual se sugiere la técnica de extracción descrita anteriormente.

En la figura 11, se muestra la gráfica de calibración que permite cuantificar las cantidades de AD en cualquier tipo de muestra, utilizando el método de absorbancia a 242 nm. La gráfica demuestra que esta detección es lineal en un rango de 0-1000 ng de AD, demostrando una sensibilidad de 5-10 ng. Ambos resultados califican a éste como un excelente método para los niveles regulatorios ya que tiene una sensibilidad de detección 1000-2000 veces menor que los niveles pautados.

NIVELES REGULATORIOS DEL VAM

Los niveles permitidos para consumo humano en Canadá y en la Unión Europea no deben sobrepasar 20 µg de AD por g de peso húmedo de carne de marisco.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvito, P., I. Sousa, P. Falcao, S. Franca & N. Lagos, 1997. Further studies on the bacteria isolated from PSP producing dinoflagellates. In VIII International Conference on Harmful Algae. Vigo, Abstracts: 24.
- Allenmark, S., M. Chelminska-Bertilsson & R.A. Thompson, 1990. N-(9-acridinyl)-bromoacetamide - a powerful reagent for phase-transfer-catalysed fluorescence labeling of carboxylic acids for liquid chromatography. Anal. Biochem. 185: 279-85.

- Anderson, D.M., 1994. Red Tides. Scientific American, August: 52-58.
- Andrinolo, D., N. Santinelli, S. Otaño, V. Sastre & N. Lagos, 1999. Paralytic shellfish toxins in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdés Peninsula, Chubut, Patagonia Argentina: kinetic of a natural depuration. J. Shellfish Res. 18: 203-209.
- Azevedo, S.M.F.O., 1996. Current studies on toxic cyanobacteria (blue-green algae) of Brazilian water bodies. In IV Congreso Latino-Americano de Ficología. Caxambu, Resúmenes: 62.
- Bates, S. S., C.J. Bird, A.S.W. De Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish Aquat. Sci. 46: 1203-1215.
- Benavides, H., L. Prado, S. Díaz & J.I. Carreto, 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-LeDenn, P. Gentien & C. Marcaillou-LeBaut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, París: 113-119.
- 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.
- Briscoe, T.J., R.H. Evans, P.M. Headley, M.R. Martin & J.C. Watkins, 1975. Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurons. Nature 255: 166-167.
- Briscoe, T.J., R.H. Evans, P.M. Headley, M.R. Martin & J.C. Watkins, 1976. Structure-activity relations of excitatory amino acids on frog and rat spinal neurons. Br. J. Pharmacol. 58: 373-382.
- Buck, K., R. Uttal-Cooke, C.H. Pilskaln, D.L. Roelke, M.C. Villac, G.A. Fryxell, L. Cifuentes & F.P. Chavez, 1992. Autoecology of the diatom *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 84: 293-302.
- Carmichael, W.W., 1996. Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor. Harmful Algae News, IOC of UNESCO 15: 11.
- Carreto, J.I., C. El Busto, H. Sancho, M.O. Carignan, A.D. Cucchi-Colleoni, S.G. de Marcos & A. Fernández, 1993. An exploratory analysis of the Mar del Plata shellfish toxicity area (1980-1990). In Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 377-382.
- Carreto, J.I., C. El Busto, H. Sancho, M.O. Carignan, T. Yasumoto & Y. Oshima, 1996. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profiles of marine snails, mussels and an *Alexandrium tamarense* isolated from the Mar del Plata coast (Argentina). Rev. Invest. Des. Pesq. 10: 101-107.
- Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. Ann. Rev. Biochem. 58: 453-508.
- Cohen, P., C.F.B. Holmes & Y. Tsukitani, 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci. 15: 98-102.
- Compagnon, D., G. Lembeye, N. Marcos, N. Ruiz-Tagle & N. Lagos, 1998. Bioaccumulation of PSP toxins in bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. J. Shellfish Res. 17: 67-74.
- Coyle, J.T., 1983. Neurotoxic action of kainic acid. J. Neurochem. 41: 1-11.
- Dickey, R.W., G.A. Fryxell, H.R. Granade & D. Roelke, 1992. Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico. Toxicon 30: 355-559.
- Dickey, R.W., H.R. Granade & F.A. Bencsath, 1993. Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC-fluorometric determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 495-499.
- Epstein, P.R., T.E. Ford & R.R. Colwell, 1993. Marine ecosystems. Lancet 342: 1216-1219.
- Fallon, A., R.F.G. Booth & L.D. Bell, 1987. Applications of HPLC in Biochemistry. In Burdon, R.H. & P.H. van Knippenberg (eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Amsterdam: 1-338.
- Fernández, M. L., A. Míguez, E. Cacho & A. Martínez, 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. Toxicon 34 (3): 381-387.
- Franca, S., L. Pinto, P. Alvito, I. Sousa, V. Vasconcelos & J.G. Doucette, 1996. Studies on prokaryotes associated with PSP producing dinoflagellates. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 347-350.
- Franco, J.M. & P. Fernández, 1993. Separation of PSP toxins by reversed phase high performance liquid chromatography, with postcolumn reaction and fluorimetric detection. Chromatographia 35: 613-620.
- Fritz, L., M.A. Quilliam, J.L.C. Wright, A.M. Beale & T.M. Work, 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. J. Phycol. 28: 430-442.
- Fujiki, H., M. Suganuma, H. Suguri, S. Yoshizawa, K. Takagi, N. Uda, K. Wakamatsu, K. Yamada & M. Murata, 1988. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. Jpn. J. Cancer Res. 79: 1089-1093.
- Garrison, L.D., S.M. Conrad, P.P. Eilers & E.M. Waldron, 1992. Confirmation of domoic acid production by

- Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28: 604-607.
- Guo, X., A. Uehara, A. Ravindran, S.H. Bryant, S. Hall & E. Moczydlowski, 1987. Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry* 26: 7546-7556.
- Guzmán, L., I. Campodónico & M. Antunovic, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. IV. Distribución y niveles de toxicidad de veneno paralítico de los mariscos (noviembre de 1972-noviembre de 1973). *An. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)* 4: 209-223.
- Guzmán, L. & G. Lembeye, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. II.- Algunas condiciones hidrográficas asociadas. *An. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)* 4: 185-195.
- Hall, S., G. Strichartz, E. Moczydlowski, A. Ravindran & P.B. Reichardt, 1990. The saxitoxins; sources, chemistry, and pharmacology. In Hall, A. & G. Strichartz (eds.), *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*. American Chemical Society Symposium series 418, American Chemical Society, Washington DC: 29-65.
- Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32: 79-99.
- Hamano, Y., Y. Kinoshita & T. Yasumoto, 1986. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 27: 375-379.
- Hampson, D.R. & R.J. Wenthold, 1988. A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 263: 2500-2505.
- Hampson, D.R., X.P. Huang, J.W. Wells, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1992. Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 218: 1-8.
- Henderson, R., J.M. Ritchie & G.R. Strichartz, 1973. The binding of labelled saxitoxin to the Sodium Channel in nerve membranes. *J. Physiol.* 235: 783-804.
- Hu, T., J. Doyle, D. Jackson, J. Marr, E. Nixon, S. Pleasance, M.A. Quilliam, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1992a. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Chem. Commun.* 1992, 39-41.
- Kat, M., 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In Taylor, D. & H.H. Seliger (eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, Amsterdam: 215-220.
- Kodama, M., T. Ogata & S. Sato, 1988. Bacterial production of saxitoxin. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1075-1077.
- Kao, C.Y., C.Y. Suzuki, T. Kleinhaus & M.J. Siegelman, 1966. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Arch. Int. Pharmacod. T* 165: 438-450.
- Lagos, N., 1998. Microalgal bloom: a global issue with negative impact in Chile. *Biological Research* 31: 375-386.
- Lagos, N., D. Compagnon, M. Seguel & Y. Oshima, 1996. Paralytic Shellfish Toxin composition: A quantitative analysis in Chilean mussels and dinoflagellates. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 121-124.
- Lagos, N., D. Compagnon, D. Andrinolo & K. Salas, 1998. Quantitative analysis of PSP toxicity in the fjord system of the southern regions of Chile: HPLC technology. In II Reuniao Ibero-Americana de Ficología e IV Congresso Latino-Americano de Ficología. Caxambu, Actas Vol. I: 51-62.
- Lagos, N., H. Onodera, P.A. Zagatto, D. Andrinolo, D., S.M.F.Q. Azevedo & Y. Oshima, 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 37: 1359-1373.
- Lawrence, J.F., C. Menard & C. Cleroux, 1995. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of Paralytic Shellfish Poisons in Shellfish. *J. AOAC Int.* 78: 514-520.
- Lee, J.S., T. Yanagi, R. Kenma & T. Yasumoto, 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem. Tokyo* 51: 877-881.
- Lembeye, G., L. Guzmán & I. Campodónico, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. III.- Fitoplancton asociado. *An. Inst. Pat., Punta Arenas (Chile)* 4: 197-208.
- Lembeye, G., T. Yasumoto, J. Zhao & R. Fernández, 1993. DSP outbreak in Chilean fjords. In Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 525-529.
- Long, R.R., J.C. Sargent & K. Hammer, 1990. Paralytic shellfish poisoning: A case report and serial electrophysiological observations. *Neurology* 40: 1310-1311.
- Loscutoff, S., 1992. West coast experience - an overview. *Proceedings of the US FDA. Domoic Acid Workshop, California (USA), February 1992: 125-132.*
- Luckas, B., 1992. Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *J. Chromatogr.* 624: 439-456.
- Mahmood, N.A. & W.W. Carmichael, 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* 24: 175-186.
- Marr, J.C., L.M. McDowell & M.A. Quilliam, 1994. Investigation of derivatization reagents for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Nat. Toxins* 2: 302-311.

- Moczydlowski, E., S. Hall, S.S. Garber, G.S. Strichartz & C. Miller, 1984. Voltage-dependent blockade of muscle Na^+ channels by guanidinium toxins: effect of toxin charge. *J. Gen. Physiol.* 84: 687-704.
- Moczydlowski, E., 1987. Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry* 26: 7546-7556.
- Muñoz, P., S. Avaria, H. Sievers & R. Prado, 1992. Presencia de dinoflagelados tóxicos del género *Dinophysis* en el Seno Aysén, Chile. *Rev. Biol. Mar., Valparaíso* 27: 187-212.
- Murata, M., M. Shimatani, H. Sugitani, Y. Oshima & T. Yasumoto, 1982. Isolation and structure elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43: 549-552.
- Murata, M., M. Sano, T. Iwashita, H. Naoki & T. Yasumoto, 1986. The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2693-2695.
- Murata, M., M. Kumagai, J-S Lee & T. Yasumoto, 1987. Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28: 5869-587.
- Ohfune, Y. & M. Tomita, 1982. Total synthesis of domoic acid. A revision of the original structure. *J. Amer. Chem. Soc.* 104: 3511-3513.
- Onodera, H., Y. Oshima, M.F. Watanabe, M. Watanabe, C.J. Bolch, S. Blackburn & T. Yasumoto, 1996. Screening of paralytic shellfish toxins in freshwater cyanobacteria and chemical confirmation of the toxins in cultured *Anabaena circinalis* from Australia. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 563-566.
- Onodera, H., M. Satake, Y. Oshima, T. Yasumoto & W.W. Carmichael, 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat. Toxins* 5: 146-151.
- Oshima, Y., K. Sugino & T. Yasumoto, 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. In Natori, S., K. Hashimoto & Y. Ueno (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam: 319-326.
- Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 78: 528-532.
- Perl, T., L. Bédard & R. Remis, 1987. Intoxication following mussel ingestion in Montreal. *Can. Dis. Wkly. Rep.* 13: 224-226.
- Petrie, B.F., C. Pinsky, N.M. Standish, R. Bose & G.B. Glavin, 1991. Parenteral domoic acid impairs spatial learning in mice. *Pharmacol. Biochem. Be.* 41: 211-214.
- Pocklington, R., F.E. Milley, S.S. Bates, C.J. Bird, A.S.W. De Freitas & M.A. Quilliam, 1990. Trace determination of domoic acid in seawater and plankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Int. J. Environ. An. Chem.* 38: 351-368.
- Proença, L.A., L. Rörig, M. Silva, S. Guimaraes & N. Lagos, 1997. PSP outbreak in Brazil. *Harmful Algae News* 16, IOC of UNESCO: 1-3.
- Proença, L.A., L. Rörig, M.A. Barreiro & N. Lagos, 1998. A possible case of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Southern Brazil. In IV Congreso Latino-Americano de Ficología. Caxambu, Anais Vol. II: 257-263.
- Proença, L.A., N. Lagos, L. Rörig, M. Silva & S. Guimaraes, 1999. Occurrence of paralytic shellfish toxins - PSP in southern Brazilian waters. *Ciencia e Cultura* 51: 16-21.
- Quilliam, M.A., P.G. Sim, A.W. McCulloch & A.C. McInnes, 1989. High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Int. J. Environ. An. Chem.* 36: 139-154.
- Quilliam, M.A., 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 78: 555-570.
- Quilliam, M.A., 1998. Liquid chromatography-mass spectrometry: a universal method for the analysis of toxins?. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 509-514.
- Rivas, M., C. García, J.L. Liberona & N. Lagos, 2000. Biochemical characterization and inhibitory effects of dinophysistoxin-1, okadaic acid and microcystine-LR on protein phosphatase 2A purified from the mussel *Mytilus chilensis*. *Biol. Res.* 33: 197-206.
- Sommer, H. & K.F. Meyer, 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Pathol.* 24: 560-598.
- Strichartz, G. 1984. Structural determinants of the affinity of saxitoxin sodium channel. *J. Gen. Physiol.* 84: 281-305.
- Stewart, G.R., C.F. Zorumski, M.T. Price & J.W. Olney, 1990. Domoic acid: A dementia-inducing excitotoxic food poison with kainic acid receptor specificity. *Exp. Neurol.* 110: 127-138.
- Subba Rao, D.V., M.A. Quilliam & R. Pocklington, 1988. Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* 45: 2076-2077.
- Suganuma, M., H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada & T. Sugimura, 1988. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate 13-acetate-type tumor promoter. *P. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 1768-1771.
- Sullivan, J.J. & W.T. Iwaoka, 1983. High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *J. AOAC Int.* 66:

- 297-303
- Sullivan, J.J., M.M. Wekell & L.L. Kentala, 1985. Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. *J. Food Sci.* 50: 26-29.
- Sutherland, R.J., J.M. Hoising & I.Q. Wishaw, 1990. Domoic acid, and environmental toxin, produces hippocampal damage and severe memory impairment. *Neurosci. Lett.* 120: 221-223.
- Takemoto, T. & K. Daigo, 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull.* 6: 578-580.
- Takemoto, T., 1978. Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids. In McGeer, E.G., J.W. Olney & P.L. McGeer (eds.), *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Raven Press, New York: 1-15.
- Teitelbaum, J.S., R.J. Zatorre, S. Carpenter, D. Gendron, A.C. Evans, A. Gjedde & N.R. Cashman, 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N. Engl. J. Med.* 322: 1781-1787.
- Terao, K., E. Ito, T. Yanagi & T. Yasumoto, 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. *Toxicon* 24: 1141-1151.
- Thielert, G., I. Kaiser & B. Luckas, 1991. HPLC determination of PSP toxins. In Freymy J.M. (ed.), *Actes du Colloque sur les Biotoxines Marines*. C.N.E.V.A., Paris: 121-125.
- Tripuraneni, J., A. Koutsouris, L. Pestic, P. De Lanerolle & G. Hecht, 1997. The toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning, Okadaic Acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology* 112: 100-108.
- Tubaro, A., C. Florio, E. Luxich, S. Sosa, R. Della Loggia & T. Yasumoto, 1996. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assesment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* 34 (7): 743-752.
- Uribe, J.C., 1993. PSP outbreaks in Chile. In *Abstracts of the VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Nantes (France), 1993: 210.
- Vale P. & M.A. Sampayo, 1999. Esters of okadaic acid and Dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37: 1109-1121.
- Vieytes, M., O. Fontal, F. Leira, J.M. Baptista de Sousa & L. Botana, 1997. A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal. Biochem.* 248: 258-264.
- Work, T.M., B. Barr, A.M. Beale, L. Fritz, M.A. Quilliam & J.L.C. Wright, 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J. Zoo Wildlife Med.* 24: 54-62.
- Wright, L.L.C., M. Falk, A.G. McInnes & J.A. Walter, 1990. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Can. J. Chem.* 68: 22-25.
- Wright, J.L.C., R.K. Boyd, A.S.W. De Freitas, M. Falk, R.A. Foxall, W.D. Jamieson, M.V. Laylock, A.W. McCulloch, A.G. McInnes, P. Odense, V. Pathak, M.A. Quilliam, M.A. Ragan, P.G. Sim, P. Thibault, J.A. Walter, M. Gilgan, D.J.A. Richard & D. Dewar, 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67: 481-490.
- Yasumoto, T., Y. Oshima & M. Yamaguchi, 1979. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Japan and chemical properties of the toxin. In Taylor, D. & H.H. Seliger (eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, Amsterdam: 495-502.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, W. Sugawara, Y. Fukuyo, H. Oguri, T. Igarishi & N. Fujita., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causitive organism of diarrhetic shellfish poisoning. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 1405-1411.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G.K. Matsumoto & J. Clardy, 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025.
- Yasumoto, T., M. Murata, J.-S. Lee. & K. Torigoe, 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In Natori, S., K. Hashimoto & Y. Ueno (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam: 375-382.
- Yasumoto, T. & M. Murata, 1993. Marine Toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909.
- Yasumoto, T., M. Fukui, K. Sasaki & K. Sugiyama, 1995. Determination of Marine Toxins in Foods. *J. AOAC. Int.* 78: 574-582.
- Zhao, J., G. Lembeye, G. Cenci, B. Wall & T. Yasumoto, 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 587-592.

CAPÍTULO 3: BIOENSAYOS CON MAMÍFEROS Y ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y CELULARES PARA LA DETECCIÓN DE FICOTOXINAS

M. LUISA FERNÁNDEZ¹, AÚREA MÍGUEZ¹, EMILIANO CACHO¹, ANA MARTÍNEZ¹,
JORGE DIOGÉNE² & TAKESHI YASUMOTO³

¹ Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas,
Estación Marítima s/n, Apto. 90, 36208 Vigo, España.

² IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Centro de Acuicultura, Apto 200, 43540 Sant
Carles de la Rápita, Tarragona, España.

³ Japan Food Research Laboratories, 6-11-10 Nagayama, Tama-Shi 206-0025, Japón.

INTRODUCCIÓN	79
Consideraciones generales	79
Métodos de determinación de ficotoxinas marinas	80
ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE FICOTOXINAS MARINAS	81
1. Ensayos <i>in vivo</i>	82
1.1. Consideraciones generales	82
1.2. Ensayos <i>in vivo</i> para la determinación de PSP	83
1.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES	83
1.2.2. BIOENSAYO EN RATÓN DE LA AOAC	85
1.3. Ensayos <i>in vivo</i> para la determinación de DSP	86
1.3.1. CONSIDERACIONES GENERALES	86
1.3.2. EL BIOENSAYO DE LA RATA	91
1.3.3. BIOENSAYOS EN RATÓN	91
1.4. BIOENSAYO EN RATÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE BREVETOXINAS (NSP)	95
1.5. BIOENSAYO EN RATÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CIGUATOXINAS (CFP)	96
2. Ensayos <i>in vitro</i>	96
2.1. Ensayos de inhibición enzimática	96
2.2. Inmunoensayos	98
2.3. Ensayos de receptores	101
2.4. Ensayos celulares	102
2.4.1. ENSAYOS CELULARES DE TOXINAS QUE ACTÚAN SOBRE CANALES DE SODIO	104
2.4.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD PARA EL ÁCIDO OKADAICO (AO)	105
2.4.3. OTRAS TOXINAS Y ENSAYOS	105
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	106
BIBLIOGRAFÍA	107

ANEXO I	113
METODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO PARALIZANTE DE MARISCOS - PSP (AOAC, 1995)	113
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	113
2. PRINCIPIO	113
3. APARATOS Y MATERIAL	113
4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	113
5. REACTIVOS	113
6. MÉTODO DE ENSAYO	113
7. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD	115
MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS	116
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	116
2. PRINCIPIO	116
3. APARATOS Y MATERIAL	116
4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	116
5. REACTIVOS	116
6. MÉTODO DE ENSAYO	116
7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	117
PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO PARA ELIMINAR INTERFERENCIAS CON TOXINAS PSP O ASP	117
1. MÉTODO DE ENSAYO	117
2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	117
MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE ACIDO OKADAICO, DINOFIGISTOXINAS, PECTENOTOXINAS, YESOTOXINAS Y AZASPIRÁCIDOS EN EL CUERPO ENTERO DE LOS MOSLUSCOS	118
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	118
2. PRINCIPIO	118
3. REACTIVOS	118
4. APARATOS Y MATERIAL	118
5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	118
6. MÉTODO DE ENSAYO	118
7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	119
PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE AO, DTXS, PTXS Y AZAS EN EL EXTRACTO DE DICLOROMETANO Y DETECCIÓN DE YTXS EN EXTRACTO METANÓLICO	120
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	120
2. REACTIVOS	120
3. APARATOS Y MATERIAL	120
4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	120
5. MÉTODO DE ENSAYO	120
6. BIOENSAYO EN RATÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD	120

BIOENSAYOS CON MAMÍFEROS Y ENSAYOS BIOQUÍMICOS Y CELULARES PARA LA DETECCIÓN DE FICOTOXINAS

M. LUISA FERNÁNDEZ¹, AÚREA MÍGUEZ¹, EMILIANO CACHO¹, ANA MARTÍNEZ¹,
JORGE DIOGÉNE² & TAKESHI YASUMOTO³

¹ Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas. Ministerio de Administraciones Públicas,
Estación Marítima s/n, Apto. 90, 36208 Vigo, España.

² IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Centro de Acuicultura, Apto. 200, 43540 Sant
Carles de la Ràpita, Tarragona, España.

³ Japan Food Research Laboratories, 6-11-10 Nagayama, Tama-Shi 206-0025, Japón.

INTRODUCCIÓN

Consideraciones generales

La presencia de ficotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en moluscos, representa un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica, y que afecta tanto a países industrializados como a países en desarrollo. La transferencia y acumulación de estas toxinas, producidas principalmente por un reducido número de especies de dinoflagelados y diatomeas, tiene lugar a través de las redes tróficas. Los principales vectores de transmisión son los moluscos bivalvos (mejillones, vieiras o conchas de abanico, almejas, berberechos, ostras, etc.) y en el caso de la ciguatera, algunas especies de peces de zonas intertropicales. Asimismo, diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar como transvectores.

Las ficotoxinas comprenden un amplio espectro de sustancias de estructura molecular, mecanismo de acción y actividad biológica muy diversa y pueden clasificarse atendiendo a sus diferentes efectos toxicológicos. Basándose en la sintomatología de la intoxicación y en los vectores de transmisión, se han definido cinco tipos de síndromes asociados a las siguientes toxinas o venenos:

- Veneno Paralizante de Marisco (VPM = Paralytic Shellfish Poisoning = PSP);
- Veneno Diarreico de Marisco (VDM = Diarrhetic Shellfish Poisoning = DSP);
- Veneno Amnésico de Marisco (VAM = Amnesic Shellfish Poisoning = ASP);
- Veneno Neurotóxico de Marisco (VNM = Neurotoxic Shellfish Poisoning = NSP);
- Veneno Ciguatérico (CFP = Ciguatera Fish Poisoning).

Recientemente ha sido definido un nuevo síndrome tóxico, "Envenenamiento por Azaspirácido" ("Azaspiracid Poisoning" = AZP), producido por la ingestión de bivalvos contaminados con azaspirácido y análogos, y que se manifiesta con síntomas similares al envenenamiento diarreico (DSP). Si bien el origen del azaspirácido no está totalmente esclarecido, su aparición estacional y su estructura molecular hicieron sospechar que el agente productor era un dinoflagelado (Satake *et al.*, 1998a, b). Recientemente Yasumoto (datos no publ.) demostró analíticamente que *Protoperidinium crassipes* y otros *Protoperidinium spp.* contenían azaspirácidos.

Además de las sustancias mencionadas anteriormente, existen otras toxinas procedentes de microalgas para las cuales no se ha definido un síndrome específico. Es el caso de ciertas hepatotoxinas (microcistinas y nodularinas) y neurotoxinas (anatoxinas) producidas por determinadas especies de cianobacterias cuya aparición y proliferación no está únicamente restringida a aguas dulces, y cuya presencia en ambientes marinos ha derivado en la contaminación de moluscos (Luu *et al.*, 1993; Holmes, 1991; Boland *et al.*, 1993).

La prevención de los riesgos tanto para la salud pública, como para los diferentes sectores económicos afectados (industrias de la acuicultura, pesquerías y turismo) conlleva la implantación de programas de seguimiento de la presencia de microalgas potencialmente tóxicas y de control de la presencia de ficotoxinas en los diferentes vectores de transmisión. Con el fin de prevenir que puedan llegar mariscos tóxicos al consumidor, se han desarrollado diferentes métodos para la detección de ficotoxinas, que en muchos casos, en un tiempo reducido, permiten detectar su presencia en los mariscos a niveles muy

por debajo de lo que se considera un riesgo; de ahí que en la última década se hayan reducido notablemente el número de intoxicaciones. Dichos métodos han de abordar dificultades tales como la presencia de las toxinas en matrices biológicas complejas y la presencia de mezclas de congéneres relacionados estructuralmente y con potencias tóxicas que pueden llegar a diferir hasta en tres órdenes de magnitud en el caso de las toxinas PSP (Oshima *et al.*, 1993). Hay que añadir las dificultades ocasionadas por la ausencia en la mayoría de estas sustancias de grupos cromóforos que faciliten su detección por las técnicas convencionales de espectrofotometría UV-Visible o de fluorescencia.

La aparición de toxinas de diferentes grupos en un mismo producto marino no es un hecho infrecuente y representa una complicación adicional a efectos de determinar la toxicidad de los mariscos. Es digna de mención la ocurrencia simultánea en las aguas costeras de especies fitoplanctónicas productoras de toxinas diarreicas y aquellas productoras de toxinas paralizantes, y como consecuencia de este hecho, la co-ocurrencia de DSP y PSP en los moluscos (Gago-Martínez *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1996; Amzil *et al.*, 1999). Las toxinas paralizantes, incluso cuando se encuentran en niveles por debajo del límite de detección del bioensayo en ratón utilizado habitualmente para su determinación (AOAC, 1995), dan lugar a interferencias en uno de los métodos más extendidos de detección de toxinas DSP, el bioensayo en ratón con extracción acetónica (Yasumoto *et al.* 1978), que de no ser eliminadas no permitirían la determinación de la presencia de toxinas diarreicas.

Cabe mencionar la posibilidad de biotransformaciones de las toxinas a lo largo de su transmisión a través de la cadena trófica, mediante diferentes procesos metabólicos, de tal forma que la composición tóxica de los transvectores, y por tanto de los mariscos, puede diferir notablemente de aque-

lla de las microalgas productoras de las toxinas. Una última dificultad viene dada por la labilidad química de algunas de estas sustancias que hace que puedan sufrir transformaciones durante los procesos de extracción, purificación y análisis.

Métodos de determinación de ficotoxinas marinas

De manera general, y atendiendo a la naturaleza de la información obtenida a partir de los métodos de determinación, éstos pueden clasificarse en métodos de ensayo y métodos analíticos (Sullivan, 1993) (Tabla 1).

En el área de la determinación de toxinas, el término *ensayo*, se refiere a aquellos métodos que proporcionan un valor del contenido total de toxinas basado en la medición de una única respuesta, biológica o bioquímica, que engloba la actividad de todos los congéneres presentes en la muestra. La determinación de la toxicidad se lleva a cabo en función de una curva dosis-respuesta que se realiza usualmente con una de las toxinas representativas del grupo objeto de estudio, expresándose finalmente la toxicidad total en equivalentes de dicha toxina. Dentro de este primer grupo se encuadrarían los bioensayos *in vivo*, los ensayos de inhibición enzimática, los ensayos celulares, los ensayos de receptor, los inmunoensayos y los ensayos electrofisiológicos.

El término *análisis* se refiere a aquellos métodos de detección en los que se realiza una separación, identificación y posterior cuantificación individual de las toxinas en función de una respuesta instrumental que es proporcional a la concentración de cada una de las toxinas presentes en la muestra. Dicha cuantificación requiere la calibración previa del equipo instrumental con patrones de concentración conocida de cada una de las toxinas objeto de determinación. La respuesta instrumental debe ser con-

Tabla 1. Métodos analíticos de determinación de toxinas.

Ensayos		Análisis
Ensayos <i>in vivo</i>	Ensayos <i>in vitro</i>	<i>Cromatografía Líquida de Alta Eficacia</i>
Bioensayo en ratón	Ensayos celulares	Detección UV, DAD
Bioensayo de la rata	Ensayos de receptor	Detección fluorimétrica
	Ensayos de inhibición enzimática	Detección por Espectrometría de masas
	Inmunoensayos	Electroforesis capilar

vertida posteriormente a valores de toxicidad en función de factores de conversión específicos para cada toxina, de manera que la toxicidad global se determina como una sumatoria de las toxicidades individuales. En este segundo grupo se incluyen los métodos químicos basados en la separación de las toxinas por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE/HPLC) y detección colorimétrica, fluorimétrica o por Espectrometría de Masas (MS), así como la Electroforesis Capilar.

Dejando a un lado valoraciones de carácter económico, la elección de uno u otro método se realiza en función de los objetivos del estudio a realizar. Los métodos químicos instrumentales se utilizan generalmente en programas de investigación que requieran la identificación y cuantificación de cada una de las toxinas presentes. En los programas de monitoreo o control sanitario, en aras de proteger la salud pública, se da relevancia al conocimiento de la toxicidad global potencial y por tanto en rutina se utilizan preferentemente ensayos.

Sin ninguna duda, tanto los programas de control como los de investigación se benefician de ambas estrategias de detección. Sin embargo, el hecho de que las ficotoxinas aparezcan en sus organismos productores o en sus transvectores como mezclas de numerosos congéneres dificulta que su control en los alimentos se pueda realizar utilizando como primera línea de acción métodos químicos. Por una parte, sería necesario disponer de patrones de todas y cada una de las posibles toxinas para realizar la calibración del equipo instrumental y la posterior cuantificación, lo que no parece actualmente factible, siendo la escasez de toxinas puras uno de los principales cuellos de botella para el desarrollo y aplicación de los métodos de análisis instrumental. Por otra parte la aplicación de estos métodos como primera línea de acción para el control de toxinas reduciría el nivel de protección al consumidor, puesto que la aparición de nuevos congéneres o nuevas toxinas no sería detectada por el método instrumental, que solo detectaría aquellas toxinas para las que ha sido previamente calibrado.

Únicamente en el caso del Envenenamiento Amnésico por consumo de mariscos (ASP), síndrome tóxico cuyo principal responsable hasta la fecha parece ser un solo compuesto, el ácido domoico, se ha establecido el control sanitario mediante un método químico instrumental (HPLC-UV/DAD).

ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE FICOTOXINAS MARINAS

Los programas de control sanitario de los alimentos requieren idealmente ensayos rápidos, sensibles, reproducibles, de bajo coste, fáciles de ejecutar y que permitan el análisis de un gran número de muestras. Estos ensayos no deben producir falsos negativos y el número de falsos positivos debe ser tan bajo como sea posible. Actualmente, la mayor parte de los programas de control de ficotoxinas en los alimentos están basados en ensayos *in vivo*, esto es, ensayos con animales, que si bien han demostrado su eficacia en la protección de la salud pública, al poner en evidencia la toxicidad de alimentos no aptos para el consumo, están lejos de la consideración de "ideales". Los bioensayos *in vivo* presentan limitaciones y dificultades técnicas y para su correcta realización se requieren infraestructuras costosas, períodos de adaptación de los animales y control de las condiciones ambientales de los estabularios *obioterios*. Por otra parte, consideraciones éticas han dado lugar a que en algunos países se hayan adoptado regulaciones que limitan o prohíben la aplicación de estos ensayos. Con el fin de reducir en el futuro el uso de animales en los programas de control alimentario y en aras de lograr una mayor sensibilidad y especificidad, se han desarrollado en los últimos tiempos diferentes ensayos *in vitro* bioquímicos y biológicos, algunos de ellos muy prometedores y que serán analizados a lo largo de este capítulo.

En los ensayos *in vitro* bioquímicos se evalúa la presencia de toxinas en función de la medición de la interacción entre las toxinas y anticuerpos, o bien entre las toxinas y receptores biológicos específicos de las mismas como son algunos canales iónicos (canales de sodio en el caso de las toxinas PSP, NSP y Ciguatoxinas), los receptores glutámico (toxinas ASP) o ciertas enzimas de importancia biológica crucial (proteín-fosfatasas en el caso de las toxinas DSP). En los ensayos *in vitro* biológicos se valora la toxicidad en función de la respuesta celular a la acción de las toxinas (cambios morfológicos, muerte celular, etc.), respuesta que se ejerce en la mayoría de los casos a través de los mecanismos bioquímicos anteriormente mencionados.

Cabe una diferenciación adicional entre *ensayos funcionales* y *ensayos estructurales*. En los ensayos funcionales la respuesta que se mide está directamente relacionada con el mecanismo de acción res-

ponsable de la toxicidad de la sustancia que se determina, ya sea la inhibición de la actividad enzimática o la activación o el bloqueo de canales iónicos. El grado de correlación entre la respuesta observada y la toxicidad real es muy alto con independencia de los perfiles tóxicos, es decir, de los tipos y cantidades de toxinas presentes en la muestra analizada. En el caso de los ensayos estructurales (ej. inmunoensayos) la respuesta está basada en el reconocimiento por parte de los anticuerpos de fragmentos de las estructuras moleculares de las toxinas que no están necesariamente ligados al mecanismo de acción de las mismas y por tanto a su actividad biológica. En este caso no siempre existe una buena correlación entre la respuesta inmunológica y la toxicidad real, de manera que los anticuerpos no identificarán a todos los congéneres activos (falsos negativos) y podrían reconocer congéneres inactivos (falsos positivos).

En general, la sensibilidad de los ensayos *in vitro* es varios órdenes de magnitud superior a la de los ensayos *in vivo*, aspecto relevante no sólo desde el punto de vista sanitario sino también desde el punto de vista de posibilitar una detección precoz de los episodios tóxicos que permita mitigar el impacto negativo de los mismos. Gran parte de los ensayos *in vitro* han sido desarrollados para su aplicación en placas de pocillos múltiples (ej. 96 pocillos), utilizando lectores con detección colorimétrica o fluorimétrica, o mediante contadores de centelleo, lo que permite la realización simultánea en un tiempo reducido de curvas de calibrado y el análisis de un alto número de muestras a través de diferentes diluciones. En contrapartida, los ensayos *in vivo* presentan la ventaja difícilmente superable de su potencial para la detección no solo de las toxinas ya conocidas, para las que han sido estandarizados, sino de otros compuestos bioactivos no conocidos de antemano que puedan representar un riesgo para la salud pública, y que no podrían ser detectados en el caso de utilizar métodos más específicos.

La aplicación de ensayos *in vitro* en laboratorios de control sanitario con fines de control oficial está todavía dificultada por el hecho de que no se ha realizado una validación formal de los mismos a través de protocolos internacionalmente reconocidos (AOAC, ISO, etc.). Dichos protocolos establecen básicamente la realización de estudios intercomparativos y colaborativos entre un número suficiente de laboratorios de tal forma que se establezcan las características del método en términos

de exactitud y precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y que se verifique la aplicabilidad del ensayo para la determinación de diferentes toxinas de un mismo grupo en las diferentes matrices biológicas que puedan ser objeto de análisis. Tanto en los procesos de desarrollo de los ensayos como en lo que se refiere a la validación e implantación de los mismos, es necesario disponer de las toxinas puras y de materiales tóxicos de concentración certificada que permitan la puesta a punto del ensayo y la realización de controles de calidad de los análisis. Si bien la disponibilidad y distribución de ciertas toxinas ha mejorado en los últimos años, existen todavía graves carencias en esta área que están retrasando el desarrollo, validación e implantación de estas nuevas metodologías.

El objetivo de este capítulo es proporcionar una visión de los diferentes ensayos disponibles en la actualidad para la determinación de ficotoxinas, principalmente toxinas PSP y DSP, desde los tradicionales bioensayos *in vivo* en ratón, hasta los más recientes y sofisticados ensayos *in vitro* bioquímicos y biológicos, haciendo hincapié en aquellos ensayos que sean de especial interés desde el punto de vista de la protección de la salud pública.

1. Ensayos *in vivo*

1.1. Consideraciones generales

El principio general de los ensayos *in vivo* para determinación de ficotoxinas se basa en la administración a un animal de la muestra a analizar o de un extracto de la misma, ya sea por vía oral o, lo que es más usual, mediante inyección intraperitoneal, seguida de la observación de los síntomas y/o de la determinación del tiempo de supervivencia, parámetro que se utiliza frecuentemente para la cuantificación a través de curvas dosis-respuesta previamente establecidas.

Los bioensayos por administración oral simulan el modo de intoxicación en humanos y en la mayoría de ellos no se realiza una extracción química de las toxinas, evitándose así posibles pérdidas asociadas a este proceso. En la práctica, la aplicación de este tipo de ensayos con fines de control sanitario conlleva un alto grado de inexactitud derivado de la dificultad para establecer una relación cuantitativa entre la cantidad de toxina ingerida por el animal y la respuesta observada.

En la administración de la muestra o toxina por vía intraperitoneal, funciones asociadas con el tracto gastrointestinal como absorción, distribución y metabolización, que podrían tener influencia en un aumento o disminución de la toxicidad, no son tenidas en cuenta (Sullivan, 1993). Sin embargo, los bioensayos por inyección intraperitoneal, como herramientas para cuantificar la toxicidad, pueden ser realizados en condiciones más controladas y la relación dosis-respuesta se establece de forma más exacta y precisa.

Los extractos serán acuosos u orgánicos dependiendo de las propiedades de solubilidad de las toxinas, y pueden ser purificados en mayor o menor grado a través de diferentes procesos de partición líquido/líquido con distintos solventes, que permiten separar las diferentes sustancias presentes en la muestra en función de su polaridad.

Tras la administración del extracto tóxico al animal, se procede a la observación y evaluación de la sintomatología característica de los diferentes síndromes tóxicos y a la determinación del tiempo de supervivencia, parámetro que en la mayoría de los bioensayos se utiliza para la valoración de la toxicidad. Esta valoración ha de ir precedida de una calibración previa de la respuesta de los animales con las toxinas a determinar. En la práctica se calibra con una sola de las toxinas del grupo, obteniéndose una curva dosis respuesta, y se expresa posteriormente la toxicidad en equivalentes de esta toxina.

Para la obtención de resultados de confianza y reproducibles, es necesario mantener una colonia estandarizada de ratones en condiciones ambientales controladas y realizar una calibración frecuente de la colonia con la/s toxina/s a medir. Los factores ambientales que merecen especial atención son la temperatura, la humedad, los ciclos de luz/oscuridad y los ciclos de renovación del aire.

Existen otros parámetros que pueden afectar a la respuesta o a la supervivencia de los animales, siendo muy importantes la cepa de ratones, la edad, el peso, el sexo y el estado general. Estos parámetros adquieren especial importancia cuando la toxicidad está próxima a los límites establecidos en las regulaciones sanitarias, de tal forma que a partir de pequeñas variaciones en los resultados se podría derivar la aceptación o el rechazo de una mercancía destinada al consumo humano. El grado de confianza y la precisión del ensayo están directamente relacionados con

la calidad y el estado de los animales utilizados. En el caso de que los laboratorios no dispongan de bioterios, se pueden utilizar ratones procedentes de proveedores o empresas cualificadas y certificadas para su cría y suministro. Se deberá realizar una planificación adecuada de las peticiones de animales de tal forma que se respete el periodo de acondicionamiento necesario, de manera que los animales se encuentren en condiciones óptimas de estado general y de peso para la realización del ensayo.

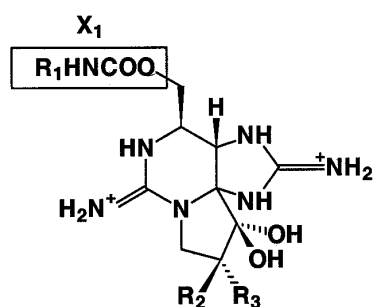
Los bioensayos en ratón son poco selectivos, de baja especificidad y sensibilidad, pueden producir falsos positivos debido a interferencias de las matrices biológicas y la variabilidad entre laboratorios es alta (alrededor de un 20%). Sin embargo, la baja especificidad es de gran utilidad desde el punto de vista de la estimación del riesgo para la salud pública, puesto que permite la detección de nuevas toxinas o congéneres, proporcionando de esta forma un alto grado de protección al consumidor.

Actualmente, los bioensayos en ratón son los únicos métodos internacionalmente reconocidos para la determinación de toxinas PSP, DSP y NSP con fines de control sanitario. Es importante resaltar que la utilización de animales con fines de experimentación está sujeta a estrictas normas establecidas en legislaciones o convenciones sobre buenas prácticas de laboratorio con el fin de asegurar la calidad de los resultados y garantizar el bienestar de los animales (Diario Oficial de la Comunidad Europea 86/609/CEE).

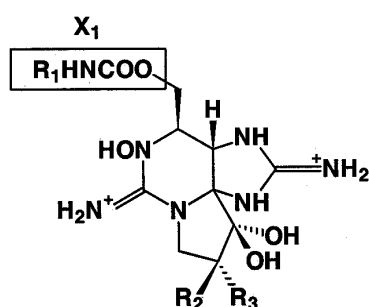
1.2. Ensayos *in vivo* para la determinación de PSP

1.2.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El envenenamiento paralizante (PSP, PSP) es un síndrome neurotóxico asociado a la presencia en los mariscos de saxitoxina (STX) y/o análogos, un grupo de más de 26 potentes neurotoxinas (Fig. 1) que tienen en común un núcleo tetrahidropurínico y cuya acción biológica se desarrolla a través del bloqueo de los canales de sodio, unas proteínas intrínsecas de las membranas celulares que permiten el paso de los iones sodio entre el medio extracelular y el citoplasma. El bloqueo de los canales de sodio da lugar a la inhibición de los potenciales de acción, esenciales en la transmisión del impulso nervioso y en la contracción muscular. Los síntomas neurotóxicos derivados de este mecanismo de acción son parestesia, parestesia



Saxitoxina: $R_1=R_2=R_3=H$
 Gonyautoxina-2: $R_1=R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 Gonyautoxina-3: $R_1=R_3=H; R_2=OSO_3^-$
 Gonyautoxina-5: $R_1=SO_3^-; R_2=R_3=H$
 $R_1=SO_3^-; R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 $R_1=SO_3^-; R_2=OSO_3^-; R_3=H$
 Decarbamoilgonyautoxina-2: $X_1=OH; R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 Decarbamoilgonyautoxina-3: $X_1=OH; R_1=H; R_2=OSO_3^-$
 Deoxidecarbamoilsaxitoxina: $X_1=R_2=R_3=H$
 $X_1=R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 $X_1=R_3=H; R_2=OSO_3^-$
 Decarbamoilsaxitoxina: $X_1=OH; R_2=R_3=H$
 Deoxidecarbamoilgonyautoxina-2: $X_1=H; R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 Deoxidecarbamoilgonyautoxina-3: $X_1=H; R_3=H; R_2=OSO_3^-$



Neosaxitoxina: $R_1=R_2=R_3=H$
 Gonyautoxina-1: $R_1=R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 Gonyautoxina-4: $R_1=R_3=H; R_2=OSO_3^-$
 Gonyautoxina-6: $R_1=SO_3^-; R_2=R_3=H$
 $R_1=SO_3^-; R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 $R_1=SO_3^-; R_2=OSO_3^-; R_3=H$
 Decarbamoilneosaxitoxina: $X_1=OH; R_2=R_3=H$
 Decarbamoilgonyautoxina-1: $X_1=OH; R_2=H; R_3=OSO_3^-$
 Decarbamoilgonyautoxina-4: $X_1=OH; R_3=H; R_2=OSO_3^-$

Fig. 1. Toxinas PSP.

y parálisis muscular que pueden desembocar en los casos más graves en paro respiratorio y muerte.

Los estudios epidemiológicos relativos a la cantidad de toxinas PSP necesarias para producir la intoxicación, presentan variaciones considerables que podrían tener como origen diferencias de sensibilidad entre los individuos o diferencias en los métodos de análisis. Cantidades entre 144 y 304 μg equivalentes de STX por persona produjeron síntomas leves,

mientras que las mínimas dosis asociadas con intoxicaciones fatales oscilaron entre 456 y 576 μg STX por persona (Acres & Gray, 1978; Prakash *et al.*, 1971).

Diferentes especies de microalgas pertenecientes a los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium* son productoras de este grupo de neurotoxinas (Yasumoto & Murata, 1993). Además de estas especies de dinoflagelados, ciertas cianobacterias (Carmichael, 1997) y bacterias marinas (Kodama *et al.*, 1990) pueden sintetizar saxitoxinas.

Si bien el mecanismo de acción es común a todas las toxinas del grupo, la potencia tóxica varía dependiendo de la estructura molecular, de tal forma que pequeños cambios estructurales dan lugar a variaciones drásticas en la toxicidad específica de hasta tres órdenes de magnitud. Teniendo en cuenta la carga molecular y la estructura, las toxinas PSP se pueden clasificar en tres grupos: toxinas carbamato (STX, Neo-STX y GTX1-GTX4) de elevada potencia tóxica, toxinas sulfocarbamatos (B1, B2, C1-C4) de toxicidad considerablemente menor y toxinas decarbamoiladas, de toxicidad intermedia (dc-STX, dc-Neo-STX, dc-GTX1, dc-GTX4, etc.). Las toxinas PSP son solubles en agua y metanol y son estables durante al menos un año en solución a pH ácido y a temperaturas inferiores a 4°C (Louzao *et al.*, 1994a). Después de un proceso de liofilización las toxinas PSP son inestables, sobre todo la neosaxitoxina (Alfonso *et al.*, 1994) y el grupo de las C1-C4 (Louzao *et al.*, 1994b). En condiciones alcalinas son inestables y se descomponen rápidamente.

La labilidad de este grupo de sustancias las hace susceptibles de sufrir bioconversiones en los moluscos a través de reacciones enzimáticas o conversiones químicas dependiendo de las condiciones de almacenamiento y procesamiento de los alimentos o muestras, interconversiones que pueden transformar sustancias débilmente tóxicas en compuestos de elevada toxicidad. Así, el calentamiento en condiciones ácidas convierte las toxinas sulfocarbamatos de baja toxicidad en toxinas carbamato de elevada toxicidad, dependiendo el grado de conversión del pH (Nagashima *et al.*, 1991; Alfonso *et al.*, 1993), y el calentamiento en condiciones alcalinas puede transformarlas en los correspondientes análogos decarbamoilados de toxicidad intermedia.

1.2.2. BIOENSAYO EN RATÓN DE LA AOAC

La mayor parte de los países que realizan control de toxinas PSP en los mariscos utilizan el bioensayo en ratón de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) (AOAC, 1995), que fue desarrollado originalmente por Sommer y Meyer en 1937 (Sommer & Meyer, 1937) y posteriormente estandarizado y validado a través de sucesivos estudios intercolaborativos (Mc Farren, 1959). Este ensayo se ha aplicado con éxito durante décadas y es el único método reconocido internacionalmente para determinar las toxinas PSP con fines regulatorios. Si bien existen algunas diferencias en la expresión de la toxicidad, existe un acuerdo casi general en cuanto al nivel máximo aceptable en los mariscos: 80 µg equivalentes de STX por 100 g de carne de molusco (µg STX eq. · 100 g⁻¹).

El bioensayo en ratón de la AOAC, cuyo protocolo detallado se encuentra en el Anexo I, consiste en una extracción acuosa ácida (CIH 0.1 N) del tejido de los moluscos, seguida de la inyección intraperitoneal de 1 ml del extracto (0.5 g carne del molusco por ml de extracto inoculado) en cada uno de tres ratones estandarizados (19-21 g). Tras la inyección del extracto, se observa la aparición de los síntomas típicos de la intoxicación: agitación, dificultad respiratoria y saltos, seguidos de muerte por paro respiratorio que se produce normalmente antes de 15 min. El bioensayo es cuantitativo cuando las muertes ocurren entre 5 y 7 min, de tal forma que en el caso de que se produzcan muertes en tiempos más cortos se realizan sucesivas diluciones hasta que se obtiene un extracto dentro del rango lineal del ensayo. Para cuantificar la respuesta, se toma el tiempo transcurrido entre la inyección del extracto y la muerte del ratón, y la toxicidad se determina en unidades ratón a partir de las tablas de Sommer (AOAC, 1995) que asignan a un tiempo de muerte determinado un valor de unidades ratón y que corrigen el valor de las unidades ratón en el caso de que el peso del animal se desvíe de 20 g.

Se define la *unidad ratón* (UR) como la cantidad de toxina que inyectada intraperitonealmente en un ratón de 20 g produce su muerte en 15 min. El valor de la UR depende de la sensibilidad del animal, por lo que la respuesta de una colonia determinada de ratones requiere su calibración periódica con STX pura. Los valores usuales de la UR se encuentran alrededor de 0.18 µg de STX con variaciones aceptables alrededor del 20 %. La cantidad de STX que

corresponde a una UR es lo que se denomina *factor de conversión* (FC). Las UR determinadas en el ensayo son convertidas a µg de equivalentes de saxitoxina por 100 g de vianda mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g STX eq} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ de vianda} = \text{UR} \times \text{FC} \times 200$$

En el caso de que sea necesario realizar diluciones, se tendrá en cuenta en la fórmula el correspondiente factor de dilución. El límite de detección del ensayo varía aproximadamente entre 32 y 58 µg STX eq. · 100 g⁻¹, dependiendo de la cepa de ratones utilizada. La precisión del ensayo es del ± 20 %. Aunque el bioensayo en ratón para determinación de PSP ha sido sometido a un proceso de estandarización y validación, en la práctica existen variables que pueden repercutir en la sensibilidad y la precisión del ensayo (repetibilidad y reproducibilidad):

- **Cepa de ratones:** La sensibilidad del ensayo depende de la cepa de ratones. Una cuidadosa estandarización del bioensayo siguiendo el protocolo de la AOAC, y una determinación y comprobación periódica del factor de conversión son factores cruciales para determinar la sensibilidad del ensayo, esto es, convertir las UR en µg de equiv. de STX, y para que los resultados de diferentes laboratorios sean comparables.
- **pH de extracción:** El bioensayo en ratón de la AOAC se desarrolló originariamente para la determinación de STX, estableciéndose un rango de 2-4 de pH para la extracción. Actualmente se conocen más de 24 derivados de la STX que difieren en estructura química, toxicidad específica, estabilidad química y abundancia relativa en moluscos y dinoflagelados. Bajo las condiciones ácidas y en caliente, requeridas en el protocolo AOAC, cierta proporción de las lábiles toxinas sulfocarbamatos (C1-C4, B, B2) son convertidas a las respectivas toxinas carbamato de mayor toxicidad, dependiendo del grado de interconversión del pH. Parece aconsejable una disminución de la amplitud del rango de pH establecido en el procedimiento de la AOAC para reducir la variabilidad y mejorar la reproducibilidad del ensayo. Valores de pH entre 3 y 4 proporcionan el mayor rango de estabilidad a todas las toxinas del grupo (Alfonso *et al.*, 1994; Louzao *et al.*, 1994a, b). Valores muy bajos de pH pueden producir artefactos.
- **Sales:** Altas cantidades de sales (principalmente Na⁺) en los extractos pueden disminuir la toxicidad.

dad PSP en el bioensayo en ratón (Shantz *et al.*, 1958). La adición de NaOH es a veces necesaria para aumentar el pH previamente a la inyección. Esta adición debe realizarse por goteo, cuidadosamente y en continua agitación para evitar la descomposición parcial de las toxinas debido a cambios bruscos locales de pH.

- **Zinc:** La presencia de altas concentraciones de ciertos metales es una fuente potencial de interferencias en el bioensayo de PSP. Así, altos niveles de Zn pueden producir la muerte de los ratones con síntomas similares a los producidos por las toxinas PSP (McCulloch *et al.*, 1989; Cacho, 1993). La diferencia más importante entre la toxicidad debida al Zn y la clásica toxicidad PSP es que las muertes ocasionadas por la presencia de Zn tienen lugar en tiempos superiores a 15 min.

El bioensayo en ratón de la AOAC para la determinación de toxinas PSP ha demostrado su eficacia en la protección de la salud pública a lo largo de muchos años de aplicación. Si bien es deseable que en un futuro próximo puedan implementarse otras metodologías alternativas que no impliquen el uso de animales, y que incluso puedan complementar o reemplazar el bioensayo en ratón, en el caso de la detección y cuantificación de las potentes y letales saxitoxinas del complejo PSP, será necesario la demostración inequívoca de que dichas metodologías proporcionan un nivel de protección al consumidor cuando menos equivalente al del bioensayo en ratón.

1.3. Ensayos *in vivo* para la determinación de DSP

1.3.1. CONSIDERACIONES GENERALES

A diferencia de la situación del control sanitario de las toxinas PSP, en el caso de las toxinas DSP, no existe un protocolo acordado, reconocido internacionalmente y que haya sido sometido a un proceso formal de estandarización y validación. Si bien es cierto que la mayor parte de los países que realizan el control de DSP en los mariscos utilizan ensayos *in vivo*, existen diferencias en cuanto al animal usado (rata o ratón albino), en cuanto al modo de administración de la toxinas (ingestión oral en el caso de la rata, o inyección intraperitoneal en el caso del ratón) y en cuanto a la naturaleza y proporción de los solventes utilizados para la extracción de las toxinas. Esto se traduce en una diferente especificidad, selectividad y recuperabilidad de los bioensayos y por tanto en una falta de equivalencia de los mismos, de tal manera que algunos protocolos pueden detectar todo el rango de sustancias lipofílicas bioactivas potencialmente presentes en los mariscos contaminados, mientras que la mayor especificidad de otros protocolos limita el espectro de toxinas detectables por los mismos (Tabla 2). Existen igualmente discrepancias en cuanto a los criterios de positividad del ensayo. Esta situación no es gratuita, sino que se produce como consecuencia de la escasez de estudios epidemiológicos y toxicológicos que permitan establecer los riesgos derivados de la exposición aguda y

Tabla 2. Toxinas DSP detectables por los diferentes ensayos *in vivo*.

	AO, DTX1, DTX2	DTX3	Pectenotoxinas	Yesotoxinas
Bioensayo ratón Yasumoto <i>et al.</i> (1978)	SI	SI	SI	SI
Bioensayo ratón Yasumoto <i>et al.</i> (1984a)	SI	SI	SI	Parcialmente
Bioensayo ratón Yasumoto <i>et al.</i> (1984a) modificado	SI	SI	SI	SI
Bioensayo ratón Le Baut <i>et al.</i> (1990)	SI	NO	SI	SI
Bioensayo de la rata	SI	SI	?	NO

crónica a las sustancias bioactivas que han sido históricamente incluidas en el grupo DSP, y por tanto los niveles de tolerancia. A esto hay que añadir la controversia existente en relación a la idoneidad de la clasificación de algunas de estas sustancias polietéreas liposolubles dentro del grupo DSP. Recientemente la Unión Europea ha dado un paso muy importante hacia la clarificación de estas cuestiones, a través de la publicación de la Decisión 2002/225/CEE en la que se establecen normas detalladas para la aplicación de la Directiva 91/492/CEE en lo que se refiere a los niveles máximos y los métodos de análisis de éstos compuestos. La extrema complejidad de este grupo hace que su descripción merezca una especial atención.

Históricamente, tres grupos de sustancias han sido incluidas en el grupo DSP: el ácido okadaico (AO) y las dinofisistoxinas (DTX1, DTX2, DTX3,

etc.), las pectenotoxinas (PTXs) y las yesotoxinas (YTXs). Todas ellas son compuestos polietéreos, de elevado peso molecular, gran lipofilia y que comparan propiedades de solubilidad de tal forma que pueden ser co-extraídas utilizando los protocolos genéricos de extracción de toxinas liposolubles. Aunque presentan analogías químicas y en concreto los dos primeros grupos son producidos por las mismas especies de dinoflagelados, su mecanismo de acción, y por tanto su actividad biológica, son diferentes.

Acido okadaico y análogos

Los dinoflagelados productores de estas toxinas (Fig. 2) relacionados con episodios de contaminación en moluscos, son diferentes especies del género *Dinophysis* tales como *D. acuminata*, *D. fortii*, *D. sacculus*, *D. acuta* y *D. norvegica* (Yasumoto *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989a). El dinoflagelado

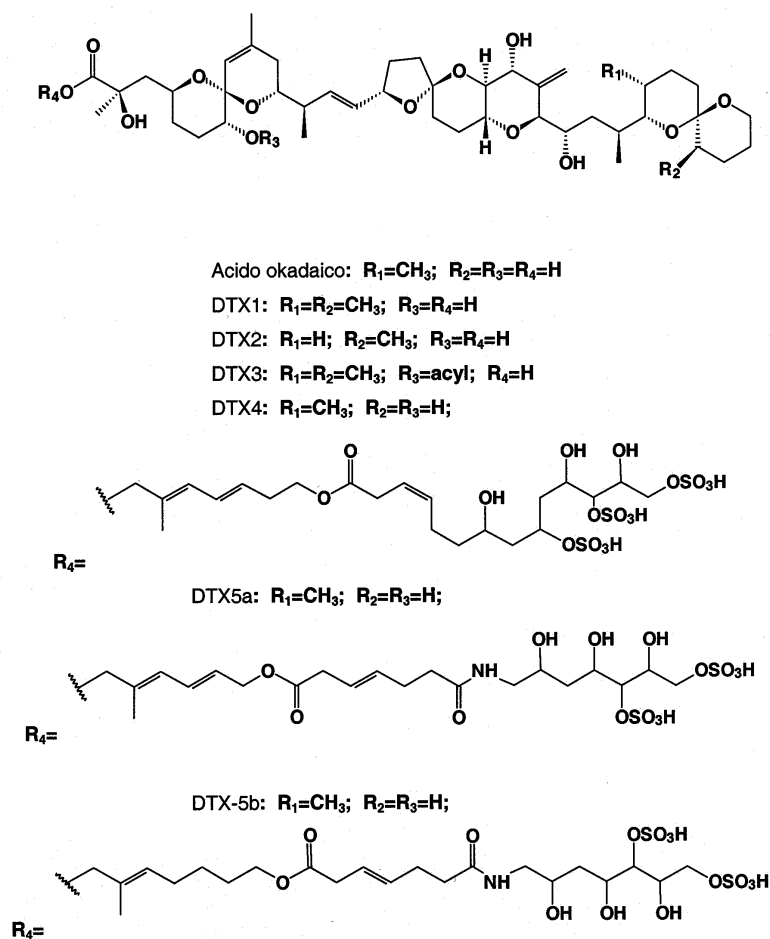


Fig. 2. Acido okadaico y análogos.

bentónico *Prorocentrum lima* es también productor de estas sustancias pero su implicación en episodios de intoxicación diarreaica sólo se ha demostrado en moluscos de aguas canadienses (Lawrence *et al.*, 1998; Lawrence *et al.*, 2000)

Con respecto a la producción de toxinas y a los perfiles tóxicos existe una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada especie en diferentes áreas geográficas, e incluso en la misma localidad. AO, DTX1 y DTX2 son las toxinas más relevantes desde el punto de vista de las intoxicaciones diarreaicas, estando el AO asociado a casi todas las especies de *Dinophysis* y la DTX2 asociada fundamentalmente a la presencia de *D. acuta* (Blanco *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2000, 2001; Gago-Martínez *et al.*, 1996; Carmody *et al.*, 1996; Vale & Sampayo, 1996).

La DTX1 está asociada fundamentalmente a la presencia de *D. fortii* y *D. norvegica*, y algunas cepas de *D. acuta* (Dahl & Yndestad, 1985, Dahl *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1989a; Suzuki *et al.*, 1997). Numerosos isómeros del AO y las DTXs (DTX2b, DTX1b, DTX2c, etc.) han sido detectados en fitoplancton y moluscos utilizando HPLC asociada a MS, si bien parecen estar presentes en los moluscos en muy pequeñas cantidades (James *et al.*, 1997; Draisci *et al.*, 1998).

La presencia de DTX3, un grupo de toxinas producto de la acilación metabólica del AO, DTX1 o DTX2 en las glándulas digestivas de los moluscos

(Suzuki *et al.*, 1999), ha sido demostrada en moluscos de Japón, Irlanda, España y Portugal (Yasumoto *et al.*, 1989; Marr *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1996; Vale & Sampayo, 1999). Su presencia en almejas de aguas portuguesas ha sido relacionada con una reciente intoxicación diarreaica en Portugal (Vale & Sampayo, 1999). Se han descrito otros derivados del AO, principalmente diol-ésteres (Yasumoto *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1992; Norte *et al.*, 1994), la DTX4, que es un derivado hidrosoluble del diol-éster del AO en el que un grupo hidroxilo está esterificado con un grupo trisulfatado y dos análogos de la DTX4 que contienen nitrógeno, la DTX5a y la DTX5 b (Hu *et al.*, 1995a, b). Estos compuestos son producidos por dinoflagelados de carácter bentónico como *P. lima*, *P. concavum* y *P. maculosum*. Recientes estudios (Moroño *et al.*, datos no publ.) señalan la posibilidad de que este tipo de derivados del AO estén también presentes en dinoflagelados del género *Dinophysis* y que por tanto puedan estar implicados en la contaminación de los moluscos.

Pectenotoxinas

Las Pectenotoxinas son un grupo de macrólidos polietéreos cíclicos (Fig. 3) de naturaleza neutra, de los cuales se han aislado hasta la fecha 10 análogos, conociéndose la estructura de 8 de ellos. La Pectenotoxina-2 (PTX2) ha sido detectada en *Dinophysis fortii*, *D. acuta* (Lee *et al.*, 1989a, b; Draisci *et al.*, 1996, 1999; Suzuki *et al.*, 1998) y *D. acuminata* (Yasumoto, com. pers.). El resto de las

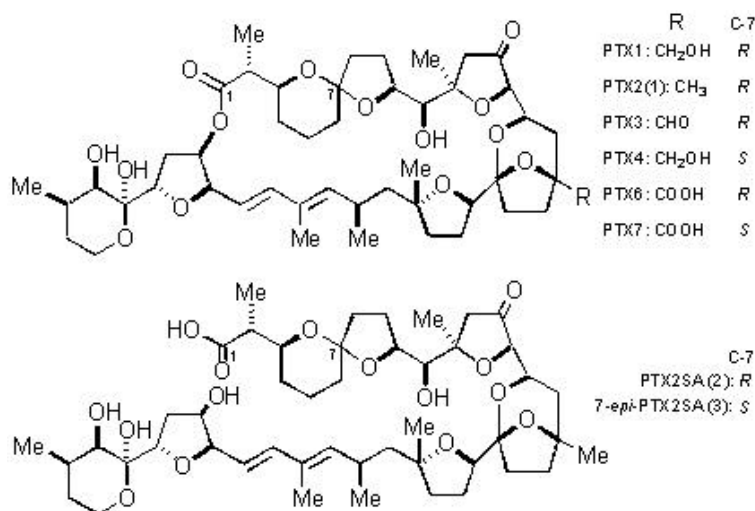


Fig. 3 Estructura de las pectenotoxinas.

pectenotoxinas parecen ser productos de la oxidación metabólica de la PTX2 que tiene lugar en las glándulas digestivas de los moluscos, y su presencia ha sido confirmada en vieiras japonesas (Yasumoto *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989a, b; Suzuki *et al.*, 1998).

Recientemente se han identificado nuevos homólogos como el ácido secoico de la PTX2

(PTX2SA) y su epímero 7-epi-pectenotoxina -2 (7-epi-PTX2SA) en mejillones de Nueva Zelanda y en *D. acuta* de Irlanda (Daiguji *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999). La ubicuidad de estas especies de dinoflagelados hace sospechar que estas sustancias pueden aparecer en moluscos de otros orígenes co-ocurriendo con el AO y las dinofisistoxinas.

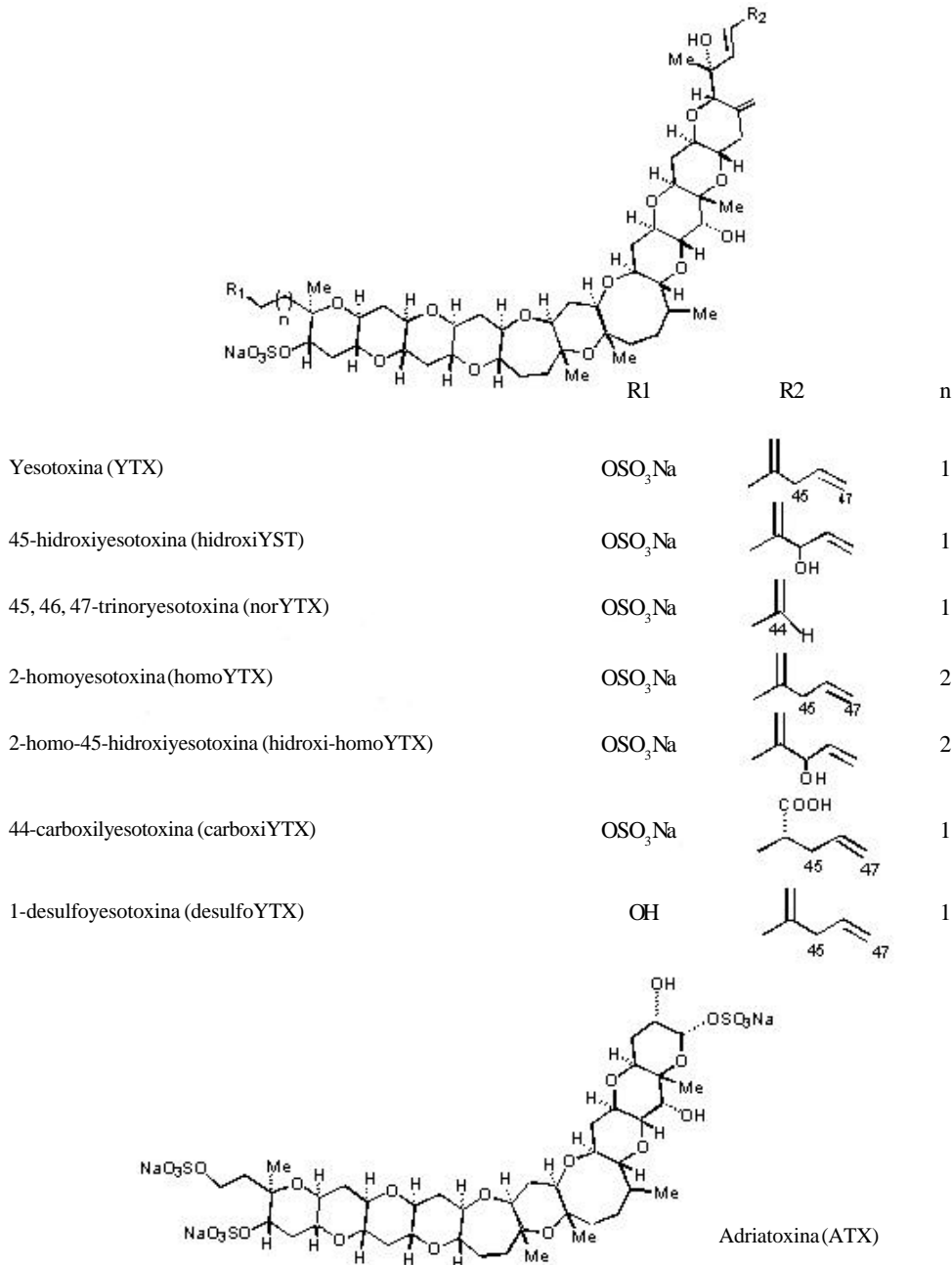


Fig. 4 Estructuras y nombres comunes para la yesotoxina, sus análogos y la adriatoxina.

Yesotoxinas

La Yesotoxina (YTX) es una sustancia polietérea disulfatada, cuya estructura recuerda a las brevetoxinas. La presencia de YTX ha sido confirmada en moluscos de Japón (Murata *et al.*, 1987), Noruega (Lee *et al.*, 1988), Chile (Zhao *et al.*, 1993), Italia (Ciminiello *et al.*, 1997, 1999) y Nueva Zelanda (Yasumoto & Takizawa, 1997; MacKenzie *et al.*, 1998). En los últimos años, se ha confirmado la ocurrencia de un amplio número de análogos: 45-hidroxi YTX, 45,46,47 trinor YTX, homo YTX, adriatoxina, carboxi-YTX y 1-desulfo-YTX (Ciminiello *et al.*, 1998, 1999; Dajugui *et al.*, 1998; Satake *et al.*, 1996, 1997a; Tubaro *et al.*, 1998) (Fig. 4). *Protoceratium reticulatum* ha sido identificada como la especie productora de YTX en Nueva Zelanda (Satake *et al.*, 1997b) y de YTX y 45,46,47 trinor YTX en Japón (Satake *et al.*, 1999). Homo-YTX fue detectada en una muestra de red en la que la especie predominante era *Lingulodinium polyedrum*. Si bien cultivos de laboratorio de esta misma especie procedentes de Nueva Zelanda, Estados Unidos y Japón no produjeron yesotoxinas, la producción de YTX por cultivos de *L. polyedrum* procedentes de aguas de Andalucía (Sur de España) fue confirmada por HPLC acoplada a MS (Fernández, datos no publ.). Tanto *Protoceratium reticulatum* como *Lingulodinium polyedrum*, son especies ubicuas, por lo que la contaminación de moluscos con YTX se presenta como un problema generalizado.

Epidemiología y toxicología

Existen datos epidemiológicos de intoxicaciones producidas por el AO y/o derivados que han cursado con trastornos gastrointestinales tales como diarrea, náuseas y vómitos (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980; Kat *et al.*, 1979). El nivel de AO necesario para inducir diarrea en adultos está entre 40 y 50 µg de AO, siendo 200 µg · kg⁻¹ la dosis letal en ratón por administración intraperitoneal (LD50). Los valores correspondientes para DTX1 y DTX3 son 160 y 500 µg · kg⁻¹ respectivamente (Yasumoto *et al.*, 1989). Con respecto al mecanismo de acción, el AO y la DTX1 son potentes inhibidores de las protein-fosfatasa, enzimas que intervienen en el control de procesos biológicos tales como la división y el crecimiento celular, organización estructural, metabolismo, control hormonal, etc. (Cohen, 1989), siendo este mecanismo el responsable de la inducción de diarrea y de la promoción tumoral observada en estudios *in vitro*

(Suganuma *et al.*, 1988; Fujiki *et al.*, 1988; Fujiki *et al.*, 1992; Fujiki & Suganuma, 1993). Existe un acuerdo general en cuanto a la pertinencia de la clasificación de las toxinas del grupo del AO como toxinas DSP (genuinamente diarreicas) y en cuanto a la necesidad de monitorear y regular la presencia de estas toxinas en los moluscos.

En el caso de las Yesotoxinas y Pectenotoxinas, no existen datos epidemiológicos que asocien la presencia de estas sustancias en los moluscos con intoxicaciones diarreicas, a excepción de un evento reciente que sugiere la implicación de los ácidos secoicos de la PTX2 (PTX2SA) en un episodio de intoxicación gastrointestinal debida al consumo de bivalvos en Australia (Quilliam *et al.*, 2000). Estudios con animales de experimentación muestran que la toxicidad aguda intraperitoneal de las PTXs oscila entre 230 µg · kg⁻¹ en el caso de la PTX2 y 770 µg · kg⁻¹ en el caso de la PTX4. La toxicidad oral de la PTX2 es muy similar a la intraperitoneal, observándose efectos diarreicos (Yasumoto, com. pers.). Las PTXs no inhiben las protein-fosfatasa, pero exhiben una potente citotoxicidad de manera que dosis comprendidas entre 500 y 1000 µg · kg⁻¹ inducen necrosis en el hígado a las pocas horas de la inoculación intraperitoneal (Terao *et al.*, 1986, 1993). El mecanismo de acción de las PTXs no ha sido elucidado hasta la fecha. Con respecto a las Yesotoxinas, las dosis letales en ratón para los diferentes análogos oscilan entre 100 y 400 µg · kg⁻¹, siendo en este caso el corazón el órgano diana (Murata *et al.*, 1987). Si bien el derivado desulfatado (desulfo-YTX) no presenta cardiotoxicidad, hígado y páncreas se ven afectados a partir de dosis intraperitoneales de 300 µg · kg⁻¹ (Terao *et al.*, 1990). La toxicidad oral es al menos un orden de magnitud más baja que la toxicidad intraperitoneal (Ogino *et al.*, 1997; Aune *et al.*, 2000) no observándose efectos diarreicos tras su administración, hecho que cuestiona la pertinencia de la inclusión de estas sustancias en el grupo DSP. Aunque el mecanismo de acción de las Yesotoxinas no está totalmente dilucidado, estudios con linfocitos humanos sugieren que estas toxinas actúan sobre los canales de calcio celulares, de manera similar a las brevetoxinas y a la maitotoxinas, incrementando los niveles citosólicos de estos iones (de la Rosa *et al.*, 2001).

La reciente Decisión 2002/225/CEE fue elaborada sobre la base de un análisis de riesgo llevado a

cabo por un grupo de trabajo organizado por la Comisión Europea y el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas y constituido por expertos internacionales en la materia. La Decisión establece el nivel máximo total de AO, DTXs y PTXs en $160 \mu\text{g equiv. AO} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado; el nivel máximo de YTXs $1 \text{ mg equiv. YTXs} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado y el nivel máximo de AZPs en $160 \mu\text{g equiv. AZP} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado. Esta legislación supone un avance muy importante en cuanto a la armonización de los controles sanitarios de este tipo de sustancias en los mariscos, al designar claramente que sustancias deben ser objeto de control, y cuales son los niveles de tolerancia. La Decisión contempla la posibilidad de que además de los bioensayos, otros métodos de detección alternativos, como son los métodos químicos y los ensayos *in vitro* bioquímicos puedan ser utilizados para el control de estas toxinas, siempre que hayan sido previamente validados siguiendo un protocolo reconocido internacionalmente y que se demuestre que su aplicación proporciona un nivel equivalente de protección de la salud pública.

Los ensayos que se describen a continuación se utilizan para la determinación de toxinas pertenecientes a los grupos anteriormente mencionados en distintos países, pero tanto el rango de sustancias detectadas por los mismos, como la sensibilidad, difiere de unos protocolos a otros, y por lo tanto no son ensayos equivalentes.

1.3.2. EL BIOENSAYO DE LA RATA

En el bioensayo de la rata (Kat *et al.*, 1983), ratas Wistar (*Rattus norvegicus* 100-120g) son alimentadas con el hepatopáncreas de los moluscos a analizar. Al día siguiente se valora la consistencia de las heces: normal (0 ó -), normal-blanda (1 ó +), blanda (2 ó ++), blanda-diarreica (3 ó +++), o diarreica (4 ó ++++). Una consistencia distinta a la normal (> 0) es interpretada como presencia de toxinas DSP en la muestra y se traduce en la calificación de dicho alimento como “no apto para el consumo”.

El bioensayo de la rata es un ensayo de administración oral, y por tanto simula el modo de intoxicación en humanos. Los síntomas que muestra la rata son similares a los del síndrome diarreico en humanos. Por otra parte no se realiza una extracción quími-

ca de las toxinas de tal forma que se evitan posibles pérdidas de toxinas asociadas a este proceso. Con este procedimiento únicamente son detectadas las toxinas que producen síntomas genuinamente diarreicos, fundamentalmente el AO y derivados, probablemente algunas pectenotoxinas y los azaspirácidos. Si bien el ensayo es muy sensible para la detección del AO y análogos, no existen actualmente datos sobre su nivel de sensibilidad en cuanto a la detección de AZAs y sobre su eficacia para la detección de las pectenotoxinas. Las yesotoxinas no son detectadas por este ensayo.

El ensayo es cualitativo y poco específico, de tal forma que agentes diarreicos diferentes al AO y derivados pueden producir resultados positivos e influir en el diagnóstico. La precisión es baja debido a la amplia variación individual en la sensibilidad y sintomatología de las ratas.

1.3.3. BIOENSAYOS EN RATÓN

Bioensayo de Yasumoto (1978)

El protocolo del bioensayo en ratón basado en el ensayo propuesto por Yasumoto en 1978 (Yasumoto *et al.*, 1978), es utilizado en numerosos países para el control sanitario de DSP (el protocolo detallado se encuentra en el Anexo I).

En el procedimiento original, las toxinas son extraídas del hepatopáncreas de los moluscos con acetona. Tras evaporación del solvente y resuspensión del residuo en solución salina estéril, el extracto final es inyectado intraperitonealmente en cada uno de tres ratones albinos (aproximadamente 20g), procediéndose a la observación de los mismos durante un tiempo entre 24 y 48 h, para realizar el cálculo de la toxicidad en lo que se denomina “unidades ratón” (UR). Los síntomas mostrados por el ratón son postración y debilidad general. En el caso de este grupo de toxinas, se define la UR como la cantidad mínima de toxina administrada por inyección intraperitoneal que se necesita para producir la muerte de un ratón de 20 g en 24 h. Según estudios de Yasumoto, una UR corresponde a $4 \mu\text{g}$ de AO y $3.2 \mu\text{g}$ de DTX1. En el caso de tiempos de supervivencia inferiores a 24 h, la determinación de la toxicidad en UR requiere sucesivas diluciones del extracto hasta encontrar aquella que produce la muerte de los ratones en 24 h. El límite que se estableció originalmente en Japón fue de $5 \text{ UR} \cdot 100\text{g}^{-1}$ carne. Dado que este

Tabla 3. Síntomas de toxinas detectables por el bioensayo en ratón (Yasumoto *et al.*, 1978).

Toxinas	Síntomas de inyección intraperitoneal
AO, DTX1, DTX2	Postración, debilidad de los miembros, convulsión (40'-24h)
DTX3	Postración, debilidad de los miembros, convulsión (1h-48h)
Pectenotoxinas	Similar PSP, tiempo de supervivencia por encima de 20' (30'-24h)
Yesotoxinas	Similar PSP, tiempo de supervivencia por encima de 20' (40'-5h)
Brevetoxinas B1, B2	Similar PSP, tiempo de supervivencia por encima de 20' (40'-48h)
Ácido Azaspiro	Similar PSP, tiempo de supervivencia por encima de 20' (40'-36h) (a pequeñas dosis, parálisis progresiva)
Gimnodimina	Similar PSP
Espirólidos	Similar PSP
Pinnatoxina	Similar PSP
Ciguatoxina	Diarrea, disnea, parálisis, convulsión
Palitoxina	Parálisis progresiva, cianosis, postración
Aplisiatoxina	Diarrea severa, postración
Lingbiatoxina	Postración, parálisis progresiva, convulsión previa a la muerte
Ácido domoico	Espasmos, rascado de orejas

procedimiento es largo y laborioso, en la práctica se suele utilizar el tiempo de supervivencia del ratón para la evaluación de la toxicidad.

No existe consenso internacional en cuanto al criterio de positividad del bioensayo, variando éste entre: “dos ratones muertos de tres inyectados antes de 5 h” y “dos ratones muertos de tres inyectados antes de 24 h”. El bioensayo en ratón de Yasumoto (1978) es adecuado para la detección de AO y Dinofisitoxinas, Pectenotoxinas y Yesotoxinas a los niveles establecidos en la Decisión 2002/224/CEE, siempre que se utilice como criterio de positividad “dos ratones muertos de tres inyectados antes de 24 horas”. El hecho de que los azaspirácidos se distribuyan a través de todos los tejidos de los moluscos, hace que este protocolo, que utiliza como muestra analítica el hepatopáncreas, no sea suficientemente sensible para la detección de estas sustancias a los niveles regulados en la Decisión. El ensayo detecta otras posibles toxinas liposolubles que pudieran estar presentes en los moluscos como son: espirólidos, gimnodimina, brevetoxinas y ciguatoxinas (Tabla 3).

La sintomatología del ratón es muy diferente dependiendo de las sustancias presentes, pero no siempre es posible discernir qué tipo de toxinas o sustancias han producido su muerte. Aunque por su carác-

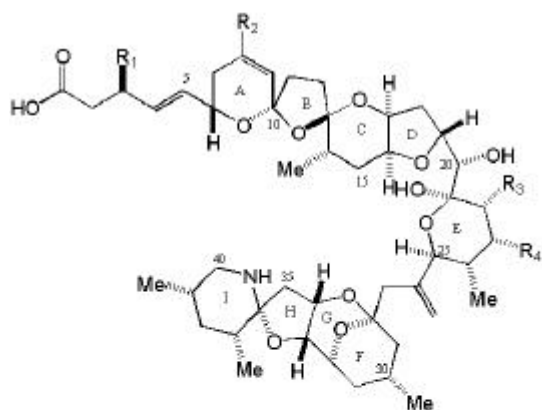
ter poco selectivo, el ensayo es susceptible de interferencias (toxinas PSP, ASP, sales, ácidos grasos, etc.), este ensayo ha demostrado gran eficacia en la protección de la salud pública a lo largo de muchos años de aplicación en numerosos países. La reciente introducción en la legislación europea del control de los azaspirácidos hace que este bioensayo deba ser modificado de manera que permita el análisis del cuerpo entero del molusco o bien complementado mediante la aplicación de métodos analíticos tales como la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a la Espectrometría de Masas.

Bioensayo en ratón de Yasumoto (1984)

Con el propósito de eliminar las interferencias producidas por las toxinas PSP en el bioensayo propuesto en 1978, se desarrolló un protocolo alternativo (Yasumoto *et al.*, 1984). Tras la evaporación de la acetona del extracto bruto, se procede a una redisolución del extracto lípido-acuoso en éter dietílico, posteriores lavados de la fase etérea con pequeños volúmenes de agua, evaporación del éter y de nuevo resuspensión del extracto en solución salina estéril para posterior inoculación en los ratones. Con este procedimiento no sólo las toxinas PSP sino también otras interferencias de tipo polar debidas a toxinas ASP o sales, que podrían estar presentes en

las muestras, son eliminadas en la fase acuosa. Aunque los lavados del extracto etéreo con agua representan una mejora en cuanto a la eliminación de interferencias, toxinas liposolubles de polaridad superior al AO, como es el caso de las yesotoxinas, son parcialmente eliminadas en la partición con agua. A pesar de ello, la elevada sensibilidad que presenta el ratón a la presencia de las YTXs (un nivel de $160 \mu\text{g YTX} \cdot \text{kg}^{-1}$ ya produce la muerte del ratón) hace que a pesar de que se puedan producir pérdidas durante la partición, el protocolo sea suficientemente eficaz para la detección de estas sustancias al nivel máximo establecido en la Decisión 2202/225 ($1 \text{ mg YTX} / \text{Kg}$). La eficiencia del protocolo en lo que se refiere a la extracción de las YTXs puede ser aumentada sustituyendo el éter dietílico por diclorometano o acetato de etilo. Sin embargo, el acetato de etilo presenta para su uso en rutina problemas operativos derivados de las emulsiones que se producen durante la partición con agua. Aunque el diclorometano no presenta este inconveniente, su elevada toxicidad y las regulaciones existentes en algunos países restringiendo su uso podrían dificultar su aplicación en aquellos laboratorios que realicen un número elevado de análisis. Una ventaja adicional de los protocolos que

incluyen particiones líquido/líquido con agua (ver protocolo en Anexo 1) es que variando adecuadamente las cantidades de los solventes de extracción, permiten su aplicación a la determinación de las toxinas sobre el cuerpo entero de los moluscos. El realizar la determinación de las toxinas a partir del cuerpo entero produce resultados de mayor exactitud y es más susceptible de estandarización, pero la mayor laboriosidad del proceso había limitado hasta la fecha su aplicación en rutina en programas de control que requieren normalmente el procesado y análisis de un número muy elevado de muestras. Sin embargo, el descubrimiento de la ocurrencia en moluscos del azaspirácido y análogos (Fig. 5), responsables del AZP, la constatación de que estas toxinas no se concentran en las glándulas digestivas de los moluscos, sino que se distribuyen por todos los tejidos del molusco, y la reciente legislación europea que regula su control, tienen como consecuencia que deba ser considerada la introducción en rutina del análisis del cuerpo entero para de esta forma posibilitar el control sanitario de los azaspirácidos, a la espera de que se desarrollen ensayos más específicos. Con este fin se ha desarrollado recientemente un bioensayo en ratón (Yasumoto, en prep.) que permite la detección conjunta de AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs a los niveles regulados en la reciente Decisión. El hecho de que debido a la menor toxicidad por vía oral de las YTXs, se haya establecido en la legislación europea un nivel de tolerancia superior al establecido para el resto de las toxinas liposolubles, unido a su elevada toxicidad por vía intraperitoneal, que da lugar a la muerte del ratón en tiempos usualmente inferiores a 6 horas (Yasumoto, com. pers.) y por tanto, a resultados positivos del ensayo, ha introducido una nueva problemática ligada a la aplicación de los protocolos de bioensayo disponibles en la actualidad: se pueden obtener resultados positivos en el bioensayo en ratón aún cuando las YTXs se encuentren en niveles por debajo del nivel máximo regulado. Para paliar este problema, el bioensayo para la determinación de las toxinas en cuerpo entero mencionado anteriormente contempla un protocolo adicional para ser aplicado en el caso de que, debido a la sintomatología presentada por el ratón, se sospechara la presencia de YTXs en los moluscos. Incluye la realización de una partición líquido/líquido entre diclorometano y metanol acuoso (60%) que permite determinar la presencia de AO, DTXs, PTXs y AZAs a niveles superiores a los regulados en la legislación europea en el extracto



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Azaspirácido (AZA)	H	H	Me	H
Azaspirácido-2 (AZA2)	H	Me	Me	H
Azaspirácido-3 (AZA3)	H	H	H	H
Azaspirácido-4 (AZA4)	OH	H	H	H
Azaspirácido-5 (AZA5)	H	H	H	OH

Fig. 5 Estructura de los azaspirácidos y acción letal en los ratones de los extractos inyectados intraperitonealmente (i.p.). Nombre común: 8-metilazaspirácido (AZA2); 22-dimetilazaspirácido (AZA3); 3-hidroxi-22-dimetilazaspirácido (AZA4); 23-hidroxi-22-dimetilazaspirácido (AZA5).

de diclorometano, y la presencia de YTXs a niveles superiores a $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ en el extracto metanólico. Si bien este bioensayo es susceptible de modificaciones o refinamientos en función de una experimentación posterior, permite en su estado actual abordar la implantación de la reciente Decisión europea (ver Anexo I).

Tiempo de supervivencia como criterio de positividad

Como ya se ha mencionado anteriormente, el protocolo original del bioensayo en ratón para la detección de toxinas diarreas se diseñó para que la determinación y expresión de la toxicidad se efectuara en UR, estableciéndose un límite de $5 \text{ UR} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ carne (Yasumoto *et al.*, 1984a).

En los últimos años, algunos países redujeron el tiempo de supervivencia, considerado como resultado positivo en el bioensayo de 24 a 5 h. Esta modificación en el criterio de positividad se efectuó a raíz del estudio llevado a cabo por Le Baut *et al.* (1990) utilizando como material de experimentación mejillones contaminados naturalmente con una concentración elevada de AO. El extracto de dicha muestra se sometió a diluciones seriadas que fueron inoculadas a ratones, hasta alcanzar aquella que producía en los animales tiempos de supervivencia superiores a 24 h. Tras determinación por HPLC del contenido en AO de los extractos de mejillón objeto de estudio, los autores concluyeron que tiempos de supervivencia superiores a 5 h se correspondían con cantidades de AO inferiores a $4 \mu\text{g}$ y que no existían diferencias significativas en las cantidades de AO que daban lugar a tiempos de supervivencia comprendidos entre 5 y 24 h, esto es, $4 \mu\text{g}$ de AO o lo que es lo mismo, $0.8 \mu\text{g}$ de AO por g hepatopaneas (HP) en el caso más usual de inoculación de un extracto correspondiente a 5 g de HP. Como consecuencia, tiempos superiores a 5 h fueron considerados como resultados negativos en el bioensayo en ratón, adoptándose este criterio de positividad en varios países que realizan control de toxinas DSP.

Estudios posteriores comparando los resultados del bioensayo en ratón y de determinación de AO por HPLC con detección fluorimétrica mostraron que tiempos de supervivencia de 5 h se corresponden con concentraciones de AO cercanas a y en algunos casos superiores a $2.8 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP, considerablemente superiores a las determinadas por Le Baut *et*

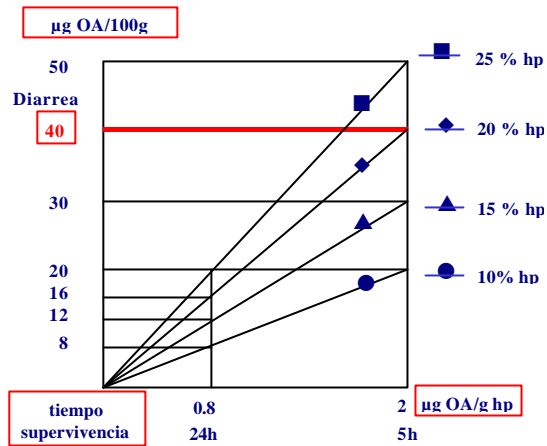


Fig. 6. Cálculo de la toxicidad DSP en relación con la masa visceral completa (carne total) del bivalvo.

al. (1990). Vieites *et al.* (1996), tras analizar por ambos métodos un número de muestras superior a 100, encontraron que la utilización de un tiempo de 5 h como criterio de positividad incrementaba desde el 35 hasta el 76 % el porcentaje de resultados negativos para niveles tóxicos comprendidos entre 2 y $3 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP. Asimismo, Vale & Sampayo (1996) mostraron que aunque tiempos de supervivencia comprendidos entre 5 y 24 h se correspondían en la mayor parte de las muestras analizadas con concentraciones de AO + DTX2 de $2 \mu\text{g AO eq.} \cdot \text{g}^{-1}$ HP aproximadamente, existían muestras con un contenido superior en toxinas DSP que producían tiempos de supervivencia superiores a 5 h. Estos resultados ponen de manifiesto que la reducción en el tiempo de supervivencia de 24 a 5 h lleva consigo una mayor permisividad en cuanto a los niveles de AO en los moluscos.

Por otra parte, cuando se valora el grado de protección al consumidor que proporcionan los diferentes criterios de positividad del bioensayo en ratón es importante tener en cuenta el alto grado de incertidumbre asociado al resultado del ensayo. Si bien el objetivo del mismo es evaluar la toxicidad de la parte comestible del molusco, lo que en la práctica se corresponde en muchas especies con todo el molusco, el ensayo se realiza usualmente sobre el hepatopáncreas, asumiendo que las toxinas diarreas se acumulan preferentemente en las glándulas digestivas. Cuando se considera la relación entre el tamaño del HP y el del cuerpo entero del molusco, se ponen en evidencia variaciones intra e inter-específicas significativas (entre 7-25% expresado en por-

centaje del peso del HP con respecto al cuerpo entero del molusco). La Fig. 6 (Míguez *et al.*, 1998) muestra la incertidumbre en el cálculo de la toxicidad expresada en relación al cuerpo entero que corresponde a los diferentes criterios de positividad. Si consideramos un intervalo de variación en el porcentaje de HP con respecto al cuerpo entero del molusco entre 10 y 20%, un tiempo de supervivencia de 24 h se corresponde con una concentración aproximada de $0.8 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP de manera que la toxicidad total del molusco estaría comprendida entre 8 y 20 $\mu\text{g equiv. AO} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de molusco, mientras que utilizando un tiempo de muerte de 5 h como criterio de positividad la toxicidad del molusco estaría comprendida entre 20 y 50 $\mu\text{g AO} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de molusco, cantidades muy próximas e incluso superiores a aquéllas que producen diarrea, es decir, 40-48 $\mu\text{g AO}$.

Como última consideración, en el supuesto de que toxinas diarreas de actividad biológica más lenta que el AO, como es el caso de la DTX3, estuvieran presentes en las muestras de molusco, la curva dosis respuesta varía teniendo lugar una demora en la aparición de los síntomas de hasta 24 h.

Como conclusión, la reducción, de 24h a 5h, del tiempo de supervivencia correspondiente a un resultado positivo aumenta de manera notable las posibilidades de que moluscos con cantidades nocivas de AO sean puestos en el mercado.

Los diferentes protocolos de bioensayo en ratón aplicados en la actualidad para la determinación de toxinas DSP y los criterios de positividad del ensayo no son equivalentes. Es de esperar que, con el desarrollo de nuevas técnicas de detección y cuantificación de toxinas, con el análisis riguroso de datos epidemiológicos y el desarrollo de estudios toxicológicos, y con una mayor asequibilidad de patrones de las diferentes toxinas, se armonizarán a los niveles internacionales los niveles de tolerancia, de manera que los criterios de riesgo y los protocolos metodológicos utilizados en diferentes países convergerán.

Mientras tanto, al igual que en el caso de las toxinas del grupo PSP, el bioensayo en ratón permanece como un elemento fundamental en los programas de control sanitario de este grupo de toxinas.

1.4. BIOENSAYO EN RATÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE BREVETOXINAS (NSP)

El NSP es un síndrome tóxico producido por la ingestión de mariscos contaminados con brevetoxinas, sustancias polietéreas liposolubles producidas por el dinoflagelado *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*, *Ptychodiscus brevis*) (Steidenger, 1983). Las brevetoxinas son potentes neurotoxinas cuyo mecanismo de acción se desarrolla a través de la activación de los canales de sodio de las membranas celulares.

La determinación de toxinas NSP en mariscos con fines de control sanitario se lleva a cabo mediante bioensayo en ratón y no está tan generalizada como la determinación de las toxinas PSP o DSP, fundamentalmente debido a que los agentes productores de estas toxinas parecen estar restringidos geográficamente a determinadas zonas costeras del este de Estados Unidos, México y Nueva Zelanda (Mc Farren *et al.*, 1965; Ishida *et al.*, 1995).

En la actualidad, el método oficial en Estados Unidos para la determinación de NSP con fines de control sanitario es el procedimiento de la American Public Health Association, (APHA, 1985, originalmente Irwin, 1970), que está basado en la extracción de las toxinas con éter dietílico. Sobre un homogeneizado del molusco entero, previamente acidificado y llevado a ebullición durante un período de 5 min, se realizan sucesivas extracciones con éter dietílico. Tras evaporación del solvente, el residuo se resuspende en aceite de semilla de algodón de tal forma que se alcance una concentración de 10g de muestra por ml. Alicuotas de 1 ml se inyectan intraperitonealmente a 2 o más ratones. Los ratones se observan un mínimo de 6 h. A partir de los tiempos de muerte de los ratones se calcula el número de UR según la tabla de Irwin (Irwin, 1970). Un tiempo de supervivencia de 6 h se corresponde con 20 UR $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ carne. Un valor superior a 20 UR $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ carne da lugar a que los moluscos se consideren no aptos para el consumo humano.

En Nueva Zelanda, país que ha experimentado episodios tóxicos con ocurrencia simultánea de varios grupos de ficotoxinas, se utiliza el método desarrollado por Hannah *et al.* (1995) para la determinación de toxinas NSP y DSP a partir del mismo extracto. El método se basa en la extracción de las toxinas liposolubles con acetona, seguida de una partición en diclorometano. El extracto de diclorometano

es evaporado a peso constante y suspendido en una solución detergente salina para posterior inoculación al ratón. Los resultados del bioensayo en ratón se evalúan en función de los tiempos de supervivencia a partir de los cuales se calculan las UR según definición de Irwin (Irwin, 1970).

1.5. BIOENSAYO EN RATÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE CIGUATOXINAS (CFP)

Las ciguatoxinas son unas neurotoxinas liposolubles termoestables, presentes en ciertos peces de mares tropicales y subtropicales. Estas toxinas son sintetizadas por *Gambierdiscus toxicus* y otros dinoflagelados bentónicos, y posteriormente transmitidas al hombre a través de las redes tróficas. Recientemente, se han descrito tres nuevas especies de *Gambierdiscus* que también producirían CTXs (*G. pacificus*, *G. australis* y *G. polyniensis*). Las microalgas son consumidas por peces herbívoros que a su vez son alimento de peces carnívoros y del hombre. El mecanismo de acción de las CTXs se desarrolla a través de la activación de los canales de sodio de las membranas celulares dando lugar en el hombre al síndrome tóxico conocido como Ciguatera, caracterizado por un amplio espectro de síntomas gastrointestinales, circulatorios y neurológicos.

El bioensayo en ratón es el método más utilizado en la actualidad para la detección de ciguatoxinas en sus organismos transvectores. Además del bioensayo en ratón, se han desarrollado otros ensayos utilizando diferentes animales de experimentación tales como pollos (Vernoux *et al.*, 1985), gatos (Hessel *et al.*, 1960; Bagnis *et al.*, 1985; Lewis, 1987), mosquitos (Bagnis *et al.*, 1985, 1987), larvas de dípteros (Labrouse *et al.*, 1992), etc., que son utilizados en un número reducido de laboratorios, y de los que el más prometedor como alternativa al bioensayo en ratón podría ser el que utiliza larvas de dípteros (Lewis, 1995).

La ejecución del bioensayo en ratón requiere un tratamiento previo de la muestra que es largo y laborioso (2-3 días). Si bien existen diferentes protocolos, el principio general consiste en la extracción del tejido con acetona seguida de diferentes particiones líquido-líquido (Scheuer *et al.*, 1967) tales como: a) agua:dietileter seguida de metanol:hexano (Yasumoto *et al.*, 1984b); b) metanol-agua:hexano seguida de etanol-agua:éter dietílico (Lewis *et al.*, 1993); c) metanol-agua:hexano seguida de agua:cloroformo (Dickey *et al.*, 1994), etc. Adicionalmente se ha pro-

puesto una posterior extracción en fase sólida (columna) previo al ensayo en ratón (Dickey *et al.*, 1994). La complejidad de estos protocolos se explica en parte por la dificultad que conlleva la extracción de las ciguatoxinas, de naturaleza lipofílica, y por la posible presencia de otras sustancias más hidrofílicas o lipídicas que las ciguatoxinas, que podrían interferir en el bioensayo ratón y que por tanto deben ser eliminadas. Si bien han sido desarrollados protocolos más cortos y rápidos para la preparación de la muestra, éstos pueden no ser adecuados para todas las muestras de pescado.

Para la ejecución del ensayo ratón, una alícuota del extracto se evapora, se pesa, y se resuspende en una solución fisiológica (0.8% NaCl, 1% Tween 60) que se inyecta por vía intraperitoneal al ratón. La cantidad varía en función de los diferentes protocolos. Se recomienda inyectar al ratón (de 18-21 g) 0.5 ml de la solución fisiológica con el extracto (un máximo de 20 mg de extracto en peso seco). La dosis de extracto inyectada a cada ratón podría por ejemplo corresponder a 45, 90 o 180 g de equivalentes en peso fresco de tejido muscular de pescado. Una evaluación de la toxicidad oral de las ciguatoxinas ha demostrado equipotencia en relación a la administración por vía intraperitoneal. El ensayo ratón se realiza en duplicado o triplicado. Tras la inyección, se observa a los animales durante 48 h. Como síntomas de ciguatoxicidad se incluyen: inactividad, piloerección, vasodilatación de las orejas, cianosis de la cola, pies y hocico, lagrimeo, salivación, diarrea, disnea, marcha inestable, temblores, convulsiones, saltos y muerte por parálisis respiratoria. Si tras la administración de extracto se observaran tiempos de supervivencia cortos, se deberán reducir las dosis de cara a observar los síntomas característicos del síndrome. Se define la UR como la cantidad de toxina necesaria para matar a un ratón (20 g) en 24 h. Si bien se ha aconsejado que se deben evitar aquellos peces que contengan ciguatoxinas en concentraciones superiores a $2.5 \text{ UR} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Yasumoto *et al.*, 1984b), la sola presencia de CTXs en la muestra podría ser un elemento disuasivo para el consumo.

2. Ensayos *in vitro*

2.1. Ensayos de inhibición enzimática

Algunas ficotoxinas marinas y de agua dulce son potentes inhibidores de la actividad de ciertas enzimas que regulan procesos biológicos de importancia crucial. En concreto, el AO y algunos de sus análogos

gos (DTX1, DTX2...) ejercen su actividad biológica a través de mecanismos de inhibición de las proteinfosfatasa PP1 y PP2A, dos importantes enzimas que intervienen en el control de procesos tales como la división y crecimiento celular, organización estructural, metabolismo, control hormonal, etc (Bialojan & Takai, 1988). Estas enzimas regulan la desfosforilación de proteínas como la serina y la treonina en las células eucarióticas (Cohen, 1989; Cohen *et al.*, 1990). Como consecuencia de la inhibición de la actividad enzimática producida por estas toxinas, se produce un incremento de las proteínas fosforiladas. Así, el efecto diarreico de estos compuestos ha sido atribuido a la acumulación de proteínas fosforiladas que controlan la secreción de sodio en las células intestinales. La acción inhibitoria ejercida sobre las fosfatasa es también responsable de la promoción de crecimiento tumoral que exhiben el AO y congéneres (Fujiki *et al.*, 1992; Fujiki & Suganuma, 1993). Teniendo en cuenta que la magnitud de la inhibición de fosfatasa es proporcional a la concentración de toxinas, este mecanismo puede ser utilizado para medir el contenido de estas sustancias en muestras de moluscos o fitoplancton.

Basándose en estos hallazgos se han desarrollado diferentes ensayos, cuyo principal interés es que el parámetro que se evalúa, esto es, la inhibición de las fosfatasa, está directamente relacionado con el mecanismo de acción de estas toxinas y por tanto con su acción biológica y toxicidad. Son, por tanto, ensayos funcionales. La magnitud de la inhibición enzimática puede ser medida utilizando diversos sustratos naturales o artificiales de las enzimas. Las fosfatasa actúan sobre los diferentes sustratos causando su desfosforilación, proceso que es fuertemente inhibido en presencia de estas toxinas.

Un ensayo basado en un sustrato radiactivo, la 32-glucógeno fosforilasa, fue desarrollado por Holmes (1991) para la detección de AO y DTX1, y fue posteriormente utilizado por Chen *et al.* (1993) para la detección de inhibidores de fosfatasa de la familia de las microcistinas, otras toxinas también presentes en agua dulce y en ambientes marinos y producidas por cianobacterias. El ensayo está basado en una separación previa de las toxinas mediante HPLC y en la medición posterior de la actividad fisiológica de estas toxinas en base a su capacidad para inhibir la desfosforilación de la fosforilasa a través de la inhibición de la protein fosfatasa. El grado de desfosforilación se mide a través de la formación de

³²P, que es cuantificado mediante un contador de centelleo, siendo la cantidad de ³²P inversamente proporcional a la cantidad de toxina presente. La sensibilidad de este método es muy alta, del orden de 10 pg de AO. Basado también en un sustrato radiactivo, la fosfohistona, Honkanen *et al.* (1996) desarrollaron un ensayo de inhibición enzimática para la detección del AO en extracto de ostras, con un límite de detección de 0.2 µg · g⁻¹ de tejido del molusco.

El principal inconveniente de estos ensayos desde el punto de vista de su aplicación en laboratorios de control sanitario es el uso de compuestos radiactivos, que presentan un coste muy elevado y especiales dificultades en relación con su manipulación, eliminación y con la protección de los usuarios.

Takai & Mieskes (1991) estudiaron la aplicación del para-nitrofenil fosfato como sustrato para la PP2A, y sugirieron la posibilidad de su uso para la detección colorimétrica del AO en moluscos. Basados en este mismo sustrato, Simon & Vernoux (1994) propusieron un ensayo colorimétrico de inhibición de fosfatasa, utilizando una preparación semipurificada de PP1 y PP2A obtenida a partir de músculo de conejo. La mínima concentración detectada en este ensayo es de 4 ng · ml⁻¹ en soluciones acuosas y 100 ng · g⁻¹ en mejillones. Con posterioridad, Tubaro *et al.* (1996) desarrollaron un ensayo similar utilizando PP2A comercial y aplicando para la detección colorimétrica un lector de placas de pocillos múltiples. El ensayo requiere una purificación previa del extracto a través de diferentes particiones líquido:líquido para eliminar sustancias de la matriz, como son los ácidos grasos, que producen interferencias. El límite de detección es de 63 pg · ml⁻¹ ó 2 ng · g⁻¹ glándula digestiva del molusco. El ensayo colorimétrico ha sido desarrollado en dos versiones en forma de kit, uno de ellos comercializado por la compañía italiana TECNA, y otro comercializado por la compañía chilena TEPUAL.

Vieytes *et al.* (1997) desarrollaron un ensayo fluorimétrico de inhibición de fosfatasa, utilizando PP2A comercial y diferentes sustratos fluorescentes como son: 4-metil-lumbeliferona, fluorescein difosfato (FDP), 6,8, difluoro-7-hidroxi-4-metilumbeliferona fosfato (Di FMUP), 9H- (1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-one-7-yl) fosfato, sal diamonio (DDAO fosfato) y 4 metilumbeliferona fosfato (4-MUP). El ensayo puede realizarse con cualquiera de los sustratos mencionados en placas de pocillos múltiples, siendo necesario en este caso un lector de fluo-

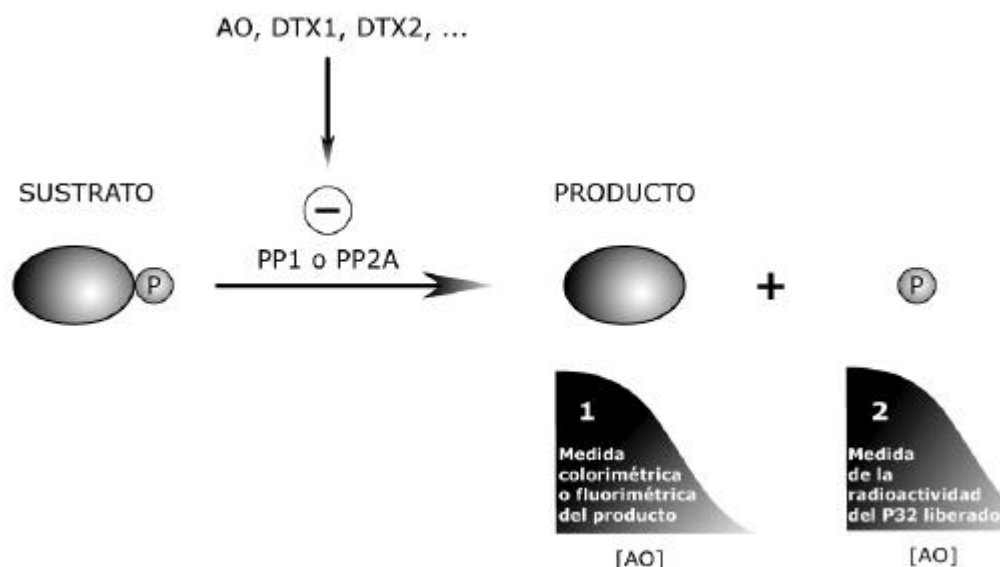


Fig. 7 Detección de toxinas del grupo del AO mediante la medida de la inhibición de la actividad de las fosfatasa. Las estrategias de detección comprenden la evaluación por colorimetría o fluorimetría de la concentración de producto (placas de 96 pocillos) o bien la medición de la radioactividad.

rescencia. Este ensayo conlleva una extracción sencilla de las toxinas con metanol 80%, no requiere una purificación posterior de las muestras, y permite la realización del análisis simultáneo de un número elevado de muestras en un tiempo reducido. Es muy sencillo, de ejecución rápida y gran sensibilidad, con un límite de detección de $3.2 \text{ pg AO} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los mismos autores han aplicado con éxito este tipo de ensayo a la determinación de microcistinas (Fontal *et al.*, 1999). Estudios recientes, comparando el ensayo colorimétrico y el fluorimétrico (Mounfort *et al.*, 1999), han mostrado que el ensayo fluorimétrico es más preciso y sensible y produce menos falsos positivos que el que utiliza los sustratos cromogénicos.

Los ensayos de inhibición enzimática (Fig. 7) son muy simples, sensibles, rápidos y selectivos, y tienen capacidad para detectar otras sustancias bioactivas potencialmente tóxicas a través de los mismos mecanismos de inhibición enzimática. El ensayo es adecuado para la detección del AO, DTX1, DTX2 y presumiblemente cualquier isómero de estas toxinas. Otras toxinas del grupo, como son la DTX3, los diolésteres y la DTX4 no presentan actividad inhibitoria de las enzimas, pero su presencia puede ser detectada mediante estos ensayos si se realiza una hidrólisis previa (Mounfort *et al.*, 2001).

Si bien la utilización de estos ensayos con fines de control de la presencia de AO y análogos en los mariscos está actualmente limitada por la falta de

estudios robustos de validación, existen iniciativas importantes dirigidas a este fin, de manera que es previsible que en un futuro próximo los ensayos de inhibición enzimática sean utilizados como herramientas de control sanitario. Las pectenotoxinas y las yesotoxinas no son inhibidores de las proteinfosfatasa, y por tanto no son detectadas con este tipo de ensayos, de manera que los ensayos de inhibición enzimática con fines de control sanitario tendrán que ser complementados con otros ensayos o análisis que detecten las PTXs y las YTXs.

2.2. Inmunoensayos

Existen diversos tipos de inmunoensayos para la detección de ficotoxinas marinas basados en el uso de anticuerpos especialmente desarrollados contra ellas. Dichos anticuerpos se obtienen aprovechando la capacidad que tiene el sistema inmune de los animales de protegerlos contra organismos patógenos o sus toxinas produciendo, a través de sus linfocitos, una serie de proteínas (anticuerpos) capaces de unirse específicamente a moléculas extrañas al organismo. Una molécula capaz de unirse a un anticuerpo se denomina antígeno, y la capacidad de generar una respuesta inmune por parte de una molécula se denomina inmunogenicidad. Uno de los principales problemas que se plantea a la hora de obtener anticuerpos contra las ficotoxinas marinas es su escasa inmunogenicidad debido, principalmente, a sus características estructurales. Esto significa que por sí mis-

mas no inducirían la producción de anticuerpos al ser inyectadas dentro de un animal. Por este motivo, deben ser unidas químicamente a otras proteínas denominadas «carriers», las cuales son capaces de provocar una respuesta inmune apropiada (un ejemplo sería la ovoalbúmina o la hemocianina de determinados organismos como la lapa). Esto disminuye en gran medida la eficiencia del proceso, ya que no toda la toxina se va a unir al carrier.

Existen otros dos problemas añadidos al anterior. Por un lado, la escasa disponibilidad de toxinas puras, que es esencial para la generación de anticuerpos y por otro lado la complejidad de los distintos grupos de toxinas marinas, que están constituidos por múltiples congéneres muy similares entre sí, lo que dificulta la obtención de anticuerpos específicos para cada una de ellas. De ahí que en este tipo de ensayos cobre gran importancia lo que se denomina “reacción cruzada” y que hace referencia a la reacción inmunológica entre un anticuerpo específico, generado a partir de una toxina, y las toxinas estructuralmente relacionadas con el antígeno a partir del cual fue generado el anticuerpo. Así, cuanto mayor sea la reactividad cruzada de un anticuerpo, mayor será el rango de toxinas relacionadas entre sí potencialmente detectables por el inmunoensayo.

Los anticuerpos generados a partir de la inoculación del antígeno en el animal utilizado como fuente de anticuerpos (generalmente conejo, oveja o cabra) se recogen a partir del suero sanguíneo. Dicho suero se denomina policlonal, porque contiene muchos anticuerpos diferentes que reaccionarán contra diferentes partes (o epítomos) del antígeno inyectado. Sin embargo, también se pueden obtener anticuerpos monoclonales, es decir, anticuerpos que reaccionarán únicamente con un solo epítomo de la toxina, lo que aumenta enormemente la especificidad del reconocimiento anticuerpo-toxina, disminuyendo las reacciones cruzadas. La obtención de anticuerpos monoclonales se consigue fusionando un solo linfocito B (productor de un solo tipo de anticuerpos) con una célula tumoral que lo hará inmortal. De esta manera se consigue una fuente ilimitada de un solo tipo de anticuerpo altamente específico.

Existen numerosas variantes de inmunoensayos que utilizan diferentes estrategias de acoplamiento antígeno-anticuerpo como reacciones directas o indirectas, reacciones de competición, etc. La magnitud de la reacción inmunológica puede ser detectada de diversas maneras, ya sea mediante el uso de mar-

cadore radiactivos (radioinmunoensayos, RIA), marcadores fluorescentes (FIA) o mediante acoplamiento de una reacción enzimática (EIA). Los inmunoensayos más frecuentes para la determinación de ficotoxinas son los denominados ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que pueden ser configurados en una gran variedad de formatos y en los que básicamente, se mide la interacción toxina-anticuerpo mediante la reacción de una enzima ligada al anticuerpo con un sustrato específico de la misma, reacción que da lugar a un producto coloreado o fluorescente, y por lo tanto, cuantificable.

Los inmunoensayos tienen un grado variable de reactividad con los diferentes miembros de las toxinas pertenecientes a un mismo grupo y la sustitución de determinados grupos funcionales afecta a la reactividad cruzada de las toxinas con los anticuerpos. Los inmunoensayos son ensayos estructurales de tal forma que los anticuerpos reconocen moléculas de similar estructura, que podrían no ser tóxicas, produciéndose en este caso falsos positivos, y no reaccionan con moléculas diferentes que presenten actividad biológica similar produciéndose en este caso falsos negativos. La correlación entre la respuesta inmunológica y la toxicidad real depende por tanto de los perfiles tóxicos de las muestras de fitoplancton o de mariscos.

El principal inconveniente para adoptar los inmunoensayos en el control sanitario de ficotoxinas es la falta de respuesta de algunas toxinas, el desconocimiento de las reacciones cruzadas y la dificultad de obtener una correlación satisfactoria entre la reacción inmunológica y la toxicidad real de las muestras. En contrapartida, la gran sensibilidad de los ensayos inmunológicos permite importantes aplicaciones como por ejemplo la localización de las toxinas en diferentes compartimentos de las células o de los tejidos, o el análisis de muestras clínicas obtenidas en pacientes para el diagnóstico de intoxicaciones. Además, la posibilidad de diseñar y desarrollar algunos de estos ensayos en formatos muy sencillos de fácil aplicación, por ejemplo en la forma de bastoncillos (“sticks”), hace que puedan ser fácilmente utilizados para hacer análisis cualitativos o semi-cuantitativos en el campo, sin necesidad de trasladar las muestras al laboratorio.

En relación a la detección de toxinas DSP, se han desarrollado varios métodos configurados como RIA o ELISA, que utilizan anticuerpos preparados

contra el AO. El radioinmunoensayo desarrollado por Levine *et al.* (1988) se basa en la inhibición competitiva de la reacción entre AO tritiado y el anticuerpo del AO producida por el AO de las muestras. La magnitud de la inhibición se determina mediante contador de centelleo y permite la detección de hasta $0.2 \text{ ng AO} \cdot \text{ml}^{-1}$. El método es sin embargo muy laborioso y complejo para su uso en rutina.

Existen comercialmente dos ELISA desarrollados en forma de kits para la determinación de AO: el «DSP-Check» (Sceti, Tokio, Japón) y el «Okadaic Acid kit» de Rougier Bio-Tech (Montreal). El DSP-check utiliza anticuerpos monoclonales previamente desarrollados por Usagawa *et al.* (1989). Los anticuerpos monoclonales marcados con una enzima, reaccionan competitivamente con una cantidad constante de AO fijada en los pocillos y con el AO procedente de la muestra objeto de análisis. La cantidad de enzima es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo fijado, que será tanto mayor cuanto menor sea la cantidad de AO en las muestras, y que es medida colorimétricamente, de manera que el contenido de AO de las muestras es inversamente proporcional a la absorbancia. La sensibilidad del ensayo es de $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. Los anticuerpos utilizados en el kit presentan una reactividad cruzada de aproximadamente 40 % con la DTX2 (Carmody *et al.*, 1995) y del 70 % con la DTX1 (Usagawa *et al.*, 1989) y no reaccionan con la DTX3.

El kit de Rougier Bio-Tech, está basado en el uso de un anticuerpo monoclonal específico del AO (denominado 6/50) y un anticuerpo específico del anticuerpo monoclonal (1/59) (Shestowsky *et al.*, 1992), que está unido a la fase sólida y que compete con el AO de las muestras por el anticuerpo 6/50. La cantidad de anticuerpo fijado es inversamente proporcional a la cantidad de AO y se mide mediante una reacción enzimática. La afinidad que presenta el anticuerpo 6/50 por la DTX1 y la DTX2 es entre 10 y 20 veces menor que la correspondiente al AO (Chin *et al.*, 1995), y la DTX3 no es detectada. Sin embargo, algunos derivados del AO como son ésteres o diol-ésteres, DTX4 y DTX5 presentan una afinidad similar a la del AO (Shestowsky *et al.*, 1993). Tanto las pectenotoxinas como las yesotoxinas no reaccionan con ninguno de los anticuerpos anteriormente mencionados y por tanto no son detectadas mediante estos inmunoensayos. La detección de la DTX3, en cualquiera de las versiones del inmunoensayo requiere una hidrólisis previa antes de su determinación.

Con respecto a la determinación de toxinas PSP mediante inmunoensayos, se han desarrollado diferentes versiones (ELISA, EIA, etc.) (Chu & Fan, 1985; Davio *et al.*, 1985; Usleber *et al.*, 1991, 1995; Chu *et al.*, 1992; Burk *et al.*, 1995) de las que existen en la actualidad dos sistemas comercialmente disponibles: el «Rida-screen Saxitoxin» (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Alemania) y el «MIST-Alert» (Jellett Biotek). El kit de RIDA-screen Saxitoxin es un ELISA directo competitivo, en el que una cantidad fija de saxitoxina ligada a una enzima y las toxinas PSP presentes en las muestras compiten por los anticuerpos fijados a la fase sólida. La reacción colorimétrica entre la enzima y un sustrato de la misma permite la cuantificación de las toxinas presentes en la muestra, cuya concentración será inversamente proporcional a la absorbancia. El límite de detección del ensayo para la saxitoxina es de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. La reactividad cruzada es buena para STX, GTX2 y GTX3 siendo muy pobre en el caso de neo STX, GTX1, GTX4 y toxinas decarbamoiladas, de manera que en el caso de que estas toxinas estén presentes en las muestras se produce una subestimación de la toxicidad.

El MIST-Alert kit (Laycock *et al.*, 2001) desarrollado por Jellett-Biotek es la más reciente aportación a las técnicas inmunológicas aplicadas a la detección de PSP. El test está basado en técnicas de inmunocromatografía de flujo lateral y contiene una mezcla de anticuerpos, producidos a partir de diferentes análogos. Está diseñado en un formato muy sencillo y fácil de usar, para ser utilizado como método de criba, proporcionando una indicación cualitativa (positivo/negativo) a la presencia de toxinas PSP. La STX, GTX 2-3, toxinas C1 y C2, B1 y dc STX son detectables en concentraciones del orden de 200 nM. En el caso de Neo-STX, GTX1 y GTX4, se requieren concentraciones entre 400 y 600 nM para producir una respuesta positiva. El kit se encuentra actualmente en proceso de validación. Debido a las diferentes afinidades de la mezcla de anticuerpos hacia los análogos individuales, no es posible establecer un límite de detección definitivo para el caso de las diferentes mezclas de toxinas que pueden aparecer en diversas especies de moluscos. Dependiendo del perfil tóxico, el límite de detección se encuentra entre 7 y $60 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de tejido.

Con respecto a las ciguatoxinas, diferentes equipos han obtenido anticuerpos para su detección en muestras de pescado. Si bien en algunos casos se ha

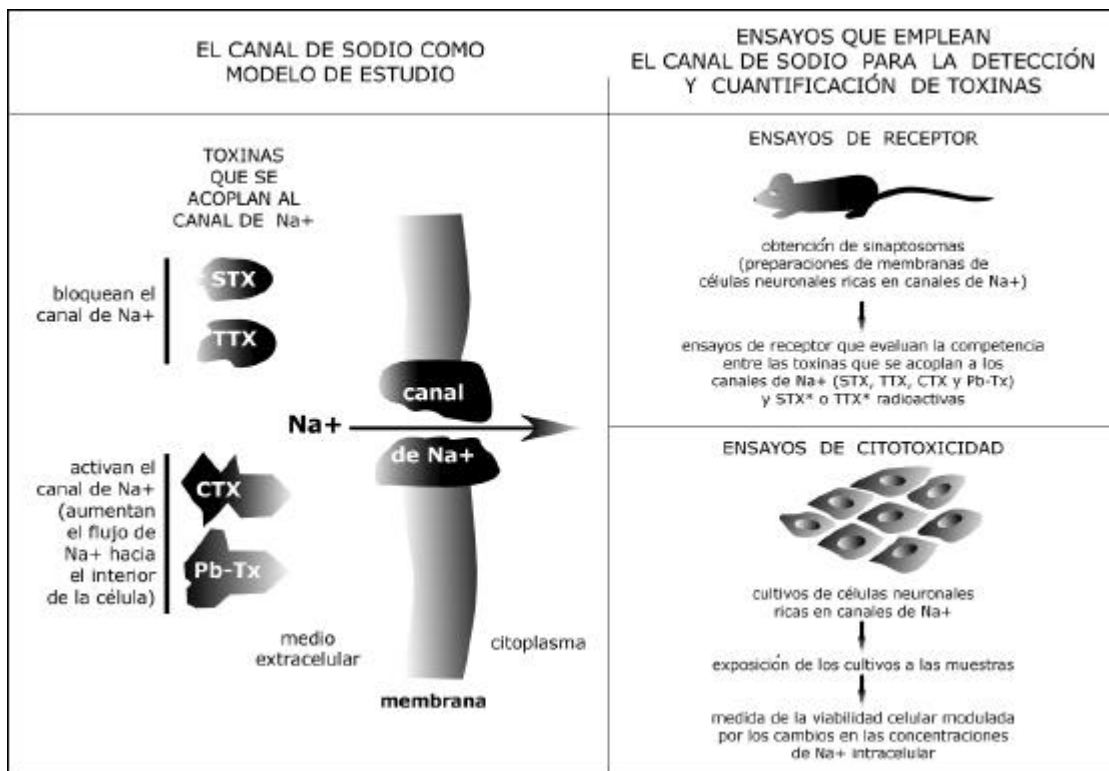


Fig. 8 Utilización del canal de sodio para la detección y cuantificación de saxitoxina (STX) y derivados, tetrodotoxina (TTX), ciguatoxinas (CTX) y brevetoxinas (Pb-Tx) mediante ensayos de receptor y ensayos celulares.

probado su relativa eficacia, aún no se ha podido asegurar una alta especificidad (Lewis, 1995). A pesar de ello, han sido desarrollados diferentes ensayos basados en anticuerpos adheridos a bastoncillos o a placas, de cara a obtener respuestas con rapidez (1 h o menos). Su eficacia, hasta la fecha, permanece objeto de estudio. Como ejemplos, cabe citar el ensayo CIGUATECT™ de dudosa eficacia dada la gran cantidad de falsos positivos y negativos (Dickey *et al.*, 1994). Recientemente un nuevo ensayo, el Ciguac-Check™ ha sido propuesto y comercializado, si bien aún no se ha finalizado el proceso de validación.

2.3. Ensayos de receptores

El principio de los ensayos de receptor es la medición de la interacción que tiene lugar entre algunas ficotoxinas marinas y ciertos componentes estructurales (proteínas) de las membranas celulares, como son los canales de sodio (toxinas PSP, NSP y algunas de las relacionadas con el síndrome ciguatérico) o bien el receptor del ácido glutámico, sustancia que actúa como neurotransmisor (toxinas ASP) (ver Fig. 8). Las toxinas anteriormente citadas ejercen su ac-

tividad biológica, y por tanto su toxicidad, a través de su acción sobre estos receptores biológicos altamente específicos, de manera que el grado de afinidad de una toxina dada por el receptor es directamente proporcional a su potencia tóxica.

Los receptores utilizados en los ensayos se aíslan previamente a partir del tejido nervioso de animales (por ejemplo rata o rana). Tras la disgregación de estos tejidos se obtienen unos artificios constituidos por canales o receptores y restos de membranas que se denominan sinaptosomas. La estrategia de detección más usual en este tipo de ensayos es la cuantificación del desplazamiento que una toxina, o grupo de toxinas de una familia dada, ejerce de forma competitiva sobre un compuesto con afinidad por el mismo receptor y previamente marcado con tritio. En el radioensayo para determinación de PSP, la saxitoxina (STX) y análogos, se ligan a los canales de sodio presentes en los sinaptosomas, desplazando de los mismos a la STX radiactiva previamente ligada a los canales. En función de la concentración de las toxinas y de su potencia tóxica se produce un mayor o menor desplazamiento del compuesto mar-

cado. La saxitoxina radiactiva que no ha sido desplazada se cuantifica posteriormente mediante un contador de centelleo, de manera que la radioactividad detectada será inversamente proporcional a la cantidad de toxinas PSP presentes en la muestra objeto de estudio.

El primer radioensayo basado en este mecanismo de desplazamiento competitivo fue el desarrollado por Davio & Fontelo (1984) para la detección de saxitoxina en muestras de plasma humano. Posteriormente, Vieytes *et al.* (1993) modificaron el ensayo introduciendo el uso de sinaptosomas ligados a una fase sólida, lo que permitió la utilización de placas de pocillos múltiples y su aplicación al análisis de extractos de moluscos. Doucette *et al.* (1997) modificaron el ensayo introduciendo el uso de un equipo sofisticado de filtración (Millipore MultiScreen Assay System) que simplifica el protocolo y cuya aplicación al análisis de extractos de diferentes especies de moluscos ha generado resultados muy consistentes con el bioensayo en ratón de la AOAC. Recientemente, este mismo grupo ha demostrado la aplicabilidad de la tetrodotoxina marcada con tritio (Doucette *et al.*, 2000) como alternativa al radioensayo de saxitoxina tritiada, cuyo transporte está actualmente restringido por regulaciones internacionales. Estos autores han introducido además el uso de contadores de centelleo de microplacas, en sustitución de los contadores de centelleo convencionales, dando lugar a un ensayo más rápido, eficaz y flexible.

Sierralta y colaboradores (Sierralta *et al.*, 1996) aplicaron el radioensayo para evaluar la toxicidad de extractos de mariscos pertenecientes al programa nacional de monitoreo y control de toxinas de Chile, encontrando una buena correlación entre el desplazamiento de STX marcada y la toxicidad hallada mediante bioensayo en ratón de la AOAC ($R=0.972$, $N=41$). El ensayo se aplicó en rutina para monitorear niveles de PSP por debajo del límite de detección del bioensayo en ratón en las áreas de producción de moluscos del norte de Chile, demostrándose su aplicabilidad como herramienta de detección y alerta temprana de episodios tóxicos.

Se han desarrollado ensayos de receptor para la detección de CTX, brevetoxinas (PbTx) y tetrodotoxinas (TTX). En el caso de las toxinas ASP, que exhiben su acción tóxica mediante la interacción con los receptores glutamato, se ha desarrollado el

ensayo usando sinaptosomas de rana, ricos en este tipo de receptores y kainato marcado con tritio (Van Dolah *et al.*, 1994).

Al igual que los ensayos de inhibición enzimática, los radioensayos de receptor se basan en el mecanismo de acción de las toxinas y por lo tanto son ensayos funcionales de gran sensibilidad y especificidad, ya que sólo detectan aquellos compuestos que actúan sobre los canales de sodio o los receptores glutamato. El radioensayo es varios órdenes de magnitud más sensible que el bioensayo en ratón. La toxicidad es proporcional al grado de interacción con los receptores. El grado de correlación de la respuesta medida en el radioensayo con la toxicidad real de las muestras es muy alto, con independencia de los perfiles de toxinas en la muestra.

Los principales problemas para su aplicación en rutina se derivan de las dificultades para conseguir una fuente consistente de receptores para los diferentes ensayos y de las dificultades de gran parte de los laboratorios de monitoreo y control para trabajar con marcadores radiactivos.

2.4. Ensayos celulares

La detección y cuantificación de ficotoxinas marinas en extractos obtenidos a partir de microalgas o de alimentos puede realizarse mediante ensayos celulares, es decir aquellas metodologías que permiten detectar, cualitativa o cuantitativamente, una respuesta tóxica en células mantenidas en cultivo y expuestas a uno o más agentes, en este caso ficotoxinas. La respuesta celular se basa en las propiedades bioquímicas o fisiológicas que pueden ser comunes a toxinas que presenten diferentes estructuras moleculares, de ahí que a menudo estas respuestas sean inespecíficas. Las diferencias más significativas entre los ensayos propuestos se refieren al tipo celular, a las condiciones de ensayo en función del mecanismo de acción de las toxinas y a los parámetros evaluados. Si bien existen ensayos celulares cualitativos que ponen en evidencia la presencia de una toxina a partir de la observación microscópica de su efecto tóxico, se han intentado desarrollar ensayos cuantitativos, que por lo general estiman la concentración de toxina en el medio a partir de la medida de una variable cuantificable (actividad enzimática, viabilidad, etc.). De esta manera se puede calcular, por ejemplo, la concentración de toxina que, en la población celular inhibe al 50% una actividad determinada, (IC-50).

Tabla 4. Ensayos celulares para detección de toxinas PSP, NSP, DSP, ASP y Ciguatera.

	Toxinas detectadas	Evaluación en fitoplancton	Evaluación en bivalvos	Evaluación en otros organismos	Tiempo de respuesta (Horas)	Observación de la toxicidad por microscopía	Cuantificación por observación	Especificidad de la observación	Cuantificación automática	Validación correlación	Límite de detección	Tipo celular
Ne+ (PSP, NSP, CIGUATERA)												
Kogure <i>et al.</i> 1988	TTX STX	-	-	-	6-8	+ Membrana	+	-	-	-	3 nM	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Jellett <i>et al.</i> 1992	STX	-	-	-	-	-	-	-	-	Ratón	33 nM Eq.	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Jellett <i>et al.</i> 1995	NeoSTX GTXII-III	+	+	-	24	-	-	-	+	Ratón HPLC	30-300 nM	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Jellett <i>et al.</i> 1998	dcSTX	-	-	-	-	-	-	-	+	Ratón HPLC	25 nM	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Gallacher <i>et al.</i> 1992	SCB	-	+	Bacterias	24	-	-	-	+	Ratón HPLC	8.9 pM 2.9 nM	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
Manger <i>et al.</i> 1995	CITX I-3C PbTx1 STX	-	-	Peces Cangrejos	4-22 22-48	-	-	-	+	-	-	Neuroblastomas 2-A de ratón ATCC CCL-131
DSP												
Aune <i>et al.</i> 1991 *	AO DTX1 (PTX1 YTX)	-	-	-	2	+ (M.O./M.E.) Membrana	-	+	-	-	0.6 µM 0.6 µM 5.7 µM 8.4 µM	Hepatocitos de ratón (Cultivo primario)
Amzil <i>et al.</i> 1992	AO	-	+	-	3	+ Membrana	+	-	-	HPLC	6.2 µM	Células cancerosas humanas KB
Fessard <i>et al.</i> 1994	AO	+	-	-	3	+ Membrana	-	+	+	Ratón	22 nM	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Diogène <i>et al.</i> 1995	AO	+	-	-	3	+ Citosqueleto	-	+	+	Ratón	5 nM	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Fernández-Suárez <i>et al.</i> 1993 García <i>et al.</i> 1998	AO DTX2	-	+	-	24	+ Citosqueleto	+	+	+	Ratón HPLC	3 nM 3 nM	Neuronas granulares y astrocitos de cerebelo de rata (Cultivo primario)
OTRAS TOXINAS												
Diogène <i>et al.</i> 1994	MTX	+	-	-	1	+ Membrana + Citosqueleto	+	+	+	Ratón	2.7 nM Eq.	Fibroblastos de hámster BHK 21 C-13
Diogène <i>et al.</i> 1995		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Novelli <i>et al.</i> 1992* García <i>et al.</i> 1998	AD (STX)	-	+	-	24	+ Citosqueleto	+	+	+	Ratón HPLC	3 µM 5 nM	Neuronas granulares y Astrocitos de cerebelo de rata (Cultivo primario)

*: Se incluyen además otras toxinas para las cuales el mismo ensayo ha sido propuesto. Toxinas: AD: ácido domóico; CITX: ciguatera; dcSTX: decarbonyl saxitoxina; DTX: dinofisistoxina; GTX: goniautoxina; MTX: maitotoxina; NeoSTX: neo-saxitoxina; AO: ácido okadáico; PbTx: brevetoxina; PTX: pectenotoxina; SCB: toxinas bloqueadoras de canales de sodio; STX: saxitoxina; TTX: tetrodotoxina; YTX: yessotoxina. Abreviaciones: M.O.: Microscopía óptica. M.E.: Microscopía electrónica. HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

El ensayo celular se inicia, en la mayoría de los casos, con la exposición de las células a la muestra objeto del análisis. Para ello se incluye una alícuota del extracto de la muestra en el medio de cultivo celular durante un tiempo determinado (1-24 h) para proceder seguidamente a la evaluación del efecto causado sobre las células. En el caso de que el parámetro a evaluar sea la viabilidad celular, uno de los métodos consiste en incubar las células con un colorante vital (de 1 a 3 h) que será retenido por las células vivas. Se procede posteriormente a la fijación de las células, extracción del colorante vital y a su cuantificación, por absorbancia o fluorescencia, para obtener una estimación de la viabilidad de la población.

Si bien los ensayos celulares han demostrado su utilidad en investigación, éstos no han sido aún reconocidos como herramientas de control sanitario, para lo cual es necesario proceder a estudios rigurosos de validación.

Desde que en 1975 Caterall (1975) describió las actividades de diferentes neurotoxinas en el modelo celular Neuro 2-A, se han propuesto numerosos ensayos celulares para la detección de toxinas relacionadas con el PSP, VNM, DSP, ASP y ciguatera en diversos tipos de muestras (Tabla 4).

2.4.1. ENSAYOS CELULARES DE TOXINAS QUE ACTÚAN SOBRE CANALES DE SODIO

Las toxinas PSP y la tetrodotoxina son compuestos que ejercen su acción biológica por bloqueo de los canales de sodio de las membranas celulares. A través de este mecanismo de acción, estas toxinas pueden afectar a las neuronas responsables de la conducción nerviosa, y más concretamente a aquellas que forman la conexión neuromuscular.

Kogure *et al.* (1988) desarrollaron un ensayo celular con cultivos de células Neuro-2A (Kogure). La exposición de dichas células a la STX o TTX no altera la viabilidad celular y no se obtiene una respuesta tóxica evidente. Para detectar la presencia de STX o TTX, el ensayo requiere la utilización de dos toxinas complementarias: la veratridina y la ouabaina. La veratridina aumenta el flujo del sodio hacia el interior de la célula a través de los canales de sodio presentes a nivel de la membrana celular. La ouabaina bloquea la actividad de la bomba sodio-potasio también a nivel de la membrana celular e

impide que se contrarreste el flujo de sodio provocado por la veratridina. El aumento de sodio intracelular conduce a un estado hiperosmótico que provoca una entrada de agua, con el consiguiente hinchamiento celular (observable en microscopía) y posterior muerte celular. La STX y análogos y la TTX bloquean el flujo de sodio a través de los canales celulares, y pueden contrarrestar el efecto del complejo veratridina-ouabaina, de tal manera que en presencia de estas toxinas la viabilidad de la población celular aumentará. El ensayo celular se basa, pues, en la medida del efecto tóxico por observación microscópica de las células en cultivo, siendo el número de células intactas directamente proporcional a los niveles de STX o TTX (o de cualquier otra sustancia que bloquee los canales de sodio).

En un intento de mejorar el ensayo de citotoxicidad para las toxinas bloqueantes del sodio, Gallacher & Birbeck (1992) y Jellett *et al.* (1992, 1995) introdujeron el uso de colorantes vitales, es decir colorantes indicadores de la viabilidad celular. Ello permitió realizar la cuantificación de las toxinas mediante la lectura de absorbancia con el uso de lectores de placas de pocillo múltiples. En una segunda fase, Jellett *et al.* (1998) desarrollaron el ensayo celular en forma de tres tipos de kits: cualitativo, semi-cuantitativo y cuantitativo, con un formato que permite su aplicación en aquellos laboratorios que no disponen de la infraestructura necesaria para desarrollar y mantener cultivos celulares. Si bien el desarrollo de este kit hizo que se concibieran esperanzas en cuanto a la posibilidad de su aplicación para el control de PSP, en la práctica se detectaron problemas derivados del transporte de los kits desde el país de origen (Canadá) que afectaban a la viabilidad celular y que comprometían su uso en laboratorios de otros países, dificultando el proceso de validación formal (AOAC) al que se sometió el ensayo.

Louzao *et al.* (en prensa) han desarrollado un método de fluorescencia para la detección de PSP basado en su actividad funcional. El método consiste básicamente en la incubación de células de neuroblastoma humano con el marcador fluorescente bis-oxonol, cuya distribución en la membrana plasmática es dependiente del potencial, seguido de la despolarización de las membranas con veratridina y de la posterior inhibición dosis-dependiente de la despolarización por la acción de las toxinas PSP. El porcentaje de inhibición de la despolarización está directamente relacionado con la concentración de

toxinas PSP. El límite de detección del ensayo es de $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Recientemente, Velez *et al.* (2001) han desarrollado un ensayo funcional electrofisiológico para la determinación de toxinas PSP. Mediante la aplicación de la técnica "patch clamp" se registra la disminución de las corrientes de sodio que tiene lugar, en presencia de saxitoxinas, en células de una línea celular HEK 293 transfectadas establemente con la isoforma del canal de sodio perteneciente a músculo esquelético de rata. La sensibilidad del ensayo electrofisiológico es tres órdenes de magnitud superior al bioensayo, observándose una buena correlación entre ambos métodos.

Las Ciguatoxinas (CTXs) y las Brevetoxinas (Pb-Tx), al igual que la veratridina, son toxinas activadoras de los canales de sodio. Manger *et al.* (1995), basándose en el ensayo propuesto por Kogure, desarrollaron el ensayo celular para la detección de este tipo de toxinas. En este ensayo se utiliza únicamente la ouabaina. Al bloquear la ouabaina la bomba de Na^+/K^+ , las células son sensibles a la presencia de CTX o Pb-Tx, ya que aumentan el flujo de Na^+ hacia el interior de las mismas. Como resultado de la presencia de CTXs o Pb-Tx se produce la muerte celular. Con un lector de placas se determina la cantidad de células muertas que es proporcional a la concentración de las toxinas.

La presencia en las muestras de otras toxinas o sustancias que afecten directamente la viabilidad celular puede afectar la respuesta del ensayo. Así, la inclusión de etapas de purificación de las muestras facilita la eliminación de las posibles interferencias y aumenta la especificidad del ensayo celular.

2.4.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD PARA EL ÁCIDO OKADAICO (AO)

Se han desarrollado numerosos ensayos para detectar una respuesta celular tóxica al AO, utilizando observaciones microscópicas y/o cuantificaciones colorimétricas. Si bien numerosas publicaciones describen el mecanismo de acción celular del AO, un promotor tumoral inhibidor de las protein fosfatasas PP1, PP2A, PP3 y PPX, no se ha desarrollado aún un ensayo de citotoxicidad altamente específico para esta toxina.

Aune *et al.* (1991) utilizaron hepatocitos de rata para la evaluación de la respuesta citotóxica al AO

por microscopía óptica y electrónica de barrido. La observación de alteraciones morfológicas diferenciales del AO respecto a otras toxinas fue un paso hacia la especificidad parcial del ensayo. Diferentes modelos celulares fueron propuestos con posterioridad. Amzil *et al.* (1992) obtuvieron una correlación positiva entre los resultados del ensayo celular y la cuantificación del AO por HPLC, si bien no se contempló la especificidad del ensayo. En 1994, Fessard *et al.* (1994) describieron con un ensayo de fibroblastos una nueva respuesta morfológica al AO, que fue más tarde completada con un ensayo más específico basado en el análisis de las alteraciones del citoesqueleto de actina (Diogène *et al.*, 1995). Este ensayo permitía cuantificar mediante medidas fluorimétricas con lector de placas el efecto tóxico del AO sobre la viabilidad celular.

En cualquier caso, la especificidad de la respuesta al AO, puede ser mejorada si durante la etapa previa al ensayo celular se realizan procedimientos de purificación de la muestra de manera que se excluyan otros grupos de toxinas.

2.4.3. OTRAS TOXINAS Y ENSAYOS

Algunos de los ensayos anteriormente descritos para el AO han sido utilizados para la detección de otras toxinas. Este es el caso de los trabajos de Aune *et al.* (1991) con la DTX1, la PTX1 y la Yesotoxinas y de Diogène *et al.* (1994) con la maitotoxina (MTX). Así, Aune ha descrito diferencias entre las actividades o alteraciones morfológicas provocadas por el AO, DTX1, PTX y YTX, evidentes en microscopio electrónico de barrido pero más confusas con microscopio óptico.

En el caso de la MTX, se han descrito en detalle las alteraciones morfológicas y las concentraciones internas de calcio intracelular producidas por esta toxina, lo que ha permitido el desarrollo de ensayos de citotoxicidad muy específicos (Diogène *et al.*, 1994; Diogène *et al.*, 1995). En el caso de las YTX se han descrito también alteraciones en los niveles de calcio cuando se estudió el efecto de estas toxinas en linfocitos humanos (De la Rosa *et al.*, 2001).

Se ha descrito un cultivo celular primario de neuronas de cerebelo de rata que permite en función de las condiciones del ensayo su aplicación a la detección de toxinas relacionadas con PSP, DSP y ASP (Novelli *et al.* 1992; Fernández-Sánchez *et al.*, 1991; García *et al.*, 1998).

Los ensayos celulares son utilizados rutinariamente en toxicología como etapas obligadas en el largo proceso de validación de fármacos para poner en evidencia actividades biológicas de interés y efectos secundarios no deseables. Igualmente, resultan fundamentales para elucidar el mecanismo de acción de moléculas con actividad biológica, y en particular de toxinas. A esta gran ventaja cabe añadir propiedades suplementarias de este tipo de ensayos tales como una alta sensibilidad, la posibilidad de multiplicar fácilmente el número de muestras examinadas, una relativa sencillez y la posibilidad de reducir el número de animales empleados en los bioensayos con animales. Por todo ello, es de esperar que dichos modelos sean en un futuro utilizados para la detección y cuantificación de toxinas marinas en programas de control sanitario.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

La detección y la cuantificación de toxinas es un elemento clave para la prevención de episodios tóxicos y para el diagnóstico de las intoxicaciones. Los métodos de detección existentes en la actualidad exhiben diferentes características, de manera que la elección de un método estará determinada por los objetivos a cumplir mediante su aplicación. Así, el nivel de especificidad, exactitud, precisión y sensibilidad de un método requerido para un programa de control sanitario podría ser sustancialmente menor que aquel potencialmente alcanzable en el caso de utilizar la tecnología más sofisticada y avanzada, otorgándose prioridad a propiedades tales como aplicabilidad, facilidad de uso, rapidez para generar resultados que permitan acciones preventivas, y fundamentalmente, capacidad del método para detectar todo el espectro de toxinas pertenecientes a un determinado grupo, de manera que se minimicen los riesgos para la salud pública.

Desde el punto de vista del control sanitario, es importante señalar que el simple hecho de utilizar métodos de detección adecuados no garantiza la utilidad de la información generada por los mismos. A la hora de obtener resultados analíticos de confianza, y que proporcionen información fiable sobre la toxicidad de una población de mariscos, cabe resaltar la tremenda importancia de los planes de muestreo, tanto en las áreas de producción de los bivalvos y como parte del programa de monitoreo, como en el control del producto final, de manera que el número y tamaño de las muestras sea representativo de la hetero-

geneidad de toxinas entre individuos y puntos de muestreo. Debe prestarse especial atención y cuidado a las condiciones de transporte y de almacenamiento de las muestras, para minimizar los efectos de la labilidad e inestabilidad de algunos grupos de toxinas.

Los ensayos *in vitro* de carácter funcional, esto es, ensayos de inhibición de fosfatasa, ensayos de receptor y ensayos celulares, se presentan sin duda como las herramientas analíticas más prometedoras para complementar o reemplazar en un futuro a los ensayos *in vivo* (bioensayos con ratón o rata), una vez que se hayan realizado estudios formales de validación siguiendo protocolos internacionalmente reconocidos. Si bien los inmunoensayos, por su carácter estructural, no parecen los más adecuados como primera línea de acción en el control sanitario, cobran importancia debido su elevada sensibilidad y a la facilidad para desarrollarlos en formatos sencillos de fácil aplicación en el campo, de manera que son instrumentos muy valiosos para obtener información *in situ* con gran rapidez, para la localización de toxinas en compartimentos celulares y en el diagnóstico de intoxicaciones mediante la detección de toxinas en fluidos biológicos.

Actualmente el principal escollo para la aplicación de ensayos *in vitro* en los programas de control sanitario es la escasa disponibilidad comercial de toxinas puras y de materiales contaminados de concentración certificada, hecho que dificulta los procesos de validación de los ensayos y su posterior implementación en los laboratorios de control. Asimismo, la carencia de patrones de la mayor parte de las ficotoxinas dificulta la realización de estudios toxicológicos robustos que permitan realizar una valoración de los riesgos para la salud pública de algunas de estas sustancias, especialmente de aquellas incluidas en el grupo DSP. Es por tanto prioritario que se establezcan programas dedicados a la obtención de patrones de las diferentes ficotoxinas, y que se desarrollen estudios inter-laboratorios para determinar las características de funcionamiento de los diferentes ensayos y así verificar su aplicabilidad para el control sanitario.

En cuanto a las regulaciones internacionales sobre límites y métodos para el control de ficotoxinas, es de esperar que en un futuro próximo, el análisis de datos epidemiológicos y la realización de estudios toxicológicos permita el establecimiento de límites aceptables internacionalmente. En el área de los

métodos de detección utilizables con fines regulatorios, es necesario que se establezcan los criterios de aceptabilidad de los mismos en términos de sensibilidad, precisión, exactitud y rango de sustancias detectables, de manera que puedan incorporarse nuevas técnicas. De esta manera se podrán incorporar nuevas metodologías, y los programas de control que contemplen métodos de detección diferentes, podrán ser aceptados por los países entre los que se realizan intercambios comerciales, en tanto que demuestren su equivalencia en cuanto a las características de funcionamiento y desde el punto de vista de protección de la Salud Pública.

Nuestro agradecimiento a Mercedes Vieytes, Javier Fernández, Ángeles Aguilera y Beatriz Reguera, por su valiosa ayuda en la elaboración de este capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acres, J. & J. Gray, 1978. Paralytic Shellfish Poisoning. Can. Med. Assoc. J. 119: 1195-1197.
- APHA, 1985. Method for *Ptychodiscus brevis* toxins. In Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th Edition. American Public Health Association, Washington D.C.: 64-80.
- Alfonso, A., M.C. Louzao, M.R. Vieytes & L.M. Botana, 1994. Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples. *Toxicon* 32: 1593-1598.
- Alfonso, A., M.R. Vieytes, A.M. Botana, X. Goenaga & L.M. Botana, 1993. Preparation of mixtures of paralytic shellfish toxin (PSP) standards from mussel hepatopancreas. *Fresen. J. Anal. Chem.* 345: 212-216.
- Amzil, Z., Y. Pouchus, J. Le Boterff, C. Roussakis, J. Verbist, C. Marcaillou-Le Baut & P. Masselin, 1992. Short time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30: 1419-1425.
- Amzil, Z., M.A. Quilliam, T. Hu & J.L.C. Wright, 1999. Winter accumulation of Paralytic Shellfish Toxins in digestive glands of mussels from Arcachon and Toulon (France) without detectable toxic plankton species revealed by interference in the mouse bioassay for lipophilic toxins. *Nat. Toxins* 7: 271-277.
- AOAC, 1995. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, sec 959.08. Chapter 35: 21-22.
- Aune, T., R. Sorby, T. Yasumoto, H. Ramstad & T. Landsverk, 2000. In HABTECH-2000. Workshop on Harmful Algal Blooms and Marine Biotxin Monitoring. Nelson (New Zealand), February 2000. Abstracts: 8.
- Aune, T., T. Yasumoto & E. Engeland, 1991. Light and electron microscopic studies on effects of marine algal toxins on freshly prepared hepatocytes. *J. Toxicol. Env. Health* 34: 1-9.
- Bagnis, R., M. Barsinas, C. Prieur, A. Pompom, E. Chungue & A.M. Legrand, 1987. The use of the mosquito bioassay for determining the toxicity to man of ciguateric fish. *Biol. Bull.* 172: 137-143.
- Bagnis, R., E. Chanteau, E. Chungue, J.H. Drollet, I. Lechat, A.M. Legrand, A. Pompom, C. Prieur, J. Roux & C. Tetaria, 1985. Comparison of the cat bioassay, the mouse bioassay and the mosquito bioassay to detect ciguatoxicity in fish. In Gabrei, C. & B. Salvat (eds.), Proc. V Int. Coral Reef Cong., Tahiti: 491-496.
- 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.
- Blanco, J., M.L. Fernández, J. Mariño, B. Reguera, A. Míguez, J. Maneiro, E. Cacho & A. Martínez, 1995. From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Baut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris: 777-782.
- Boland, M.P., M.A. Smillie, D.Z.X. Chen & C.F.B. Holmes, 1993. A unified bioscreen for the detection of diarrhetic shellfish toxins and microcystins in marine and freshwater environments. *Toxicon* 31: 1393-1405.
- Burk, C., E. Usleber, R. Dietrich & E. Martbauer, 1995. Production and characterization of antibodies against neosaxitoxin utilizing novel immunogen synthesis procedure. *Food Agr. Immunol.* 7: 315-322.
- Cacho, E., 1993. Zinc, cadmio y cobre en ostras de distintas procedencias. Interferencias en la determinación de PSP por bioensayo. In Mariño, J. & J. Maneiro (eds.), Actas de la III Reunión Ibérica sobre fitoplancton tóxico y biotoxinas. Ediciones de la Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura (Xunta de Galicia), Santiago de Compostela: 79-82.
- Carmichael, W., 1997. The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.* 27: 211-256.
- Carmody, E.P., K.J. James & S.S. Kelly, 1995. Diarrhetic shellfish poisoning: evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays methods for dinophysistoxin-2 determination. *J. AOAC Int.* 78: 1403-1408.
- Carmody, E.P., K.J. James & S.S. Kelly, 1996. Dinophysistoxin-2: the predominant diarrhetic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon* 34: 351-359.
- Caterall, W., 1975. Cooperative activation of action potential Na^+ ionophore by neurotoxins. *P. Natl. Acad. Sci. USA:* 1782-1786.
- Ciminiello, P., E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, R. Poletti, M. Satake, R. Viviani & T. Yasumoto, 1997. Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35: 177-183.
- Ciminiello, P., E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, R. Poletti & R. Viviani, 1998. Isolation of Adriatoxin, a new analog of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett.* 39: 8897-8900.

- Ciminiello, P., E. Fattorusso, M. Forino, S. Magno, R. Poletti & R. Viviani, 1999. Isolation of 45-OH hydroxyessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37: 689-693.
- Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508.
- Cohen, P., C.F.B. Holmes & Y. Tsukitani, 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15: 98-102.
- Chen, D.Z.X., M.P. Boland, M.A. Smillie, H. Klix, K. Ptak, R.J. Anderson & C.F.B. Holmes, 1993. Identification of protein-phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon* 31: 1407-1414.
- Chin, J.D., M.A. Quilliam, J.M. Fremy, S.K. Mohatrapa & H.M. Sikorska, 1995. Screening for okadaic acid by immunoassay. *J. AOAC Int.* 78: 508-513.
- Chu, F.S. & T.S.L. Fan, 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J. AOAC Int.* 68: 13-16.
- Chu, F.S., X. Huang & S. Hall, 1992. Production and characterization of antibodies against neosaxitoxin. *J. AOAC Int.* 75: 341-345.
- Dahl, E., A. Rogstad, T. Aune, V. Hormazábal & B. Underdal, 1995. Toxicity of mussels related to occurrence of *Dinophysis* species. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Baut (eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, París: 783-788.
- Dahl, E. & M. Yndestad, 1985. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis* spp. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 495-500.
- Daiguji, M., M. Satake, K.J. James, A. Bishop, L. Mackenzie, H. Naoki & T. Yasumoto, 1998. Structures of new pectenotoxin analogues, pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and Greenshell mussels. *Chem. Lett.*: 653-654.
- Davio, S.R. & P.A. Fontelo, 1984. A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. *Anal. Biochem.* 141: 199-204.
- Davio, S.R., J.F. Hewetson & J.E. Beheler, 1985. Progress towards development of monoclonal antibodies to saxitoxin: antigen preparation and antibody detection. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 343-348.
- Dickey, R.W., H.R. Granade & F.D. McClure, 1994. Evaluation of a solid-phase immunobead assay for the detection of ciguatera related biotoxins in Caribbean finfish. *Mem. Qd. Mus.* 34: 481-488.
- Diario Oficial de la Comunidad Europea 86/609/CEE. NºL 38/28.
- Diogène, J., P. Dubreuil, P. Breittmayer & S. Puiseaux-Dao, 1994. Cytotoxic quantification of maitotoxin-like activity from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Toxicol. In Vitro* 8: 37-45.
- Diogène, J., V. Fessard, A. Dubreuil & S. Puiseaux-Dao, 1995. Comparative studies of the actin cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid. *Toxicol. In Vitro* 9: 1-10.
- Doucette, G.J., M.M. Logan, J.S. Ramsdell & F.M. Van Dolah, 1997. Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins. *Toxicon* 35: 625-636.
- Doucette, G.J., C.L. Powell, E.U. Do, C.Y. Byon, F. Cleves & S.G. McClain, 2000. Evaluation of 11-3H-tetrodotoxin use in a heterologous receptor binding assay for PSP toxins. *Toxicon* 38: 1465-1474.
- Draisci, R., L. Lucentini, L. Giannetti, P. Boria, K.J. James, A. Furey, M. Gillman & S.S. Kelly, 1998. Determination of diarrhetic toxins in mussels by microliquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 81(2): 441-447.
- Draisci, R., L. Lucentini, L. Giannetti, P. Boria & R. Poletti, 1996. First report of Pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34: 923-925.
- Draisci, R., L. Palleschi, L. Giannetti, L. Lucentini; K.J. James, A.G. Bishop, M. Satake & T. Yasumoto, 1999. New approach to the direct detection of known and new diarrhetic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 847: 213-221.
- FAO/WHO, 1995. Application of risk analysis to food standard issues. Report of the joint FAO/WHO Expert consultation. WHO, Geneva.
- Fernández, M.L., A. Míguez, E. Cacho & A. Martínez, 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon* 34: 381-387.
- Fernández, M.L., B. Reguera, I. Ramilo & A. Martínez, 2000. Toxinología y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Bajas Gallegas. In VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Congresos y Jornadas Nº 55/00, Junta de Andalucía, Sevilla: 127-137.
- Fernández, M.L., B. Reguera, I. Ramilo & A. Martínez, 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In Hallegraef, G.M., S.I. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), *Harmful Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 360-363.
- Fernández-Sánchez, M.T., V. Zitko, S. Gascón & A. Novelli, 1991. The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for cultured cerebellar neurons. *Life Sci.* 49: 157-162.
- Fernández-Sánchez, M.T., V. Zitko, S. Gascón, A. Torreblanca & A. Novelli, 1993. Neurotoxic effect of okadaic acid, a seafood related toxin, on cultured cerebellar neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 679: 260-269.
- Fessard, V., J. Diogène, A. Dubreuil, J.P. Quod, M. Durand Clement, C. Legay & S. Puiseaux-Dao. 1994. Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid

- and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts. *Nat. Toxins* 2: 322-328.
- Fontal, O.I., M.R. Vieytes, J.M.V. Baptista de Sousa, M.C. Louzao & L.M. Botana, 1999. A fluorescent microplate assay for microcystin-LR. *Anal. Biochem.* 269: 289-296.
- Fujiki, H. & M. Suganuma, 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein-phosphatases 1 and 2A. The okadaic acid class of compounds. *Adv. Cancer Res.* 61: 143-194.
- Fujiki, H., M. Suganuma, S. Nishiwaki, S. Yoshizawa, J. Yatsunami, R. Matsushima, H. Furuya, S. Okabe, S. Matsunaga & T. Sugimura, 1992. Specific mechanisms aspects of animal tumor promoters: the okadaic acid pathway. In D'Amato, R., T.J. Slaga, W. Farland & C. Henry (eds.), *Relevance of animal studies to the evaluation of human cancer risk*. John Wiley & Sons Inc., New York: 337-350.
- Fujiki, H., M. Suganuma, H. Suguri, S. Yoshizawa, K. Takagi, N. Uda, K. Wakamatsu, K. Yamada, M. Murata, T. Yasumoto & T. Sugimura, 1988. Diarrhetic Shellfish Toxin, Dinophysistoxin-1 is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 1089-1093.
- Gago-Martínez, A., J.A. Rodríguez Vazquez, P. Thibault & M. Quilliam, 1996. Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat. Toxins* 4 (2): 72-79.
- Gallacher, S. & T.H. Birkbeck, 1992. A tissue culture assay for direct detection of sodium channel blocking toxins in bacterial culture supernates. *FEMS Microbiol. Lett.* 92: 101-108.
- García, A., M. Fernández-Sánchez, M. Reyero, J. Franco, K. Haya, J. Martín, V. Zitco, C. Salgado, F. Arévalo, M. Bermúdez, M.L. Fernández & A. Míguez, 1998. Detection of PSP, DSP and ASP toxins by neuronal bioassay; comparison with HPLC and mouse bioassay. In Reguera B., J. Blanco, M. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 239-240.
- Hannah, D. J., D.G. Till, T. Deverall, P.D. Jones & J.M. Fry, 1995. Extraction of lipid-soluble marine biotoxins. *J. AOAC Int.* 78: 480-483.
- Hessel, D.W., B.W. Halstead & N.H. Peckham, 1960. Marine Biotoxins. I. Ciguatera poison: some biological and chemical aspects. *Ann. NY Acad. Sci.* 90: 788-797.
- Holmes, C.F.B., 1991. Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon* 29: 469-477.
- Honkanen R.E., D.E. Mowdy & R.W. Dickey, 1996. Detection of DSP toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, in shellfish by serine/threonine protein-phosphatase assay. *J. AOAC Int.* 79: 1336-1343.
- Hu, T., J.M. Curtis, J.A. Walter, J.L. McLachlan & J.L.C. Wright, 1995b. Two new water soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Lett.* 36: 9273-9276.
- Hu, T., J.M. Curtis, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1995a. Identification of DTX4, a new water soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Chem. Commun.* 1995: 597-599.
- Hu, T., J. Doyle, D. Jackson, J. Marr, E. Nixon, S. Pleasance, M.A. Quilliam, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1992. Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *Chem. Commun.* 54: 39-41.
- Irwin, N., 1970. In *Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish*, 4th edition. American Public Health Association Inc., Washington DC: 61-65.
- Ishida, H., A. Nozawa, K. Totoribe, N. Muramatsu, H. Nukaya, K. Tsuji, K. Yamaguchi, T. Yasumoto, H. Kaspar & N. Berkett, 1995. Brevetoxin B1, a new polyether marine toxin from the New Zealand Shellfish *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Lett.* 36: 725-728.
- James, K.J., A.G. Bishop, R. Draisci, L. Pallechi, C. Marchiafava, E. Ferretti, M. Satake & T. Yasumoto, 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J. Chromatogr. A* 844: 53-65.
- James, K.J., E.P. Carmody, M. Gillman, S.S. Kelly, R. Draisci, L. Lucentini & L. Giannetti, 1997. Identification of a new diarrhetic toxin in shellfish using liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometry detection. *Toxicon* 35: 973-978.
- Jellett, J., L. Marks, J. Stewart, M. Dorey, W. Watson-Wright & J. Lawrence, 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated end point determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon* 30: 1143-1156.
- Jellett, J., J. Stewart & M. Laycock, 1995. Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay. *Toxicol. In Vitro* 9: 57-65.
- Jellett, J., C. Wood, E. Belland & L. Doucette, 1998. The MIST TM shippable cell bioassay kits for PSP: an alternative to the mouse bioassay. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 558.
- Kat, M., 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In Taylor D. & H.H. Seliger (eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, Amsterdam: 215-220.
- Kat, M. 1983. Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Antonie V. Leeuwenhoek* 49: 417-427.
- Kodama, M., T. Ogata, S. Sakamoto, S. Sato, T. Honda & T. Miwatami, 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 28: 707-714.

- Kogure, K., M. Tamplin, U. Simidu & R. Colwell, 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon* 26: 191-197.
- Labrousse, P.H., S. Pauillac, A.M. Legrand & S. Avrameas, 1992. Utilisation de larves de dipteres pour la detection de poissons ciguatoxique. *B. Soc. Pathol. Exot.* 85: 529.
- Lawrence, J.E., A.G. Bauder, M.A. Quilliam & A.D. Cembella, 1998. *Prorocentrum lima*: a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 78-79.
- Lawrence, J.E., J. Grant, M.A. Quilliam, A.G. Bauder & A.D. Cembella, 2000. Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 147-154.
- Laycock, M.V., J.F. Jellett, E.R. Belland, P.C. Bishop, B.L. Theriault, A.L., Russell-Tattrie, M.A. Quilliam, A.D. Cembella & C.R. Richards, 2001. MIST Alert™: a rapid assay for paralytic shellfish poisoning toxins. In Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), *Harmful Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 254-256.
- Le Baut, C., B. Bardin, M. Bardouil, M. Bohec, P. Masselin & P. Truquet, 1990. Etude de la decontamination de moules toxiques. Rapport IFREMER-DERO 90-02 MR, 21pp.
- Lee, J.S., T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard & T. Yasumoto, 1989a. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J. Appl. Phycol.* 1: 147-152.
- Lee, J.S., M. Murata & T. Yasumoto, 1989b. Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. In Natori S., K. Hashimoto & T. Ueno (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam: 327-334.
- Lee, J.S., K. Tangan, E. Dahl, P. Hovgaard & T. Yasumoto, 1988. Diarrhetic shellfish toxins in Norwegian mussels. *Nippon Suisan Gakk.* 54: 1953-1957.
- Levine, L., H. Fujiki, K. Yamada, M. Ojika, H.B. Gjika & H. Van Vanakis, 1988. Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon* 26: 1123-1128.
- Lewis, R.J., 1987. Ciguatera (fish poisoning) with special reference to cats. *Veterin. Clin. Toxicol.* 103: 59-61.
- Lewis, R.J., 1995. Detection of Ciguatoxins and related benthic Dinoflagellate toxins: *in vivo* and *in vitro* methods. In Hallegraeff G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO: 135-161.
- Lewis, R.J., A.W. Wong Hoy & M. Sellin, 1993. Ciguatera and manitol: *in vitro* and *in vivo* assessment in mice. *Toxicon* 31: 1039-1050.
- Louzao, M.C., A. Alfonso, A.M. Botana, M.R. Vieytes, A. Boenke & L.M. Botana, 1994a. Study of stability of gonyautoxins in acidic solution. *Fresen. J. Anal. Chem.* 349: 465-468.
- Louzao, M.C., A. Alfonso, A.M. Botana, X. Goenaga, M.R. Vieytes & L.M. Botana, 1994b. Effect of lyophilization on the stability of gonyautoxins obtained from contaminated mussels. *Toxicon* 32: 807-817.
- Louzao, M.C., M.R. Vieytes, J.M.V. Baptista de Sousa, F. Leira & L.M. Botana, en prensa. A fluorimetric method based on changes in membrana potential for screening paralytic shellfish toxins in mussels. *Anal. Biochem.*
- Luu, H.A., D.Z.X. Chen, J. Magoon, J. Worms, J. Smith & C.F.B. Holmes, 1993. Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. *Toxicon* 31: 75-83.
- MacKenzie, L., P. Truman, T. Yasumoto, J. Adamson, D. Mountfort & D. White, 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 74-77.
- Manger, R., L. Leja, S. Lee, J. Hungerford, Y. Hokama, R. Dickey, R. Granade, R. Lewis, T. Yasumoto & M. Wekell, 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assay of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins and seafood extracts. *J. AOAC Int.* 78: 521-527.
- Marcaillou-Le Baut, C. & P. Masselin, 1990. Recent data on diarrhetic shellfish poisoning in France. In Granèli E., B. Sundström, L. Edler & D.M. Anderson (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York: 487-492.
- Marr, J.C., T. Hu, S. Pleasance, M.A. Quilliam & J.L.C. Wright, 1992. Detection of new 7-O-acyl-derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 30 (12): 1621-1630.
- McCulloch, A., R. Boyd, S. Freitas, R. Foxall, W. Jamieson, M. Laycock, M.A. Quilliam & J.F.C. Wright, 1989. Zinc from oyster tissue as causative factor in mouse deaths in official bioassay for paralytic shellfish poison. *J. AOAC Int.* 72: 384-386
- McFarren, E.F., 1959. Report on collaborative studies of the bioassay for paralytic shellfish poison. *J. AOAC Int.* 41: 168-177.
- McFarren, E.F., H. Tanabe, F.J. Silva, W.B. Wilson, J.E. Campbell & K.L. Lewis, 1965. The occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams, and *Gymnodinium breve* cultures. *Toxicon* 3: 111-123.
- Míguez, A., M.L. Fernández, E. Cacho & A. Martínez, 1998. Mouse survival time as a DSP toxicity criterion. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 239-240.
- Mounfort, D.O., G. Kennedy, I. Garthwaite, M.A. Quilliam,

- P. Truman & D. Hannah, 1999. Evaluation of the phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels. *Toxicon* 37: 909-922.
- Mounfort, D.O., T. Suzuki & P. Truman, 2001. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP contaminated mussels. *Toxicon* 39: 383-390.
- Murata, M., M. Kumagai, J.S. Lee & T. Yasumoto, 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28: 5869-5872.
- Nagashima, Y., T. Noguchi, M. Tanaka & K. Hashimoto, 1991. Thermal degradation of paralytic shellfish poison. *J. Food Sci.* 56: 1572-1575.
- Norte, M., A. Padilla, J.J. Fernández & M.L. Souto, 1994. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima*. *Tetrahedron* 50(30): 9175-9180.
- Novelli, A., J. Kispert, M.T. Fernández-Sánchez, A. Torreblanca & V. Zitco, 1992. Domoic acid-containing toxic mussels produce neurotoxicity in neuronal cultures through a synergism between excitatory amino acids. *Brain Res.* 577: 41-48.
- Ogino, H., M. Kumagai & T. Yasumoto, 1997. Toxicologic evaluation of Yessotoxin. *Nat. Toxins* 5: 255-259.
- Oshima, Y., S.I. Blackburn, G.M. Hallegraef, 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.* 116: 471-476.
- Prakash, A., J.C. Medcof, A.D. Tennat, 1971. Paralytic shellfish poisoning in Eastern Canada. *B. Fish. Res. Board Can.* 177: 1-87.
- Quilliam, M., G. Eaglesham, G. Hallegraef, J. Quaine, J. Curtis, D. Richard & P. Nuñez, 2000. Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales. In IX International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania, February 2000. Abstracts: 48.
- Rosa, de la L.A., A. Alfonso, N. Vilariño, M.R. Vieytes & L.M. Botana, 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 61: 827-833.
- Satake, M., T. Ichimura, K. Sekiguchi, S. Yoshimatsu & Y. Oshima, 1999. Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins* 7: 147-150.
- Satake, M., L. MacKenzie & T. Yasumoto, 1997b. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5: 164-167.
- Satake, M., K. Ofuji, K. James, A. Furey & T. Yasumoto, 1998a. New toxic event caused by Irish mussels. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 468-469.
- Satake, M., K. Ofuji, H. Naoki, K. James, A. Furey, T. Mc Mahon, J. Silke & T. Yasumoto, 1998b. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.
- Satake, M., K. Terasawa, Y. Kadowaki & T. Yasumoto, 1996. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogues from toxic scallops. *Tetrahedron Lett.* 37: 5955-5958.
- Satake, M., A. Tubaro, J.S. Lee & T. Yasumoto, 1997a. Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Toxins* 5: 107-110.
- Scheuer, P.J., W. Takahashi, J. Tsutsumi & T. Yoshida, 1967. Ciguatoxin, isolation and chemical nature. *Science* 155: 1267-1268.
- Shantz, E.J., E.F. McFarren, M.L. Shaffer & K.H. Lewie, 1958. Purified poison for bioassay standardization. *J. AOAC Int.* 41: 160-168.
- Shestowsky, W.S., C.F.B. Holmes, T. Hu, J. Marr, J.L.C. Wright, J. Chin & H. Sikorski, 1993. An anti-okadaic acid-anti-idiotypic antibody bearing an internal image of okadaic acid inhibits protein phosphatase PP1 and PP2A catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 193: 302-310.
- Shestowsky, W.S., M.A. Quilliam & H.M. Sikorski, 1992. An idiotypic-anti idiotypic competitive immunoassay for quantitation of okadaic acid. *Toxicon* 30: 1441-1448.
- Sierralta, J., M. Fill & B.A. Suárez-Isla, 1996. Functionally heterogeneous ryanodine receptors in avian cerebellum. *J. Biol. Chem.* 271: 17028-17034.
- Simon, J.F. & J.P. Vernoux, 1994. Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and parantrophenyl phosphate. *Nat. Toxins* 2: 293-301
- Sommer, H. & K.F. Meyer, 1937. Paralytic Shellfish Poisoning. *Arch. Pathol.* 24: 560-598.
- Steidenger, K.A., 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagellates biology and ecology. In Round, F.E. & D. J. Chapman (eds), *Progress in Phycological Research*. Elsevier, Amsterdam: 147-188.
- Suganuma, M., H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada & T. Sugimura, 1988. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1768-1771.
- Sullivan, J.J., 1993. Methods of Analysis for Algal Toxins: Dinoflagellate and Diatom Toxins. In Falconer, I.R. (ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London: 29-48.
- Suzuki, T., T. Mitsuya, M. Iami & M. Yamasaki, 1997. DSP toxin contents in *Dinophysis fortii* and scallops collected at Mutsu Bay, Japan. *J. Appl. Phycol.* 8: 509-515.
- Suzuki, T., T. Mitsuya, M. Matsubara & M. Yamasaki, 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. *J. Chromatogr. A.* 815: 155-160.
- Suzuki, T., H. Ota & M. Yamasaki, 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.
- Takai, A. & G. Mieskes, 1991. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenyl phosphate phosphatase activity on protein phosphatases. *Biochem. J.* 275: 233-239.
- Terao, K., E. Ito, M. Oarada, M. Murata & T. Yasumoto, 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28: 1095-1104.
- Terao, K., E. Ito, M. Ohkusu & T. Yasumoto, 1993. A comparative study of the effects of DSP toxins on mice and rats. In Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 581-586.
- Terao, K., E. Ito, T. Yanagi & T. Yasumoto, 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin I and pectenotoxin I. *Toxicon* 24: 1141-1151.
- Tubaro, A., C. Florio, E. Luxich, S. Sosa, R. Della Loggia & T. Yasumoto, 1996. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon* 34: 743-752.
- Tubaro, A., L. Sidari, R. Della Loggia & T. Yasumoto, 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC UNESCO: 470-472.
- Usagawa, T., M. Nishimura, Y. Itoh, T. Uda & T. Yasumoto, 1989. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halicondria okadae*. *Toxicon* 27: 1323-1330.
- Usleber, E., E. Schneider & G. Terplan, 1991. Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 275-277.
- Usleber, E., E. Schneider, G. Terplan & M.V. Laycock, 1995. Two formats of enzyme immunoassay for the detection of saxitoxin and other paralytic shellfish poisoning toxins. *Food Addit. Contam.* 12: 405-413.
- Vale, P. & A. Sampayo, 1996. DTX-2 in Portuguese bivalves. In Yasumoto T., Y. Oshima Y & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 539-542.
- Vale, P. & M.A. Sampayo, 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon* 37: 1109-1121.
- Van Dolah, F. M., E.L. Finley, B.L. Haynes, G. Doucette, P.D. Moeller & J. Ramsdell, 1994. Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins. *Nat. Toxins* 2: 189-196.
- Vélez, P., J. Sierralta, C. Alcayaga, M. Fonseca, H. Loyola, D.C. Johns, G.F. Tomaselli, E. Marban & B.A. Suárez-Isla, 2001. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon* 39: 929-935.
- Vernoux, J.P., N. Lahlou, L.P.H. Magra & J.B. Greaux, 1985. Chick feeding test: a simple system to detect ciguatoxin. *Acta Trop.* 42: 235-240.
- Vieites, J.M., F. Leira, L.M. Botana & M.R. Vieytes, 1996. Determination of DSP toxins: comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay. *Arch. Toxicol.* 70: 440-443
- Vieytes, M.R., A.G. Cabado, A. Alfonso, M.C. Louzao, A.M. Botana & L. Botana, 1993. Solid-phase radio-receptor assay for paralytic shellfish toxins. *Anal. Biochem.* 211: 87-93
- Vieytes, M.R., O. Fontal, F. Leira, J.M. Baptista de Sousa & L.M. Botana, 1997. A fluorescent microplate assay for Diarrhetic Shellfish Toxins. *Anal. Biochem.* 248: 258-264.
- Yasumoto, T. & M. Murata, 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909.
- Yasumoto, T., M. Murata, J. Lee & K. Torigoe, 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In Natori S., K. Hashimoto & T. Ueno (eds). In *Mycotoxins and Phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam: 375-382.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, K. Matsumoto & J. Clardy, 1984 a. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In Ragelis E.P (ed.), *Seafood Toxins*. ACS Symposium series 262. American Chemical Society, Washington D.C: 207-214.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, W. Sugawara, Y. Fukuyo, H. Oguri, T. Igarishi & N. Fujita, 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jp. Soc. Sci. Fish.* 46: 1405-1411.
- 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
- Yasumoto, T., U. Raj & R. Bagnis, 1984 b. Seafood Poisonings in Tropical Regions. Symposium on Seafood Toxins in Tropical Regions. Kagoshima: 1-25.
- Yasumoto, T. & A. Takizawa, 1997. Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61(10): 1775-1777.
- Zhao, J., G. Lembeye, G. Cenci, B. Wall & T. Yasumoto, 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In Smayda T.J. & Y. Shimizu. (eds), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 587-592.

ANEXO I

METODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO PARALIZANTE DE MARISCOS - PSP (AOAC, 1995)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente ensayo es aplicable a los análisis de toxinas PSP en moluscos y tiene carácter cuantitativo, permitiendo la cuantificación de las toxinas en las muestras analizadas. El límite de detección depende de la cepa de ratones utilizada, oscilando usualmente entre 32 y 48 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne.

2. PRINCIPIO

El bioensayo en ratón permite la determinación de la toxicidad global producida por las toxinas PSP (PST) presentes en la muestra. El bioensayo se basa en el efecto tóxico causado por un extracto ácido de la muestra analítica, inoculado intraperitonealmente en ratones albinos de aproximadamente 20 g de peso. Las PST se extraen en caliente mediante una maceración acuosa en medio ácido de toda la carne del bivalvo previamente triturada. Posteriormente se inyecta 1 ml de extracto a cada uno de 3 ratones y se registra el tiempo de muerte (T_m). Con los datos del peso del ratón, dilución del extracto y tiempo transcurrido hasta su muerte se calcula la toxicidad en unidades ratón (UR). Se define la UR como la cantidad de toxina que produce la muerte de un ratón de 20 g en 15 min. Con ayuda de las tablas de Sommer y del factor de conversión (FC) se transforman en μg de equivalentes de STX por 100 g de molusco ($\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne).

Precaución: Utilizar guantes de goma cuando se manipulen materiales que puedan contener PST.

3. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tamiz de acero inoxidable
- Papel de filtro o secante
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades
- Probetas de 100 y 250 ml
- Pipetas de diferentes capacidades
- Espátulas
- Varillas de vidrio
- Tubos de vidrio con capacidad mínima de 10 ml
- Triturador-Homogeneizador
- Balanzas
- Placa calefactora

- Centrífuga
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Papel indicador de pH
- Cronómetro

4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Utilizar ratones de un peso preferentemente de 19-21 g procedentes de una colonia controlada. Si el peso es menor o mayor de 20 g, aplicar el factor de corrección correspondiente para obtener las UR corregidas (URC). No utilizar ratones con un peso superior a 23 g. No reutilizar los ratones.

5. REACTIVOS

- Solución patrón estándar de STX (La FDA de EE UU suministra sin costes patrón de STX de concentración $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- Solución patrón de trabajo de STX de $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$: en el caso de utilizar el patrón de la FDA, diluir 1 ml de la solución patrón estándar en 100 ml de agua destilada. Esta solución es estable durante varias semanas a 3-4°C
- Ácido clorhídrico (ClH) 0.1 N
- Ácido clorhídrico (ClH) 5 N
- Agua acidulada con ClH (pH aprox. 3)
- Hidróxido sódico (NaOH) 0.1 N

6. MÉTODO DE ENSAYO

6.1. Estandarización del bioensayo: cálculo del factor de conversión (FC)

Diluir alícuotas de 10 ml de la solución patrón de trabajo de $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ con 10, 15, 20, 25 y 30 ml de agua acidulada. Inocular intraperitonealmente dosis de 1 ml de las diferentes diluciones hasta encontrar aquélla que inyectada a unos pocos ratones produzca una mediana de T_m entre 5 y 7 min. El pH de las diluciones deberá estar comprendido entre 2 y 4, y no será superior a 4.5. Adicionalmente, ensayar diluciones que se diferencien en 1 ml de agua destilada de la dilución que proporcionó un T_m entre 5 y 7 min. Ej.: si 10 ml de la solución de trabajo diluidos con 25 ml de agua proporcionan T_m de 5-7 min, ensayar las diluciones 10+24 y 10+26. Inocular grupos de 10 ratones con cada una de las 2, o preferiblemente 3 diluciones que produzcan una mediana de T_m entre 5 y 7 min. Inocular dosis de 1 ml a cada ratón y determinar el T_m como el tiempo transcurrido desde la finalización de la inoculación hasta la última respiración (bo-

queada) del ratón. Repetir el ensayo uno o dos días después, utilizando las diluciones anteriormente preparadas, incluyendo las que difieren en ± 1 ml de agua destilada. Posteriormente repetir el ensayo completo con diluciones preparadas a partir de una nueva solución patrón de trabajo. Calcular la mediana del T_m para cada grupo de 10 ratones utilizados con cada dilución. Si todos los grupos de 10 ratones inoculados con cualquier dilución dieran medianas de $T_m < 5$ ó > 7 min., descartar los resultados de esta dilución en los cálculos posteriores. Por otra parte, si cualquiera de los grupos de 10 ratones inoculados con una dilución dieran una mediana de T_m comprendido entre 5 y 7 min., incluir todos los grupos de 10 ratones utilizados en esa dilución, aunque alguno de los T_m pueda ser < 5 ó > 7 min. A partir de la mediana del T_m de cada grupo de 10 ratones para cada una de las diluciones seleccionadas, determinar el número de UR \cdot ml⁻¹ utilizando la tabla de Sommer que se adjunta en este Anexo. Dividir los μ g de STX \cdot 1 ml⁻¹ calculados por las UR \cdot 1 ml⁻¹ para obtener el FC, que expresa los μ g equivalentes de STX para una UR. Calcular el promedio de los valores FC individuales, y usar este promedio como punto de referencia para controlar los análisis rutinarios.

6.2. Verificación del factor de conversión en los análisis rutinarios

Comprobar periódicamente el FC: Si los análisis se realizan con una frecuencia inferior a una vez por semana, determinar el valor del FC cada día que se lleven a cabo los análisis, inoculando para ello 5 ratones con la solución patrón de trabajo apropiada. Si la frecuencia analítica es de varios días a la semana, únicamente se hará un control semanal con la dilución del patrón que proporcione una mediana de T_m comprendida entre 5 y 7 min. El valor del FC así determinado deberá contrastarse con el valor FC promedio y su diferencia con él no deberá ser superior al ± 20 % del valor FC promedio. Si no fuera así, completar el grupo de 10 ratones añadiendo 5 ratones a los 5 ya inoculados, e inocular un segundo grupo de 10 ratones con la misma dilución del patrón. Promediar el valor del FC determinado para el segundo grupo con el valor del FC del primer grupo. Tomar el valor resultante como nuevo valor de FC. Una variación > 20 % representa un cambio significativo en la respuesta de los ratones al veneno, o en la técnica analítica. Cambios de este tipo requieren un cambio en el valor del FC. Los controles repetidos del valor FC generalmente proporcionan resulta-

dos consistentes dentro del rango ± 20 %. Si se encontraran con frecuencia variaciones más amplias, debería investigarse la posibilidad de que existan variables no controladas o no reconocidas antes de proceder a los análisis en rutina.

6.3. Preparación de la muestra

Moluscos: Limpiar el exterior de los moluscos con agua dulce. Abrirlos cortando los músculos aductores. Enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arena y otras substancias extrañas. Separar la carne de la concha seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela. No utilizar calor ni anestésicos para abrir las conchas y tener cuidado de no cortar o dañar el cuerpo de los moluscos en esta etapa. A continuación acondicionar las carnes para permitir su drenado durante 5 min. Descartar el drenado. Recoger 100-150 g de carne y proceder a su homogeneización.

Marisco en conserva: En este caso, en la preparación de la muestra se ha de conseguir la homogeneización de todo el contenido del envase (carne y líquido de gobierno). Para ello, triturar la carne, mezclar con el líquido de cobertura y homogeneizar en forma semejante a la descrita anteriormente. En el caso de conservas con envases de gran capacidad, separar la carne y drenar durante unos minutos, recolectando todo el líquido de gobierno. Determinar el peso de la carne y el volumen de líquido, a fin de poder recombinar posteriormente porciones de cada fracción en cantidades proporcionales. Triturar una porción de la carne con una cantidad proporcional de líquido de gobierno. Homogeneizar como se ha descrito anteriormente.

6.4. Extracción

Pesar 100 g del homogeneizado en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 100 ml de CIH 0.1 N y agitar vigorosamente. Comprobar el pH (debe estar entre 2 y 4, preferiblemente 3). Si fuese necesario, ajustar el pH como se indicará posteriormente. Calentar el homogeneizado en placa calefactora, manteniendo en ebullición suave durante 5 min. Enfriar en baño de agua fría. Transferir el homogeneizado a una probeta graduada y enrasar hasta 200 ml. Ajustar el pH entre 2.0 y 4.0 (preferiblemente 3). Para disminuir el pH, añadir CIH 5N gota a gota y agitando; para aumentar el pH, añadir NaOH 0.1 N gota a gota y agitando continuamente para prevenir una alcalinización local y la consecuente

destrucción de la toxina. Mezclar convenientemente para homogeneizar de nuevo y dejar reposar el homogeneizado hasta que la porción líquida (sobrenadante) sea traslúcida y se pueda decantar libre de partículas sólidas lo suficientemente grandes como para atorar la aguja hipodérmica. Si fuera necesario (y preferiblemente como norma general), centrifugar el homogeneizado o el líquido sobrenadante durante 5 min a 3.000 rpm, o bien filtrar a través de papel. Sólo se necesita una pequeña cantidad de líquido sobrenadante para la realización del bioensayo.

6.5. Bioensayo del ratón

Inocular intraperitonealmente cada uno de los ratones utilizados en el ensayo con 1 ml del extracto ácido. Anotar el momento de la inoculación y observar los ratones cuidadosamente para estimar el *Tm* del ratón, que vendrá determinado por el último movimiento respiratorio (boqueada) del ratón. Utilizar un cronómetro para medir el *Tm*. Para una determinación inicial se puede usar un ratón, pero es preferible utilizar 2 ó 3. Si el *Tm* o la mediana del *Tm* de varios ratones es <5 min, diluir el extracto hasta obtener tiempos de muerte comprendidos entre 5 y 7 min. Si es necesario realizar grandes diluciones, ajustar el pH entre 2 y 4 adicionando gota a gota CIH 0.1 N. Inocular un mínimo de tres ratones con el extracto o dilución que produce tiempos de muerte entre 5 y 7 min. Si el *Tm* de uno o dos ratones inoculados con el extracto no diluido de la muestra es >7 min. (o hay supervivencia), debe inocularse un total de 3 ó más ratones para establecer la toxicidad de la muestra.

7. CÁLCULO DE LA TOXICIDAD

Determinar el *Tm* de cada uno de los ratones utilizados en el ensayo, incluyendo, en su caso, los supervivientes. Calcular las UR correspondientes utilizando la tabla de Sommer. Considerar que el *Tm* de los ratones supervivientes es >60 min o equivalente a 0.875 unidades ratón. Corregir las UR obtenidas para cada ratón multiplicando por el FC del peso de ese ratón obtenido en la tabla de corrección de peso que se adjunta. Después, calcular la mediana de las UR corregidas (URC) del grupo. Las URC se convierten en toxicidad PSP, expresada como $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne mediante la fórmula: $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1} = \text{URC} \times \text{FC} \times \text{factor de dilución} \times 200$

Un valor superior a $80 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ se considera peligroso y no apto para el consumo.

Tabla de Sommer con las relaciones entre tiempos de muerte y unidades ratón (UR) para PSP.

Tiempo de muerte (min y s)	Unidades ratón (UR)	Tiempo de muerte (min y s)	Unidades ratón (UR)
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3:00	3.70	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43		
15	3.31	10:00	1.11
20	3.19	30	1.09
25	3.08		
30	2.98	11:00	1.075
35	2.88	30	1.06
40	2.79		
45	2.71	12:00	1.05
50	2.63		
55	2.56	13	1.03
		14	1.015
4:00	2.50	15	1.000
05	2.44	16	0.99
10	2.38	17	0.98
15	2.32	18	0.972
20	2.26	19	0.965
25	2.21	20	0.96
30	2.16	21	0.954
35	2.12	22	0.948
40	2.08	23	0.942
45	2.04	24	0.937
50	2.00	25	0.934
55	1.96	30	0.917
		40	0.898
		60	0.875

Tabla de valores de corrección según el peso de los ratones

Peso ratón (g)	Unidades ratón (UR)
10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE VENENO DIARREICO DE LOS MARISCOS

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento es aplicable a los análisis de ácido okadaico (AO) y dinofisitoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), y yesotoxinas (YTXs) en moluscos bivalvos. El límite de detección es $0.8 \mu\text{g}$ de AO eq. $\cdot \text{g}^{-1}$ hepatopáncreas.

2. PRINCIPIO

El AO y derivados, las PTXs y las YTXs son sustancias polietéreas liposolubles extraíbles con acetona. El bioensayo en ratón de Yasumoto *et al.* (1978) permite su detección conjunta, proporcionando una única respuesta a todas las sustancias activas de la muestra. Este bioensayo se basa en el efecto tóxico agudo causado por un extracto acetónico de la muestra analítica, evaporado y redisoluto en una solución acuosa de Tween 60. Este extracto se inocula intraperitonealmente en ratones albinos de aprox. 20 g

de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del T_m de los ratones inoculados con 1 ml del extracto de Tween.

3. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tijeras
- Tamiz de acero inoxidable
- Papel de filtro o secante
- Homogeneizador eléctrico ó Ultraturax
- Balanzas
- Rotavapor
- Filtros de papel
- Baño de agua termostaticado
- Agitador magnético
- Matraces colectores adaptables al rotavapor
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Material diverso de uso en laboratorio

4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Swiss, preferentemente entre 19 y 21 g.

5. REACTIVOS

- Acetona P.A.
- Eter dietílico P.A.
- Agua destilada
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada

6. METODO DE ENSAYO

6.1. Preparación

Lavar los moluscos con agua dulce. Abrir los bivalvos con un cuchillo seccionando el músculo aductor, cuidando de no cortar o dañar el cuerpo. Enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arenas o sustancias extrañas. Disecar perfectamente los hepatopáncreas (HP), procurando eliminar todas las porciones del manto adheridas a éstos y depositarlos sobre un tamiz de acero inoxidable para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Posteriormente, colocar los HP en un papel de filtro y dejar secar. Homogeneizar aprox. 30 g de HP con ayuda del Ultraturax. En el caso de moluscos con HP de gran tamaño, se tomarán los HP procedentes de al menos 10-12 individuos.

6.2. Extracción

Pesar 25 g del homogeneizado de HP en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 50 ml de acetona y homogeneizar con Ultraturax o similar durante 2-3 min.. Dejar sedimentar la fase sólida.

Filtrar el sobrenadante a través de papel de filtro, recogiendo en un matraz colector adaptable al rotavapor. Repetir los mismo pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 ml de acetona en cada ocasión. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector.

Evaporar a sequedad el extracto acetónico en rotavapor, con el baño de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C (nunca superior a 45 °C). Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1%, previamente atemperada a 40 °C de tal forma que el volumen final de inóculo sea aproximadamente 5 ml. La relación peso/volumen a obtener será de aproximadamente 5 g de HP iniciales por ml de solución acuosa de Tween 60 al 1%.

6.3. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aprox. 20 g con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Anotar la hora de inoculación. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas. En el caso de observar en los ratones una sintomatología que pudiera indicar interferencias de biotoxinas PSP o ASP se seguirá el procedimiento alternativo que se expone al final del anexo.

7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones inyectados en un período menor o igual a 24 horas después de la inyección.

PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO PARA ELIMINAR INTERFERENCIAS CON TOXINAS PSP O ASP

En el caso de observar síntomas de PSP o ASP en los ratones, se seguirá el procedimiento de Yasumoto *et al.* (1984) que se describe a continuación. Los apartados 3, 4, 5 y 6.1 relativos a aparatos y material, animales de experimentación, reactivos y preparación de la muestra del protocolo anterior son de aplicación en el protocolo alternativo.

1. METODO DE ENSAYO

1.1. Extracción

Pesar 25 g del homogeneizado de HP en un vaso de precipitados previamente tarado. Añadir 50 ml de

acetona y homogeneizar con Ultraturax o similar durante 2-3 min. Dejar sedimentar la fase sólida. Filtrar el sobrenadante a través de papel de filtro, recogiendo en un matraz colector adaptable al rotavapor. Repetir los mismos pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 ml de acetona en cada ocasión. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector. Evaporar el extracto acetónico final en rotavapor, con el baño de agua a aprox. 40 °C (nunca > 45 °C). No es necesario evaporar totalmente el agua residual. Añadir al extracto residual un pequeño volumen de agua de manera que el volumen final de extracto sea aprox. 15 ml. Trasvasar el extracto a un embudo de decantación. Arrastrar los restos del residuo que pudieran permanecer en el matraz colector con 50 ml de éter dietílico y combinar este extracto etéreo con el extracto acuoso en el embudo de decantación. Agitar suavemente invirtiendo varias veces el embudo (evitar agitación vigorosa para prevenir la formación de emulsiones). Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases. Separar la fracción acuosa y reservar la fracción etérea. Extraer la fracción acuosa dos veces más con 50 ml de éter dietílico. Combinar las fracciones etéreas y realizar dos lavados adicionales del extracto etéreo con 15 ml de agua. Descartar las fracciones acuosas y evaporar el extracto etéreo a sequedad. Redisolver el residuo con una solución acuosa de Tween 60 al 1%, previamente atemperada a aprox. 40 °C de tal forma que el volumen final de inóculo sea 5 ml. La relación P/V a obtener será de 5 g de HP por cada ml de Tween 60 al 1%.

1.2. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aprox. 20 g de peso con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Anotar la hora de inoculación. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas.

2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones inyectados en un período menor o igual a 24 horas tras la inyección.

Nota: La sustitución del éter dietílico por diclorometano mejora la extractabilidad de las Yesotoxinas.

MÉTODO BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE ACIDO OKADAICO, DINOFISISTOXINAS, PECTENOTOXINAS, YESOTOXINAS Y AZASPIRÁCIDOS EN EL CUERPO ENTERO DE LOS MOLUSCOS

(Yasumoto et al., en prep.)

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente procedimiento es de aplicación a los análisis de Acido okadaico (AO), Dinofisistoxinas (DTXs), Pectenotoxinas (PTXs), Yesotoxinas (YTXs) y Azaspirácidos (AZAs) en moluscos bivalvos. El presente ensayo permite la determinación sobre el cuerpo entero de los moluscos de la presencia o ausencia de estas toxinas a los niveles establecidos en la Decisión 2002/225/CEE del 15 de Marzo de 2002.

2. PRINCIPIO

El AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs son sustancias bioactivas polietéreas producidas por diferentes especies de dinoflagelados. Todos estos compuestos son extraíbles con acetona, si bien la extracción cuantitativa de los AZAs requiere una segunda extracción con metanol. El presente ensayo está basado en el bioensayo en ratón de Yasumoto (1984), que ha sido modificado de manera que permita el análisis del cuerpo entero del molusco y la detección conjunta de las sustancias contempladas en la Decisión 2002/225/CEE a los niveles establecidos en la misma. El bioensayo en ratón se basa en el efecto tóxico agudo causado por un extracto acetónico/metanólico de la muestra analítica (homogeneizado de la carne de los moluscos) purificado a través de partición líquido/líquido y posteriormente evaporado y resuspendido en una solución acuosa de Tween 60 al 1 %. Este extracto es inoculado intraperitonealmente en ratones albinos de aproximadamente 20 g de peso. La determinación de la toxicidad se realiza en función del tiempo de muerte de los ratones inoculados con 1 ml del extracto de Tween.

3. REACTIVOS

- Acetona
- Metanol
- Solvente* para la partición líquido/líquido: éter dietílico ó acetato de etilo o diclorometano
- Butanol
- Agua destilada
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada

* Nota: El diclorometano y el acetato de etilo son equivalentes en lo que se refiere a extractabilidad de las toxinas reguladas en la Decisión 2002/225/CEE, de manera que AO, DTXs, PTXs, YTXs y AZAs son extraídas cuantitativamente con ambos solventes. Sin embargo, el uso en rutina del acetato de etilo puede presentar inconvenientes debido a la emulsión formada durante la partición con agua. El diclorometano no presenta este problema, si bien su elevada toxicidad y las regulaciones establecidas en algunos países contra el uso de solventes clorinados, pudieran dificultar su aplicación en rutina. La eficacia del éter dietílico en cuanto a la extracción de las YTXs no es tan alta como en el caso de la extracción de AO, DTXs, PTXs y AZAs (alrededor de un 50 % de las YTXs presentes pueden pasar a la fase acuosa). Sin embargo, debido a la alta sensibilidad del ratón a la presencia de YTXs, se puede considerar este solvente como adecuado para detectar la presencia de YTXs a concentraciones muy por debajo del límite establecido en la Decisión, y por tanto, puede ser utilizado con fines de control. Los tres solventes propuestos para la partición líquido/líquido pueden ser considerados equivalentes en términos de protección de la Salud Pública.

4. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tamiz de acero inoxidable.
- Homogeneizador eléctrico o Ultraturrax.
- Balanzas
- Filtros de papel
- Rotavapor
- Baño de agua termostaticado
- Matraces colectores adaptables al rotavapor de diferentes volúmenes
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Bomba de vacío regulable
- Matraces Erlenmeyer Kitasato
- Embudos de decantación
- Embudo Buchner o similar
- Material diverso de uso en laboratorio

5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Swiss, preferentemente de peso 20 ± 1 g.

6. MÉTODO DE ENSAYO

6.1. Preparación

Limpiar externamente los moluscos con agua dulce. Con ayuda de un cuchillo abrir los bivalvos

seccionando el músculo aductor, cuidando de no cortar o dañar el cuerpo de los bivalvos. Si fuera necesario, enjuagar el interior con agua dulce para eliminar arenas o sustancias extrañas. Separar la carne de la concha seccionando los músculos aductores y el tejido adherido a la charnela. Depositar la vianda en un tamiz de acero inoxidable y escurrirla el tiempo necesario para eliminar la mayor cantidad de agua. Recoger entre 100 y 150 g de vianda y proceder a su homogeneización.

6.2. Extracción

Pesar 100 g del homogeneizado de carne del molusco en un vaso de precipitados. Añadir 300 ml de acetona y homogeneizar durante 2 min. Filtrar a presión reducida y reservar el filtrado. Extraer el residuo con 300 ml de metanol, homogeneizando durante dos minutos. Filtrar este segundo extracto a presión reducida. Combinar los extractos acetónico y metanólico en un matraz colector adaptable a rotavapor, preferentemente de 2 litros. Añadir 20-25 ml butanol (nunca más de 50 ml) para prevenir la formación de espumas.

Evaporar hasta casi sequedad (la temperatura del baño de agua no debe exceder los 45°C) y transferir el residuo con 100 ml del solvente seleccionado para la partición a un embudo de decantación. Añadir al embudo 50 ml de agua y agitar suavemente invirtiendo varias veces el matraz (evitar agitación vigorosa). Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases. Reservar la fase orgánica y recoger la fase acuosa llevándola a otro embudo de decantación. Lavar la fase acuosa con 20 ml adicionales de solvente orgánico.

Dejar en reposo para separar las dos fases. Descartar la fase acuosa y combinar las fases orgánicas. Transferir el extracto combinado a un matraz colector adaptable al rotavapor y evaporar hasta sequedad. No obstante como, dependiendo del tipo de muestras, la resuspensión del residuo final en Tween 60 al 1 % para la posterior inoculación a los ratones pudiera resultar difícil, el residuo obtenido tras la evaporación del solvente orgánico se reextrae mediante sonicación con 16 ml de metanol. Tras unos minutos de reposo, separar el sobrenadante que contiene las toxinas del residuo que permanece en el fondo.

Evaporar a sequedad el extracto metanólico y resuspenderlo en Tween 60 al 1 %, transfiriéndolo a un tubo graduado de manera que el volumen final

sea de 4 ml. La relación peso/volumen a obtener es de 25 g de carne iniciales por cada ml de solución acuosa de Tween 60 al 1%.

6.3. Bioensayo en ratón

Inocular por vía intraperitoneal tres ratones de aproximadamente 20 g de peso con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas.

7. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La muerte de 2 de 3 ratones en 24 horas podría ser interpretada como la presencia de una o más toxinas liposolubles (AO y DTXs, PTXs, YTXs y AZAs) a niveles superiores a los establecidos en la Decisión 2002/225/CEE del 15 de Marzo de 2002. Aunque esta asunción es correcta en el caso de toxinas de los grupos del AO, DTXs, PTXs y AZAs, si hay YTXs en las muestras a analizar se pueden producir resultados positivos incluso si estas sustancias se encuentran a niveles muy por debajo del nivel regulatorio de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($160 \text{ } \mu\text{g}$ equiv. $\text{YTX} \cdot \text{kg}^{-1}$ pueden producir la muerte en los ratones).

Se puede sospechar la presencia de YTXs o su co-ocurrencia con las otras toxinas del grupo si los ratones mueren antes de 6 h con síntomas similares a los producidos por las toxinas PSP (convulsiones y saltos), aunque este tipo de muerte puede ser también ocasionado por la presencia de niveles elevados de algunas toxinas de los otros grupos regulados en la Decisión. En este caso, se recomienda la aplicación del protocolo que se describe seguidamente y que contempla una partición líquido/líquido con diclorometano/metanol 60 % y que permite la determinación de AO, DTXs, PTXs y AZAs en el extracto de diclorometano y la determinación de las YTXs en la fase metanólica.

Si los ratones mueren entre las 6 y 24 horas, es muy improbable que las YTXs estén presentes en las muestras, o bien que contribuyan a su toxicidad de forma significativa, de manera que este resultado se puede interpretar como la presencia de una o más toxinas de los siguientes grupos: OA, DTXs, PTXs y AZAs a niveles superiores a los establecidos en la decisión 2002/225/CEE.

PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE AO, DTXS, PTXS Y AZAs EN EL EXTRACTO DE DICLOROMETANO Y DETECCIÓN DE YTXs EN EXTRACTO METANÓLICO

1. AMBITO DE APLICACIÓN

Se aplicará este protocolo en el caso de que se sospeche la presencia de YTXs en las muestras.

2. REACTIVOS

- Acetona
- Metanol
- Metanol 60 %
- Butanol
- Diclorometano
- Agua destilada
- Solución de Tween 60 al 1% en agua destilada

3. APARATOS Y MATERIAL

- Cuchillos para abrir los moluscos
- Tamiz de acero inoxidable.
- Homogeneizador eléctrico ó Ultraturrax.
- Balanzas
- Filtros de papel
- Rotavapor
- Baño de agua termostatizado
- Matraces colectores adaptables al rotavapor de diferentes volúmenes
- Jeringuillas estériles de 1 ml desechables
- Bomba de vacío regulable
- Matraces Erlenmeyer Kitasato
- Embudos de decantación
- Embudo Buchner o similar
- Material diverso de uso en laboratorio

4. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Ratones Swiss, preferentemente de peso 20 ± 1 g.

5. MÉTODOS DE ENSAYO

5.1. Preparación y extracción

Preparar la carne del molusco tal como se explicó en el apartado 6.1 de la página 119. Pesar 100 g del homogeneizado de carne en un vaso de precipitados. Añadir 300 ml de acetona y homogeneizar con Ultraturrax o similar durante 2 min. Filtrar a presión reducida y reservar el filtrado. Extraer el residuo con 300 ml de metanol, homogeneizando durante 2 min. Filtrar este segundo extracto a presión reducida. Combinar los extractos acetónico y metanólico en un matraz colector adaptable a rotavapor, preferentemente de 2 l.

Añadir 20-25 ml de butanol (nunca más de 50 ml) para prevenir la formación de espumas. Evaporar hasta casi sequedad (la temperatura del baño de agua no debe exceder los 45°C). Transferir el residuo a un matraz de decantación con 30 ml de diclorometano y 60 ml de metanol : agua al 60 %. Es esencial que ambos solventes estén saturados uno con el otro, para evitar emulsiones posteriores. Agitar suavemente el matraz de decantación y dejar reposar. Después de que se separen ambas fases recoger el extracto de diclorometano y reservar la fase metanólica. Extraer la solución de diclorometano 2 veces más con 60 ml de metanol al 60 % y combinar todos los extractos metanólicos. La presencia de AO, DTxs, PTxs y AZAs se investiga en el extracto de diclorometano. La presencia de YTXs se investiga en el extracto metanólico.

6. BIOENSAYO EN RATÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD

6.1. Investigación de AO, DTxs, PTxs y AZAs

Evaporar el extracto de diclorometano. El residuo obtenido tras la evaporación del solvente se re-extrae mediante sonicación con 16 ml de metanol. Tras unos minutos de reposo, separar el sobrenadante que contiene las toxinas del residuo que permanece en el fondo. Evaporar el extracto metanólico. Resuspenderlo y transferirlo a un tubo graduado de manera que el volumen final sea de 4 ml. La relación peso/volumen a obtener es de 25 g de carne iniciales por ml de Tween 60 al 1 %. Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aprox. 20 g con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior. Mantener los ratones en observación al menos 24 horas. La muerte de 2 de 3 ratones en 24 h se interpreta como la presencia de una o más de las toxinas de los siguientes grupos: AO y DTxs, PTxs y AZAs a niveles por encima de los establecidos en la Decisión 2002/225/CE del 15 de Marzo de 2002.

6.2. Investigación de Yesotoxinas

Llevar el extracto metanólico-acuoso a 200 ml con metanol. Tomar 16 ml de la solución resultante y evaporarlos. Resuspender y transferir el residuo a un tubo graduado con porciones de Tween 60 al 1 % hasta un volumen de 4 ml. Inocular por vía intraperitoneal 3 ratones de aproximadamente 20 g de peso con alícuotas de 1 ml de la disolución anterior (equivalente a 2 g de carne). Mantener los ratones en observación al menos 6 h. La muerte de 2 de 3 ratones en 6 h se interpreta como la presencia de YTXs a niveles por encima de los establecidos en la Decisión 2002/225/CEE del 15 de Marzo de 2002.

PARTE II. TAXONOMÍA

CAPÍTULO 4: DINOFLAGELADOS TECADOS TÓXICOS DEL CONO SUR AMERICANO

ENRIQUE BALECH

Casilla de Correo 64, 7630 Necochea, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN	125
LOS DINOFLAGELADOS «BIVALVOS»: PROROCENTRALES Y DINOPHYSIALES ...	
.....	126
Orden Prorocentrales	127
<i>Prorocentrum</i> Ehrenberg, 1834	127
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard, 1916) Schiller, 1933	127
Orden Dinophysiales	128
<i>Dinophysis acuta</i> Ehrenberg, 1840	129
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparède & Lachmann, 1859	130
<i>Dinophysis acuminata</i> var. <i>acuminata</i>	130
<i>Dinophysis acuminata</i> var. <i>lachmannii</i> (Paulsen, 1949) Paulsen, 1949	131
<i>Dinophysis fortii</i> Pavillard, 1923	131
<i>Dinophysis rotundata</i> Claparède & Lachmann, 1859	131
<i>Dinophysis mitra</i> (Schütt, 1895) Abé, 1967b	132
<i>Dinophysis caudata</i> Saville Kent, 1881	132
<i>Dinophysis tripos</i> Gouret, 1883	133
Clave para ayudar a diferenciar las especies de <i>Dinophysis</i> tóxicas de la región	133
SOBRE EL USO DE LA CLAVE	134
LOS DINOFLAGELADOS «PLURITABULARES»: PERIDINIALES (PERIDINIOIDEA) ...	
.....	134
Orden Peridiniales	134
<i>Alexandrium Halim</i> , 1960, emend. Balech, 1990	134
SOBRE LA TAXINOMÍA DE <i>ALEXANDRIUM</i>	135
CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO	135
Subgénero <i>Alexandrium</i>	137
Clave para ayudar a diferenciar las especies tóxicas de la región	137
<i>Alexandrium tamarense</i> (Lebour, 1925) Balech, 1985	137
<i>Alexandrium acatenella</i> (Whedon & Kofoid, 1936) Balech, 1985	138
<i>Alexandrium catenella</i> (Whedon & Kofoid, 1936) Balech, 1985	139
<i>Alexandrium fraterculus</i> (Balech, 1964) Balech, 1985	140
<i>Alexandrium kutnerae</i> (Balech, 1979) Balech, 1985	140
<i>Alexandrium peruvianum</i> (Balech & Mendiola, 1977) Balech & Tangen, 1985	141
<i>Alexandrium tropicale</i> Balech, 1985	141
Subgénero <i>Gessnerium</i> (Halim, 1967) Balech, 1990	141
<i>Alexandrium (G.) monilatum</i> (Howell, 1953) Balech, 1995	142

BIBLIOGRAFÍA 142

DINOFLAGELADOS TECADOS TÓXICOS DEL CONO SUR AMERICANO

ENRIQUE BALECH

Casilla de Correo 64, 7630 Necochea, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son los primeros fitopláncteres que se conocieron como productores de poderosas toxinas (Sommer *et al.*, 1937) y aún siguen siendo los más importantes de ellos.

Las toxinas y las patologías que producen son de varios tipos que, desde el punto de vista del interés humano, se pueden ubicar en dos grupos: las llamadas ictiotoxinas, que ejercen su acción nociva sobre peces e invertebrados (animales poiquiloterms) y las que causan trastornos y muertes en animales homeoterms. Estas se reparten según su acción, en varios grupos.

Las ictiotoxinas no se determinaron en aguas americanas al sur del Ecuador, aunque sí se registraron en ellas diversos episodios de mortalidades masivas de fauna marina. En verdad no conozco ningún real intento de encontrar la explicación rigurosamente científica de esas mortalidades, que suele ser reemplazada por vagas hipótesis, entre ellas la de contaminantes echados al mar. Los grandes «florecimientos» planctónicos, coincidentes con esas catástrofes, sustentan la fácil relación de causa y efecto. Pero aún si ésta tiene muy alta probabilidad de ser correcta, queda por verificar el verdadero mecanismo del fenómeno.

Muchas veces el efecto nocivo no se debe a toxinas producidas por ese plancton, o por alguna de sus especies, sino a causas diversas, como oclusión de branquias, anoxia, exceso de algunos metabolitos externos o producidos por la putrefacción de gran parte de la excesiva población fitoplanctónica en su fase decadente. Por eso, y a falta de buenos análisis químicos de los dinoflagelados mismos, es siempre riesgosa la calificación de tóxica, asignada a algunas de sus especies, por su simple aparición en gran número en coincidencia con algún tipo de toxicidad. Esto se refiere tanto a las mortalidades de fauna como a las intoxicaciones humanas.

Las toxinas peligrosas para nosotros son, a su vez, de varios tipos, clasificables sea tanto por sus estructuras moleculares como por su acción patogénica. Se habla entonces, de diarreicas, de paralizantes, de ciguatéricas, de amnésicas, de neurotóxicas diversas no incluíbles en alguno de los otros grupos y de hemolisinas. Damos los nombres aceptados y de uso corriente, aunque varios de ellos sean muy discutibles desde el punto de vista semántico. Así, por ejemplo, se dice «Toxina paralizante de moluscos» (TPM), etiqueta que adolece de dos errores, pues ni paraliza moluscos ni son producidas por éstos, que sólo son acumuladores o vectores. Peor es la fiel transcripción de la denominación inglesa de «paralítica» que, si es dudosamente defendible en inglés, es completamente inaceptable, absurda, en castellano y otros idiomas.

En la región sólo se verificaron las dos primeras clases de toxinas. Además, las amnésicas sólo son producidas, por lo que se sabe hasta ahora, por diatomeas. Las neurotoxinas, producidas fundamentalmente por dinoflagelados «desnudos» (ver esta denominación más adelante) no se verificaron, hasta ahora, en aguas americanas del hemisferio sur. Las ciguatéricas son, en verdad, una mezcla bastante heterogénea de toxinas, la principal de las cuales es producida por dinoflagelados bentónicos no hallados en estos mares. También las hemolisinas son producidas por dinoflagelados bentónicos que no se tratan en este capítulo.

Los vehículos de estas toxinas son, en el caso de los dos tipos de nuestro interés directo, animales filtradores de plancton, fundamentalmente moluscos pelecípodos o bivalvos. De mucha menos importancia son los gasterópodos.

Antes de proseguir parece conveniente hacer algunas aclaraciones sobre problemas sistemáticos y taxinómicos de los dinoflagelados. Como es sabido, se mantiene un largo desacuerdo sobre su ubicación en uno de los reinos tradicionales en que se repartie-

ron todos los seres vivos: animales y vegetales. Aunque hoy esta división goza de muy poco predicamento (según los especialistas los «reinos» oscilan entre dos y doce) esta divergencia no tendría mayor importancia práctica si no fuese por su incidencia en la nomenclatura científica. Afortunadamente no hay problemas muy serios con ninguno de los taxones aquí tratados.

Empleo, por muy conveniente, las designaciones de dinoflagelados tecados y de atecados o desnudos, pese a las objeciones que varios especialistas han levantado contra ellas. Entiendo por tecados aquellos que tienen una cubierta exterior (teca) de cierta rigidez y compuesta por elementos separables o placas.

Algunos estudiosos tienden a confinar todas las observaciones al microscopio electrónico de barrido (MEB). Pero el MEB no es adecuado para los análisis planctológicos generales ni para el conocimiento profundo de la anatomía tecal. Si bien ha dado fotografías hermosas, hizo adelantar poquísimamente el conocimiento de las tecas. Es muy importante, en cambio, para el de las partes blandas (flagelos, películas, etc.) y de detalles finos de las superficies. Por eso resulta valioso para el estudio de las tecas de *Prorocentrum* y, desde luego, para el de otros organismos (diatomeas, coccolitofóridos...). Es mucho más fructífero el estudio de los protoplasmas de los dinoflagelados con microscopio electrónico de transmisión (MET).

Otro problema es el de la clasificación de determinados dinoflagelados como organismos tóxicos. Sobre todo desde las muy interesantes observaciones de la científica portuguesa E. de Sousa e Silva (Silva, 1979, 1990) no suficientemente consideradas por otros investigadores, tenemos fuertes indicios de que, en alguna forma, la producción de toxina se debe a una relación *sui generis* entre ciertas bacterias y determinadas especies de dinoflagelados. Esto explicaría, en parte, las llamativas diferencias de toxicidad comprobadas en algunas especies, según el lugar y momento en que fueron obtenidas, llegando al extremo de que algunas se clasifican tanto como atóxicas o como definitivamente tóxicas.

Como parte final de esta larga pero conveniente introducción, me parece oportuno decir algo sobre el rol del planctólogo en la prevención de las intoxicaciones humanas. Si el muestreo de plancton se hace con redes, es frecuente que estas sean de malla

demasiado grande para una retención adecuada de las especies pequeñas, entre las que se encuentran varias de las que presentamos aquí, y que, por consiguiente, estarán subrepresentadas, ocultando el verdadero tamaño de su población.

Si, a pesar de usar redes apropiadas, en la muestra aparecen escasísimos ejemplares de una o más especies tóxicas, su hallazgo, sin ser preocupante, es una llamada de atención sobre la existencia de la «semilla» inicial de poblaciones densas, peligrosas, que pueden constituirse en tiempo relativamente breve si las condiciones son favorables. Por lo tanto deben considerarse como un primer llamado de atención que aconseja la intensificación de los muestreos.

Si los individuos de esas especies están en número suficiente como para calificar sus poblaciones de pobres pero no paupérrimas, deberían instaurarse medidas preventivas, pues hay dos factores importantes a considerar: la frecuente distribución irregular del plancton, que no asegura plena representatividad de las muestras, y la capacidad filtrante y retentiva (acumulativa) de algunos de los vectores usuales de los organismos tóxicos, la que puede ser mucho más alta de lo que algunos piensan. Un mejillón puede filtrar, en la estación más favorable, tres litros de agua por hora (Andreu, 1965).

LOS DINOFLAGELADOS «BIVALVOS»: PROROCENTRALES Y DINOPHYSIALES

En ambos ordenes la teca, usualmente aplastada bilateralmente, está formada por dos valvas, derecha e izquierda. En Prorocentrales (Prorocentroidea) las valvas son simples, formada cada una por una sola placa, mientras que en las Dinophysiales (Dinophysioidea) cada una es pluritabular.

La teca de las Prorocentrales carece de *sulcus* y de *cingulum*. Esta gran simplicidad se altera un poco por la presencia de un grupito de placas diminutas cuyo número normal probablemente es de 8 (\pm 1-2) ubicadas en el extremo anterior y que delimitan un par de poros flagelares. Una de ellas puede presentar una espina, a veces bastante grande, y, usualmente, alada. Algunos autores sostienen que el número de plaquitas puede ser doce, pero se basan en interpretaciones dudosas de imágenes de MEB.

La teca de las Dinophysiales es, en cambio, bastante compleja, tiene *cingulum* y *sulcus*, y está formada por placas que se agrupan en regiones: por de-

lante del *cingulum*, la epiteca, que es muy corta en las especies que aquí consideramos y, por detrás, la hipoteca, que forma casi todo el cuerpo visible y que, en algunas especies, se extiende hacia atrás en espigas u otras proyecciones. El *cingulum* está bordeado por un par de formaciones membranosas o aletas. En el borde ventral, generalmente estrecho, se ubica el *sulcus*, delimitado a ambos lados por las aletas sulcales.

En ninguno de estos órdenes se detectaron, hasta ahora, toxinas paralizantes, pero en ambos hay especies productoras de otros tipos de toxinas, principalmente diarreicas.

Orden Prorocentrales

Tiene un bajo número de especies, reunidas en una familia: Prorocentraceae (Prorocentridae). Su género principal, único que tratamos aquí, es *Prorocentrum*. Hasta hace pocas décadas se reservaba este nombre para las formas con diente o espina apical, distinguiéndolas de *Exuviaella*, nombre genérico que se aplicaba a todas las especies que carecían de esa proyección o la tenían rudimentaria. Hoy la mayoría de los especialistas acepta la unificación genérica propuesta por Abé (1967a).

Prorocentrum Ehrenberg, 1834

Este género es muy frecuente en aguas costeras. No rara vez produce discoloraciones y es importante presa de pequeños invertebrados y de protistas planctófagos. Suele ser acompañante de diversas especies tóxicas y, por esta razón, a varias de sus especies se les atribuyó toxicidad indocumentada.

Aunque buenos estudios demostraron la presencia de toxinas en tres o cuatro de sus especies hay, empero, dos razones para decir que, aun hoy, hay que tomar con reservas la citación de intoxicaciones producidas por *Prorocentrum*, afirmaciones que sólo se apoyan en la abundancia de este género en plancton tóxico. La primera es el estado muy insatisfactorio de su taxinómia, con especies propuestas pero casi inidentificables y sinonimias que se crean y desaparecen con igual rapidez. Un carácter taxinómico seguramente importante, pero muy descuidado, es la distribución de poros en la superficie tecal, y la distinción entre ellos y pequeñas protuberancias (espínulas). Recientes estudios con MEB (Faust, 1974, 1990 y otros) prometen una mejoría.

No simplifica las cosas saber que, por lo menos en cultivos experimentales, se pueden producir hibridaciones (Costas, 1986).

La segunda razón para ser prudentes es la atribución frecuente de toxicidad a varias de sus especies, sin bases ciertas. Por ejemplo, *P. micans*, la especie más conocida y de mayor distribución mundial, fue calificada como tóxica muchas veces, pero ninguno de los análisis que se le hicieron permitieron detectar toxinas en ella. Por otra parte, es muy probable que, como pasa con otros géneros, algunos taxones puedan ser tóxicos, o no, según las condiciones del medio.

De aquellas especies en las que se verificó producción de toxinas, sólo una, la que describo a continuación, se registró en el área de nuestro interés directo, pero en ésta no hay informes fehacientes de intoxicaciones producidas por ella.

Prorocentrum minimum (Pavillard, 1916) Schiller, 1933

Fig. 1

Exuviaella minima Pavillard, 1916: 11, pl. I (1 a y b).

Prorocentrum triangulatum, Martin, 1929: 557, fig. 1-3.

Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller, 1933: 32, fig. 33 a y b.

Prorocentrum cordiforme Bursa, 1959: 31, fig. 104-107.

Exuviaella mariae-lebouriae Parke & Ballantine, 1957: 643, fig. 1-9.

Especie pequeña, de forma muy variable, casi siempre triangular o acorazonada, a veces oval o oscuramente pentagonal. Margen anterior con ligera concavidad media, con una espinita o sin ella. Las características más importantes para distinguirla son: su pequeño tamaño y la superficie tecal bastante densamente poblada por puntuaciones que el MEB re-

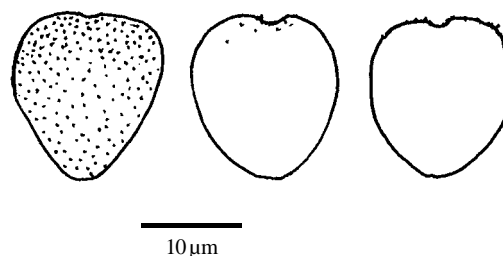


Fig. 1. Tres formas de *Prorocentrum minimum*.

vela que son de dos tipos: poros y protuberancias diminutas espiniformes.

Dimensiones: L menor de 20 μm , generalmente 15-18.

Los registros de este taxón, siempre en poca abundancia, son frecuentes en varios puntos del litoral argentino. Al parecer no ha sido encontrado en otros países de la región.

En Japón se lo responsabilizó de varios centenares de intoxicaciones humanas, hasta con algunos casos fatales, pero estudios de bioquímicos japoneses, sólo encontraron en este dinoflagelado, hasta ahora, toxinas de poca actividad.

Orden Dinophysiales

El Orden Dinophysiales (Dinophysioidea) tiene muchos más géneros y especies que el anterior, que reúne algo menos de 20. La mayoría de los géneros presentan sólo una o dos especies; sólo *Dinophysis*, *Ornithocercus*, *Histioneis* y *Amphisolenia* tienen varias. En el primero, representado en todos los mares, hasta son numerosas. Los otros tres sólo son hallados en aguas cálidas. Las características genéricas diferenciales pueden consultarse en Balech (1988). Si bien en el orden hay tremenda diversidad morfológica llama la atención la uniformidad en el número y disposición de las placas constituyentes de la teca.

El primer detalle a destacar es la clara estructura bivalvar. Las placas se ubican de manera tal que forman tres regiones bien distinguibles en vista lateral. Ellas son, de adelante a atrás: la epiteca, el *cingulum* y la hipoteca que, casi siempre, constituye por sí sola, la mayor parte de la teca.

Las dimensiones y las relaciones entre ellas son características importantes para la taxinomía. Las principales se obtienen examinando las tecas en vista lateral, que es la que comúnmente se presenta al observador ya que la vista ventral es difícil de obtener debido al fuerte aplastamiento bilateral. Sólo es fácil observar la región ventral en estados megacíticos, como se lo llama cuando entre valva y valva se desarrollan muy amplias bandas o zonas conectivales (usualmente con fuertes estrías transversales) que preceden la división celular que se hace por el plano medio dorso-ventral.

Para medir los especímenes en vista lateral se consideran dos ejes longitudinales: el que expresa la longitud del ejemplar (L) y el eje medio (Em).

L es una recta que, partiendo del centro de la epiteca llega al punto extremo posterior de la hipoteca, excluyendo espinas y membranas, si las hubiere. Em es la recta que partiendo desde el mismo punto anterior, se extiende perpendicular al *cingulum* hasta el borde posterior de la teca. Puede haber coincidencia de ambos ejes.

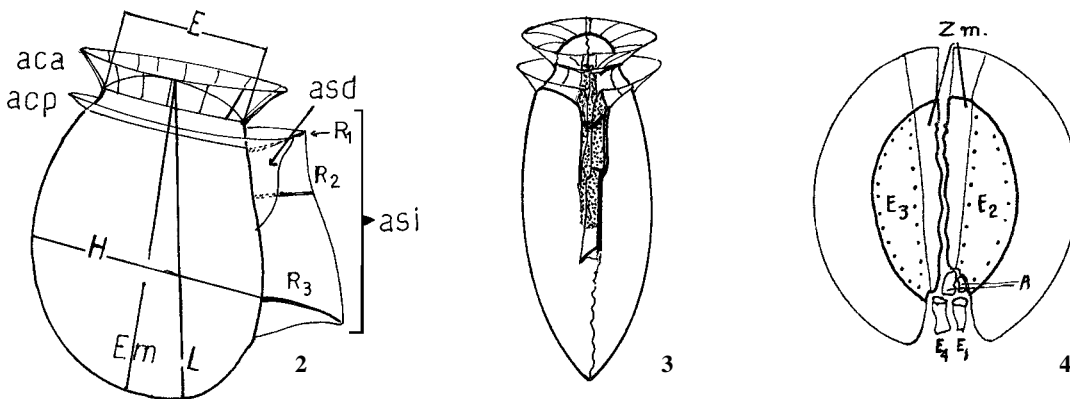


Fig. 2. Vista lateral derecha de un *Dinophysis* mostrando la forma de tomar las principales medidas. a.c.a., aleta cingular anterior, con radios; a.c.p. aleta cingular posterior; a.s.d., aleta sulcal derecha; a.s.i., aleta sulcal izquierda con sus tres costillas: R₁ o anterior, R₂ o media y R₃ o posterior; la porción que se extiende por debajo de R₃ se llama retrocostal; E, profundidad (= ancho dorso-ventral) de la epiteca; H, lo mismo de la hipoteca; L, eje longitudinal (longitud); e.m., eje medio. Fig. 3. *Dinophysis* en vista ventral. En grisado, el *sulcus*, entre las dos aletas sulcales. Fig. 4. *Dinophysis*. Vista anterior o apical de la epiteca, con sus componentes ligeramente separados. E₁, E₂, E₃ y E₄, placas epitecales. A, placas apicales. Zm., zona o banda megacítica. Obsérvese que casi toda la epiteca está formada por las dos epitecales dorsales (E₁ y E₂) y que las cuatro de la serie contribuyen a integrar la aleta cingular anterior, pero que la porción de aleta que corresponde a las pequeñas ventrales (E₃ y E₄) es reducidísima.

H es la medida del segmento que, paralelo al *cingulum*, se extiende del punto más dorsal al más ventral de la hipoteca.

En vista lateral, se distinguen tres zonas o regiones tecales que son, de adelante a atrás: epiteca, *cingulum* e hipoteca. Cada una de ellas está constituida, mayoritariamente, por dos placas principales, dorsales (una en cada valva) acompañadas por dos ventrales, mucho menores. En las tres hay, en la región ventral, otras pequeñas placas que son de difícil estudio, sobre todo las de la epiteca («placa del poro» y una o dos apicales más). Las que se ubican a lo largo del borde ventral del *cingulum* y de la hipoteca son las que integran el *sulcus*. Las figuras 2 y 3 muestran como medir las tecas y las 4-6 la ubicación y símbolos de las placas.

Elementos conspicuos de las tecas son las membranas o aletas: dos cingulares (anterior y posterior) y dos sulcales (izquierda y derecha). Caracteres taxinómicamente importantes de la aleta cingular anterior son, su desarrollo, su dirección y que tenga o no varillas o radios de sostén.

Las aletas sulcales son aún más notables y diversificadas. La derecha es una membrana única, integrante de la placa hipotecal dorsal de ese lado, no es fácil de ver, enmascarada por la izquierda, que es más grande, robusta y tripartita. Esta última ostenta tres varillas de sostén o costillas designadas de adelante atrás, con los símbolos R_1 , R_2 y R_3 . Cada una de las primeras porciones son membranas del borde ventral de sendas placas estrechas, alargadas y robustas. La primera de ellas (H_1) está ligeramente a la izquierda del plano medio o de división de la célula y la segunda (H_2) un poco a la derecha del mismo. En cuanto a la tercera porción, generalmente muy corta, no es separable, por ser integrante de la placa H_3 .

En algunas especies la hipoteca forma robustas prolongaciones posteriores o caudales (*D. caudatay D. triplos*). En otras no tratadas aquí, hay una o más espinas, a veces de gran longitud y aladas.

Son caracteres claves para la determinación de las especies de este género: contorno general en vista lateral (a veces también en vista frontal), relaciones entre los ejes longitudinal y medio, apéndices o espinas posteriores, altura, forma y ancho de la epiteca en vista lateral (= profundidad o espesor) (E), forma de las aletas sulcales, distancia entre las costillas de

la izquierda, dimensiones, amplitud, dirección y presencia de varillas de sostén de la aleta cingular anterior, y escultura.

Las especies de las que se conocen toxinas son pocas. Nos ocuparemos de las seis presentes en la

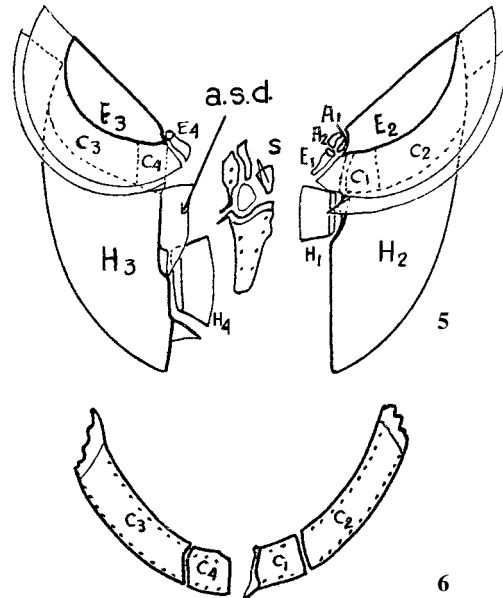


Fig. 5. *Dinophysis*, esquema de los constituyentes de ambas valvas, en vista ventral y más separadas en el dorso. En la región ventral se ubican, entre ambas, las placas sulcales, constituyentes del *sulcus*. Fig. 6. *Dinophysis*, esquema de los constituyentes del *cingulum*.

región en las que se comprobó producción de toxinas o para las que hay fuertes sospechas de que sean tóxicas.

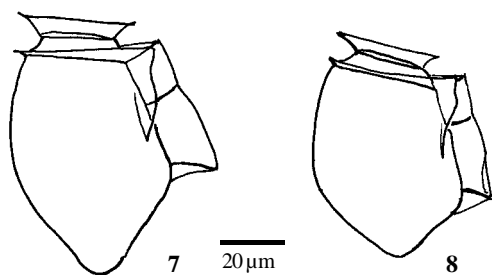
Dinophysis acuta Ehrenberg, 1840

Figs. 7-8

Dinophysis acuta Ehrenberg, (1839)1840: 124, 151, pl. 4.

Especie bastante grande, alargada. La hipoteca presenta dos partes bien diferenciadas: la anterior o mayor se ensancha algo hacia atrás; la posterior es triangular irregular de extremo redondeado. Aleta cingular anterior amplia, oblicua, sin radios. Epiteca aplastada o apenas convexa. Aleta sulcal izquierda bastante ancha con borde libre algo convexo: R_2 más cerca de R_1 que de R_3 . La aleta derecha es irregularmente triangular y bastante corta pues apenas sobrepasa el nivel de R_2 .

Dimensiones: muy variables, L 65-94 μ m.



Figs. 7- 8. *Dinophysis acuta*, en vista lateral derecha. Fig. 7. Una de las formas observadas en aguas escandinavas. Fig. 8. Forma de Pto. Montt (Chile), dibujada de fotomicrografías de G. Lembeye.

Esta especie, además de ser la especie tipo del género, es la primera que se relacionó con diarreas humanas. Se debe el descubrimiento de esta relación al biólogo chileno J. Hermosilla, quien la expresó claramente en una serie de informes elevados a las autoridades chilenas, desde 1970. Agradezco a G. Lembeye los datos pertinentes.

En 1975 se verificó en mi laboratorio del Museo Argentino de Ciencias Naturales «B. Rivadavia» la identidad específica del *Dinophysis* que produjo las diarreas en Chile. Después de la muerte accidental de Hermosilla en 1976, Lembeye *et al.* (1981) dieron a conocer el hallazgo de aquel, pero poco antes, un equipo japonés no sólo demostró la relación causa-efecto entre la abundancia de otra especie de *Dinophysis*, *D. fortii*, con episodios diarreicos en Japón, sino que, además, aisló y caracterizó la toxina (Yasumoto *et al.*, 1980).

Los ejemplares recogidos por Hermosilla en la región de Pto. Montt (Chile, aproximadamente a 41°30' S) eran algo diferentes de los *D. acuta* que estudié en aguas escandinavas, pero no dudo de su conespecificidad. Quizás podrían ser considerados como subespecie o variedad.

Productora de toxina diarreica vehiculizada por moluscos bivalvos.

***Dinophysis acuminata* Claparède & Lachmann,**

1859

Figs. 9-14

Dinophysis acuminata Claparède & Lachmann, 1859: 408, pl. 20 (17).

Especie bastante pequeña, polimórfica, elíptica más o menos alargada pero con relación L/H muy variable. Epiteca pequeña, en general irregularmente convexa y baja. Aleta cingular anterior sin radios y oblicua. Aleta sulcal izquierda bastante más corta que la hipoteca, más bien angosta, de borde libre convexo o sigmoideo, con frecuencia bastante doblada hacia la derecha por detrás de R_2 . R_2 más cerca de R_1 que de R_3 . Puede haber una o más pequeñas protuberancias o verrugas antapicales.

Su polimorfismo le valió varios nombres específicos. Generalmente aceptamos dos variedades. Frecuente en aguas templadas y frías de la región.

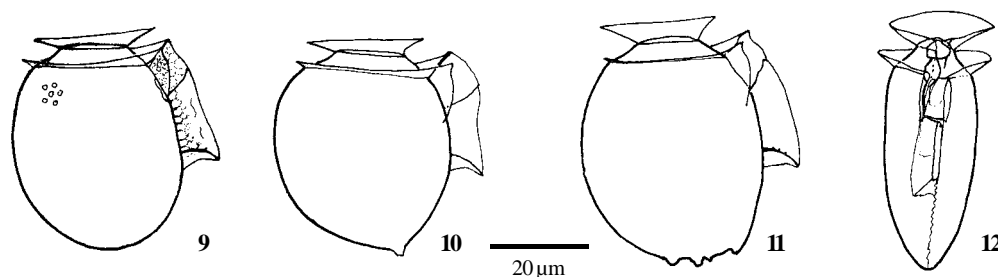
Aunque es probadamente tóxica, su producción de toxina varía mucho con la localidad y la época del año. Se sospecha de esta especie como productora de diarreas en aguas de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) y en Uruguay. Ésta y la especie anterior son, indudablemente, las más importantes especies tóxicas del género, en aguas sudamericanas.

Dinophysis acuminata* var. *acuminata

Figs. 9-12

Dinophysis acuminata Claparède & Lachmann, 1859: 408, pl. 20 (17).

Dinophysis simplex Böhm, 1933: 15 (pie de página) fig. 1 a-b.



Figs. 9-12. *Dinophysis acuminata* var. *acuminata*. Figs. 9-11. Ejemplares en vista lateral derecha; Fig. 12. Teca en vista ventral.

Dinophysis borealis Paulsen, 1949: 46, fig. 14 K-U y 15 (2).

Se da este nombre a las formas relativamente anchas, con relación L/H aproximadamente 1,07-1,18 y de extremo posterior bastante redondeado.

Dimensiones: L 39-53 μm .

Dinophysis acuminata var. *lachmannii* (Paulsen, 1949) Paulsen, 1949
Figs. 13-14

Dinophysis lachmänni Paulsen, 1949: 46, figs. 14 A-H y 15 (7).

Dinophysis böhmi Paulsen, 1949: pie de página 45.

Más pequeña y angosta que la anterior, L/H normalmente entre 1,35 y 1,44. Algunos ejemplares son bastante acuminados posteriormente. En nuestra región ambas variedades suelen ser de separación fácil pero la pertenencia a la misma especie se demuestra por no raros ejemplares de transición (Balech, 1976).

Dinophysis fortii Pavillard, 1923
Fig. 15

Dinophysis intermedia Pavillard, 1916: 58, pl. 3(4); non Cleve, 1902.

Dinophysis fortii Pavillard, 1923: 88l.

Forma elíptica-oval regular, de tamaño mediano y eje longitudinal netamente inclinado hacia la región ventral. Convexidades dorsal y posterior regulares; borde ventral de la hipoteca recto o casi recto. Aleta cingular anterior sin radios, aunque suele tener otros tipos de ornamentación, lo mismo que las sulcales. Epiteca aplastada. El ancho de la hipoteca, en vista lateral, es casi constante en la mayor parte de su longitud.

Dimensiones: L 51-66 μm (material argentino). Los especímenes del Mediterráneo son algo más grandes: L 65-75 μm .

Distribución bastante amplia en aguas cálidas. En el Atlántico es rara al sur de Brasil; más frecuente al norte, conforme a su termofilia. Esta especie es comprobadamente productora de TDM (Yasumoto *et al.*, 1980), la primera de la que se extrajo y caracterizó la toxina.

Dinophysis rotundata Claparède & Lachmann, 1859
Figs. 16-19

Dinophysis rotundata Claparède & Lachmann, 1859: 6, pl. 20(6).

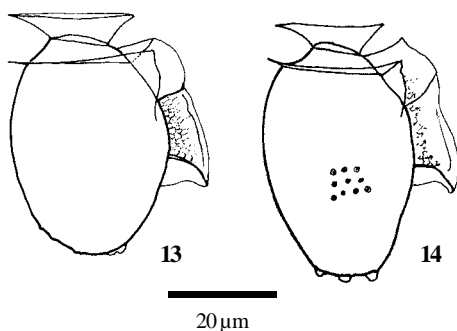
Phalacroma rotundatum (Claparède & Lachmann) Kofoid & Michener 1911:290.

Dinophysis whittingae Balech, 1971a: 73.

Pequeña a mediana, elíptica ancha, casi subcircular. La epiteca, aunque baja, es nítidamente convexa y un poco más alta que en las otras especies aquí tratadas. Aleta cingular anterior bastante angosta, lisa y casi horizontal. La sulcal derecha es bastante larga, pues termina al nivel de la base R_3 .

Dimensiones: L 41-51 μm .

Aunque es una especie poco distintiva en el conjunto de las congénicas, se puede diferenciar bien de otras de la región, y, sobre todo, de las tóxicas, por la epiteca bien convexa, relativamente alta y ancha en vista lateral, por su aleta cingular anterior casi horizontal y por la aleta sulcal derecha de borde libre sigmoideo. Puede ser confundida con *D. scrobiculata*, que también tiene todas esas características, pero de la que se distingue enseguida porque R_2 está más cerca



Figs. 13-14. *D. acuminata* var. *lachmannii*, dos ejemplares en vista lateral derecha.

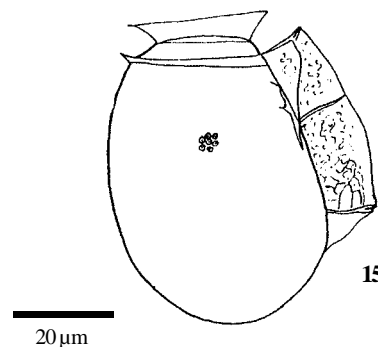
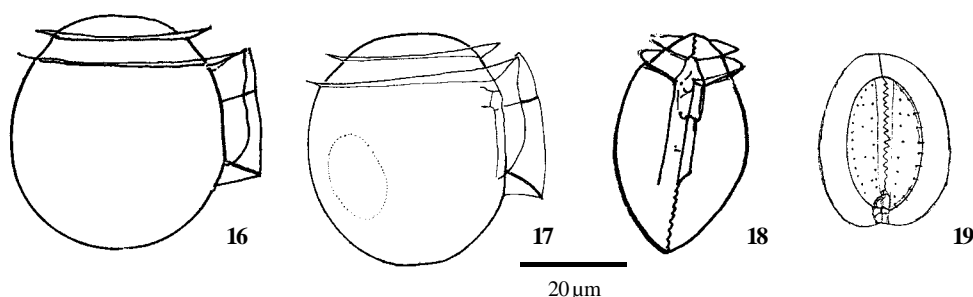


Fig. 15. *Dinophysis fortii* en vista lateral derecha.



Figs. 16-19. *Dinophysis rotundata*. Figs. 16-17. Dos ejemplares en vista lateral derecha. Fig. 18. Uno en vista ventral. Fig. 19. Vista apical de la epiteca.

de R_1 que de R_3 , al revés que en *D. scrobiculata*. El tipo de epiteca la ubica como de transición entre *Dinophysis* en sentido estricto y lo que se llamó *Phalacroma*; por eso se la cita con frecuencia como *Phalacroma rotundatum*.

Es predadora de otros dinoflagelados y se le comprobó producción de TDM.

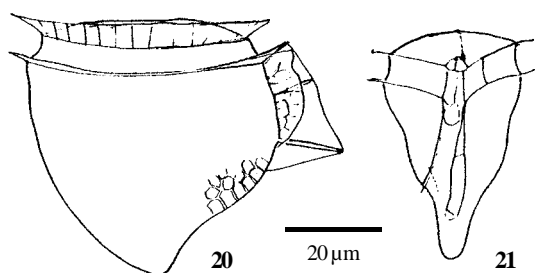
Dinophysis mitra (Schütt, 1895) Abé, 1967b
Figs. 20-21

Phalacroma mitra Schütt, 1895, pl. 4 (18; 1-4).

Dinophysis mitra (Schütt) Abé, 1967b: 63, fig. 18.

Tamaño mediano. Contorno trapezoidal ancho en vista lateral o, más bien, trapéxico en los 2/3 anteriores y cuneiforme en el posterior; el borde ventral de la última porción es cóncavo. Borde hipotecal dorsal suavemente convexo y netamente inclinado hacia el ventral. En vista ventral teca irregularmente cuneiforme. Epiteca ancha y baja en vista lateral, achatada. Aleta cingular anterior con frecuencia angosta, casi horizontal y con radios. Aleta sulcal derecha larga, llega hasta R_3 ; ambas aletas sulcales esculpidas. Escultura del cuerpo tecal formada por alvéolos grandes.

Dimensiones: L 50-68 μm , pero pueden encontrarse individuos más pequeños.



Figs. 20-21. *Dinophysis mitra*, vista lateral derecha y vista ventral, respectivamente.

Presente en aguas cálidas de la región, generalmente oceánicas. Se le probó producción de TDM, pero posiblemente no tenga importancia práctica para los toxicólogos porque nunca la encontré en abundancia en aguas sudamericanas.

Dinophysis caudata Saville Kent, 1881
Fig. 22

Dinophysis caudata Saville Kent, 1881: 455, 460.

Dinophysis homunculus Stein, 1883, pl. 21 (1, 2, 5, 7).

Bastante grande, con apéndice caudal robusto y bien definido, pero variable en grosor y longitud, a veces terminado en una o dos pequeñas puntas. Aleta cingular anterior troncocónica con radios finos, con frecuencia flexuosos y hasta incompletos. Epiteca chata y angosta en vista lateral. Aleta sulcal izquierda amplia, generalmente esculpida. Escultura tecal de poroides perforados.

Dimensiones: muy variables, L 70-120 μm , generalmente menor de 105 μm .

Es una especie euritérmica y eurihalina, aunque predominantemente nerítica y de aguas cálidas. En

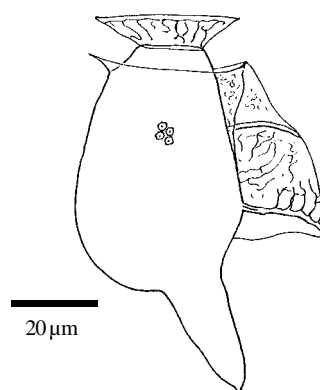


Fig. 22. *Dinophysis caudata* en vista lateral derecha.

la región se la registró en ambos océanos desde su límite norte; su máxima distribución al sur es en el Atlántico, según mis registros, hasta 43°30' S. Desconozco su máxima distribución al sur en el Pacífico.

Como todos los organismos eurioicos ostenta importantes variaciones morfológicas, lo que le ha valido numerosos nombres específicos, de los que, el más vastamente empleado, además del de *caudata*, fue *homunculus* (hoy totalmente abandonado). A uno y otro se le adjuntaron numerosos nombres subespecíficos y varietales. Pero es un taxón inconfundible. Sólo puede haber dudas al distinguirla de algunos ejemplares anormales de *D. tripos*.

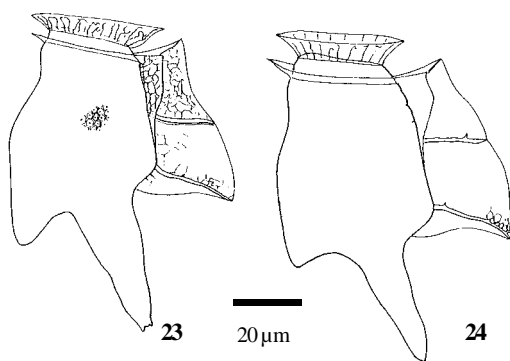
Sólo análisis efectuados a algún material de las Islas Filipinas demostraron toxicidad en *D. caudata*.

Dinophysis tripos Gourret, 1883
 Figs. 23-24

Dinophysis tripos Gourret, 1883: 114, pl. 3 (53).

Grande, parecida a la anterior, pero casi siempre de fácil diferenciación por un segundo apéndice caudal dorsal, mucho más corto que el ventral. Este apéndice dorsal es, empero, muy variable y, en algunos ejemplares, apenas rudimentario, cuando no ausente. Pero aún los individuos con atrofia casi completa del apéndice dorsal se pueden diferenciar de *D. caudata* por la fuerte concavidad de la parte anterior del borde dorsal de la hipoteca y por el extremo póstero-dorsal anguloso (truncado o romo en *D. caudata*). En esta región *D. tripos* es, casi siempre, mayor que *D. caudata*.

Dimensiones: L 94-125 µm.



Figuras 23-24. *Dinophysis tripos*, dos ejemplares en vista lateral derecha.

Los requerimientos ecológicos no son claros. Schiller (1933), la califica de termófila. Según él, su frecuente hallazgo en los mares escandinavos y Groenlandia se debe al acarreo por la corriente del Golfo. En el Atlántico Sudamericano prefiere, indiscutiblemente, las aguas subantárticas pero algunos ejemplares se ven en el sur de Brasil (Balech, 1988). Kofoid y Skogsberg no la encontraron en las numerosas muestras obtenidas por el «Albatross» en las aguas cálidas del Pacífico.

Lee *et al.* (1989) determinaron la producción de toxina diarreica en esta especie, pero sería de escasa importancia como tóxico.

Clave para ayudar a diferenciar las especies de *Dinophysis* tóxicas de la región

- I Con uno o dos apéndices caudales robustos A
- II Sin esos apéndices B
- A Con un apéndice caudal; contorno dorsal sin concavidad pronunciada del dorso hipotecal. Extremo póstero-dorsal truncado *D. caudata*
- A' Normalmente con dos apéndices; si el dorsal se atrofia, el extremo póstero-dorsal es netamente anguloso *D. tripos*
- B Epiteca relativamente alta. Aletas cingulares horizontales, que no encierran la epiteca *D. rotundata*
- B' Epiteca chata o muy baja 1
- 1 Aleta cingular anterior casi horizontal muy ancha, con radios. En vista lateral trapezoidal; mitad posterior cuneiforme con borde ventral cóncavo *D. mitra*
- 1' No así. Aleta cingular anterior lisa y marcadamente oblicua que encierra la epiteca 2
- 2- Forma elíptica-oval regular, con eje longitudinal claramente inclinado. Bordes dorsal y posterior regularmente convexos. Borde dorsal cingular recto. Tamaño mediano *D. fortii*
- 2' No así 3
- 3 Tamaño mediano a grande L > 50. Parte posterior de la hipoteca irregularmente triangular con punta roma *D. acuta*
- 3' Bastante pequeña, L < 50. Forma variable, predominantemente elíptica, con frecuencia con verrugas posteriores 4
- 4 Forma elíptica u oval bastante ancha. Relación L/H < 1,18 *D. acuminata* var. *acuminata*
- 4' Más pequeña y más angosta. L/H > 1,30 *D. acuminata* var. *lachmannii*

SOBRE EL USO DE LA CLAVE

La clave precedente sólo tiene el propósito de ayudar a diferenciar los taxones de *Dinophysis* de la región que producen toxinas. Es de poca utilidad para discriminar entre algunas de las especies aquí tratadas (caso de *D. rotundata* y *D. acuminata*) y otras registradas en la región, pero no asociadas a fenómenos de toxicidad.

LOS DINOFLAGELADOS

«PLURITABULARES»: PERIDINIALES
(PERIDINIOIDEA)

Orden Peridinales

Este orden difiere netamente de los dos anteriores por su teca no bivalva y formada por mayor número de placas. En este aspecto se nota gran disparidad de número y ordenamiento tabular de un género a otro. Por esta razón, las distinciones genéricas se basan, fundamentalmente, en las llamadas fórmulas tabulares. Las determinaciones a nivel específico e inferiores demandan, además de detalles de formas, tamaño, apéndices y escultura, que ya vimos en el orden precedente, el estudio de las placas mismas y, cuando se trata de diferenciar taxones muy parecidos, se recurre, cada vez con más frecuencia, al de las placas sulcales, lo que, por cierto, complica un tanto la labor del taxónomo pero la mejora considerablemente.

Taylor, en varios trabajos (1976, 1979) fue redefiniendo un concepto limitador de Peridinales, cuyos géneros quedarían repartidos en dos órdenes, el mencionado y otro que propuso en 1980: Gonyaulacales. La separación entre ambos es mucho menos tajante que la que existe con los dos anteriores. Por lo tanto mantengo aquí el orden del epígrafe con su acepción tradicional, pero podríamos aceptar Gonyaulacales como suborden.

Parece evidente que todavía hay que trabajar mucho en esta distinción, pues varios de los caracteres utilizados por Taylor y sus seguidores son relativos («tal cosa más bien que tal otra») o se deben más a interpretaciones más o menos subjetivas de las homologías entre distintos componentes de la teca.

No se debe negar, sin embargo, que las ideas de Taylor aportan elementos y sugerencias interesantes, sobre todo para ser utilizados en estudios filogenéticos de dinoflagelados. Sea como sea, los

taxones que tratamos a continuación son Gonyaulacoideos, expresando con esto su afinidad con el género *Gonyaulax*, en el que habían sido incluidos hasta hace poco más de dos décadas.

Alexandrium Halim, 1960, emend. Balech, 1990

Antes de 1960 sus especies eran generalmente ubicadas en *Gonyaulax*, pero casi desde el comienzo de este siglo se fue afianzando la opinión de que ese género era un conglomerado muy heterogéneo.

En 1937 Sommer y colaboradores demostraron que una especie descrita el año precedente por Whedon & Kofoid, *Gonyaulax catenella*, era responsable de la toxicidad temporal de moluscos lamelibranquios. La morfología tecal de ese «*Gonyaulax*» era semejante a la de otra especie también presentada en el trabajo de Whedon & Kofoid (1936) con el nombre de *G. acatenella* y la de ambas era esencialmente idéntica a la de *G. tamarensis* Lebour (1925), obtenida por esa investigadora en el estuario del río Tamar, en el SO de Inglaterra. Las tres tenían la misma fórmula tabular, claramente diferente de la de la especie tipo del género. Reconociendo esto se hizo hábito hablar del «grupotamarensis» de *Gonyaulax*. Esta denominación era inadecuada porque no utilizaba ninguna categoría sistemática reconocida por los códigos de nomenclatura y, además, no tomaba para su designación el nombre de la primera especie conocida del grupo, pues en 1904 Paulsen publicó una buena descripción de su *Goniodoma ostenfeldi*, más tarde transferida a *Gonyaulax*. *G. ostenfeldi* pertenece, sin dudas, al grupo que analizamos (Balech & Tangen, 1985).

Steidinger (1971) y Balech (1971 b) sugirieron, independientemente, la necesidad de ubicar esas especies en un género o en un subgénero propio, para el que Taylor (1979) propuso el nombre genérico de *Protogonyaulax*. Más tarde se demostró que era un sinónimo posterior de *Alexandrium* Halim, 1960. La redesccripción detallada de su especie tipo *A. minutum*, basada en el estudio minucioso de abundante material topotípico (Balech, 1989) dio plena validez a este género. Finalmente la IV Conferencia Internacional sobre Fitoplancton Tóxico, celebrada en Lund ese mismo año, convalidó la prioridad de *Alexandrium* como nombre genérico para ese grupo de dinoflagelados.

Alexandrium es, seguramente, el género de dinoflagelados que más estudios incitó en las últi-

mas décadas en todo el mundo y fue tema central de varias conferencias internacionales y regionales. La atracción que ejerce sobre cultores de muy diversas especialidades (taxionomos, planctólogos, higienistas, médicos, bioquímicos, genetistas y otros) se debe a que es el principal tóxico de moluscos marinos y ejerce su acción deletérea en casi todas las grandes áreas marinas costeras, sobre todo templadas y frías.

SOBRE LA TAXINOMÍA DE *ALEXANDRIUM*

El género es de morfología muy homogénea, carente de rasgos salientes que permitan su fácil identificación. Esta homogeneidad hace que muchos de sus taxones sean muy parecidos, sólo separables por caracteres menores.

Esto genera desconfianza sobre la realidad de muchas de sus especies. Las dudas se refieren, sobre todo, a la categoría sistemática, no a la realidad de esos taxones (especies, subespecies, variedades). Uno de esos caracteres pequeños pero clave es la existencia o ausencia del llamado «poro ventral» de la epiteca, usualmente muy pequeño. No es nada espectacular y suele exigir un examen muy cuidadoso para ser detectado, pero largos estudios y cultivos demostraron que está genéticamente establecido y es muy constante a través de muchas generaciones de un mismo origen (cultivos clónicos).

Los no taxionomos se resisten a veces a esa clasificación de base morfológico-tecal y han hecho diversos intentos de suplantarla por sistemáticas de otros fundamentos. Entre estos se ensayaron: naturaleza y porcentajes de toxinas y pigmentos, enzimas, secuencias ribosomales, luminiscencia, etc. La basada en pigmentos y en toxinas ha sido, hasta ahora, un fracaso total. Creo que de las taxinomías alternas la más promisoría es la de las secuencias ribosomales, no sólo por sus posibles aportes a la taxinomia sino porque también da indicaciones muy valiosas sobre el origen de algunas poblaciones de especies cuyas áreas parecen estar en continua expansión (Scholin & Anderson, 1993).

Excelente información sobre estos temas puede ser extraída de los estudios de Scholin & Anderson (1994,1996) y de Scholin *et al.* (1995). Una exposición más general y sencilla es la de Anderson (1995). Para la metodología del muestreo recomiendo el artículo de Franks & Anderson (1989).

Algunos morfólogos han propuesto como base taxinómica prioritaria la morfología de los quistes. Esta base es de particular atracción para los microplanctólogos pero hasta ahora es totalmente insatisfactoria y, como algunas de las otras propuestas, inaplicable en muchos casos (por ejemplo, estudio de muestras fijadas del plancton) y no permite la incorporación del muy gran volumen de conocimiento anterior.

En este género los forcejeos entre «splitters» (pulverizadores o divisores de especies) y «lumpers» (agrupadores o fusionadores) están en plena actividad. Puesto a decidir el autor de estas líneas prefiere, en este caso, actuar como «splitter» por una razón de peso: si bien el desmenuzamiento taxinómico obliga a mucho trabajo extra, sus registros tienen valor perdurable, mientras que la cómoda agrupación de formas parecidas bajo un solo rótulo puede llegar a producir, con el correr del tiempo, pérdida irreparable de muchos datos.

Algunos especialistas norteamericanos prefieren considerar que *A. tamarense*, *A. fundyense*, *A. acatenella* y aún *A. catenella* son sólo variedades de una misma especie. El uso de un solo rótulo para esos tres o cuatro taxones («sibling species» o criptoespecies = miniespecies) los libraría de un estudio fastidioso, pero puede hacer perder mucho valor a sus hallazgos si más tarde se demuestra que esas criptoespecies tienen diferencias fisiológicas, epidemiológicas, etc. de importancia práctica.

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO

Muchos géneros de dinoflagelados (*Ceratium*, *Dinophysis*, *Amphisolenia*, *Histioneis*, *Prorocentrum* y otros) son bastantes fáciles de identificar en observaciones rápidas y sin análisis tabular. No sucede lo mismo con el que estamos tratando porque no tiene ningún gran carácter distintivo salvo, en algunas pocas especies, la formación de cadenas. Sólo con larga experiencia se los discrimina en los exámenes preliminares del plancton. Aún con ella el planctólogo tiene que recurrir con cierta frecuencia al análisis tabular para confirmarlo.

Caracteres negativos, es decir, inexistentes en *Alexandrium* y que, por consiguiente, permiten descartar enseguida cualquier dinoflagelado que los tenga son: espinas o cuernos, aletas cingulares bien desarrolladas, *cingulum* ascendente o fuertemente descendente (más de una vez y media en propia altura),

extremos cingulares entrecruzados, formas muy alargadas o lenticulares. Agreguemos que las membranas sulcales de *Alexandrium* suelen ser muy poco notables y que, en la mayoría de las especies, la superficie tecal es lisa o casi lisa, sólo alterada por pequeños poros; sin embargo en unas pocas especies es esculpida.

Generalmente los individuos son independientes salvo, a veces, en células recién divididas que, como consecuencia de la división, pueden originar cortas cadenas temporarias de dos individuos, excepcionalmente de cuatro o seis. Pero algunas especies forman normalmente cadenas largas (de hasta 64 miembros) que se pueden fragmentar fácilmente por factores mecánicos externos, como fuerte agitación de la muestra.

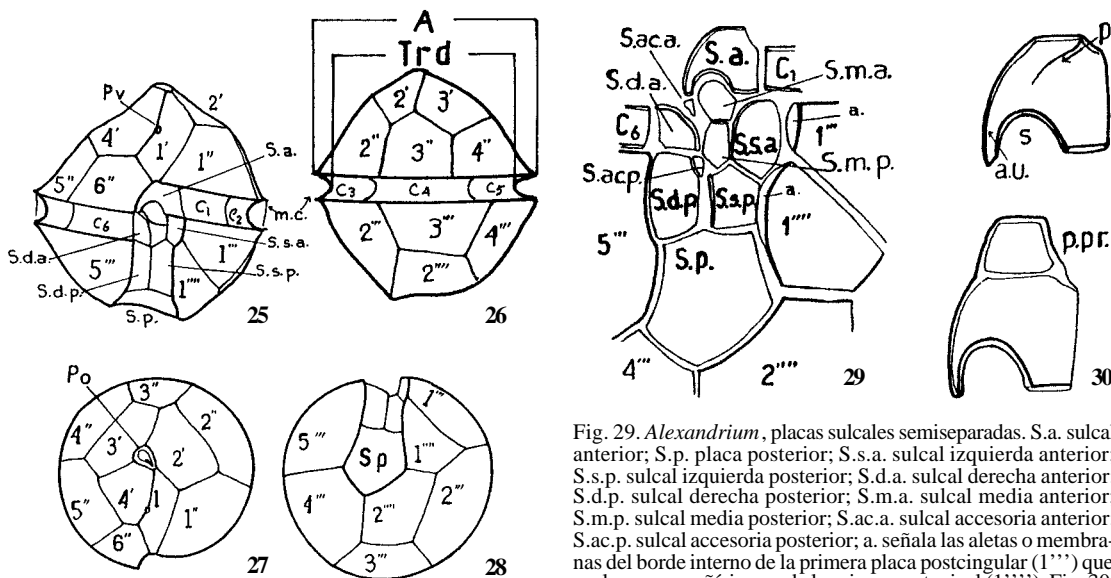
La mayoría de las especies son bastante pequeñas, de 25 a 40 µm de longitud. El contenido celular suele ser oscuro, con numerosos cloroplastos discoidales y cuerpos de reserva (glóbulos de lípidos). El núcleo, con frecuencia bien visible sin tinción, tiene casi siempre forma de banana, alargado transversalmente respecto al eje longitudinal celular.

Con cierta frecuencia este género se presenta en forma masiva, sobre todo en primavera y cerca de frentes oceánicos (Anderson *et al.*, 1982, 1994; Tyler *et al.*, 1982; Carreto *et al.*, 1985). En las especies

concatenadas hay cierta unión protoplasmática de los integrantes de la cadena, la que se hace por un orificio bastante conspicuo de la placa S.p. (Figs. 44 y 48) del individuo anterior que se adosa al de la plaquita Po de la célula subsiguiente. Sin embargo el agujero de conexión suele verse también en la S.p. de especies que no formen cadenas.

Las figuras 25-28 muestran la organización tabular del género *Alexandrium* y la nomenclatura de las placas, y las figuras 29 y 30 los detalles de las placas sulcales.

La fórmula tabular del género es: Po, 4' (o 3' + 1) 6'', 5''', 2''''', 6 C y 10 (o 9) S. Un elemento muy distintivo es la placa del extremo anterior, Po, que es muy distinta de la de *Protoperdinium* y de *Gonyaulax* y que, aunque se asemeja a la de algunos otros géneros, tiene detalles que le son propios. La placa 1' es casi siempre romboidal, oblicua y unida directamente a Po, o indirectamente por una prolongación filiforme. Sin embargo, un grupo bastante reducido de taxones, tiene esa placa de forma diferente, pentagonal asimétrica o trapezoidal, totalmente desconectada de Po. En realidad debiera ser considerada como la primera precingular (1'') pero, por razones de evidente homología, se la trata como la primera apical anómala. Las especies con esta característica constituyen el subgénero *Gessnerium*.



Figs. 25-28. *Alexandrium*. Anatomía tecal esquemática y nomenclatura tabular. Fig. 25. Vista ventral, P.v. poro ventral. Fig. 26. Vista dorsal, se indica la diferencia entre A (ancho) y Trd (Transdiámetro). Fig. 27. Vista apical. Fig. 28. Vista antapical.

Fig. 29. *Alexandrium*, placas sulcales semiseparadas. S.a. sulcal anterior; S.p. placa posterior; S.s.a. sulcal izquierda anterior; S.s.p. sulcal izquierda posterior; S.d.a. sulcal derecha anterior; S.d.p. sulcal derecha posterior; S.m.a. sulcal media anterior; S.m.p. sulcal media posterior; S.ac.a. sulcal accesoria anterior; S.ac.p. sulcal accesoria posterior; a. señala las aletas o membranas del borde interno de la primera placa postcingular (1''') que suele ser pequeñísima, y de la primera antapical (1'''''). Fig. 30. *Alexandrium*, dos sulcales anteriores, la de arriba sin proceso precingular pero con pliegue oblicuo (p), y la de abajo, con proceso precingular (p.pr.). S. señala el seno posterior de la placa (sinus) y au. la apósis unciforme o uncinada.

En *Alexandrium* son frecuentes dos procesos biológicos no registrados con frecuencia en otros géneros: reproducción sexual y formación de estados resistentes o «quistes» durmientes. Estos dos procesos parecen ligados porque esos «quistes» son, por lo menos en los bien estudiados, cigotos (hipnocigotos). Estas formas aseguran a las especies la subsistencia en épocas desfavorables, la expansión de sus áreas de distribución por transporte pasivo y la aparición rápida y masiva de los individuos activos en determinadas áreas en momentos favorables (sobre todo en primavera). Esas masas importantes de pláncton pueden producir alocromías más o menos intensas del agua, que, con alta frecuencia, son verdaderas hemotalias, es decir, rojas. Un fenómeno concomitante muy frecuente es la bioluminiscencia.

El género se divide en dos subgéneros: *Alexandrium* y *Gessnerium*. Ambos fueron propuestos por el egipcio Halim como géneros, pero toda la organización tecal, excepto la epitecal, es de características similares en ambos, por lo que parece aconsejable mantenerlos unidos en un sólo género.

Gessnerium es más heterogéneo que el subgénero tipo por las formas de las placas 1', 6'', 1''' y de algunas de las sulcales, así como por la superficie tecal. En ninguna de sus especies se detectaron las toxinas paralizantes de moluscos (TPM) aunque pueden producir las de otros tipos (ictiotoxinas, hemolisinas).

Subgénero *Alexandrium*

Placa 1' casi siempre romboidal, cuyo extremo anterior tiene, normalmente, claro contacto con Po; a veces aparece alejado de éste pero la unión se hace, asimismo, por una prolongación filamentosa. Con o sin poro ventral.

En aguas que bañan el continente americano al sur del Ecuador, hasta ahora se comprobó la presencia de siete especies. En el Atlántico se registraron: *A. tamarense*, *A. acatenella*, *A. fraterculus*, *A. kutnerae*; *A. tropicale* es más propio de aguas más oceánicas. En el litoral Pacífico se halló *A. catenella*, *A. peruvianum* y *A. fraterculus*.

Clave para ayudar a diferenciar las especies tóxicas de la región

- Especies en cadena A
 Noconcatenadas B

- A Casi siempre con aplastamiento anteroposterior, más anchas que largas, en forma de torta irregular. Po ancha y bastante regular. 1' ancha y sin poro ventral ...
 *A. catenella*
- A' Ligeramente más larga que ancha o, a lo sumo, isodiamétrica. Pequeño poro ventral. Po bastante angosta, irregular, con ángulos agudos y salientes
 *A. fraterculus*
- B Placa 1' angosta, muy curvada, con poro ventral muy grande
 *A. peruvianum*
- B' No así I
- I Placa S.a. con una porción precingular separada de la parte principal por una barra horizontal. Casi siempre L > 50
 *A. kutnerae*
- I' S.a. sin porción precingular. Casi siempre L < 50 .. a
- a Placa Po y 1' no oblicuas; 1' muy angosta. S.p. relativamente angosta
 *A. tropicale*
- aa No así, 1' netamente inclinada respecto al eje de Po b
- b Tercas más o menos isodiamétricas. Longitud de la epiteca más o menos igual que la de la hipoteca. Casi siempre L < 39
 *A. tamarense*
- bb Forma netamente más larga que ancha. Epiteca claramente más alta que la hipoteca, pentagonal alta, casi siempre de lados rectos y «hombros» muy marcados. Generalmente L > 40
 *A. acatenella*

En la clave no se incluye a *A. concavum* por ser una especie netamente oceánica, al parecer de aguas cálidas. Es fácilmente distinguible por su forma pentagonal, de lados casi rectos, apenas flexuosos; a veces se encuentran individuos pareados de una envoltura cística esférica. Es una especie de distribución aún incierta, obtenida pocas veces y en cantidad escasísima. Normalmente de gran tamaño (L puede alcanzar 80 µm).

Alexandrium tamarense (Lebour, 1925) Balech, 1985
 Figs. 31-35

Gonyaulax tamarensis Lebour, 1925:95, fig. 14 (1a-1d).

Gonyaulax excavata (Braarud) Balech, 1971: 20 (non figs. 119-124).

Alexandrium excavatum (Braarud) Balech & Tangen, 1985: 334, figs. 1 (A-L) and fig. 2.

De tamaño mediano o pequeño, isodiamétrica o con muy pequeña diferencia entre L y A y, en este caso, apenas más ancha que larga. Hombros perceptibles aunque no fuertemente marcados. Margen pos-

terior generalmente aplastado o apenas cóncavo, casi siempre ascendente hacia la derecha. Tiene un pequeño poro ventral que puede estar en el borde mayor derecho de 1', más raramente en el de 4' que se une a éste.

Su longitud más frecuente es de 28 a 35 µm; los ejemplares de esta región rara vez exceden los 33 µm.

Esta especie es de vasta distribución y, como suele ocurrir en los taxones que la tienen, muestra variaciones grandes en forma, tamaño y hasta fisiología. Cuando se estudia mucho material de distintas localidades, se ve que, entre ejemplares de gran parecido, hay algunos que se diferencian de otros por detalles pequeños pero constantes. Los cultivos demuestran que son hereditarios. Surgió así una polémica entre los que opinan que diferencias tan pequeñas no tienen validez taxinómica y los que sostienen que su constancia y transmisión hereditaria justifican la separación específica. Aún estos reconociendo la gran afinidad entre todas esas formas, las reúnen bajo el rótulo «grupo *tamarensis*».

A. tamarensis es el gran productor de TPM en el Atlántico y su acción perniciosa tiene gran incidencia negativa desde el punto de vista sanitario y económico en las costas de aguas templadas y templado-frías de diversos mares, sobre todo del Atlántico. En este aspecto su contraparte en el Pacífico es *A. catenella*.

A. tamarensis fue citada con frecuencia (a veces esto ocurre aun hoy) como *Gonyaulax excavata*, *Protogonyaulax excavata* o *Alexandrium excavatum*. El nombre *excavata* fue creado por Braarud (1945) como varietal y luego usado como específico, en combinación con el genérico *Gonyaulax*, por Balech (1971 b). Así se la mantuvo en la literatura mundial por varios años. Ahora ha pasado, al parecer definitivamente a sinónimo más reciente de *tamarensis*. Otros enigmas o problemas relacionados con esta especie (por ejemplo, coexistencia de formas tóxicas y atóxicas, luminiscentes o no, y posibles cambios en requerimientos ecológicos) aún siguen irresueltos.

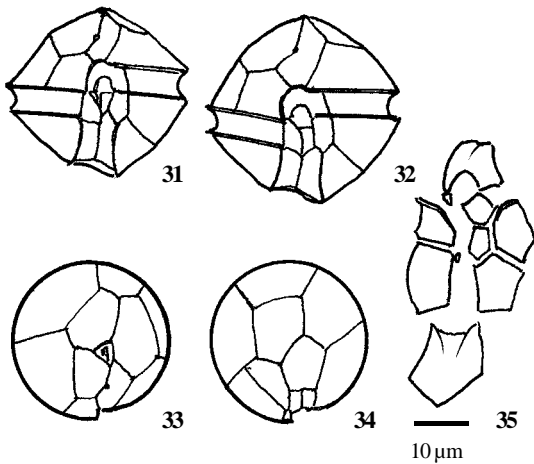
Su presencia ha sido bien comprobada en la mitad norte de la costa argentina, desde algo al sur de la boca del Río de la Plata hasta el sur del Golfo San Jorge, y en Uruguay (Brazeiro *et al.*, 1997). Otras menciones no han sido probadas.

Alexandrium acatenella (Whedon & Kofoid, 1936) Balech, 1985
Figs. 36-40

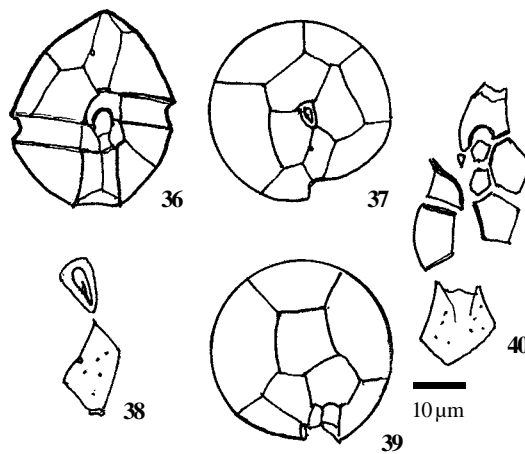
Gonyaulax acatenella Whedon & Kofoid, 1936: 31, figs. 8-12.

Alexandrium acatenella (Whedon & Kofoid) Balech, 1985: 37, fig. 19.

Muy afín a la anterior, de la que no siempre se la distingue con facilidad, es separable de ella por ser netamente más larga que ancha, de tamaño promedio algo mayor, por su epiteca relativamente larga,



Figs. 31-35. *Alexandrium tamarensis*. Fig. 31-32. Ejemplares en vista ventral. Fig. 33. Vista apical. Fig. 34. Vista antapical. Fig. 35. Placas sulcales.



Figs. 36-40. *Alexandrium acatenella*. Fig. 36. Vista ventral. Fig. 37. Vista apical. Fig. 38. Po y 1'. Fig. 39. Vista antapical. Fig. 40. Placas sulcales.

más que la hipoteca, y por su forma general que suele ser más angulosa, con hombros bien marcados, oscuramente heptagonal u octogonal. Los 2/3 posteriores de los flancos epitecales divergen hacia atrás (muy poco) del eje longitudinal de la teca, mientras que en el tercio anterior ambos convergen abruptamente adelante. En algunos pocos individuos la forma es menos angulosa.

Dimensiones: la longitud más frecuente es de 40-45 μm .

Se la identificó varias veces en el norte de Patagonia. Una cita para el norte de Chile (Arica) debe tomarse con reservas.

Es una especie productora de TPM.

Alexandrium catenella (Whedon & Kofoid, 1936)
 Balech, 1985
 Figs. 41-44

Gonyaulax catenella Whedon & Kofoid, 1936:125, figs. 1-7.

Alexandrium catenella (Whedon & Kofoid) Balech, 1985: 37, figs. 2 a-c.

Esta especie, de tamaño pequeño a mediano, tiene dos caracteres que permiten identificarla con bastante facilidad; el más conspicuo es la formación de largas cadenas; el otro es su forma bastante irregular y aplastada anteroposteriormente, lo que la diferencia de la otra especie concatenada de la región: *A. fraterculus*. La placa Po es bastante ancha, de

borde dorsal extenso, recto o ligeramente convexo; tiene un agujero de conexión elíptico, de ubicación dorsal-derecha. La placa 1' suele ser bastante ancha y carece de poro ventral. Algunas de las placas hipotecales tienen arrugas o crestas cortas, irregulares, vermiformes.

Dimensiones: L suele oscilar entre 24 y 35 μm . En las tecas provenientes directamente del plancton el ancho es, casi siempre, mayor. En el material cultivado las variaciones, tanto de la forma como de las dimensiones, pueden ser considerables. En un viejo cultivo de California los individuos eran esferoidales, no formadores de cadenas.

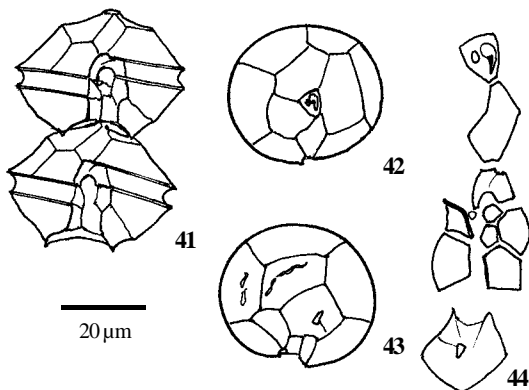
Creo útil resumir las diferencias entre las dos especies formadoras de cadenas de la región.

Esta especie es célebre por ser la primera en la que se verificó producción de TPM y por su abundancia y peligrosidad en aguas templadas del Pacífico. Es de gran importancia en todo el sur de Chile hasta Pto. Montt. Produce un quiste (planocigoto) esferoidal.

Una peculiaridad de su distribución es que, hasta ahora, no está registrada en el Océano Atlántico, salvo, ocasionalmente, en los extremos sur de África y América, donde este océano se comunica con el Pacífico y con el Índico. Es la gran intoxicante del litoral Pacífico templado y frío de América del Sur y del Norte.

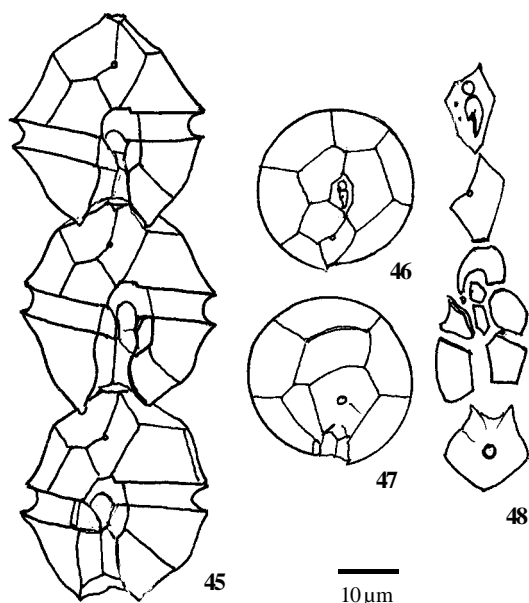
Clave para distinguir las dos especies concatenadas de Sudamérica.

<i>A. catenella</i>	<i>A. fraterculus</i>
Forma más ancha que larga	Tan o más larga que ancha
Sin poro ventral	Con poro ventral
Placa Po ancha, de borde dorsal recto o ligeramente convexo	Placa Po más bien angosta, irregular con prolongaciones dorsal y ventral agudas
Poro de conexión elíptico	Poro de conexión circular



Figs. 41-44. *Alexandrium catenella*. Fig. 41. Segmento de dos individuos de una cadena en vista ventral. Fig. 42. Vista apical. Fig. 43. Vista antapical. Fig. 44. Placas del plano medio ventral, desde Po a S.p.

Empero, observaciones recientes, efectuadas en Estados Unidos, Australia, Japón y España (costa Mediterránea) parecen mostrar una creciente adaptación a aguas más cálidas; las de varias décadas atrás parecían afirmar que no se reproducía a temperaturas mayores de 16°C.



Figs. 45-48. *Alexandrium fraterculus*. Fig. 45. Fragmento de cadena de tres individuos. Fig. 46. Vista apical. Fig. 47. Vista antapical. Fig. 48. Placas del plano medio ventral, desde Po a S.p.

Alexandrium fraterculus (Balech, 1964) Balech, 1985
Figs. 45-48

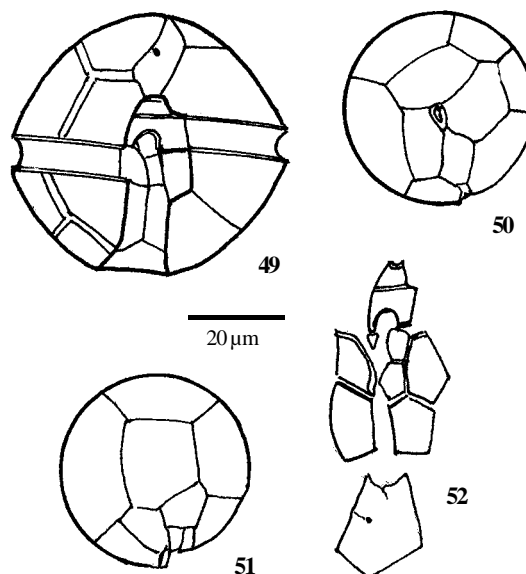
Gonyaulax fratercula Balech, 1964: 31, lam. 4 (47-58).

Alexandrium fraterculus (Balech) Balech, 1985: 37, fig. 4.

Especie formadora de largas cadenas. Cada célula es de forma pentagonal irregular, con hombros bastante marcados, isodiamétrica o un poco más larga que ancha. Las membranas sulcales generalmente se proyectan, aunque modestamente, por detrás del extremo posterior. La placa 1' tiene un pequeño poro ventral y puede ir conectada a Po directamente o, con más frecuencia, indirectamente, por una corta prolongación filiforme. La placa Po es bastante angosta, de forma irregular, con ángulos dorsal y ventral agudos; tiene un gran agujero de conexión circular de posición dorsal derecha. En este taxón esta placa es muy distintiva y, por lo tanto, importante recurso taxinómico.

Dimensiones: L oscila entre 35 y 41 μm ($\pm 2-3$).

Predominantemente en aguas bastante cálidas, encontrada con cierta frecuencia alrededor de la boca del Río de la Plata, pero también en aguas sudbra-



Figs. 49-52. *Alexandrium kutnerae*. Fig. 49. Vista ventral. Fig. 50. Vista apical. Fig. 51. Vista antapical. Fig. 52. Placas sulcales.

sileñas, en la corriente de Brasil y el litoral argentino hasta 38° S. En el Pacífico americano se la registró en el litoral de Ecuador. También fue hallada en Japón, Corea, Tailandia y las Filipinas. En Japón se la clasificó como atóxica pero hay fuertes argumentos para decir que en nuestra región es productora de TPM y responsable de intoxicaciones.

Alexandrium kutnerae (Balech, 1979) Balech, 1985
Figs. 49-52

Gonyaulax kutnerae Balech, 1979: 61, pl. 3 (1-11).

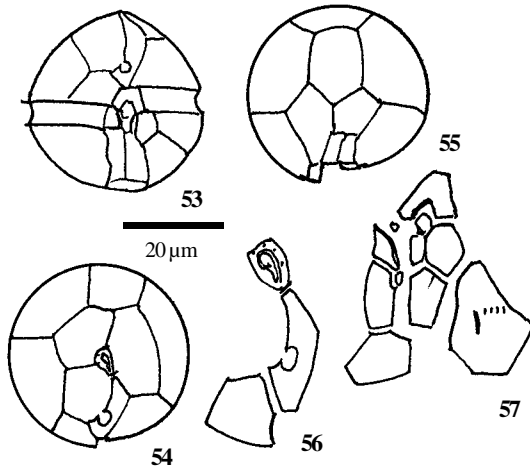
Alexandrium kutnerae (Balech) Balech, 1985: 37, fig. 8 a-c.

Se distingue bastante fácilmente de las otras de la región por su tamaño, su forma casi esferoidal con epiteca semi-elíptica ancha, su hipoteca hemisférica con ligero aplastamiento posterior y, sobre todo, por su placa S.a. alta, cruzada transversalmente, a la altura del borde anterior del extremo izquierdo del *cingulum*, por una fuerte barra. La placa queda así dividida netamente en dos porciones; un cuerpo y una porción precingular trapéfica. No hay en la región otra especie con este tipo de placa. La 1', más bien ancha, tiene un poro ventral que, con frecuencia, queda separado del borde derecho de la placa. La conexión de esta placa con Po puede ser directa o indirecta, en el último caso por un filamento corto.

La teca, de paredes delicadas, se deforma fácilmente.

Dimensiones: L 51-65 µm. El ancho es casi igual a L.

Se la obtuvo sólo en el Atlántico SO, desde el sur de Brasil hasta 38° S. Ignoramos si produce toxinas pero, desde este punto de vista, tiene muy poca importancia por ser siempre escasa.



Figs. 53-57. *Alexandrium peruvianum*. Fig. 53. Vista ventral. Fig. 54. Vista apical. Fig. 55. Vista antapical. Fig. 56. Po, 1' y 6''. Fig. 57. Placas sulcales y 1''''.

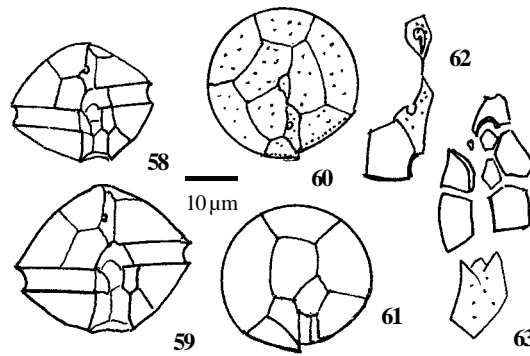
Alexandrium peruvianum (Balech & Mendiola, 1977) Balech & Tangen, 1985
 Figs. 53-57

Gonyaulax peruvianum Balech & Mendiola, 1977: 49, figs. 1-12.

Alexandrium peruvianum (Balech & Mendiola) Balech & Tangen, 1985: 342.

Por su forma ovoide regular muy ancha se parece a la anterior, pero es mucho más pequeña y su S.a. carece de porción precingular. Su característica más destacada es su 1' muy angosta, con porción posterior muy oblicua y poro ventral muy grande. Esto último lo diferencia enseguida de todas las demás especies de la región. Se parece mucho, en cambio, a *A. ostendfeldii* del Hemisferio Norte, de la que podría ser una subespecie o variedad.

Se la obtuvo en aguas del Puerto de Callao.



Figs. 58-63. *Alexandrium tropicale*. Figs. 58-59. Dos tecas en vista ventral. Fig. 60. Vista apical. Fig. 61. Vista antapical. Fig. 62. Po, 1' y 1''. Fig. 63. Placas sulcales.

Alexandrium tropicale Balech, 1985
 Figs. 58-63

Alexandrium tropicale Balech, 1985: 37, fig. 73.

Gonyaulax excavata, sec. Balech, 1976: 28.

Especie pequeña (longitud menor de 31), un poco más ancha que larga, de forma elíptico-pentagonal bastante regular. La epiteca es cónica, ancha, de ápice redondeado. Hipoteca con ligera concavidad o aplastamiento antapical. El carácter más distintivo es que, tanto la plaquita Po como la 1', tienen su eje mayor en el plano longitudinal medio de la célula, no formando entre sí un ángulo definido como en sus otros congéneres. La placa 1' es angosta, de borde postero-derecho proporcionalmente más largo que en las restantes especies. Termina anteriormente en punta, a veces prolongada en una corta formación filamentososa. La S.p. es bastante angosta. Placas epi e hipotocales con poros bastante abundantes, muy densos junto a los bordes pre y postcingulares.

Dimensiones: L 24-30,5 µm, A 15-33 µm.

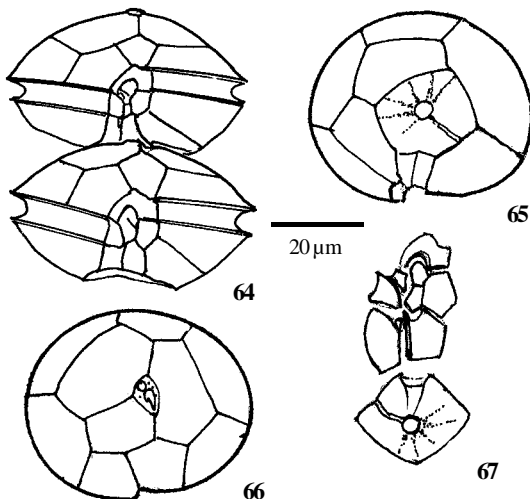
Aparentemente de aguas cálidas y preferentemente oceánicas. Siempre poco abundante. En la región sólo se obtuvieron pocos ejemplares frente a la desembocadura del Río de la Plata. Toxicidad desconocida, de cualquier manera, por su rareza, no tiene importancia toxicológica.

Subgénero *Gessnerium* (Halim, 1967) Balech, 1990

Gessnerium Halim, 1967: 729.

Alexandrium (*Gessnerium*) Balech, 1990: 77.

La característica esencial de este subgénero es la desconexión completa de Po y 1'; por esta razón la



Figs. 64-67. *Alexandrium (Gessnerium) monilatum*. Fig. 64. Dos ejemplares de una cadena, en vista ventral; Fig. 65. Vista apical. Fig. 66. Vista antapical. Fig. 67. Placas sulcales.

última se convierte en placa netamente precingular.

Algunas de sus especies lucen esculturas bastante fuertes. Este subgénero es de morfología general más variable que el subgénero tipo. En ninguna de sus especie se comprobó la producción de TPM pero pueden generar otros tipos de sustancias tóxicas. Algunas producen mucílagos y tienen hábitos bentónicos.

Su especie tipo *A.(G.) monilatum* es la única obtenida en la región.

***Alexandrium (G.) monilatum* (Howell, 1953)**

Balech, 1995

Figs. 64-67

Gonyaulax monilata Howell, 1953:153, fig. 1-5.

Gessnerium mochimaensis Halim, 1967: 729, figs. 49, 101-108.

Gessnerium monilatum (Howell) Loeblich, 1970: 903.

Alexandrium monilatum (Howell) Balech, 1985: 34 (combinación inválida por omisión del basiónimo)

Alexandrium monilatum (Howell) Balech, 1995: 67, figs. 1-16.

Formadoras de cadenas y fuertemente aplastada, se distingue de otras con la primera de esas características por: su ancho que, comparado con su longitud, es mucho mayor que en las dos especies en cadena ya mencionadas; por pertenecer al subgénero *Gessnerium*; por la forma de 1' y por su peculiar

placa S.p. que es de gran tamaño, rómbica casi cuadrada, con el vértice ventral reemplazado por una pequeña cavidad en V, con un agujero de conexión redondo y central del que divergen crestas o pliegues bajos.

Dimensiones: L 38-42 µm; A 39-70 µm.

En la región esta especie sólo fue obtenida en la boca del Río Guayas, es decir, en el límite norte del Pacífico sudamericano. El hallazgo fue bien documentado por el planctólogo ecuatoriano R. Jiménez.

BIBLIOGRAFÍA

- Abé, T.H., 1967a. The armoured dinoflagellata: II Procentridae and Dinophysidae (A). Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 14 (5): 369-389.
- Abé, T.H., 1967b. The armoured dinoflagellata: II Procentridae and Dinophysidae (B). *Dinophysid* and its allied genera. Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 15 (1): 37-78.
- Anderson, D.M., 1995. Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Baut (eds.), *Harmful Algal Blooms*. Lavoisier, Paris: 3-13.
- Anderson, D.M., D.M. Kulis, J.A. Orphanos & A.R. Ceurvels, 1982. Distribution of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* in the southern New England region. *Estuar. Coast. Shelf S.* 14: 447-458.
- Anderson, D.M., D.M. Kulis, G.J. Doucette, J.C. Gallagher & E. Balech, 1994. Biogeography of toxic dinoflagellataes in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada. *Mar. Biol.* 120: 467-478.
- Andreu, B., 1965. Biología del mejillón gallego. *Las Ciencias*, Madrid 30 (2): 107-122.
- Balech, E., 1964. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961-62. *Bol. Inst. Biol. Mar. Mar del Plata* 4: 1-49.
- Balech, E., 1971a. Microplancton de la campaña oceanográfica Productividad III. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. «B. Rivadavia»*, Hidrobiol. 3 (1): 1-202.
- Balech, E., 1971b. Microplancton del Atlántico Ecuatorial Oeste (Equalant I). *Serv. Hidrogr. Naval, Buenos Aires*, H 654: 1-103.
- Balech, E., 1976. Some Norwegian *Dinophysid* species (Dinoflagellata). *Sarsia* 61: 71-94.
- Balech, E., 1979. Tres dinoflagelados nuevos o interesantes de aguas brasileñas. *Bol. Inst. Ocean. San Paulo* 28 (2): 55-64.
- Balech, E., 1985. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 33-38.

- Balech, E., 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr. 1: 1-310.
- Balech, E., 1989. Redescription of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) type species of the genus *Alexandrium*. Phycologia 28 (2): 206-211.
- Balech, E., 1990. A short diagnostic description of *Alexandrium*. In Graneli, E., B. Sundström, L. Edler & D.M. Anderson (eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York: 77.
- Balech, E., 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Special Publication. Cork, Ireland, 151 pp.
- Balech, E. & B.R. Mendiola, 1977. Un nuevo *Gonyaulax* productor de hemotalasia en Perú. Neotropica 23: 49-54.
- Balech, E. & K. Tangen, 1985. Morphology and taxonomy of toxic species in the *tamarensis* group (Dinophyceae) *Alexandrium excavatum* (Braarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) comb. nov. Sarsia 70: 333-343.
- Böhm, A., 1933. Zur Kenntnis der antarktischen Dinophysiaceae. Int. Rev. Jena 29 (1-2): 15-16.
- Braarud, T., 1945. Morphological observations on marine dinoflagellate cultures (*Porellaperforata*, *Gonyaulax tamarensis*, *Protoceratium reticulatum*). Arch. Norske Vidensk. Akad. Oslo, Mat.-Natur. Kl. 1944, 11: 1-18.
- Bursa, A., 1959. The genus *Prorocentrum*; morphodynamics, protoplasmatic structures and taxonomy. Can. J. Bot. 37: 1-31.
- Carreto, J.I., R.M. Negri, H.R. Benavides & R. Akselman, 1985. Toxic dinoflagellate blooms in the Argentina Sea. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York: 147-152.
- Claparède, E. & J. Lachmann, 1858-59. Etude sur les infusoires et les rhizopodes. Mem. Inst. Genevois 5-6, 489 pp.
- Cleve, P.T., 1902. Additional notes on the seasonal distribution of Atlantic Plankton organisms. Göteborgs Vetensk. Handl., Ser. 4, 4: 1-51.
- Costas, E., 1986. Aparición de híbridos interespecíficos de *Prorocentrum micans* y de *P. triestinum* en cultivos experimentales. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 3 (3): 61-66.
- Ehrenberg, C.G., 1834. Dritter Beitrag zur Erkenntnis grosser Organization in der Richtung des kleinsten Raumes. Abh. Konigl. Akad. Wiss. Berlin 1833: 145-336.
- Ehrenberg, C.G., 1840. Über noch jetzt zahlreich lebende Tierarten der Kreidebildung und der Organismen der Polythalamien. Abh. Konigl. Akad. Wiss. Berlin 1839: 81-174.
- Faust, M., 1974. Micromorphology of a small dinoflagellate *Prorocentrum marie-lebouriae* (Parke & Ballantine) comb. nov. J. Phycol. 10: 315-322.
- Faust, M., 1990. Morphological details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including two new species. J. Phycol. 26: 548-558.
- Franks, P.J.S. & D.M. Anderson, 1989. Sampling coastal dinoflagellate blooms: equipment, strategies and data processing. In Hallegraeff, G.M. & J.L. Maclean (eds.), Biology, epidemiology and management of *Pyrodinium* red tides. ICLARM Conference Proceeding 21. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila: 235-256.
- Gourret, P., 1883. Sur les péridiniens du Golf de Marseille. Ann. Mus. Hist. Nat., Marseille, Zool. 1(8): 1-114.
- Halim, Y., 1960. *Alexandrium minutum*, nov. gen. nov. sp., dinoflagellé provocant des eaux rouges. Vie Milieu 11(1): 102-105.
- Halim, Y., 1967. Dinoflagellates of the South East Caribbean Sea (East Venezuela). Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 52: 701-755.
- Howell, J.F., 1953. *Gonyaulax monilata* sp. nov. the causative dinoflagellate of a red tide in the east coast of Florida in August-September 1951. T. Am. Microsc. Soc. 72: 153-156.
- Kofoed, C.A. & J. Michener, 1911. Reports on the scientific results of the expedition to the eastern tropical Pacific («Albatross») 1904-1905. New genera and species of dinoflagellates. Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard Univ. 54 (7): 267-302.
- Lebour, N.V., 1925. The dinoflagellates of the Northern Seas: I-VII. J. Mar. Biol. Assoc. U.K.: 1-250 pp.
- Lee, J.S., 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.
- Lembeye, G., I. Campodonico, L. Guzmán & C. Kiguel, 1981. Intoxicaciones por consumo de mariscos del Estero de Reloncaví (X Región), Chile (1970-1980). Resúmenes de las Jornadas de Ciencias del Mar. Montemar, Chile, 12-14 de agosto de 1981: 33.
- Loeblich III, A.R., 1970. The amphiesma or dinoflagellate cell covering. In Yochelson, E.L. (ed.), Proc. North Am. Paleont. Convention, Chicago. Allen Press, Lawrence, Kansas. Part G: 867-929.
- Martin, G.W., 1929. Three new dinoflagellates from New Jersey. Bot. Gaz., May: 556-558.
- Parke, M. & D. Ballantine, 1957. A new marine dinoflagellate: *Exuviaella marie-lebouriae* n. sp. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 36 (3): 643-650.
- Paulsen, O., 1904. Plankton investigations in the waters round Iceland in 1903. Medd. Komm. Hav., Kjöbenhavn, Ser. Plankton 1 (1): 1-40.
- Paulsen, O., 1949. Observations on dinoflagellates. K. Dan. Vidensk. Selsk. Biol. Skr. 6 (4): 1-67.
- Pavillard, J., 1916. Recherches sur les Péridiniens du Golfo

- du Lion. Trav. Inst. Bot. Univ. Montpellier, Ser. Mixte Mem. 4: 9-70.
- Pavillard, J., 1923. A propos de la systématique des Péridiniens. Bull. Soc. Bot. Fr. 70 (4ème Sér. 23): 876-882.
- Saville Kent, W., 1880-82. A manual of Infusoria. Bogue, London 1:1-472.
- Schiller, J., 1933. Dinoflagellata (Peridineae). In Rabenhorst's Kryptogamenflora. Akademische Verlags., Leipzig 10 (1): 1-589.
- Scholin, C.A. & D.M. Anderson, 1993. Population analysis of toxic and non toxic *Alexandrium* species using ribosomal RNA signature sequences. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 95-102.
- Scholin, C.A. & D.M. Anderson, 1994. Identification of group- and strain- specific genetic markers for globally distribute *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of SSu rRNA genes. J. Phycol. 30: 744-754.
- Scholin, C.A. & D.M. Anderson, 1996. LSU rDNA-based RFLP assay for discriminating species and strains of *Alexandrium* (Dinophyceae). J. Phycol. 32: 1022-1035.
- Scholin, C.A., G.M. Hallegraeff & D.M. Anderson, 1995. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* «species complex» (Dinophyceae): dispersal in the North American and West pacific regions. Phycologia 34 (6): 422-485.
- Schüt, F., 1895. Die Peridineen der Plankton Expedition. I. Studien über die zellen der Peridineen. Ergeb. Plankton Exped. 4: 1-170.
- Sommer, H., W.F. Whedon, C.A. Kofoid & R. Stohler, 1937. Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus *Gonyaulax*. Arch. Pathol. 24: 537-559.
- Silva, E.S. da, 1979. Intracellular bacteria, the origin of the dinoflagellate toxicity. In Proc. Int. IUPAC Symposium on Mycotoxins & Phycotoxins. Pahotox Publ., Lausanne: 8.
- Silva, E.S. da, 1990. Intracellular bacteria, the origin of dinoflagellate toxicity. SEPTO 10 (3): 124-128.
- Steidinger, K.A., 1971. *Gonyaulax balechii* sp. nov. (Dinophyceae) with a discussion of the genera *Gonyaulax* and *Heteraulacus*. Phycologia 10: 183-187.
- Stein, F.R., 1883. Der Organismus der Arthrodelen Flagellaten, nach eigene Forschungen in Systematischer Reihenfolge bearbeitet. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 30 pp.
- Taylor, F.J.R., 1976. Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A Report on material collected by the RV «Anton Bruun». Bibliotheca Botanica, Stuttgart 132:1-234.
- Taylor, F.J.R., 1979. The toxigenic *Gonyaulacoid* dinoflagellates. In Taylor, D.L. & H.H. Seliger (eds.), Toxic Dinoflagellates Blooms. Elsevier, New York: 47-56.
- Taylor, F.J.R., 1980. On Dinoflagellate evolution. BioSystems 13: 1-44.
- Tyler, M.A., D.W. Coats & D.M. Anderson, 1982. Encystment in a dynamic environment: disposition of dinoflagellate cysts by a frontal convergence. Mar. Ecol. Prog. Ser. 7: 163-173.
- Whedon, W.F. & C.A. Kofoid, 1936. Dinoflagellates of the San Francisco Region. I. On the skeletal morphology of two new species, *Gonyaulax catenella* and *G. acatenella*. Univ. Calif. Publ. Zool. 41: 25-34.
- Yasumoto, T., W. Sugawara, Y. Fukuyo, H.H. Oguri, T. Igarashi & N. Kujita, 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. B. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46 (11): 1405-1411.

CAPÍTULO 5: DINOFLAGELADOS ATECADOS POTENCIALMENTE TOXÍGENOS EN EL CONO SUR AMERICANO

JACOB LARSEN

IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster
Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca

INTRODUCCIÓN	147
ASIGNACIÓN GENÉRICA DE LOS DINOFLAGELADOS DESNUDOS	147
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	148
SISTEMÁTICA	148
<i>Amphidinium</i> Claparède & Lachmann.....	148
<i>Amphidinium carterae</i> Hulburt	149
<i>Amphidinium operculatum</i> Claparède & Lachmann	149
<i>Gymnodinium Stein emend.</i> G. Hansen & Moestrup	150
<i>Gymnodinium catenatum</i> Graham	150
<i>Karenia</i> G. Hansen & Moestrup	151
<i>Karenia mikimotoi</i> (Miyake & Kominami ex Oda) G. Hansen & Moestrup	151
<i>Karlodinium</i> J. Larsen	151
<i>Karlodinium micrum</i> (Leadbeater & Dodge) J. Larsen	152
<i>Noctiluca scintillans</i> (Macartney) Ehrenberg	152
BIBLIOGRAFÍA	152

DINOFLAGELADOS ATECADOS POTENCIALMENTE TOXÍGENOS EN EL CONO SUR AMERICANO

JACOB LARSEN

IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster
Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca

INTRODUCCIÓN

Casi todas las especies de dinoflagelados poseen placas celulósicas en el anfiema (Roberts, 1991), y pertenecen al grupo de lo que coloquialmente se conoce como dinoflagelados «armados» o «tecados». Los dinoflagelados «atecados» o «desnudos», objeto de este capítulo, carecen de placas celulósicas en el anfiema. La mayor parte de los dinoflagelados desnudos pertenecen a los órdenes Oxyrrhinales, Actinicales, Noctilucales y Gymnodiniales. No obstante, hay especies de dinoflagelados tecados, pertenecientes a los órdenes Desmomonadales, Dinotrichales, Dinamoebales, Dinococcales y Brachydiniales, que presentan formas desnudas en ciertos estadios de su ciclo vital (Larsen & Sournia, 1991).

En comparación con la de muchos otros grupos de flagelados, la taxonomía de los dinoflagelados presenta muchas lagunas de conocimiento, y es poco robusta. La definición de taxa de dinoflagelados se basa, casi invariablemente, en caracteres morfológicos clásicos, mientras que las características estructurales finas y los datos moleculares, ampliamente utilizados hoy día para definir taxa en otros grandes grupos de flagelados, no han hecho más que empezar a aplicarse en la moderna taxonomía de dinoflagelados. Los estudios de estructuras finas de especies desnudas, si bien aún escasos en comparación con la diversidad de especies, indican que hay géneros bien establecidos, como *Gymnodinium*, que posiblemente sean polifiléticos, por lo que es de esperar que en el futuro próximo se dividan en un número de géneros nuevos (Daugbjerg *et al.*, 2000). Un ejemplo ilustrativo lo constituye *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) Hansen & Moestrup (= *G. sanguineum*), cuyo aparato flagelar presenta mayor similitud con *Polykrikos kofoidii* Chatton que con otras especies de *Gymnodinium* (Roberts, 1991). Los estudios moleculares apoyan la opinión de que

los Gymnodiniales, tal como se conocen actualmente, constituyen un grupo polifilético (Saunders *et al.*, 1997; Daugbjerg *et al.*, 2000).

Varios grupos de dinoflagelados desnudos, por ej., *Amphidinium*, *Gymnodinium* y *Gyrodinium*, comprenden especies tanto fotótrofas, como heterótrofas o mixótrofas; en algunos géneros incluso coexisten distintos tipos de cloroplastos (Larsen & Sournia, 1991). Esta característica, muy inusual desde un punto de vista taxonómico, no se da en otros grupos de algas, y apoya aún más el sospechado carácter polifilético de estos géneros.

ASIGNACIÓN GENÉRICA DE LOS DINOFLAGELADOS DESNUDOS

Tradicionalmente, la asignación genérica de los Gymnodiniales se ha basado en caracteres morfológicos relacionados con el *cingulum*. La posición del *cingulum*, el posible desplazamiento de sus extremos, y el número de vueltas que da alrededor del cuerpo celular, se han utilizado ampliamente en la clasificación genérica. Así, en el caso de *Gymnodinium*, el *cingulum* es ecuatorial, pero los extremos no lo son, o están ligeramente desplazados. En *Gyrodinium*, la posición del *cingulum* es también ecuatorial, pero los extremos, en este caso, están desplazados al menos 1/5 de la longitud celular (Kofoid & Swezy, 1921). La dislocación cingular también se observa en *Amphidinium*, donde se localiza cerca del extremo anterior de la célula; y en *Katodinium*, donde se sitúa en la zona posterior. En estos géneros (*Amphidinium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, y *Katodinium*), el *cingulum* gira una vez, o un poco más de una vez alrededor de la célula, mientras que en *Cochlodinium*, rota una vez y media.

La aplicación de estos caracteres descriptivos no siempre es muy clara. La dislocación del *cingulum*

es un carácter cualitativo, y los límites entre, por ej., *Amphidinium* y *Gymnodinium*, no son claros, y se interpretan de distinta manera según los autores. Así, en el caso de la especie tipo de *Amphidinium*, *A. operculatum*, el *cingulum* está fuertemente dislocado y aparece como un collar alrededor del epicono con forma de lengua (Fig. 2). Otras especies con dislocación menos pronunciada del *cingulum* han sido asignadas indistintamente a los géneros *Amphidinium* o *Gymnodinium*, incluso por el mismo autor (compárese *A. pelagicum* y *G. achromaticum*, en Lebour, 1925). Tampoco están muy claros los límites entre *Gymnodinium* y *Katodinium*. En este último género, el *cingulum* presenta dislocación posterior, pero *Katodinium glaucum* (Lebour) Loeblich III ha sido adscrito al género *Gyrodinium* por algunos autores (por ej., Dodge, 1982) debido al gran desplazamiento del extremo del *cingulum*.

La distinción entre *Gymnodinium* y *Gyrodinium* se basa en el desplazamiento cingular. Podría parecer que un desplazamiento cingular superior a 1/5 de la longitud celular es un carácter objetivo. Sin embargo se ha mostrado que, al menos en algunas especies, el desplazamiento cingular no es un carácter conservador, sino que varía con la edad celular (Kimball & Wood, 1965). El desplazamiento cingular parece ser equivalente a 1/5 de la longitud celular en muchas especies, con lo cual su asignación al género *Gymnodinium* o *Gyrodinium* resulta arbitraria. Un buen ejemplo de ello es *Gyrodinium aureolum* Hulburt *sensu* Braarud & Heimdal, y *Karenia mikimotoi* (Miyake & Kominami ex Oda) Hansen & Moestrup (= *Gymnodinium mikimotoi*), que se consideran ahora conespecíficas (Hansen *et al.*, 2000). Desde hace tiempo resultaba obvia la poca consistencia de los caracteres empleados para distinguir los géneros, pero la falta de caracteres adicionales o alternativos ha impedido avances apreciables en este campo. Los estudios de Daugbjerg *et al.* (2000) podrían contribuir a clarificar las fronteras genéricas entre los Gymnodiniales (ver la sección sistemática más adelante).

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Las especies de dinoflagelados desnudos se distinguen por caracteres morfológicos, tales como:

- el tamaño, forma, posición y morfología del *cingulum* (desplazamiento y/o descolgamiento) y el *sulcus*.
- presencia/ausencia de cloroplastos y pirenoides.
- forma y posición del núcleo.
- forma de la hendidura apical (si existe).
- posibles estructuras superficiales, por ej. rayas longitudinales.
- observación de otras características adicionales, por ej., manchas oculares, apéndices específicos, etc.

Los dinoflagelados desnudos - a diferencia de los dinoflagelados tecados - no poseen una pared celular funcional, lo que implica que, por lo general, no mantienen su forma tras ser fijados. Existen otras importantes características morfológicas que se alteran tras la fijación, o tras observaciones prolongadas al microscopio. Por tanto, la identificación crítica de especies de dinoflagelados desnudos requiere normalmente la observación de células vivas.

En muchas especies existe una hendidura apical, pero con frecuencia resulta difícil observarla al microscopio óptico (Takayama, 1985). Esta hendidura suele ser muy delicada, por lo que se destruye en el material fijado y se deteriora durante la observación de células vivas al microscopio. En algunas especies, las estrías longitudinales son también muy delicadas. Según la experiencia del autor de este capítulo, no es de esperar el poder identificar todas las especies de dinoflagelados desnudos presentes en una muestra. Algunas especies son bastante robustas y se mantienen en buenas condiciones durante muchos minutos cuando se observan al microscopio, mientras que las especies más delicadas se deterioran a los pocos minutos de observación. En el caso de estas últimas, tan sólo se puede esperar la identificación de unas pocas células por cada preparación. Algunas descripciones de dinoflagelados desnudos se han basado, sin duda, en material fijado (véase, por ej., Schiller, 1933). Su carácter «no-fijable» es la principal razón por la que la taxonomía de los dinoflagelados desnudos es aún inadecuada y con muchas especies malamente descritas que probablemente no podrán ser nunca identificadas.

SISTEMÁTICA

Amphidinium Claparède & Lachmann

El *cingulum* está fuertemente dislocado hacia el extremo anterior de la célula, por lo que el epicono es pequeño, a menudo con forma de dedo o de gorrito, y está situado en la parte superior de la célula. No obstante, se observan considerables variaciones

morfológicas en este género, y en algunas especies, el epicono y el hipocono son casi del mismo tamaño. Así pues, el género no presenta unos límites claros con *Gymnodinium* y la adscripción de especies es a menudo arbitraria (véase discusión anterior).

La especie tipo de *Amphidinium*, *A. operculatum* Claparède & Lachmann, tiene un epicono con forma de dedo, y es, junto con *A. carterae* Hulburt y *A. rhynchocephalum* Anissimowa, lo que actualmente se concibe como un auténtico *Amphidinium*. Los datos moleculares sugieren que, en contra de lo que se creía hasta ahora, este grupo de especies no están estrechamente relacionadas con *Gymnodinium* (Daugbjerg *et al.*, 2000). No obstante, no se dispone de un examen detallado de la especie tipo, examen que será necesario antes de poder tratar adecuadamente los problemas taxonómicos de este grupo.

En la actualidad, existen más de 100 especies autótrofas o heterótrofas descritas que se incluyen en el género *Amphidinium*, pero la mayor parte de ellas deberán ser reexaminadas para determinar su filiación genética. Las especies de este género se encuentran sobretodo en habitats de agua salada o salobre, y muchas de ellas son bentónicas.

Amphidinium carterae Hulburt

Fig. 1

Sinónimos: Ver comentarios

Descripción: Células más ó menos ovaladas, aplastadas dorso-ventralmente. El episoma es pequeño, con forma de media luna o con forma de lengua, desviado hacia la izquierda, describiendo una espiral descendente que está desplazada 2-3 veces la anchura del *cingulum*. Posee un cloroplasto muy ramificado normalmente en posición periférica, con un gran pirenoide central. El núcleo tiene forma de media luna y está situa-

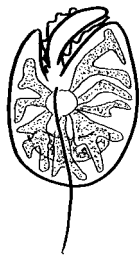


Fig. 1. *Amphidinium carterae*

do en el hiposoma.

Longitud: 12-18 μm ; anchura: 8-10 μm .

Comentarios: *Amphidinium carterae* pertenece a un grupo de especies en el que se incluye *A.*

operculatum Claparède & Lachmann, la especie tipo del género (ver a continuación).

Amphidinium carterae y *A. operculatum* (al igual que *A. klebsii*) son las especies más citadas del complejo, pero no siempre se pueden distinguir con claridad. Según Taylor (1971), se pueden distinguir por la morfología del cloroplasto. También debería considerarse el tamaño de las células: *A. carterae* parece ser más pequeña (Hulburt, 1957, indicó una longitud de 12-15 μm) que *A. operculatum* (Claparède & Lachmann indicaron una longitud de 50 μm para *A. operculatum* y Kofoid & Swezy, 1921, indicaron una longitud de 46 μm para *A. klebsii*).

A. carterae puede producir compuestos hemolíticos y podría estar implicado en la ciguatera (Tindall & Morton, 1998).

Distribución: Esta especie parece estar ampliamente distribuida. Se ha registrado tanto en zonas templadas como tropicales. No obstante, debido a problemas taxonómicos persistentes (ver comentarios de abajo), es difícil evaluar las citas previas de este taxón.

Amphidinium operculatum Claparède & Lachmann

Fig. 2

Sinónimos: *A. klebsii* Kofoid & Swezy

Descripción: Esta especie se asemeja a *A. carterae* por tener células más o menos ovaladas con un episoma con forma de pequeña lengua desviada hacia la izquierda. Contiene numerosos cloroplastos largos y esbeltos unidos a un gran pirenoide localizado en la parte central del hiposoma.

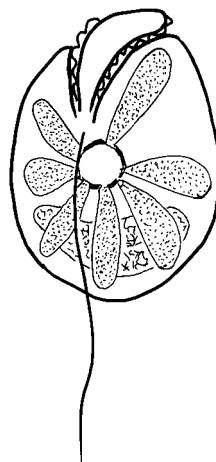


Fig. 2. *Amphidinium operculatum*

Longitud: 20-46 μm ; anchura: 14-30 μm .

Comentarios: Esta especie puede ser indistinguible de *A. carterae*, pero se puede diferenciar por su mayor tamaño y por los numerosos cloroplastos alargados unidos al gran pirenoide (Taylor,

1971) (ver también los comentarios sobre *A. carterae*).

A. operculatum, al igual que *A. klebsii*, puede producir compuestos hemolíticos y podría estar implicada en la ciguatera (Tindall & Morton, 1998).

Distribución: *Amphidinium operculatum* se ha citado en varias ocasiones en los mismos puntos y localidades que *A. carterae*. De momento, no es posible establecer la distribución precisa de las dos especies (ver comentarios de *A. carterae*).

***Gymnodinium* Stein emend. G. Hansen & Moestrup**

Tradicionalmente se asignaron al género *Gymnodinium* los dinoflagelados atecados con el *cingulum* situado en la región ecuatorial de la célula y con un desplazamiento cingular inferior a 1/5 de la longitud celular. Según la descripción enmendada del género, los *Gymnodinium* verdaderos se caracterizan también por ciertos rasgos ultraestructurales y por una hendidura apical con forma de herradura que describe una trayectoria en sentido contrario a las agujas del reloj (Daugbjerg *et al.*, 2000).

Existen más de 200 especies, fotótrofas ó heterótrofas, citadas como pertenecientes al género *Gymnodinium*. La mayor parte de ellas aparecen en habitats marinos.

***Gymnodinium catenatum* Graham**

Fig. 3

Descripción: Células que forman cadenas de 4, 8, 16 células y ocasionalmente más largas. Las condiciones adversas pueden provocar la ruptura de las cadenas y dar lugar a células individuales, y es posible que existan clones no formadores de cadenas. El *cingulum* describe una espiral descendente que puede estar desplazada hasta 1/5 de la longitud celular. El *sulcus* se extiende desde el antápice hasta el ápice, que también aparece rodeado de un anillo apical semicircular. Poseen numerosos cloroplastos con pirenoides muy conspicuos. Los rangos de talla citados son: 34-65 µm de largo y 27-43 µm de ancho para las células solitarias; 23-60 µm de largo y 27-43 µm de ancho para las células formadoras de cadenas, siendo la célula terminal del mismo tamaño que una célula solitaria.

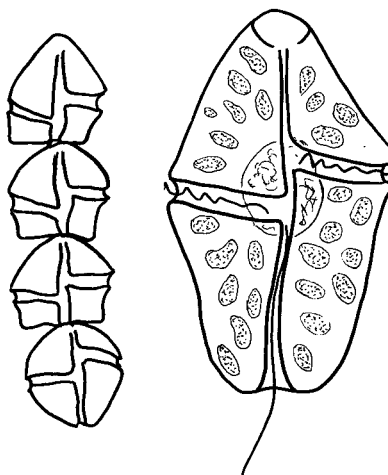


Fig. 3. *Gymnodinium catenatum* (dibujos a diferente escala).

Comentarios: *Gymnodinium catenatum* es el único dinoflagelado desnudo conocido que produce toxinas paralizantes (PSP). Se distingue de otras especies de *Gymnodinium* porque forma cadenas, pero puede confundirse tan sólo con la especie no-tóxica *Gymnodinium impudicum* (Fraga & Bravo) G. Hansen & Moestrup. *G. impudicum* se distingue por su menor tamaño (aprox. 25 µm de largo), y por la hendidura apical, que es una prolongación del *sulcus* (Fraga *et al.*, 1995). La mejor forma de identificar las células individuales de *G. catenatum* es por sus grandes pirenoides y por su marcado *sulcus*.

El ciclo vital de *Gymnodinium catenatum* ha sido estudiado por Anderson *et al.* (1988) y Blackburn *et al.* (1989), quienes encontraron que se podía inducir la reproducción sexual en condiciones de insuficiencia de nutrientes, y que los gametos eran indistinguibles de las células vegetativas (hologamia) y de carácter heterotálico. Los quistes de resistencia (hipnozigotos) son redondos (42-52 µm de diámetro) y de color marrón, con reticulaciones microscópicas. Los quistes pueden viajar a distancias considerables, por ej., a través del agua de lastre de los barcos, y así colonizar áreas nuevas (Hallegraeff & Bolch, 1991, 1992).

Distribución: Especie registrada en diversas regiones de aguas cálido-templadas del Atlántico centro oriental (España, Portugal, Marruecos) y sudoccidental, mares Mediterráneo y Caribe (Venezuela), Pacífico este (México) y oeste (Filipinas, Japón, Malasia, Tailandia, Tasmania) (Hallegraeff & Fraga, 1998). En el Cono Sur se ha registrado en distintas ocasiones en Argentina (Balech, 1988) y

Uruguay (Méndez, 1993), y más recientemente en Brasil (Proença *et al.*, en prensa). *G. catenatum* es el agente de episodios moderados de PSP en Argentina en otoño (Akselman *et al.*, 1998). Según Carreto *et al.* (1986), esta especie podría haber sido recientemente introducida en esta parte de Sudamérica. La especie ha sido citada en India (Godhe *et al.*, 1996), Costa Rica (Viquez, Phycotoxins list, datos no publ.) y Nueva Zelanda (MacKenzie, Phycotoxins list, datos no publ.).

***Karenia* G. Hansen & Moestrup**

Este género se ha creado recientemente para acomodar a las especies de gymnodinioides con una hendidura apical recta y con derivados de fucoxantina como pigmentos fotosintéticos accesorios (Daugbjerg *et al.*, 2000). Comprende la muy conocida especie tóxica *K. brevis* (Davis) Hansen & Moestrup (sin. *Gymnodinium breve* Davis 1948 y *Ptychodiscus brevis* (Davis) Steidinger), y la especie *K. brevisulcatum* (sin. *G. brevisulcatum*) recientemente descrita.

***Karenia mikimotoi* (Miyake & Kominami ex Oda) G. Hansen & Moestrup**

Fig. 4

Sinónimos: *Gymnodinium mikimotoi* Miyake & Kominami ex Oda (Oda 1935, pp. 38-39); *Gymnodinium nagasakiense* Takayama & Adachi 1984; *Gymnodinium* sp.1 (Adachi, 1972); *Gymnodinium* tipo '65 (Iizuka & Irie, 1969); *Gyrodinium aureolum* Hulburt 1957, *sensu* Braarud & Heimdal.

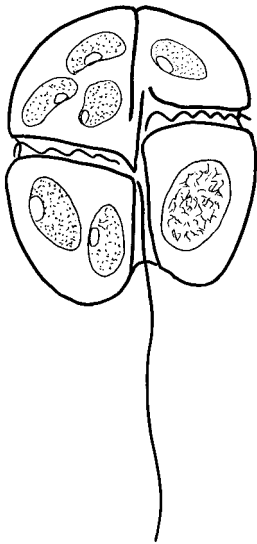


Fig. 4. *Karenia mikimotoi*

Descripción: El contorno celular es variable, ovalado a casi redondo, aplastado dorsoventralmente. El *cingulum* es ancho y describe una espiral descendente, desviado aproximadamente 1/5 de la longitud celular. El *sulcus* se adentra por una cor-

ta distancia en el epicono, donde también se extiende una hendidura apical formando una línea recta que parte de cerca de la intrusión sulcal a través del ápice, y continúa por un corto tramo sobre el lado dorsal de la célula. Posee varios cloroplastos, más ó menos ovalados, con un conspicuo pirenoide cada uno. El núcleo está localizado en la parte izquierda del epicono. Longitud: 24-40 μ m; anchura 20-32 μ m.

Comentarios: Diversos autores (por ej.: Taylor, 1985; Partensky *et al.*, 1988; Fukuyo *et al.*, 1990; Hallegraeff, 1991) apreciaron la similitud morfológica entre *K. mikimotoi* del Pacífico y el *Gyrodinium aureolum* europeo. Hansen *et al.* (2000) realizaron un detallado estudio sobre este tema y concluyeron que todos los aislamientos de *G. aureolum* o de *G. nagasakiense* europeos eran conoespecíficos con las cepas japonesas de *G. mikimotoi* y que *Gyrodinium aureolum* Hulburt es una especie distinta que ha sido transferida al género *Gymnodinium*. *K. mikimotoi* es similar a *Gymnodinium pulchellum*, que se distingue del primero por su hendidura apical sigmoidal. No obstante, hay que señalar que en Australia se han observado otras especies, presumiblemente muy relacionadas, pero aún no descritas (*Gyrodinium* sp.1, Bolch & Hallegraeff, 1990; Hallegraeff, 1991: Figs 8I, J), por lo que conviene extremar las precauciones cuando se trabaja con estas especies.

Karenia mikimotoi produce toxinas hemolíticas e ictiotoxinas. En aguas estratificadas, puede desarrollar floraciones subsuperficiales localizadas en la picnoclina (Lindahl, 1986; Bjørnsen & Nielsen, 1991; Gentien, 1998).

Distribución: *Karenia mikimotoi* está ampliamente distribuida y ha formado floraciones que han causado graves daños en los cultivos del norte de Europa, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Recientemente tuvo lugar una mortandad de peces en Chile (Clément *et al.*, 1999) que se atribuyó a una especie de *Gymnodinium* con aspecto similar a *K. mikimotoi*.

***Karlodinium* J. Larsen**

Este género se caracteriza sobretodo por sus rasgos ultraestructurales, entre los que citaremos un anfiesma con agrupaciones de estructuras con forma de enchufe, con una configuración hexagonal. Además, las células poseen cloroplastos con pirenoides internos lenticulares, y con fucoxantina o derivados de ésta como principal pigmento accesorio. La hendidura apical es recta.

Karlodinium micrum (Leadbeater & Dodge) J. Larsen

Fig. 5

Sinónimos: *Woloszynskia micra* Leadbeater & Dodge 1966: p.1; *Gymnodinium galatheanum* Braarud 1957 *sensu* Kite & Dodge, 1988; *Gymnodinium micrum* (Leadbeater & Dodge) Loeblich III 1969; *Gyrodinium galatheanum* (Braarud) Taylor, 1992.

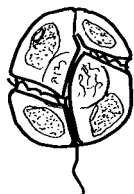


Fig. 5. *Karlodinium micrum*

Descripción: Las células tienen forma entre ovalada y redonda. El *cingulum* está profundamente excavado, describiendo una espiral descendente que está desplazada aproximadamente 1/5 de la longitud celular. El *sulcus* está fuertemente desviado en la región intercingular y se extiende por el epicono. Cada célula contiene normalmente dos cloroplastos, uno en el epicono y otro en el hipocono.

También posee un pedúnculo y un poro ventral en el epicono que son visibles al microscopio óptico. Longitud: 9-17 μm ; anchura 8-14 μm .

Comentarios: La morfología general de *K. micrum* está compartida por varias especies de dinoflagelados desnudos de pequeño tamaño, entre las que se incluyen *G. corsicum* Paulmier, Berland, Billard & Nezan, *G. galatheanum* Braarud; *G. veneficum* Ballantine, y *G. vitiligo* Ballantine. *Karlodinium micrum* se considera conespecífica con *G. galatheanum*, mientras que el *status* taxonómico de las otras especies es incierto (Daugbjerg *et al.*, 2000).

Karlodinium micrum ha demostrado ser tóxico para los mejillones y para los estadios juveniles de bacalao (*Gadus morhua*).

Distribución: Esta especie se ha registrado en el Atlántico Norte y en el Sur. Posiblemente sea de distribución muy amplia, pero puede pasar desapercibida con facilidad debido a su pequeño tamaño.

Noctiluca scintillans (Macartney) Ehrenberg

Fig. 6

Sinónimos: *Noctiluca miliaris* Suriray

Descripción: Las células son alargadas y con forma más o menos de balón, con tentáculo estriado.

Son fagótroficas y generalmente incoloras. En ciertas regiones tropicales pueden adquirir color verde por la presencia de flagelados endosimbóticos. Diámetro: 200-2000 μm .

Comentarios: Las floraciones de *N. scintillans* pueden causar intensas discoloraciones del agua de mar. Puede ser bioluminiscente, excepto en algunas partes del norte y el este del océano Pacífico. Acumula grandes cantidades de amonio en sus vacuolas, por lo que puede resultar tóxico para los peces.

Distribución: *Noctiluca scintillans* está ampliamente distribuida y ha formado floraciones en aguas templadas, subtropicales y tropicales.

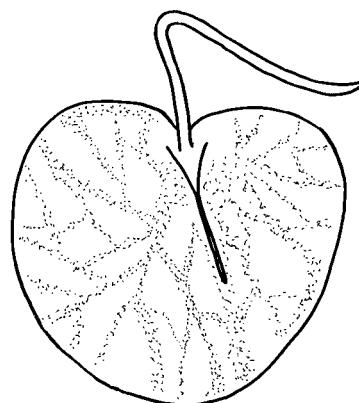


Fig. 6. *Noctiluca scintillans*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, R., 1972. A taxonomical study of the red tide organisms. J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie 9: 9-145 (en japonés con resumen en inglés).
- Anderson, D.M., D.M. Jacobson, I. Bravo & J.H. Wrenn, 1988. The unique, microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. J. Phycol 24: 255-262.
- Akselman, R., J.I. Carreto & N.G. Montoya, 1998. *Gymnodinium catenatum* and autumn toxicity in Northern shelf waters of Argentina. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 122-123.
- Balech, E., 1988. Los Dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Publ. Espec. Ins. Esp. Oceanogr. 1: 1-310.
- Bjørnsen, P.K. & T.G. Nielsen, 1991. Decimeter scale heterogeneity in the plankton during a pycnocline bloom of *Gyrodinium aureolum*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 73:263-267.
- Blackburn, S. I., G. M. Hallegraeff & C. J. Bolch, 1989.

- Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham. *J. Phycol.* 25: 577-90.
- Bolch, C.J. & G.M. Hallegraeff, 1990. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from Tasmania, Australia. *Bot. Mar.* 33: 173-192.
- Braarud, T., 1957. A red water organism from Walvis Bay. *Galathea Reports* 1: 137-138.
- Carreto, J.I., H. Benavides, R. Negri & P. Glorioso, 1986. Toxic red tide in the Argentine Sea. Phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. *J. Plankton Res.* 8 (1): 15-28.
- Clément, A., M. Seguel & G. Arzul, 1999. Fish kill in Chile associated with bloom of *Gymnodinium* sp. *Harmful Algal News* 19, IOC of UNESCO: 5-6.
- Daugbjerg, N., G. Hansen, J. Larsen & Ø. Moestrup, 2000. Phylogeny of some major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of 3 new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39 (4): 302-317.
- Davis, C.C., 1948. *Gymnodinium brevis* sp. nov., a cause of discolored water and animal mortality in the Gulf of Mexico. *Botanical Gazette* 109: 358-360.
- Dodge, J.D., 1982. Marine dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationary Office, London, 303 pp.
- Fraga, S., I. Bravo, M. Delgado, J.M. Franco & M. Zapata, 1995. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia* 34 (6): 514-521.
- Fukuyo, Y., H. Takano, M. Chihara & K. Matsuoka, 1990. Red tide organisms in Japan - an illustrated taxonomic guide. Uchida Rokakuho, Tokyo, 407 pp. (en japonés con resúmenes en inglés).
- Gentien, P., 1998. Bloom dynamics and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. In Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. NATO ASI Series, vol. G 41, Springer Verlag, Berlin: 155-173.
- Godhe, A., I. Karunasagar & I. Karunasagar, 1996. *Gymnodinium catenatum* on west coast of India. *Harmful Algal News* 15, IOC of UNESCO 15: 1.
- Hallegraeff, G.M., 1991. Aquaculturists' guide to harmful Australian microalgae. Fishing Industry Training Board of Tasmania, Hobart, 111 pp.
- Hallegraeff, G.M. & C.J. Bolch, 1991. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Mar. Poll. Bull.* 22: 27-30.
- Hallegraeff, G.M. & C.J. Bolch, 1992. Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J. Plankton Res.* 14: 1067-84.
- Hallegraeff, G.M. & S. Fraga, 1998. Bloom dynamics of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with emphasis on Tasmanian and Spanish coastal waters. In Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. NATO ASI Series, vol. G 41, Springer Verlag, Berlin: 59-80.
- Hansen, G., N. Daugbjerg & P. Henriksen, 2000. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum* comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.* 36: 394-410.
- Hulburt, E.M., 1957. The taxonomy of unarmoured Dinophyceae of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *Biol. Bull.* 112: 196-219.
- Iizuka, S. & H. Irie, 1969. Anoxic status of bottom waters and occurrences of *Gymnodinium* red water in Omura Bay. *Bull. Plankton Soc. Japan* 16: 99.
- Kimball, J.F. & E.J.F. Wood, 1965. A dinoflagellate with characters of *Gymnodinium* and *Gyrodinium*. *J. Protozool.* 12: 577-580.
- Kite, G.C. & J.D. Dodge, 1988. Cell and chloroplast ultrastructure in *Gyrodinium aureolum* and *Gymnodinium galatheanum*, two marine dinoflagellates containing an unusual carotenoid. *Sarsia* 73: 131-138.
- Kofoid, C.A. & O. Swezy, 1921. The free-living unarmoured dinoflagellates. *Mem. Univ. Calif.* 5: 1-564.
- Larsen, J. & A. Sourmia, 1991. The diversity of heterotrophic dinoflagellates. In Patterson, D.J. & J. Larsen (eds.), *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Systematic Association, Special Volume 45. Clarendon Press, Oxford: 313-332.
- Lebour, M., 1925. The dinoflagellates of the Northern Seas: I-VII. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*: 1-250.
- Leadbeater, B. & J.D. Dodge, 1966. The fine structure of *Woloszynskia micra* sp. nov., a new marine dinoflagellate. *British Phycol. J.* 3: 1-17.
- Lindahl, O., 1986. Offshore growth of *Gyrodinium aureolum* (Dinophyceae) - the cause of coastal blooms in the Skagerrak area?. *Sarsia* 71: 27-33.
- Loeblich, A.R., III, 1969. The amphiesma or dinoflagellate cell-covering. *Proc. North. Amer. Paleont. Convention, Chicago, G.*: 868-929.
- Méndez, S., 1993. *Alexandrium fraterculus* in Uruguayan waters. *Harmful Algal News*, IOC of UNESCO, 5: 3.
- Oda, H., 1935. *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami n. sp. (MS.). *Dobutsugaku Zasshi, Zoological Society of Japan* 47: 35-48.
- Partensky, F., D. Vaultot, A. Couté & A. Sourmia, 1988. Morphological and nuclear analysis of the bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium cf. aureolum* and *Gymnodinium nagasakiense*. *J. Phycol.* 24: 408-415.
- Proença, L.A.O., M.S. Tamanaha & N. P. Souza, 2001. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Atlântica* 23: 59-65.
- Roberts, K., 1991. The flagellar apparatus and cytoskeleton of dinoflagellates: organization and the use in

- systematics. In Patterson, D.J. & J. Larsen (eds.), The biology of free-living heterotrophic flagellates. Systematic Association, Special Volume 45, Clarendon Press, Oxford: 285-302.
- Saunders, G., D.R.A. Hill, J.P. Sexton & R.A. Andersen, 1997. Small-subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods. In Bhattacharya, D. (ed.), Origins of Algae and their Plastids. Springer-Verlag, Wien: 237-259.
- Schiller, J., 1933. Dinoflagellatae (Peridineae) in Monographischer Behandlung. In Raberhorst L. (ed.), Dr. L. Raberhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, 10, 3 (I). Akad. Verlag, Leipzig, 590 pp.
- Takayama, H., 1985. Apical grooves of unarmoured dinoflagellates. Bull. Plank. Soc. Japan 32: 129-140.
- Takayama, H. & R. Adachi, 1984. *Gymnodinium nagasakiense* sp. nov. a red tide forming dinophyte in the adjacent waters of Japan. Bull. Plank. Soc. Jap. 32: 129-140.
- Taylor, D.L., 1971. Taxonomy of some common *Amphidinium* species. Br. Phycol. J. 6: 129-33.
- Taylor, F.J.R., 1985. The taxonomy and relationship of red tide flagellates. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.). Toxic dinoflagellates. Elsevier, New York: 11-26.
- Taylor, F.J.R., 1992. The taxonomy of harmful marine phytoplankton. Giornale Botanico Italiano 126: 209-219.
- Tindal, D.R. & S.L. Morton, 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In Anderson D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Series, vol G 41, Springer Verlag, Berlin: 293-313.

CAPÍTULO 6: FITOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TOXÍGENOS EN EL CONO SUR AMERICANO

ØJVIND MOESTRUP

University of Copenhagen, Botanical Institute, Øster Farimagsgade 2 D, DK - 1353 Copenhagen K,
Dinamarca.

INTRODUCCIÓN	157
PHYLUM HETEROKONTOPHYTA	157
Clase Raphidophyceae	157
DETALLES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RAFIDOFÍCEAS	158
CRECIMIENTO	158
RAFIDOFÍCEAS CITADAS O CON POSIBILIDADES DE ESTAR PRESENTES EN EL CONO SUR AMERICANO	159
<i>Chattonella</i> Biecheler	159
<i>Fibrocapsa japonica</i> Toriumi & Takano	159
<i>Heterosigma akashiwo</i> (Hada) Sournia	159
<i>Olisthodiscus luteus</i> N. Carter	159
Clase Pelagophyceae	160
<i>Aureococcus anophagefferens</i> Hargraves & Sieburth	160
INDICACIONES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN	160
Clase Dictyochophyceae (Silicoflagelados).....	160
<i>Dictyocha</i> spp.	160
PHYLUM HAPTOPHYTA	161
Clase Prymnesiophyceae.....	161
INDICACIONES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS HAPTOFITAS	162
CRECIMIENTO	162
<i>Chrysochromulina</i> Lackey	162
<i>Chrysochromulina polylepis</i> Manton & Parke	163
<i>Prymnesium</i> Massart	164
<i>Prymnesium parvum</i> Massart	164
<i>Prymnesium patelliferum</i> Green, Hibbered & Pienaar	164
<i>Prymnesium calathiferum</i> Chang & Ryan	164
<i>Prymnesium nemamethecum</i> Pienaar & Birkhead	164
<i>Phaeocystis</i> Lagerheim	165
BIBLIOGRAFIA	165

FITOFLAGELADOS POTENCIALMENTE TOXÍGENOS EN EL CONO SUR AMERICANO

ØJVIND MOESTRUP

University of Copenhagen, Botanical Institute, Øster Farimagsgade 2 D, DK - 1353 Copenhagen K, Dinamarca.

INTRODUCCIÓN

Existen algunos grupos de algas flageladas que son potencialmente nocivas para los ecosistemas marinos. Los dinoflagelados han sido tratados en otros capítulos de este libro y el presente está enfocado a las microalgas potencialmente tóxicas pertenecientes a los phyla Heterokontophyta y Haptophyta. Entre las Heterokontophyta, las clases Raphidophyceae y Pelagophyceae comprenden algunas de las especies más dañinas entre las causantes de mortandad de peces (ictiotóxicas), mientras que los efectos nocivos de las crisofíceas son menos directos y producidos por unas pocas especies.

El número de especies comprendidas en la clase Raphidophyceae es muy reducido. En el medio marino se encuentran alrededor de veinte especies, la mayoría de las cuales, sino todas, son nocivas para los peces, ya que dañan el epitelio de sus agallas produciéndoles la muerte. Este tipo de episodio ha provocado inmensas pérdidas económicas en Japón, pero también en otras partes del mundo, incluyendo el Cono Sur Americano.

Entre los miembros de la clase Haptophyta, el género *Prymnesium* es el principal problema. Se conocen mortandades de peces causadas por especies de este género desde principios del siglo XX. Estos episodios son hoy día comunes en muchas partes del mundo, sobretodo en áreas de baja salinidad y elevada concentración de nutrientes. Los daños producidos se parecen a los causados por las rafdofíceas, es decir, destrucción del epitelio de las agallas de los peces. El género relacionado, *Chrysochromulina*, ha causado problemas principalmente en Escandinavia, pero es bien sabido que este género comprende numerosas especies, aún por describir, cuyo potencial tóxico se desconoce.

La identificación de las haptofitas es difícil, y hasta la fecha, se basa sobretodo en la estructura de las escamas de naturaleza orgánica que cubren la su-

perficie de la célula, pero a menudo éstas sólo son visibles mediante microscopía electrónica. Los métodos estándar empleados en la preparación del material para examinar la estructura de las escamas han sido descritos por Moestrup & Thomsen (1980) y Moestrup (1984). No obstante, las muestras fijadas son inadecuadas para la identificación de las haptofitas en la mayor parte de los casos, ya que las escamas se desprenden de la célula durante la fijación. Recientemente se ha desarrollado un método que consiste en fijar la muestra con una mezcla de lugol y glutaraldehído (Jensen, 1998). Aplicando este método generalmente se retienen las escamas en la célula, lo que permite la identificación de organismos fijados a nivel de especie.

Las rafdofitas no poseen escamas superficiales y la identificación se basa principalmente en el tamaño y forma de la célula. Por desgracia, muchas especies son excepcionalmente difíciles de fijar y explotan o cambian drásticamente de forma durante el intento. Por ello, la identificación se debe hacer con células vivas y aún así puede ser difícil, ya que no está bien establecido el concepto de especie. Habrá, pues, que esperar por los resultados del examen de un gran número de especímenes al microscopio electrónico, y de la secuenciación de genes para definir claramente este concepto.

PHYLUM HETEROKONTOPHYTA

El Phylum Heterokontophyta comprende varias clases de protistas, de las cuales cuatro incluyen especies que han sido asociadas con eventos nocivos: 1) Bacillariophyceae (Diatomeas); 2) Raphidophyceae; 3) Pelagophyceae; 4) Dictyochophyceae (Silicoflagelados)

Clase Raphidophyceae

Las rafdofíceas se encuentran entre los flagelados desnudos conocidos de mayor tamaño, con tallas que oscilan normalmente entre 15 y 100 µm de

largo. Antes eran denominadas Cloromonadas, nombre desafortunado y no válido, ya que las *Chloromonas* constituyen un género de algas verdes. Las células nadan mediante movimientos de un flagelo anterior, que describe una trayectoria sinusoidal. El segundo flagelo, a veces difícil de ver, está orientado hacia la parte posterior y se sitúa generalmente a lo largo de, y próximo a, la superficie celular. En algunas especies el segundo flagelo es corto. Mediante microscopía electrónica se observa que, al igual que en otras heterokontas, el flagelo anterior posee pelos flagelares tripartitos dispuestos en dos hileras opuestas. El segundo flagelo es liso.

Las rafdofíceas marinas son de color amarillo o amarillo-pardo debido a la presencia del carotenoide fucoxantina en los cloroplastos, además de las clorofilas verdes *a* y *c* (c_1 y c_2). Las rafdofíceas de agua dulce, en cambio, carecen de fucoxantina y son verdes. A diferencia de casi todos los otros flagelados marinos heterokontas, las células de las rafdofíceas contienen varios, o muchos (en el caso de las especies más grandes), cloroplastos diseminados en la parte externa de la célula.

Algunos flagelados que carecen de cloroplastos han sido considerados como pertenecientes a las Raphidophyceae, pero en todos los casos la microscopía electrónica ha demostrado que se trataba de un error, ya que la clase Raphidophyceae es una de las pocas clases algales en la que todas las especies poseen cloroplastos. No obstante, algunas de sus especies, como *Heterosigma akashiwo*, podrían ser mixótrofas (Nygard & Tobiesen, 1993).

Muchas rafdofíceas poseen orgánulos proyectables (a veces denominados tricocistos) y cuerpos mucíferos. El núcleo está localizado en la parte central de la célula, y por lo general es difícil de ver al microscopio óptico.

Se ha observado que muchas rafdofíceas forman quistes de resistencia a lo largo de su ciclo vital. Los quistes se pueden acumular en los sedimentos del fondo marino, junto con quistes de dinoflagelados y de otras microalgas planctónicas. Sin embargo los quistes de las rafdofíceas se adhieren a menudo a micropartículas, tales como los frústulos de las diatomeas.

Se conocen quistes de *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica*, *Chattonella antiqua* y *Ch. marina*, los cuales carecen de ornamentación. Du-

rante la germinación se observa una célula individual móvil, que se libera a través del opérculo del quiste.

DETALLES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RAFIDOFÍCEAS

Las rafdofíceas se pueden distinguir de otros flagelados marinos amarillentos por sus numerosos cloroplastos y por sus dos flagelos, de los cuales el anterior se mueve describiendo un senoide. El único flagelado marino con el que podrían ser confundidas es con la fase desnuda de los silicoflagelados, cuyas células también poseen numerosos cloroplastos amarillos. Los silicoflagelados difieren de ellas por tener un solo flagelo, visible al microscopio óptico, que parte de un surco apical y se extiende en sentido anterior. Es importante distinguir los silicoflagelados de las rafdofíceas, ya que estas últimas son (casi siempre) potenciales causantes de muertes de peces, mientras que la fase desnuda de los silicoflagelados se considera inofensiva.

Las rafdofíceas se pueden deformar o explotar cuando se tratan con fijadores. El tratamiento con lugol da buenos resultados en algunos casos, pero con frecuencia provoca una ligera contracción celular. Esta contracción hace que los cloroplastos se proyecten ligeramente hacia fuera, con lo que la célula adquiere el aspecto de una frambuesa. En *Fibrocapsa*, los grandes tricocistos posteriores se descargan a menudo al fijar la célula, mostrándose entonces como largos hilos irregulares adheridos a la misma. Los flagelos se suelen caer durante la fijación, por lo que casi siempre la identificación, a nivel de especie requiere el análisis de material vivo.

CRECIMIENTO

Al tratarse de células bastante grandes, muchas rafdofíceas tienden a crecer relativamente despacio. La especie de crecimiento más rápido es probablemente *Heterosigma akashiwo*, cuyas células, bajo condiciones óptimas de temperatura, luz y nutrientes, pueden alcanzar tasas de $1.5 \text{ div} \cdot \text{d}^{-1}$. Existen referencias sobre tasas de crecimiento superiores, pero no hemos podido reproducir estos valores en nuestros experimentos.

A veces las rafdofíceas forman densas floraciones. Se han descrito episodios en los que las células migran a capas más profundas y ricas en nutrientes al comienzo del período de oscuridad, y

retornan a las capas superficiales por la mañana cuando se reanuda la fotosíntesis. Esta migración vertical puede discurrir a una velocidad de por lo menos $1 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$. Para una información más completa sobre las rafidofíceas marinas, se recomienda consultar los trabajos de Hallegraeff & Hara (1995) y de Horiguchi (1996).

RAFIDOFÍCEAS CITADAS O CON POSIBILIDADES DE ESTAR PRESENTES EN EL CONO SUR AMERICANO

Chattonella Biecheler

Fig. 1

Chattonella se registró por primera vez en el Cono Sur en muestras tomadas en Brasil y analizadas durante el «Curso Internacional de Microalgas Tóxicas» en Copenhagen (Odebrecht & Abreu, 1995). El material disponible estaba fijado, por lo que no fue posible identificarlo a nivel de especie.

Las especies de *Chattonella* se distinguen de otras rafidofíceas por la inserción apical o casi apical de los flagelos. Miden entre 12 y 120 μm de longitud. Para el tratamiento de las especies conocidas, consultar Hallegraeff & Hara (1995).

Algunas especies del género *Chattonella* han causado mortandad de peces en muchas partes del mundo, por lo general en aguas más cálidas (Mar Mediterráneo, India, región central de Japón, etc.), pero existen citas de su presencia en aguas templadas del Atlántico Norte (en Dinamarca y Noruega).

Fibrocapsa japonica Toriumi & Takano

Fig. 2

No hay citas de esta especie en América del Sur. No obstante, ha sido observada por el autor de este capítulo en muestras de Belice (Mar Caribe), y su amplia distribución geográfica en otras partes del mundo inclina a sospechar que es muy probable que esté presente en América del Sur. *Fibrocapsa japonica* se distingue del resto de las especies del género por poseer un grupo de tricocistos muy grandes y en forma de uña situados en el extremo posterior de la célula. Sus dimensiones habituales son 20-30 μm de longitud y 15-17 μm de anchura.

Heterosigma akashiwo (Hada) Sournia

Fig. 3

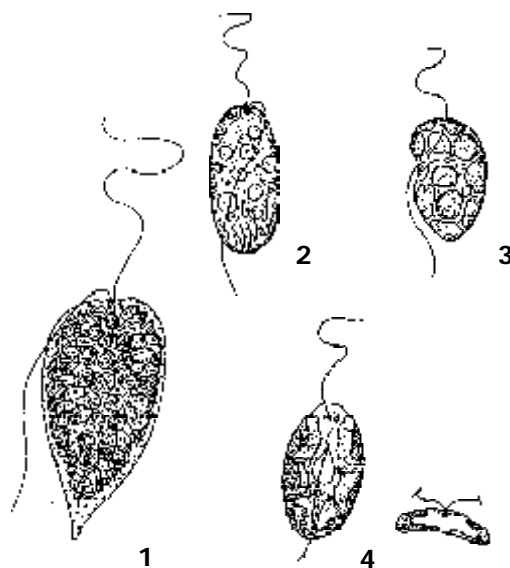
H. akashiwo es un conocido agente de mortandades de peces en distintas partes del mundo. Causó una gran mortandad e ingentes pérdidas económicas en los cultivos de salmón en la región de los fiordos chilenos, y posiblemente está presente en otras muchas partes del continente. Su presencia se asocia normalmente con granjas marinas (Smayda, 1998).

Heterosigma se puede confundir con especies de *Chattonella*, pero difiere de éstas por la inserción de los flagelos, que es claramente lateral y emergente de un surco. La célula contiene normalmente alrededor de 20 cloroplastos discoidales, pero el número exacto depende de su estado fisiológico. Las dimensiones comunes de *Heterosigma akashiwo* son 15 μm (8-25) de longitud y 10 μm (6-15) de anchura.

Olisthodiscus luteus N. Carter

Fig. 4

No hay citas de *Olisthodiscus luteus* en América del Sur. De hecho, se conoce con certeza su presencia tan sólo en el norte de Europa y en Japón. Es probable que esté presente en muchas otras partes del mundo, incluyendo América del Sur. Se diferen-



Figs. 1-4. Rafidofitas marinas. Fig. 1. *Chattonella marina*. Fig. 2. *Fibrocapsa japonica*. Fig. 3. *Heterosigma akashiwo*. Fig. 4. *Olisthodiscus luteus*, vista ventral (izquierda) y en sección transversal (derecha). Tomado de Hara & Chihara (1983).

cia de otras rafdofíceas marinas por su carácter bentónico, mientras que el resto de las especies son planctónicas. Las células de *Olisthodiscus* se han adaptado a la vida bentónica adquiriendo una forma muy aplanada; el flagelo frontal arrastra a la célula hacia delante y el posterior se proyecta hacia atrás y se adhiere a las superficies sólidas, incluso al portaobjetos cuando se examinan ejemplares al microscopio óptico. La célula se desliza sin rotar a lo largo de la superficie. Las células, similares en cierto modo a *Heterosigma*, son menos aplanadas y rotan alrededor del eje longitudinal mientras nadan. No hay información disponible sobre mortandad de peces causadas por *Olisthodiscus*, pero hay datos preliminares que muestran que es hemolítica (J. Thronsen, com. pers.), por lo que su potencial tóxico debería ser evaluado. Las dimensiones celulares de la especie son de 15-25 μm de longitud y 10-16 μm de anchura.

Clase Pelagophyceae

Aureococcus anophagefferens Hargraves & Sieburth

Las pelagofíceas fueron anteriormente clasificadas como crisofíceas. Las microalgas unicelulares similares a las crisofíceas raras veces causan problemas en los ecosistemas marinos. La única especie nociva conocida es *Aureococcus anophagefferens*, cuyas diminutas células esféricas, carentes de flagelos, forman espectaculares floraciones en la costa este de Estados Unidos. No se ha identificado ninguna sustancia tóxica en *Aureococcus* y los problemas surgen aparentemente cuando las condiciones ambientales son óptimas para el crecimiento de esta especie, y sobrecompite a los otros organismos del fitoplancton. Sus células no son consumidas por los mejillones y una vez desarrollada la floración, prácticamente monoespecífica, de *Aureococcus*, los filtradores pueden llegar a morir de inanición.

INDICACIONES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN

A. anophagefferens no ha sido citada hasta la fecha en América del Sur, pero podría estar presente. Los caracteres empleados para el diagnóstico de la especie son escasos, ya que carece de apéndices y de escamas. Las células miden 1.5-2 μm de diámetro, con un sólo cloroplasto y núcleo (Sieburth *et al.*, 1988).

Clase Dictyochophyceae (Silicoflagelados)

Dictyocha spp.

Fig. 5

Se ha señalado en ocasiones a los silicoflagelados como causantes de mortandad de peces. La fase desnuda de los silicoflagelados no está considerada como tóxica (Moestrup & Thomsen, 1990; Henriksen *et al.*, 1993) (ver diferencias morfológicas entre esta fase y las rafdofíceas en la sección sobre estas últimas). Sin embargo, la fase esquelética de los silicoflagelados puede causar lesiones de tejidos delicados, tales como el epitelio de las agallas, de algunos peces. En ciertos casos estas lesiones conducen a un aumento de la producción de mucílago por las células epiteliales, interfiriendo así con el intercambio gaseoso, y causando la asfixia del pez por falta de oxígeno. Un efecto similar lo pueden producir las diatomeas que poseen largas espinas o setas. En nin-

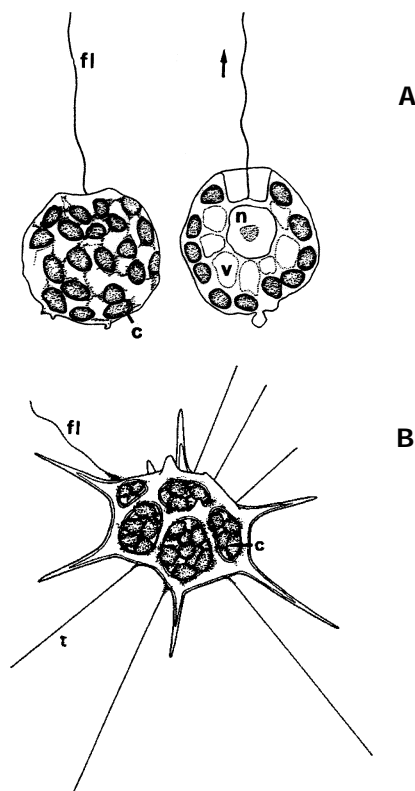


Fig. 5. El silicoflagelado *Dictyocha speculum*. A) Fase desnuda, que mide 10-15 μm de diámetro (c, cloroplasto; fl, flagelo; n, núcleo; v, vacuola; la flecha indica la dirección en que nada). B) Fase con esqueleto, que mide 35-55 μm entre las puntas de las dos espinas más largas (c, cloroplasto; fl, flagelo; t, tentáculo). Tomado de Moestrup & Thomsen (1990).

guno de los dos casos parece haber toxinas implicadas en la muerte de los peces.

La clasificación taxonómica de los silicoflagelados se basa en la morfología del exoesqueleto silíceo. No obstante, la morfología de este esqueleto es muy variable, lo que convierte en incierto el concepto de especie. Un problema adicional es que los esqueletos presentes en el sedimento, incluyendo los de muchas especies ya extinguidas, pueden dar lugar a falsas interpretaciones cuando se encuentran en muestras de plancton. Moestrup & Thomsen (1990) reconocen tan sólo 3 especies, de las cuales se han mostrado ilustraciones de células vivas, pertenecientes todas ellas al género *Dictyocha*: *D. fibula* Ehrenberg, *D. speculum* Ehrenberg y *D. octonaria* Ehrenberg.

Los silicoflagelados y el grupo relacionado de los pedinélidos, difieren en varios aspectos de otras heterokontas. El rasgo más importante para el diagnóstico es la presencia de tentáculos estructuralmente armados de haces de microtúbulos internos. El extremo proximal de los microtúbulos está situado en la superficie nuclear. Este rasgo no se ha observado en ningún miembro de las crisofíceas. Los silicoflagelados están presentes en todos los mares.

PHYLUM HAPTOPHYTA

El phylum Haptophyta comprende dos clases, las Prymnesiophyceae y las Pavlovophyceae (Cavalier-Smith, 1993; Edvardsen *et al.*, 2000). Tan sólo los miembros de la primera clase son conocidos causantes de episodios nocivos.

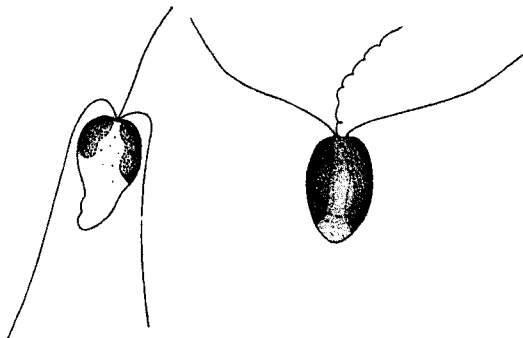


Fig. 6. La haptofita *Chrysochromulina*: Célula con el haptonema extendido (izquierda) y célula con el haptonema enrollado (derecha), tal como se ve normalmente en células fijadas. Las células de *Chrysochromulina* miden normalmente 5-10 μm de longitud. Tomado de Hajdu *et al.* (1996).

Clase Prymnesiophyceae

Los miembros de esta clase se parecen en muchos detalles a las crisofitas, con las que se pensó durante mucho tiempo que estaban relacionados. Las células tienen los mismos pigmentos principales que las crisofitas, es decir las clorofilas *a* y *c* (c_1 y/o c_2) y el carotenoide fucoxantina. Otras partes de la célula son, sin embargo, diferentes.

Las haptofitas (conocidas a veces como prymnesiofitas, nombre no válido) son unicelulares o forman colonias, desconociéndose hasta la fecha especies multicelulares. Muchas especies son flageladas, con dos flagelos lisos como en las algas verdes (muy raramente 4); otras carecen de flagelos durante la mayor parte del ciclo vital, excepto durante fases reproductivas de corta duración. Muchas haptofitas poseen un tercer apéndice filamentososo, próximo a los flagelos, que originalmente se pensó que era un tercer flagelo. El microscopio electrónico mostró que el «tercer flagelo» era un orgánulo totalmente distinto al que se llamó haptonema, apéndice que no se conoce en ningún otro grupo de protistas. El haptonema contiene típicamente 7 microtúbulos en lugar de la característica estructura de 9 + 2 de los flagelos, aunque en unas pocas especies puede contener aún menos microtúbulos. La membrana celular de las haptofitas está en general internamente cubierta por una cisterna de retículo endoplásmico liso, parte del cual se extiende dentro del haptonema. En algunas especies el haptonema puede alcanzar una longitud de más de 100 μm , pero por lo general es más corto; otras especies del grupo carecen de haptonema. En este último caso la microscopía electrónica ha permitido observar, en algunas especies, restos internos de un haptonema, el cual aparentemente está reducido a un orgánulo rudimentario.

La mayoría de las haptofitas contienen dos cloroplastos amarillos o amarillo-pardos, mientras que unas pocas especies tienen un solo cloroplasto. Se ha encontrado un número creciente de haptofitas carentes de cloroplastos, pero hasta la fecha no se sabe nada sobre sus mecanismos de obtención de carbono, es decir, no se sabe si estos organismos son fagótrofos u osmótrofos. Lo más probable es que sean fagótrofos ya que se ha demostrado recientemente que un buen número de haptofitas son mixótrofas, es decir, pueden utilizar luz para realizar la fotosíntesis en los cloroplastos, o ingerir alimentos sólidos, por ejemplo otros organismos, mediante fagocitosis. En algunos casos se ha encontrado que

el haptonema desempeña una función en el proceso de toma del alimento. Las partículas alimenticias (bacterias o pequeños eucariontes) se adhieren al haptonema, que se mantiene estirado delante de la célula durante la natación. En *Chrysochromulina hirta*, uno de los casos mejor estudiados, el alimento se mueve a lo largo de la superficie del haptonema hasta llegar a un punto situado a unos pocos μm del cuerpo de la célula (Kawachi *et al.*, 1991). Una vez acumulada una cantidad suficiente de comida en este punto, la partícula alimenticia total se traslada hacia la punta del haptonema, que se dobla hacia atrás hasta alcanzar el extremo posterior de la célula, lugar donde es incorporada por fagocitosis formando una vacuola alimenticia. En especies cubiertas de largas espinas, como *Chrysochromulina spinifera*, las partículas alimenticias son capturadas por las espinas, que las transfieren después al haptonema donde son procesadas a continuación, al igual que en *C. hirta* (Kawachi & Inouye, 1995). En especies con haptonema corto (por ej. *Prymnesium*), es posible que la toma de alimento se haga mediante un mecanismo distinto, pero todavía se desconocen los detalles. En *Prymnesium*, el haptonema parece tener una función diferente, y su extremo se fija a otros objetos tales como algas filamentosas, el portaobjetos, etc. En tales casos el haptonema parece funcionar como un orgánulo de fijación.

Las células de las haptofitas aparecen a menudo cubiertas de escamas orgánicas cuya función es aún un misterio. Las escamas más grandes se pueden distinguir al microscopio óptico, especialmente si se dispone de contraste de fase, o de sistema Nomarski (contraste de interfase diferencial o DIC). En otros casos resulta imposible visualizar las escamas en las células vivas. Algunas escamas orgánicas pueden tener un borde de material calcificado. Al igual que otras escamas, estos «cocolitos» son muy pequeños, pero normalmente los verdaderos cocolitos se pueden distinguir claramente al microscopio óptico. En unas pocas especies, como *Emiliana huxleyi*, la célula está cubierta de cocolitos que no tienen una placa basal orgánica.

INDICACIONES ÚTILES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS HAPTOFITAS

Es esencial que el material se fije cuidadosamente si se quieren retener los flagelos y el haptonema. Si el lugol añadido es insuficiente, el haptonema, o los flagelos, o ambos, se desprenden, con lo que la iden-

tificación resulta imposible, ya que las células son entonces idénticas a las crisofitas. En los ambientes marinos las crisofitas son poco comunes, y las pequeñas células que se observan de color amarillento, con dos cloroplastos parietales, son casi siempre haptofitas que han sido fijadas de forma precaria. A veces es posible ver algunos tipos de escamas en la superficie celular si se fijan y secan las células en un cubreobjetos. Una vez secas (preferentemente en una estufa, a aproximadamente 40°C , para acelerar el secado), el cubreobjetos con las células adheridas se sumerge cuidadosamente en agua alcalina durante un corto período de tiempo a fin de remover los cristales de sal que se forman durante el secado. Después de un segundo secado, se monta el cubreobjetos con el material hacia abajo, apoyado en tres o cuatro «patas»: por ej., diminutas astillas de cubreobjetos. La preparación completa puede quedar hecha de forma permanente bordeándola con esmalte de uñas. El material se puede examinar entonces utilizando un objetivo de inmersión (100 X) y contraste de fase o sistema Normanski. De esta forma, algunas de las escamas previamente invisibles se vuelven visibles al microscopio óptico. Se puede obtener una mejor resolución y una identificación más fiable si se preparan «montajes completos» para examinar al microscopio electrónico de transmisión o, en el caso de cocolitos, al microscopio electrónico de barrido. En muchos casos, la identificación precisa a nivel de especie requiere observaciones al microscopio electrónico de transmisión de los montajes completos, ya sean teñidos o sombreados.

CRECIMIENTO

Debido a que son células pequeñas, las haptofitas por lo general, pueden multiplicarse rápidamente, siendo común observar tasas de $1 \text{ div} \cdot \text{d}^{-1}$. Estas tasas pueden dar lugar a floraciones masivas de especies del género *Prymnesium*, *Phaeocystis*, o *Chrysochromulina*.

HAPTOFITAS CITADAS O CON POSIBILIDADES DE ESTAR PRESENTES EN EL CONO SUR AMERICANO

Chrysochromulina Lackey

Fig. 6

Hasta 1988, fecha en que un florecimiento de *Chrysochromulina polylepis* causó una gran mortandad de peces en la costa sur de Escandinavia, se consideraba que las especies del género

Chrysochromulina eran inofensivas. Desde esta fecha, otra especie del género, *Ch. leadbeateri*, ha sido señalada como el agente de mortandad de peces en la costa norte de Noruega. Posteriormente se han realizado tests de toxicidad de los cultivos de muchas de las cerca de 50 especies descritas de *Chrysochromulina*, pero los resultados han sido siempre negativos. La única especie de la que se sabe con certeza que es tóxica es *Ch. polylepis*. Los cultivos de algunas cepas han mantenido su toxicidad tras 10 años en condiciones de laboratorio. Sin embargo es posible que existan más especies tóxicas, ya que muchas especies del género no han sido aisladas, ni establecidas en cultivo y descritas formalmente. El número total de especies en este género es probablemente alrededor de cien.

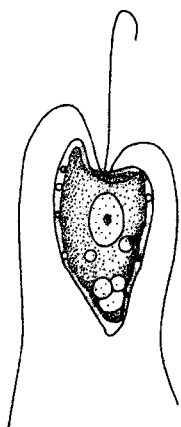


Fig. 7. Célula viva de *Chrysochromulina polylepis*. Tomado de Moestrup & Thomsen (1995).

Chrysochromulina polylepis ha sido citada muchas veces para el norte de Europa y es también conocida en Australia. Dado que esta especie no prolifera a altas temperaturas, es probable que no crezca en los trópicos, pero es muy posible que esté presente en el Cono Sur.

Chrysochromulina polylepis Manton & Parke

Figs. 7-8

Las células tienen forma muy variable, generalmente ovoide o esférica y poseen dos flagelos insertados en la región subapical. Las células miden 6-12 μm de longitud y 5-9 μm de anchura (Fig. 7). Los dos flagelos presentan aproximadamente la misma longitud, 2-3 veces la longitud de la célula.

El haptonema mide 1-5 veces la longitud de la célula, y normalmente se mantiene recto hacia delante durante la natación. Las células también pueden nadar con todos los apéndices dirigidos hacia atrás, lo cual probablemente sea una reacción de escape. En algunas ocasiones el haptonema se enrosca.

Existe una especie de *Chrysochromulina* en aguas danesas, aún no descrita, que vista al micros-

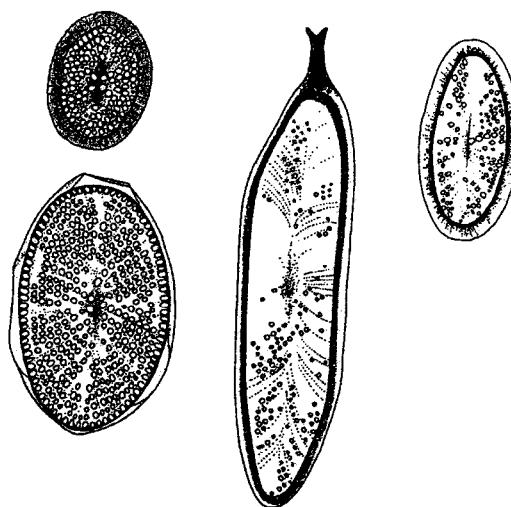


Fig. 8. Las escamas orgánicas que cubren la superficie celular en *Chrysochromulina polylepis*. A la izquierda, los dos tipos de escamas que cubren totalmente la superficie de la célula formando dos capas. Las escamas pequeñas (arriba) forman una capa continua próxima al cuerpo de la célula; esta capa está recubierta por otra de escamas algo más grandes (abajo). Los otros dos tipos de escamas (centro y derecha) son las que están restringidas al área de inserción de los flagelos y el haptonema en la célula, y son mucho menos numerosas. Todas las escamas están dibujadas con el mismo aumento. Las escamas más grandes miden aproximadamente 2.5 μm de largo. Tomado de Moestrup & Thomsen (1995).

copio óptico es idéntica a *Ch. polylepis*, pero no es tóxica. Por tanto, la identificación precisa de *Ch. polylepis* requiere la observación al microscopio electrónico de las escamas orgánicas que cubren la superficie celular.

En esta especie se encuentran cuatro tipos diferentes de escamas (Fig. 8), dos tipos que cubren toda la célula en dos capas separadas, y los otros dos que sólo están presentes cerca de la base de los flagelos y el haptonema. Una característica de las escamas son las perforaciones, que son particularmente numerosas en las escamas que cubren el cuerpo. La especie no descrita de Dinamarca tiene escamas muy diferentes.

El ciclo vital de *Ch. polylepis* ha sido estudiado por Paasche *et al.* (1990), Edvardsen & Paasche (1992) y Edvardsen & Vault (1996), y en él se observan dos tipos de células diferentes. Las células conocidas como «aberrantes» o «formas alternativas» difieren de las «normales» en que sólo poseen dos clases de escamas, una de las cuales lleva una espina central. Quedan aún detalles de su ciclo vital por describir, y no se ha conseguido observar ni la

meiosis ni la fusión de células. Las células normales, o auténticas células tipo, son diploides, mientras que de las células aberrantes se conocen tanto formas haploides como diploides.

Prymnesium Massart

Figs. 9-10

De entre todos los fitoflagelados causantes de muerte de peces, puede que *Prymnesium* sea el mejor conocido. Las especies de este género están ampliamente distribuidas a nivel mundial. Sin embargo los problemas han sido descritos, por lo general, en regiones templadas o subtropicales. Hasta la fecha se han descrito diez especies, pero vistas al microscopio óptico son todas muy similares, y por lo general es imposible identificarlas sin examinar las escamas de la superficie celular.

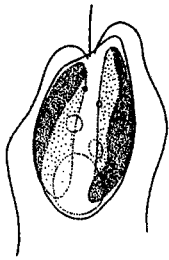


Fig. 9. *Prymnesium parvum* f. *patelliferum*. Tomado de Moestrup & Thomsen (1995).

Las células están recubiertas por dos tipos de escamas, pero la estructura detallada de las mismas sólo se puede observar al microscopio electrónico. La situación se complica aún más por la existencia de cepas tóxicas y no tóxicas dentro de la misma especie. Las células de *Prymnesium* varían de forma, entre piriformes y casi esféricas. Los dos flagelos y el haptonema están insertados subapicalmente. Las dimensiones celulares varían

entre 6-18.5 μm de longitud y 3-11.5 μm de anchura. En contraste con las especies de *Chrysochromulina*, a menudo se adhieren a otros objetos, tales como algas filamentosas o el cubreobjetos, con la punta de

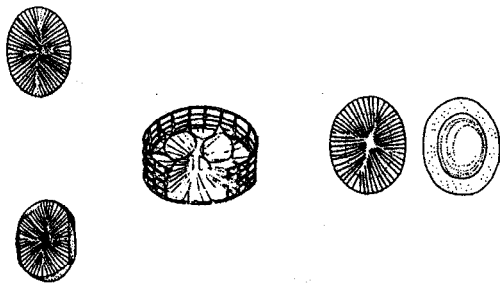


Fig. 10. Escamas de *Prymnesium parvum* f. *patelliferum* (izquierda) y *P. calathiferum* (centro y derecha). Todas dibujadas con el mismo aumento. Las escamas de *P. parvum* f. *patelliferum* miden aproximadamente 0.35 μm de largo. Tomado de Moestrup & Thomsen (1995).

su corto y rígido haptonema (2-6 μm de largo). Al menos una especie de *Prymnesium* es mixótrofa (Nygaard & Tobiesen, 1993) pero aún se desconoce el mecanismo de toma del alimento. El haptonema es tan corto que difícilmente podría estar involucrado en la toma de alimentos y lo más probable es que funcione tan sólo como órgano de fijación.

Prymnesium parvum Massart

Prymnesium patelliferum Green, Hibbered & Pienaar

Fig. 9

P. parvum y *P. patelliferum* son las dos especies más citadas del género *Prymnesium*. Se conocen cepas de ambas especies causantes de mortalidad de peces en muchas partes del mundo. Hay evidencias recientes de que ambas «especies», que difieren sólo en pequeños detalles de la cobertura de escamas, son parte del mismo ciclo vital, es decir, pertenecen a la misma especie (Larsen, 1999).

El nombre correcto de la especie es *P. parvum*, y debemos referirnos a los dos morfotipos como *P. parvum* f. *parvum* y *P. parvum* f. *patelliferum*. Hasta ahora en América del Sur sólo se ha encontrado *P. parvum* f. *patelliferum* (Bergesch & Moestrup, datos no publ.). No hay información disponible sobre la potencial toxicidad de las cepas latinoamericanas.

Prymnesium calathiferum Chang & Ryan

Prymnesium nemamethecum Pienaar & Birkhead

P. calathiferum es una especie tóxica conocida en Nueva Zelanda (Chang & Ryan, 1985) y en Vietnam (Moestrup, datos no publ.), pero según los datos de C. Billard (datos no publ.) también está presente en Martinica (Andersen *et al.*, 1995).

En *P. calathiferum* las escamas externas tienen un borde recto en forma de cesta abierta hacia arriba y una red de fibrillas que se extiende entre el borde y la espina central proyectada hacia arriba. Por el contrario, las escamas de *P. parvum* (f. *patelliferum* inclusive) carecen de sistema reticular.

P. nemamethecum, descrita en Sudáfrica (Pienaar & Birkhead, 1994), se encontró recientemente en aguas danesas (M.Ø. Jensen, datos no publ.). Es,

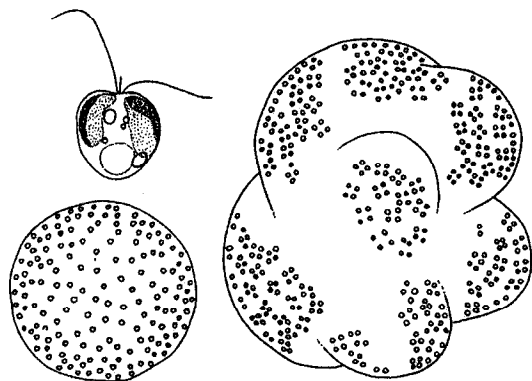


Fig. 11. *Phaeocystis* spp. A la izquierda, una célula móvil y una colonia esférica; a la derecha, colonia de forma más irregular. Tomado de Moestrup & Thomsen (1995).

por tanto, una especie ampliamente distribuida que también podría estar presente en el Cono Sur. Curiosamente, ni las cepas de Sudáfrica ni las cepas danesas de *P. nemamethecum* resultaron tóxicas cuando se les aplicó el test de *Artemia* (Moestrup, Jensen, Nielsen & Boesen, datos no publ.).

Phaeocystis Lagerheim

Fig. 11

Las especies de *Phaeocystis* forman colonias esféricas, más o menos irregulares, de células sin flagelos que se sitúan en la periferia de la colonia. Cada célula posee dos cloroplastos amarillentos. Las colonias pueden alcanzar tallas de más de 1 mm de diámetro, lo que permite visualizarlas a simple vista sin necesidad de microscopio.

Ocasionalmente se producen fases flageladas móviles, que son células pequeñas de 3- 8 μm de longitud y que poseen dos flagelos y un haptonema muy corto. Se cree que esta fase flagelada se forma a partir de las células de la colonia, pero aún no se conoce el ciclo vital completo. Se cree que las colonias son diploides, y las fases flageladas normalmente haploides (Vaulot *et al.*, 1994). Las células de la colonia no tienen escamas mientras que las células móviles las presentan de dos tipos. Pero estas escamas son tan diminutas, que hay que tener cuidado cuando se las busca al microscopio electrónico, ya que suelen quedar oscurecidas por el mucílago. En algunos casos se ha observado una estructura estrellada saliendo de las células durante el proceso de secado. Esta estructura se forma en la célula, es de

quitina (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1997) y podría funcionar a modo de tricocisto. La estructura estrellada tiene normalmente cinco rayos, siendo la única excepción la estrella de nueve rayos de *P. scrobiculata* (Moestrup, 1979). No se han identificado toxinas en *Phaeocystis*, y el efecto dañino que se le atribuye a las especies del género está causado por la magnitud de algunas de sus floraciones, que pueden llegar a causar atascos de las redes de pesca, reduciendo las capturas, o pueden depositarse en las playas formando capas de espuma que alejan a los turistas a otros lugares. En América del Sur se presentan formas de *Phaeocystis* que no han sido aún descritas a nivel de especie. El concepto de especie en el género *Phaeocystis* está actualmente sometido a debate. Convendría aislar cepas provenientes de América del Sur para realizar exámenes al microscopio electrónico de transmisión y secuenciación de genes y de esta forma saber qué especies están presentes en esta región.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen, R.A., S.I. Blackburn, F.J.R. Taylor & C.R. Tomas, 1995. Algal culture collections and toxic algal strains. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO: 489-531.
- Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiological Reviews 57: 953-994.
- Chang, F.H. & K.G. Ryan, 1985. *Prymnesium calathiferum* sp. nov. (Prymnesiophyceae), a new species isolated from Northland, New Zealand. Phycologia 24: 191-198.
- Chrétiennot-Dinet, M.-J., M.-M. Giraud-Guille, D. Vaulot, J.-L. Putaux, Y. Saito & H. Chanzy, 1997. The chitinous nature of filaments ejected by *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 33: 666-672.
- Edvardsen, B. & E. Paasche, 1992. Two motile stages of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae): morphology, growth and toxicity. J. Phycol. 28: 104-114.
- Edvardsen, B. & D. Vaulot, 1996. Ploidy levels of the two motile forms of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 32: 94-102.
- Edvardsen, B., W. Eikrem, J.C. Green, R.A. Andersen, S.Y. Moon-van der Staay & L.K. Medlin, 2000. Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from 18S ribosomal DNA sequences and available morphological data. Phycologia 39: 19-35.
- Hajdu, S., U. Larsson & Ø. Moestrup, 1996. Seasonal dynamics of *Chrysochromulina* species (Prymnesiophyceae) in a coastal area and a nutrient-enriched inlet of the Northern Baltic proper. Bot. Mar. 39: 281-295.

- Hallegraeff, G.M. & Y. Hara, 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides N° 33, UNESCO: 365-371.
- Hara, Y. & M. Chihara, 1983. Raphidophyceae. In Adachi, R., M. Chihara & H. Irie (eds.), Red Tide Manual, Vol. IV. Other Algae. Red Tide Research Group, Tokyo: 55-69 (in Japanese).
- Henriksen, P., F. Knipschildt, Ø. Moestrup & H.A. Thomsen, 1993. Autecology, life history and toxicology of the silicoflagellate *Dictyocha speculum* (Silicoflagellata, Dictyochophyceae). Phycologia 32: 29-39.
- Horiguchi, T., 1996. *Haramonas dimorphagen*. et sp. nov. (Raphidophyceae), a new marine raphidophyte from Australian mangrove. Phycol. Res. 44: 143-150.
- Jensen, M.Ø., 1998. A new method for fixation of unmineralized haptophytes for TEM (whole mount) investigations. J. Phycol. 34: 558-560.
- Kawachi, M., I. Inouye, O. Maeda & M. Chihara, 1991. The haptonema as a food-capturing device: observations on *Chrysochromulina hirta* (Prymnesiophyceae). Phycologia 30: 563-573.
- Kawachi, M. & I. Inouye, 1995. Functional roles of the haptonema and the spine scales in the feeding process of *Chrysochromulina spinifera* (Fournier) Pienaar et Norris (Haptophyta=Prymnesiophyta). Phycologia 34: 193-200.
- Larsen, A., 1999. *Prymnesium parvum* and *P. patelliferum* (Haptophyta) – one species. Phycologia 38: 541-543.
- Moestrup, Ø., 1979. Identification by electron microscopy of marine nanoplankton from New Zealand, including the description of four new species. N. Z. J. Bot. 17: 61-95.
- Moestrup, Ø., 1984. Further studies on *Nephroselmis* and its allies (Prasinophyceae). II. *Mamiella* gen. nov., Mamiellaceae fam. nov., Mamiellales ord. nov. Nord. J. Bot. 4: 109-121.
- Moestrup, Ø. & H.A. Thomsen, 1980. Preparation of shadow-cast whole mounts. In Gantt, E. (ed.), Handbook of Phycological Methods. Developmental and Cytological Methods. Cambridge University Press: 385-390.
- Moestrup, Ø. & H.A. Thomsen, 1990. *Dictyocha speculum* (Silicoflagellata, Dictyochophyceae), studies on armoured and unarmoured stages. Biol. Skr. 37: 1-57.
- Moestrup, Ø. & H.A. Thomsen, 1995. Taxonomy of toxic haptophytes (prymnesiophytes). In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides N° 33, UNESCO: 319-338.
- Nygaard, K. & A. Tobiesen, 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. Limnol. Oceanogr. 38: 273-279.
- Odebrecht, C. & P.C. Abreu, 1995. Raphidophycean in southern Brazil. Harmful Algae News 12/13, IOC of UNESCO: 4.
- Paasche, E., B. Edvardsen & W. Eikrem, 1990. A possible alternate stage in the life cycle of *Chrysochromulina polylepis* Manton et Parke (Prymnesiophyceae). Nova Hedwigia, Beih 100: 91-99.
- Pienaar, R.N. & M. Birkhead, 1994. Ultrastructure of *Prymnesium nemamethecum* sp. nov. (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 30: 291-300.
- Sieburth, J. McN., P.W. Johnson & P.E. Hargraves, 1988. Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (Chrysophyceae): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, summer 1985. J. Phycol. 24: 416-425.
- Smayda, T. J., 1998. Ecophysiology and bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). In Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 113-131.
- Vaulot, D., J.L. Birrien, D. Marie, R. Casotti, M.J.W. Veldhuis, G.W. Kraay & M.-J. Chrétiennot-Dinet, 1994. Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 30: 1022-1035.

CAPÍTULO 7: DIATOMEAS POTENCIALMENTE TOXÍGENAS DEL CONO SUR AMERICANO

MARTHA E. FERRARIO, EUGENIA A. SAR & SILVIA E. SALA

Departamento Científico de Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

INTRODUCCIÓN	169
EL GÉNERO <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> PERAGALLO	170
Características morfológicas que permiten diferenciar las especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	171
Clave de las especies tóxicas de <i>Pseudo-nitzschia</i>	171
ESPECIES REGISTRADAS PARA EL CONO SUR AMERICANO	171
<i>Pseudo-nitzschia australis</i> Frenguelli	171
OBSERVACIONES NOMENCLATURALES	172
DISTRIBUCIÓN	172
PRODUCCIÓN DE AD.....	172
DATOS ECOLÓGICOS	174
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	174
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (P.T. Cleve) Heiden in Heiden & Kolbe	175
DISTRIBUCIÓN	176
PRODUCCIÓN DE AD.....	176
DATOS ECOLÓGICOS	176
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	176
<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i> (P.T. Cleve) Hasle	176
DISTRIBUCIÓN	178
PRODUCCIÓN DE AD.....	178
DATOS ECOLÓGICOS	178
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	178
<i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> (Hasle) Hasle	179
OBSERVACIONES	179
DISTRIBUCIÓN	179
PRODUCCIÓN DE AD.....	180
DATOS ECOLÓGICOS	181
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	181
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle	182
OBSERVACIONES	182
DISTRIBUCIÓN	182
PRODUCCIÓN DE AD.....	182
DATOS ECOLÓGICOS	182
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	184
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle	184

DISTRIBUCIÓN	186
PRODUCCIÓN DE AD.....	186
DATOS ECOLÓGICOS	186
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	187
<i>Pseudo-nitzschia turgidula</i> (Hustedt) Hasle	187
OBSERVACIONES	188
DISTRIBUCIÓN	188
PRODUCCIÓN DE AD.....	188
DATOS ECOLÓGICOS	188
COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES	188
ESPECIE NO REPORTADA FEHACIENTEMENTE PARA EL CONO SUR AMERICANO	
.....	189
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (Grunow ex P.T. Cleve) H. Peragallo	189
OBSERVACIONES NOMENCLATURALES	189
DISTRIBUCIÓN	189
PRODUCCIÓN DE AD.....	189
DATOS ECOLÓGICOS	190
AMPHORA COFFEAIFORMIS MENCIONADA COMO PRODUCTORA DE ACIDO	
DOMOICO	190
BIBLIOGRAFÍA	190

DIATOMEAS POTENCIALMENTE TOXÍGENAS DEL CONO SUR AMERICANO

MARTHA E. FERRARIO, EUGENIA A. SAR & SILVIA E. SALA

Departamento Científico de Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace pocos años los registros de eventos de intoxicación causados por microalgas planctónicas marinas estuvieron restringidos, en forma casi exclusiva, a los dinoflagelados. Sin embargo, episodios ocurridos más recientemente en áreas costeras permitieron establecer que otros grupos tales como diatomeas, primnesiofíceas y rafidofíceas también son capaces de producir este tipo de eventos.

El primer episodio de intoxicación asociado a la presencia de diatomeas data de 1987 y se produjo en la Isla Príncipe Eduardo, en la costa este de Canadá. A raíz de este suceso murieron tres personas y alrededor de ciento cinco presentaron síntomas agudos de envenenamiento a consecuencia del consumo de bivalvos (Bates *et al.*, 1989). Estos síntomas fueron desórdenes gastrointestinales en los casos leves, desórdenes neurológicos, trastornos del equilibrio, desorientación, pérdida permanente de la memoria de corto plazo, en los casos severos, llegando incluso a la muerte del paciente (Todd, 1993). El síndrome de intoxicación fue denominado *Amnesic Shellfish Poisoning* (Envenenamiento Amnésico de Moluscos) aludiendo a uno de los síntomas característicos y al organismo vector. Las investigaciones llevadas a cabo durante este episodio, demostraron que el agente causante fue *Nitzschia pungens* f. *multiseriata* Hasle, actualmente denominada *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Hasle) Hasle y que el bivalvo que actuó como vector fue el mejillón azul, *Mytilus edulis*. La toxina implicada fue el ácido domoico (AD), un aminoácido previamente aislado de varias especies de macroalgas pertenecientes a la División Rhodophyta (Subba Rao *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1989, 1995; Bates, 1998).

Estudios ulteriores demostraron que otras especies del género marino *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo, tales como *P. australis* Frenguelli, *P.*

delicatissima (P.T. Cleve) Heiden in Heiden & Kolbe, *P. fraudulentata* (P.T. Cleve) Hasle, *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle, *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle, *P. seriata* (Grunow ex P.T. Cleve) H. Peragallo y *P. turgidula* (Hustedt) Hasle han estado relacionadas con la producción de AD en el medio natural y/o en laboratorio. Recientemente Sarno & Dahlmann (2000) han detectado la toxina en cepas de *P. multiseriata* aisladas en el Golfo de Nápoles.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la producción de AD estaba restringida a especies de diatomeas marinas. Sin embargo Kotaki *et al.* (2000) determinaron que una cepa de *Nitzschia navisvaringica*, una nueva especie para la ciencia erigida por Lundholm & Moestrup (2000), aislada de un cultivo de camarón en una laguna salobre de Vietnam, era también productora de esta toxina. Otra diatomea, identificada como *Amphora coffeaeformis* (Agardh) Kützing, fue citada como productora de AD por Shimizu *et al.* (1989) y Maranda *et al.* (1990) durante el episodio sucedido en la Isla Príncipe Eduardo. Sin embargo no existen reportes ulteriores que involucren a esta u otra especie del género *Amphora* en la producción de la toxina.

Varias especies del grupo bajo análisis, han sido señaladas como nocivas a pesar de no producir toxinas. Entre ellas se incluyen las que, en altas concentraciones, generan un medio anóxico que produce mortandad masiva de organismos marinos, o las que generan compuestos ricos en proteínas formando barreras que afectan a la migración de peces. Algunos taxa que producen estos problemas son: *Coscinodiscus concinnus* Wm. Smith, *C. centralis* Ehr., en el Mar del Norte; *Thalassiosira mala* Takano en la Bahía de Tokio, Japón y *Cerataulina pelagica* (Cleve) Hendey en la costa este de Nueva Zelanda (Hasle & Fryxell, 1995). Además, especies cuyos frústulos poseen estructuras punzantes, lesionan los

tejidos y membranas branquiales de peces por acción mecánica, causándoles la muerte, lo que es particularmente grave desde el punto de vista económico cuando son mantenidos en sistemas de cultivo. Pueden mencionarse dentro de este grupo especies del género *Chaetoceros* tales como, *Ch. convolutus* Castracane, *Ch. concavicornis* Manguin y *Ch. danicus* Cleve (Horner *et al.*, 1997; Rensel, 1993). Eventos provocados por alguna de estas especies han producido pérdidas de varios millones de dólares en Japón, Canadá, Nueva Zelanda, Noruega y en el Cono Sur, en Chile.

La mayoría de las diatomeas señaladas como potencialmente tóxicas han sido halladas en ambientes costeros de Argentina (Sar *et al.*, 1998; Ferrario *et al.*, 1999; Negri & Inza, 1998) y del resto del Cono Sur Americano (Odebrecht *et al.*, 2001; Rivera, 1985; Villac & Tenenbaum, 2001). Asimismo se ha detectado la presencia de AD en la región, sin que hasta el presente se hayan registrado eventos de intoxicación vinculados a este veneno.

El objetivo de este capítulo es hacer una puesta al día sobre diatomeas marinas tóxicas presentes en el Cono Sur Americano y brindar información sobre taxonomía, morfología, distribución y eventos de intoxicación relacionados con este grupo de microalgas. Es nuestra aspiración que este trabajo sirva como consulta a quienes tienen bajo su responsabilidad programas de seguimiento, que no siempre son taxónomos experimentados. Para facilitar la correcta identificación de las especies involucradas en FAN, incluimos una clave con los caracteres diferenciales de las especies productoras de AD, complementada con descripciones e ilustraciones de cada una de ellas y comparaciones con especies afines.

EL GÉNERO *PSEUDO-NITZSCHIA* PERAGALLO

El género *Pseudo-nitzschia* fue erigido por Peragallo en el año 1900 (Peragallo & Peragallo, 1897-1908) sobre la base de *Nitzschia seriata* Cleve, *N. fraudulenta* Cleve y *N. sicula* Castracane, sin que el autor designara una especie tipo. Fryxell *et al.* (1991) escogieron de estas tres especies a *P. seriata* (Cleve) Peragallo como lectotipo del género. Hustedt (1958) consideró al género *Pseudo-nitzschia* como un grupo del género *Nitzschia* Hassall. Este criterio fue más tarde compartido por Hasle (1965), quien delimitó dentro de la sección *Pseudo-nitzschia* dos

complejos a los que denominó «complejo *Nitzschia seriata*» y «complejo *Nitzschia delicatissima*». El primer grupo está caracterizado por reunir las formas más robustas y anchas, con un eje transapical mayor de 3 µm y el segundo grupo por reunir las formas más delicadas y estrechas, con un eje transapical menor de 3 µm. Un criterio similar había sido utilizado por Proschkina-Lavrenko (1955) para diferenciar las especies de este grupo en el Mar Negro. Recientemente Hasle (1993, 1994), restableció el género *Pseudo-nitzschia*, enmendó su descripción y transfirió a él 15 especies y 2 formas del género *Nitzschia*.

Los principales caracteres que delimitan el género *Pseudo-nitzschia* son: el hábitat exclusivamente planctónico-marino, el tipo de colonia escalariforme que resulta de la superposición de los extremos de las células contiguas, la localización del rafe a nivel de la superficie valvar, la ausencia de poroides en las paredes del canal y la ausencia de *conopeum*. Las células son alargadas, fusiformes a estrechamente lanceoladas y con dos cloroplastos situados en su parte central.

Los géneros más relacionados con *Pseudo-nitzschia* son *Nitzschia* Hassall y *Fragilariopsis* (Hustedt) Hasle, que fueron anteriormente considerados secciones del género *Nitzschia* (Hustedt, 1958; Hasle, 1965).

El género *Nitzschia*, descrito por Hassall (1845), presenta una marcada heterogeneidad en cuanto a la morfología del frústulo y el hábitat, que puede ser planctónico o bentónico, en ambientes marinos, salobres y dulceacuícolas. Es un grupo con una alta diversidad específica, que comprende alrededor de 900 taxa válidamente publicados (Mann, 1986). Dentro del género *Nitzschia*, Mann (1986) delimita el subgénero *Nitzschia* que contiene a la especie tipo, *N. sigmoidea* (Nitzsch) Wm. Smith. Los caracteres que permiten diferenciar a este subgénero de *Pseudo-nitzschia* son: frústulos fuertemente silicificados, valvas con manto muy profundo, rafe excéntrico o subexcéntrico situado sobre una elevación de la superficie valvar, poroides en la pared del canal del rafe, *conopeum* y una banda de sílice con poroides en la unión entre la superficie valvar y el manto distal (Mann, 1986; Hasle *et al.*, 1996).

El género *Fragilariopsis* (Hustedt) Hasle 1993, es exclusivamente marino y planctónico. Sus especies, aproximadamente 20, están principalmente res-

tringidas a aguas polares. Este género comparte algunos caracteres con el género *Pseudo-nitzschia*: el rafe está situado a nivel de la superficie valvar, las paredes del canal del rafe carecen de poroides y no presentan *conopeum*. El tipo de colonia de *Fragilariopsis*, inmóvil y en empalizada, es decir con las células unidas total o parcialmente por su superficie valvar, permite diferenciar sencillamente a este género de *Pseudo-nitzschia*.

El género *Nanoneis* Norris, con una única especie, *N. hasleae* Norris, de hábitat oceánico, es hasta donde sabemos, el único que presenta colonias semejantes a las del género *Pseudo-nitzschia*. Estos géneros tienen una morfología valvar tan diferente que son inconfundibles incluso al microscopio óptico (MO).

Características morfológicas que permiten diferenciar las especies del género *Pseudo-nitzschia*

El género *Pseudo-nitzschia* es un componente frecuente dentro del fitoplancton marino. Fryxell *et al.* (1997) listaron 24 especies dentro de este género. Una de ellas, *Pseudo-nitzschia* sp, se fundó sobre la base de materiales anteriormente clasificados dentro del «complejo Americana» (Hasle y Villac, com. pers.). Todas estas especies comparten caracteres, algunos de los cuales son difícilmente observables al MO. El análisis al MO de material fresco y/o tratado sólo permite realizar una identificación aproximada de las especies. Por ello, para una correcta identificación, en la mayoría de los casos se debe recurrir al uso del microscopio electrónico (ME) de barrido (MEB) y/o de transmisión (MET). Con esta idea en mente, cuando tratamos en este capítulo la distribución de cada una de las especies registradas para el Cono Sur Americano, consideramos prudente hacer figurar solamente aquellas citas que están fundamentadas en análisis llevados a cabo con ME.

Estas especies se pueden diferenciar por:

1. Caracteres observables al MO en preparados transitorios de material sin tratar:
 - grado de superposición de los extremos de las células en la colonia.
 - ancho valvar.
 - forma del frústulo en vista cingular y valvar.
 - simetría del contorno valvar.
 - forma de los extremos en vista valvar y cingular.

2. Caracteres observables al MO en preparados permanentes de material tratado:
 - presencia o ausencia de interespacio central.
 - densidad de las estrías y fíbulas.
3. Caracteres observables al ME:
 - número de hileras de poroides por estría.
 - forma y número de poroides en 1 µm.
 - ornamentación de las bandas.

Clave de las especies toxígenas de *Pseudo-nitzschia*

- 1 Valvas con interespacio central 2
- 1' Valvas sin interespacio central5
- 2 Eje transapical mayor de 4 µm ..*P. fraudulenta*
- 2' Eje transapical menor de 4 µm3
- 3 Estrías con una hilera de poroides
..... *P. pseudodelicatissima*
- 3' Estrías con dos hileras de poroides4
- 4 Estructura delicada, estrías 36-40 en 10 µm.....
..... *P. delicatissima*
- 4' Estructura robusta, estrías 23-28 en 10 µm
..... *P. turgidula*
- 5 Estrías con dos hileras de poroides6
- 5' Estrías con más de dos hileras de poroides7
- 6 Eje transapical mayor de 5.5 µm *P. australis*
- 6' Eje transapical menor de 4.5 µm *P. pungens*
- 7 Contorno valvar simétrico según el eje apical
..... *P. multiseries*
- 7' Contorno valvar asimétrico según el eje apical ..
..... *P. seriata*

ESPECIES REGISTRADAS PARA EL CONO SUR AMERICANO

Pseudo-nitzschia australis Frenguelli Figs. 1-6

Frenguelli, 1939: 217, lam. 2, fig.13; Hasle, 1965: 11, lam. 4, figs. 3-4; lam. 5, figs.1-6; lam. 6, fig.1; Sar *et al.*, 1998: 183-185, fig. 1.

Sinónimo: *Nitzschia pseudoseriata* Hasle 1965.

Holotipo: ilustración Frenguelli, 1939, lam. 2, fig.13.

Isotipo: serie 397, preparados 1 y 2. Colección Frenguelli «Diatomeas Argentinas».

Localidad tipo: Golfo San Matías (42°15' S, 62°13' W), Provincia de Río Negro, Argentina.

Las colonias son en escalera, formadas por superposición de los extremos valvares en 1/3 a 1/4 del largo total de las células. Los frústulos son muy silicificados, linear-lanceolados, con ápices agudos en vista cingular y subrostrados en vista valvar. La val-

va presenta lados paralelos en su parte media en los especímenes de mayor tamaño. Los especímenes de pequeña talla pueden ser asimétricos respecto del eje apical presentando uno de los lados recto. El eje apical es de 70 a 110 μm y el eje transapical de 6.5 a 10 μm .

La superficie valvar presenta estrías e interestrias, visibles incluso en montajes con agua y un rafe excéntrico sin interespacio central. El número de estrías y el de fíbulas es aproximadamente el mismo, 12-19 en 10 μm . Al MEB se observa que las estrías están formadas por dos hileras de poroides circulares, 4-5 en 1 μm , separadas por un espacio liso. Algunas veces puede aparecer un poroide aislado próximo al canal del rafe, entre las hileras de areolas de una estría. Las interestrias son internamente elevadas y coinciden con las fíbulas, su patrón de distribución varía en los extremos valvares.

El manto valvar es bajo, con estrías de 3 a 4 poroides de alto. La cintura está formada por 4 bandas, la *valvocopula* es más angosta y lisa y el resto presenta estrías, 19-20 en 10 μm , con más de dos hileras de poroides.

OBSERVACIONES NOMENCLATURALES

Esta especie fue creada por Frenguelli en 1939, sobre la base de material proveniente del Golfo San Matías, Provincia de Río Negro, 42°52' S; 64°59' W, sin designar material tipo. Sar *et al.* (1998), basados en el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN), artículos 7.2 y 9.1 (Greuter *et al.*, 2000) designaron la ilustración que acompaña a la diagnosis, como holotipo de *P. australis*. Una revisión al microscopio óptico de los materiales de las series 382 y 397 correspondientes al trabajo de 1939, depositados en la Colección Frenguelli, demostró que *P. australis* fue asignada erróneamente a la serie 382. La especie fue encontrada en los preparados de la serie 397, los que fueron designados como isotipos, y el punto donde fue recogida la muestra pertinente fue designado como localidad tipo.

DISTRIBUCIÓN

Hasle (1972) señaló que *P. australis* estaba circunscripta a aguas costeras del Hemisferio Sur, donde había sido reportada para Chile, Perú, Argentina, Africa Sudoccidental y Nueva Zelanda. Sin embargo Horner & Postel (1993), Lange *et al.* (1994), Villac *et al.* (1993a) y Fryxell *et al.* (1997) la encon-

traron en varios puntos de la costa oeste del Pacífico de EEUU y Hernández-Becerril (1998) en áreas costeras del Pacífico mejicano.

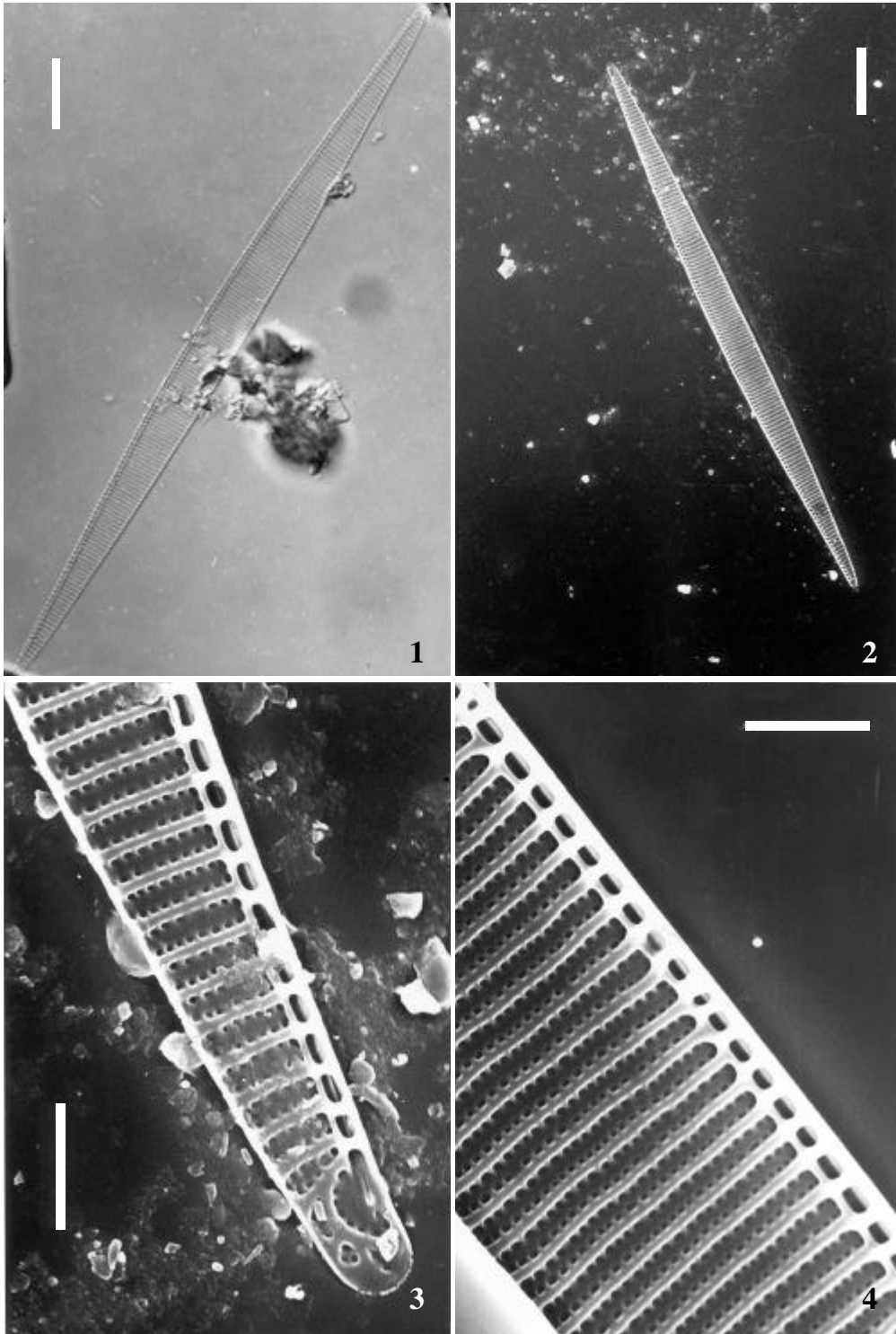
En el Cono Sur Americano, *P. australis* ha sido registrada al sur de Brasil, en la Laguna de los Patos (Rio Grande do Sul) por Odebrecht *et al.* (2001), en aguas costeras del litoral argentino por Frenguelli (1939), Hasle (1965), Negri & Inza (1998), Sar *et al.* (1998), Ferrario *et al.* (1999) y Sastre *et al.* (2001) y a lo largo de la costa Chilena, 36°- 41°S, por Rivera (1985).

En el catálogo de Ferrario & Galván (1989) *P. seriata* (Cleve) H. Peragallo figura con numerosas citas para las costas de Argentina. Dado que todas ellas fueron realizadas en base a análisis efectuados con MO, que esta especie es semejante a *P. australis* con este nivel de resolución y que no hay ninguna cita fehaciente de *P. seriata* en el Hemisferio Sur, consideramos que es altamente probable que estas citas sean erróneas y que correspondan a *P. australis*. En tal caso la especie se distribuiría entre el Norte de la Provincia de Buenos Aires y el Sur de Tierra del Fuego.

PRODUCCIÓN DE AD

En un episodio ocurrido en septiembre de 1991, en la Bahía de Monterey, California, se reportó por primera vez a *Pseudo-nitzschia australis* como especie productora de AD (Garrison *et al.*, 1992; Buck *et al.*, 1992; Fritz *et al.*, 1992). Este caso tuvo características diferentes al anterior en el que se registró mortandad de organismos por intoxicación con AD. La toxina no afectó al hombre sino a aves marinas como pelícanos (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*), cuya fuente principal de alimentación es la anchoita (*Engraulis mordax*), que fue en esta ocasión el organismo vector (Fritz *et al.*, 1992; Work *et al.*, 1993).

En octubre y noviembre del mismo año, se detectó la presencia de AD en las costas de California, Oregon y Washington. Taylor & Horner (1994), sugirieron que este evento pudo haber sido causado por floraciones de *P. australis*. En este episodio fueron afectadas personas que habían consumido navajas de mar (*Siliqua patula*) y cangrejos (*Cancer magister*) en los que se hallaron altas concentraciones de AD. Esto motivó la clausura de la pesca comercial y recreacional en el área afectada.



Figs. 1-4. *Pseudo-nitzschia australis*. Fig. 1. (MO). Aspecto general de la valva. Figs. 2-4. (MEB). Fig. 2. Aspecto general de la valva en vista interna. Fig. 3. Vista interna de uno de los extremos valvares. Fig. 4. Vista interna de las estrias centrales compuestas por dos hileras de poroides. Escalas: Figs. 1-2 = 10 μ m; Figs. 3-4 = 2 μ m.

P. australis fue posteriormente asociada a niveles bajos de AD y a intoxicaciones leves de humanos en Los Ángeles, Oregon y en la boca del Río Columbia (Anónimo, 1991). Los test de laboratorio llevados a cabo sobre clones aislados de algunos de los lugares antes mencionados dieron positivo para AD (Villac *et al.*, 1993 a).

A fin de establecer la distribución espacio-temporal de las especies de *Pseudo-nitzschia* en la costa oeste de EEUU, Lange *et al.* (1994) y Fryxell *et al.* (1997) llevaron a cabo una revisión de datos históricos correspondientes a tres períodos de tiempo, 1920-43, 1960-90 y 1991-96. En las conclusiones del análisis estos autores indicaron que *P. australis* había estado presente en primavera/verano en el plancton marino al sur de California y señalaron que los materiales determinados como *P. seriata* correspondían a *P. australis*.

Buck *et al.* (1992) comentaron que las grandes mortandades de pelícanos ocurridas en los meses de otoño de 1971, 1976 y 1981, a las que no se había encontrado explicación en su momento, podrían deberse también a intoxicación con AD producido por *P. australis*.

Recientemente se ha registrado por primera vez la muerte de mamíferos marinos por efecto del AD que estuvo asociada a una floración de *P. australis*, ocurrida en la Bahía de Monterey, California (Scholin, 1999; Scholin *et al.*, 2000).

Hasta el presente, ésta es la especie responsable de la mayor parte de los episodios de intoxicación con AD en la costa oeste de EEUU y la causante de vedas al consumo de bivalvos (Anónimo, 1991). En Nueva Zelanda, fueron registradas floraciones de *P. australis* asociadas con la presencia de AD entre los años 1993 y 1996 (Rhodes *et al.*, 1996).

En el Cono Sur Americano el primer hallazgo de AD producido por una diatomea fue realizado por López y colaboradores, en la X Región (Chile), en marzo de 1997 (comunicado en el «Segundo Taller de Floraciones de Algas Nocivas» Valparaíso, Chile, 1998). La especie productora fue *P. australis* y el veneno fue detectado en almejas (*Venus antiqua*). Los valores de AD determinados, 13 a 15.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de carne de molusco, fueron inferiores a los establecidos como límite regulatorio para consumo humano (20 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Las muestras de fitoplancton fueron colectadas en la capa superficial de la columna de

agua en enero, febrero y marzo. El número de células por litro encontrado fue de 50500, 102400 y 15500 respectivamente, valores que estuvieron positivamente correlacionados con las concentraciones de AD.

Recientemente Montoya y colaboradores detectaron la presencia de AD en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguayana en el mes de julio de 2000, en muestras de fitoplancton, de mejillón (*Mytilus edulis*) y de anchoíta (*Engraulis anchoita*). La especie productora fue *P. australis* y los valores detectados fueron 7.7 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido en mejillón y 4.9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido y 76.6 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de contenido gastrointestinal en anchoíta (Negri, com. pers.).

Walz *et al.* (1994) llevaron a cabo estudios sobre las condiciones de producción de ácido domoico en *P. australis* en la Bahía de Monterey, California y sugirieron que esta especie puede ser siempre toxigena en poblaciones naturales, independientemente de la densidad poblacional.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1965) señaló que *P. australis* fue encontrada en el Pacífico Sur y en el Atlántico Sur en un rango de temperaturas entre 6.1 y 15.6 °C. Un estudio sobre la distribución de esta especie en la Bahía de Monterey durante el período 1989-1991 realizado por Buck *et al.* (1992) demostró que presenta un máximo anual en otoño a temperaturas comprendidas entre los 13 y 14 °C, salinidades entre 30 y 33 psu y bajas concentraciones de nutrientes. Horner & Postel (1993) observaron altas concentraciones de *P. australis* en otros puntos de la costa oeste de los EEUU durante primavera y verano.

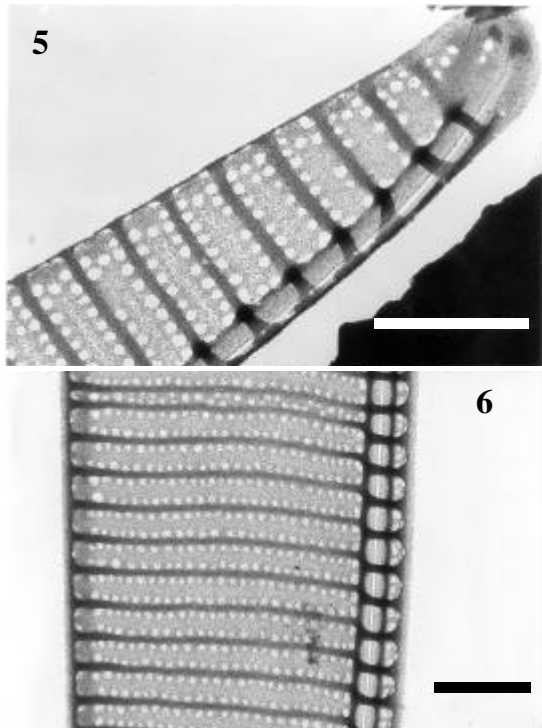
En las costas de Argentina, *P. australis* fue hallada a temperaturas entre los 6 y 21.7 °C y salinidades entre 33.45 y 34.16 psu (Negri & Inza, 1998; Ferrario *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 2001).

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. australis* son: *P. seriata* (Cleve) H. Peragallo y *P. seriata* f. *obtusa* (Hasle) Hasle. Las diferencias sobresalientes entre estos taxa surgen del resumen de caracteres presentados para cada uno a continuación:

P. australis

- Células simétricas según el plano apical, asimétricas en especímenes de pequeño tamaño.



Figs. 5-6. *Pseudo-nitzschia australis*. (MET). Fig. 5. Detalle de uno de los extremos valvares. Fig. 6. Detalle de las estrías de la superficie valvar, rafe y manto. Escala = 2 μ m.

- Extremos valvares redondeados a subrostrados.
- Estrías con dos hileras de poroides.
- Poroides: 4-5 en 1 μ m.

P. seriata

- Contorno valvar con un margen curvo y el otro casi recto.
- Extremos valvares redondeados.
- Estrías con más de dos hileras de poroides (3-5).
- Poroides: 7-8 en 1 μ m.

P. seriata f. *obtusa*

- Contorno valvar con un margen curvo y el otro casi recto.
- Extremos valvares obtusos.
- Estrías con dos hileras de poroides.
- Poroides: 7-8 en 1 μ m.

Hasle (1965), en la descripción original, diferencia a *P. seriata* f. *obtusa* de la forma nominal por ser más corta (61-100 μ m) y más angosta (4.5-5.5 μ m), por tener extremos obtusos y por su mayor densidad de estrías (15-20 en 10 μ m). Estos taxa difieren más notoriamente si se consideran caracteres

ultraestructurales, las estrías en la forma *obtusa* son biseriadas, y multiseriadas en la forma nominal, sin embargo el número de poroides por estría es el mismo en ambas. Las diferencias entre *P. seriata* f. *obtusa* y *P. australis* son sutiles en cuanto a los parámetros morfométricos y la morfología de las estrías (biseriadas en ambos taxa) y mayores en cuanto a la densidad de poroides. A nuestro entender, *P. seriata* f. *obtusa* es más semejante a *P. australis* que a *P. seriata* f. *seriata* en el tipo de estría, carácter relevante para diferenciar especies dentro del género, por lo que consideramos necesaria la revisión de la forma.

Pseudo-nitzschia delicatissima (P.T. Cleve)

Heiden in Heiden & Kolbe

Heiden & Kolbe, 1928: 672; Hasle, 1965: 35-36, lam. 2, fig. 10; lam.15, figs.19-23, lam. 16, figs. 3-7; Hasle, 1976: 102-104, figs.1-5; Hasle *et al.*, 1996: 144-146, figs. 17-19, 57-61.

Basiónimo: *Nitzschia delicatissima* P.T. Cleve.

Sinónimo: *Nitzschia actydropbila* Hasle.

Neotipo: preparado etiquetado como *Nitzschia delicatissima*, Helder 7/5/97; Hasle *et al.* (1996) fig. 23.

Localidad tipo: Atlántico, 63 10' N, 0 36 E; Spitzbergen, Suecia.

Localidad neotipo: Helder, Holanda.

Las células están unidas formando colonias por superposición de sus extremos en aproximadamente 1/9 del largo total. Los frústulos en ambas vistas son estrechos, linear-lanceolados con los ápices suavemente sigmoideos. Los extremos son redondeados en vista valvar y truncados en vista conectival. En materiales tratados y montados en un medio con alto índice de refracción es posible visualizar las fíbulas y el interespacio central, que ocupa aproximadamente el espacio de tres interestrías. El eje apical es de 42 a 66 μ m y el eje transapical de 1.0-1.5 μ m. La superficie valvar presenta mayor número de estrías (36-40 en 10 μ m) que de fíbulas (20-23 en 10 μ m). Al MEB se observa que cada estría está formada por dos hileras de pequeños poroides de forma triangular a hexagonal, 10-12 en 1 μ m. El manto valvar es bajo con 1 poroide de alto. Cíngulo constituido por varias bandas: la *valvocopula* con una hilera de poroides semejantes a los de la superficie valvar, otras con diferente ornamentación y algunas lisas.

DISTRIBUCIÓN

Esta especie ha sido hallada en la costa oeste de EEUU (Villac *et al.*, 1993 a); en las costas de Europa, en Noruega (Hasle, 1965) y España (Fraga *et al.*, 1998); en el Noroeste de África (Hasle, 1965); en Japón (Takano & Kuroki, 1977); en Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998) y en aguas Árticas y Subárticas (Hasle & Medlin, 1990).

En el Cono Sur Americano, *P. delicatissima* fue registrada en el Océano Pacífico, Chile, entre los 18° 17' S y 42° 07' S (Rivera, 1985).

PRODUCCIÓN DE AD

Smith *et al.* (1991) detectaron AD por primera vez en cultivos de *P. delicatissima* procedentes del Golfo de San Lorenzo, Canadá.

Durante 1994, fueron detectados niveles bajos de AD en las costas de Newfoundland, Canadá, en tejido de mejillones y vieiras provenientes de cultivo y de poblaciones naturales. Bates (1997) sugirió que si bien en este episodio el organismo productor de la toxina no se identificó, *P. delicatissima* y *P. seriata* podrían haber sido las causantes, ya que constituyen un componente común del fitoplancton del área.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1965) registró a *P. delicatissima* en aguas costeras de Noruega, en un amplio rango de temperatura (-1.4-18.5 °C) y del Noroeste de África (18-19 °C).

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. delicatissima* son: *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle, *P. lineola* (P.T. Cleve) Hasle y *P. cuspidata* (Hasle) Hasle. Las principales diferencias entre estos taxa surgen del resumen de caracteres presentados para cada uno a continuación:

P. delicatissima

- Valvas linear-lanceoladas.
- Eje apical: 27-88 µm.
- Eje transapical: 1.0-2.2 µm.
- Extremos redondeados en vista valvar y truncados en vista conectival.
- Estrías con dos hileras de poroides hexagonales y triangulares.

- Poroides: 10-12 en 1 µm.
- *Valvocopula* con 1 poroide de alto.
- Con interespacio central.

P. pseudodelicatissima

- Valvas lineares.
- Eje apical: 48-140 µm.
- Eje transapical: 1.2-2.5 µm.
- Extremos aguzados en vista valvar y conectival.
- Estrías con una hilera de poroides cuadrangulares.
- Poroides: 4-6 en 1 µm.
- Estrías de la *valvocopula*, 4-6 poroides de alto y 2-3 de ancho.
- Con interespacio central.

P. cuspidata

- Valvas linear-lanceoladas.
- Eje apical: 30-80 µm.
- Eje transapical: 3 µm.
- Extremos aguzados en vista valvar y aguzados, suavemente sigmoideos en vista conectival.
- Estrías con una hilera de poroides cuadrangulares.
- Poroides: 5-6 en 1 µm.
- *Valvocopula*, sin datos.
- Con interespacio central.

P. lineola

- Valvas lineares a ligeramente lanceoladas.
- Eje apical: 56-112 µm.
- Eje transapical: 1.8-2.7 µm.
- Extremos redondeados a subrostrados en vista valvar y aguzados, ligeramente sigmoideos en vista cingular.
- Estrías con una hilera de poroides circulares.
- Poroides: 3-7 en 1 µm.
- *Valvocopula*, sin datos.
- Con interespacio central.

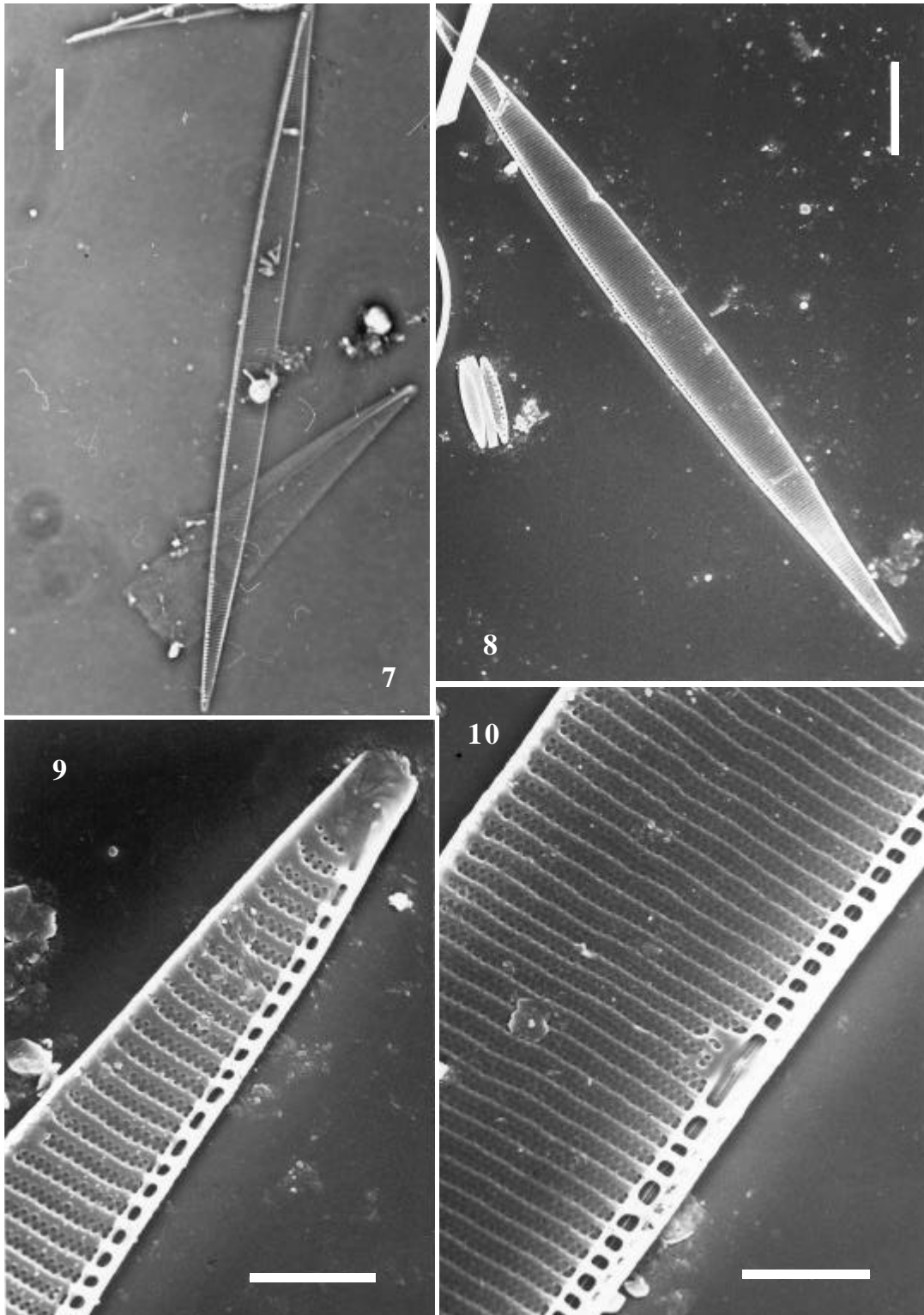
Pseudo-nitzschia fraudulenta (P.T. Cleve) Hasle
Figs. 7-12

Hasle, 1993: 318; Hasle, 1965: 15, lam. 1, figs. 2-3, lam. 4, figs. 8-10, lam. 6, figs. 5-10, lam. 8, figs. 1-3; Rivera, 1985: 15, figs. 43-46; Hasle *et al.*, 1996: 144-146, figs. 20, 65-69.

Basiónimo: *Nitzschia fraudulenta* Cleve 1897.

Sinónimo: *Pseudo-nitzschia seriata* var. *fraudulenta* (Cleve) H. Peragallo in Peragallo, H. & M. Peragallo (1897-1908).

Localidad tipo: Plymouth Harbour.



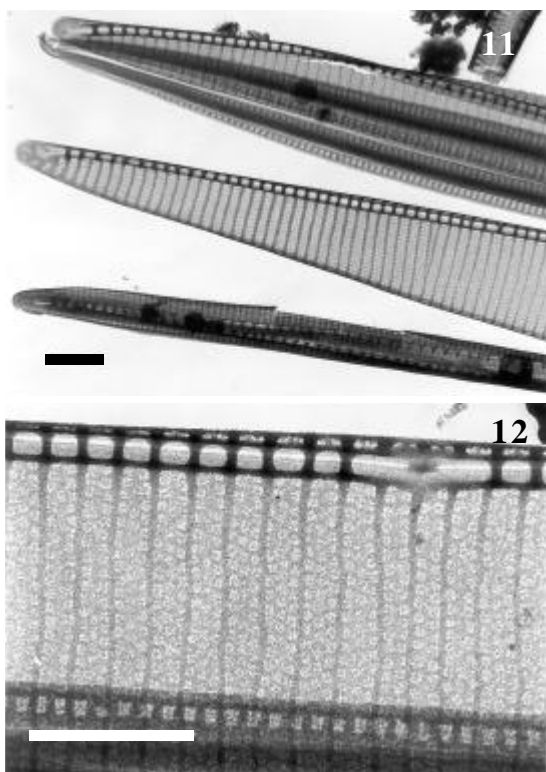
Figs. 7-10. *Pseudo-nitzschia fraudulentum*. Fig. 7. (MO). Aspecto general de la valva. Figs. 8-10. (MEB). Fig. 8. Aspecto general de la valva en vista interna. Fig. 9. Detalle de uno de los extremos valvares en vista interna. Fig. 10. Detalle del interespacio central, nódulo y estrías formadas por dos y tres hileras de poroides. Escalas: Figs. 7-8 = 10 μ m; Figs. 9-10 = 2 μ m.

Lectotipo: lam. XV-21, Hasle 1994, Fig. 4.

Las colonias están formadas por superposición de los extremos valvares en 1/6 a 1/8 del largo total de la célula. Los frústulos son poco silicificados, lanceolados con extremos aguzados en vista valvar y linear-lanceolados, con extremos aguzados en vista cingular. El eje apical es de 72 a 88 μm y el eje transapical de 5.7 a 7.2 μm .

El número de interestrías de la valva es aproximadamente igual al número de fíbulas. Las estrías, 17-20 en 10 μm , presentan dos a tres hileras de poroides cuadrangulares y densamente dispuestos, 6 en 1 μm . Las fíbulas, 18-20 en 10 μm , coinciden con las interestrías de la superficie valvar y con las estrías o interestrías del manto. Los extremos valvares presentan un patrón de distribución de estrías diferente, en uno las estrías son uniseriadas y oblicuas.

El rafe tiene un nódulo conspicuo y un interespacio central grande de 3 a 4 estrías de largo.



Figs. 11-12. *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (MET). Detalle de extremos valvares y bandas con estrías. Fig. 12. Detalle del interespacio central, nódulo, estrías y manto valvar. Escala = 2 μm .

El manto valvar tiene 1 a 2 poroides de alto. El cingulo esta formado por bandas estriadas y lisas. La *valvocopula* presenta estrías con 10 poroides de alto.

DISTRIBUCIÓN

P. fraudulenta es cosmopolita según Hasle & Syvertsen (1997). Fraga *et al.* (1998) hallaron esta especie en la costa de Galicia. Villac (1996) en su resumen de la distribución de las especies de *Pseudo-nitzschia*, señaló que ha sido reportada para el Mar de Noruega, el Estrecho de Dinamarca, el Canal de la Mancha y África. Otras citas de *P. fraudulenta* son las de Rhodes *et al.* (1998) para Nueva Zelanda, Hallegraeff (1994) para Australia, Takano & Kuroki (1977) para la Bahía de Ofunato, Japón, Villac (1996) para la Bahía de Monterey y Hernández-Becerril (1998) para las costas del Pacífico en México.

En el Cono Sur Americano esta especie ha sido reportada para los 44° S en costas de Chile por Hasle (1972) y entre los 18° 20' S y los 53° 50' S por Rivera (1985). En Brasil fue registrada en las costas de Río Grande, Laguna de los Patos (Odebrecht *et al.*, 2001) y en Argentina fue mencionada para la costa de la Provincia de Buenos Aires (Ferrario *et al.*, 1999).

PRODUCCIÓN DE AD

Esta especie fue recientemente incorporada a la lista de diatomeas toxígenas por Rhodes *et al.* (1998) quienes detectaron AD a partir de cepas de *P. fraudulenta* aisladas del Banco de Matakana, Nueva Zelanda.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1965) señaló que *P. fraudulenta* puede encontrarse en un amplio rango de temperatura entre los 9 °C y los 28.5 °C. Hallegraeff (1994) también halló a la especie ampliamente distribuida en aguas tropicales, 25-30 °C, subtropicales y templadas, 8-18 °C, de la costa australiana, como formadora de las floraciones de primavera.

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. fraudulenta* son: *P. subfraudulenta* y *P. australis*. Las diferencias sobresalientes entre estos taxa surgen del resumen de caracteres presentados para cada uno a continuación:

P. fraudulenta

- Contorno valvar lanceolado con márgenes curvos.
- Extremos valvares aguzados.
- Estrías con dos a tres hileras de poroides.
- Estrías y fíbulas en igual número.
- Poroides: 4-6 en 1 µm.
- Largo del interespacio central equivalente a 3-4 estrías.

P. subfraudulenta

- Contorno valvar linear-lanceolado con márgenes rectos en la mayor parte de su longitud.
- Extremos valvares aguzados en vista valvar y conectival.
- Estrías con dos hileras de poroides.
- Estrías en mayor número que las fíbulas.
- Poroides: 5-6 en 1 µm.
- Largo del interespacio central equivalente a 4-5 estrías.

P. australis

- Contorno valvar lanceolado con márgenes curvos.
- Extremos valvares redondeados a subrostrados.
- Estrías con dos hileras de poroides.
- Estrías en igual número que las fíbulas.
- Poroides: 4-5 en 1 µm.
- Sin interespacio central.

P. fraudulenta y *P. subfraudulenta* se diferencian principalmente por el contorno valvar y por la relación entre el número de estrías y fíbulas en 10 µm.

Pseudo-nitzschia multiseries (Hasle) Hasle
Figs. 13-16

Hasle, 1995: 428-435, figs. 2, 4-5, 7, 9, 11-13, 17-18;
Hasle *et al.*, 1996: 140-142, figs. 2, 7-9, 38-44; Ferrario
et al., 1999: 137, 140, Figs. 11-14.

Basionimo: *Nitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle
1974.

Sinónimo: *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*
(Hasle) Hasle 1993.

Localidad tipo: Drøbak, Oslofjord, Noruega.

Holotipo: IMBB, Marine Botany, Department of Biology,
University of Oslo, n°16, Hasle (1995), Fig. 2.

Las colonias están formadas por superposición
de los extremos valvares en aproximadamente 1/3
del largo total de la célula. Los frústulos son linear-

lanceolados en vistas cingular y valvar, con extremos
puntiagudos. El eje apical es de 76 a 169 µm y el eje
transapical de 4.2 a 5.3 µm.

La superficie valvar presenta igual número de
fíbulas e interestrías, 12 a 16 en 10 µm. En prepara-
dos transitorios de material tratado, analizados con
MO, sólo es posible visualizar las fíbulas y las
interestrías. Al MEB se observa que las estrías es-
tán formadas por tres a siete hileras de poroides cir-
culares, densamente dispuestos, 4 a 6 en 1 µm, y al-
ternan con interestrías internamente elevadas. Las
estrías de los extremos valvares tienen una o dos hi-
leras de poroides y un patrón de distribución diferen-
te en cada extremo de una misma valva. El rafe es
continuo, sin interespacio central.

El manto valvar es bajo y presenta estrías seme-
jantes a las de la superficie valvar, formadas por 3 a
4 hileras de poroides de ancho y por 2 a 3 poroides
de alto. La cintura está compuesta por bandas an-
chas en la parte media y muy aguzadas en los extre-
mos, con una hilera de estrías cortas, 19 a 22 en 10
µm.

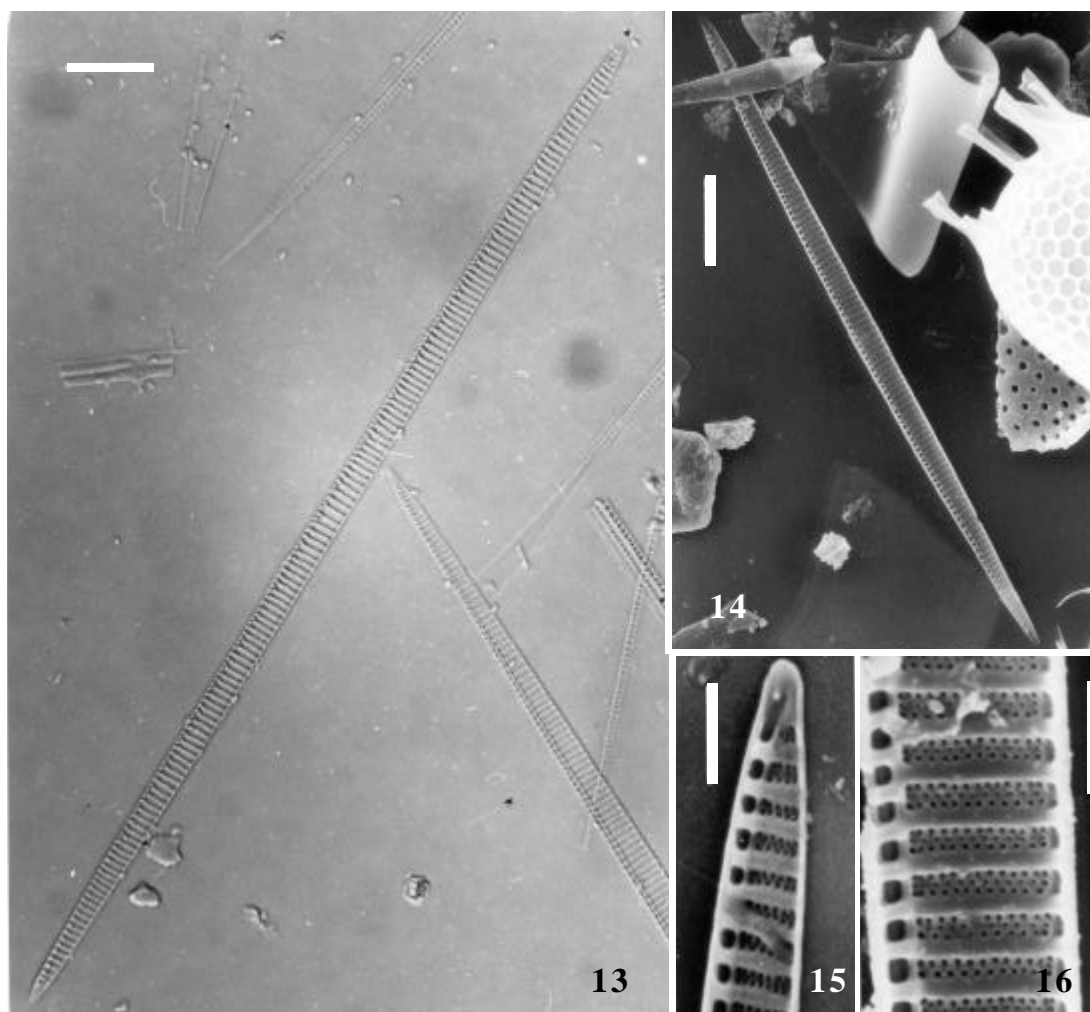
OBSERVACIONES

P. multiseries fue descrita por Hasle (1965)
como *Nitzschia pungens* f. *multiseries* y posterior-
mente elevada al rango de especie por la misma au-
tora. La descripción original fue hecha sobre mate-
rial procedente de cinco localidades, entre ellas
Quequén, Provincia de Buenos Aires, Argentina y
Atlántida, Uruguay.

DISTRIBUCIÓN

Esta especie es cosmopolita, ha sido hallada en
ambos hemisferios en aguas costeras del Pacífico y
del Atlántico y en el Mar Mediterráneo. A continua-
ción mencionaremos algunas de las citas de la espe-
cie sin la pretensión de agotarlas completamente. En
el Atlántico Norte ha sido reportada para las costas
desde Nueva Inglaterra hasta el Golfo de México
(Hasle, 1972; Fryxell *et al.*, 1990; Villarreal *et al.*,
1994; Parsons *et al.*, 1999), para las costas de Galicia
(Fraga *et al.*, 1998) y para los fiordos de Trondheims
y Oslo (Hasle, 1995). También hay registros de esta
especie en Grecia, Golfo Saronicos (Villac, 1996).

En el Océano Pacífico fue encontrada en la cos-
ta de EEUU (Fryxell *et al.*, 1997), Japón (Takano &



Figs. 13-16. *Pseudo-nitzschia multiseries*. Fig. 13. (MO). Aspecto general de la valva. Figs. 14-16. (MEB). Fig. 14. Aspecto general de la valva en vista interna. Fig. 15. Detalle de uno de los extremos valvares en vista interna. Fig. 16. Vista valvar interna. Escalas. 13-14 = 10 μm ; Figs. 15-16 = 2 μm .

Kuroki, 1977), Korea (Fryxell *et al.*, 1990) y Australia (Hallegraeff, 1994).

En el Atlántico Sur *P. multiseries* fue registrada en la costa meridional de Brasil, Laguna de los Patos, por Odebrecht *et al.* (2001). Villac & Tenenbaum (2001) hallaron materiales a los que designaron como *P. aff. multiseries* en las aguas costeras de Río de Janeiro. Ferrario *et al.* (1999) y Sastre *et al.* (2001) reportaron la especie para aguas de la Provincia de Chubut (Golfo San José).

PRODUCCIÓN DE AD

Tal como señaláramos al comienzo del capítulo, esta especie fue la causante del primer evento de intoxicación con AD, ocurrido en la isla Príncipe Eduardo, Canadá (Subba Rao *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1988; Wright *et al.*, 1989; Todd, 1993). La concentración de toxina en el organismo vector (*Mytilus edulis*) llegó a 900 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Addison & Steward, 1989). Wang *et al.* (1993) analizaron muestras de fitoplancton y material de cultivo de *P. multiseries* colectados en el lugar del primer episodio durante una floración en 1988 y detectaron además de AD dos nuevos compuestos no tóxicos, bacillariolides I y II (eicosanoides ciclopentanos).

Horner & Postel (1993) reportaron un evento ocurrido en 1992 en las costas de Puget, Washington. Niveles bajos de AD (menores a $5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) fueron detectados en ostras y mejillones, concomitantemente con la presencia de *P. multiseriis* en el área. Otros reportes sobre producción de AD en cultivos aislados en diversas áreas del Atlántico Norte, figuran en Reap (1991), Villarreal *et al.* (1994), Manhart *et al.* (1995) y Villac (1996).

El primer reporte de producción de AD por *P. multiseriis* para el Noroeste Europeo fue realizado por Vrieling *et al.* (1996), quienes aislaron esta especie del Mar del Norte en Holanda.

Bates *et al.* (1991) demostraron que *P. multiseriis* produce AD en la fase estacionaria y senescente del cultivo, cuando las células están limitadas entre otros factores por la concentración de silicatos y hay abundante nitrógeno disponible.

Hargraves *et al.* (1993) estudiaron los efectos de la exposición a diferentes niveles de UV, sobre el crecimiento, la producción de AD y de bacillariolides I y II, en clones de *P. multiseriis* y de otras especies de *Pseudo-nitzschia*, aislados de la Bahía Narragansett, Rhode Island. Estos autores comprobaron que el crecimiento y la producción de bacillariolides I y II en *P. multiseriis*, no fueron afectados por el incremento de UV, sí lo fue en cambio la producción de AD, que disminuyó.

En la costa Atlántica del Cono Sur Americano, no hay registros de *P. multiseriis* como productora de AD a pesar de que la especie ha sido frecuentemente citada como componente importante del fitoplancton marino costero.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1965) señaló que *P. multiseriis* es una especie estacional en aguas del Fiordo de Oslo, que aparece en otoño y principios de invierno a temperaturas de 2 a 14 °C y eventualmente a temperaturas bajo cero, -1.4 °C.

Observaciones de campo y experiencias de laboratorio sugieren que aguas frías y altas concentraciones de nitrógeno, estimularían el incremento de las poblaciones de *P. multiseriis* (Villac *et al.*, 1993 b). Las condiciones bajo las cuales la población de esta especie incrementó su densidad, durante los eventos sucedidos en Príncipe Eduardo y en la Bahía de

Monterey, fueron efectivamente similares a las enunciadas en el párrafo anterior (Fryxell *et al.*, 1991; Dickey *et al.*, 1992).

Buck *et al.* (1992) consideran que *P. multiseriis* tiene un amplio rango de tolerancia ambiental lo que se ve reflejado en su amplia distribución. Esta especie se encuentra en aguas frías, aún bajo cubierta de hielo (Smith *et al.*, 1989) y es capaz de sobrevivir en cultivo con temperaturas de 29 a 30 °C (Fryxell *et al.*, 1990). A pesar de la evidente tolerancia a la temperatura que presenta la especie, Lewis *et al.* (1993) señalaron que la tasa de crecimiento en cultivo es máxima a bajas temperaturas (5-15 °C).

En el Golfo San José, Argentina, *P. multiseriis* fue hallada en todas las estaciones del año, presentando los valores máximos de abundancia en primavera y verano, a temperaturas de 12 a 17.5 °C (Sastre *et al.*, 2001).

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. multiseriis* son: *P. pungens* (Grunow ex P.T Cleve) Hasle y *P. seriata* (P.T Cleve) H. Peragallo f. *seriata*. Las diferencias sobresalientes entre estos taxa surgen del resumen de caracteres presentados para cada uno a continuación:

P. multiseriis

- Contorno valvar simétrico según el eje apical.
- Extremos valvares puntiagudos.
- Manto valvar con 2 a 3 poroides de alto.
- Estrías formadas por más de 2 hileras de poroides indistinguibles al MO.
- Estrías de ambos extremos valvares con número similar de poroides y diferente patrón de distribución.

P. pungens var. *pungens*

- Contorno valvar simétrico según el eje apical.
- Extremos valvares puntiagudos.
- Manto valvar con 1 poroide de alto.
- Estrías formadas por 2 hileras de poroides visibles al MO.
- Estrías de ambos extremos valvares desiguales, con menor número de poroides en uno que en otro y con diferente patrón de distribución.

P. seriata

- Contorno valvar asimétrico según el eje apical.
- Extremos valvares redondeados.

- Estrías formadas por más de 2 hileras de poroides, 3-4, indistinguibles al MO.
- Manto con 2 a 3 poroides de alto.
- Estrías de ambos extremos valvares con diferente patrón de distribución.

Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima (Hasle)

Hasle
Figs. 17-19

Hasle, 1993: 319; Hasle, 1965: 37-40, lam.14, figs. 4-5, lam.16, figs. 8-18, lam. 17, figs.1-16; Hasle *et al.*, 1996: 149-150, figs. 26-29, 76-81; Ferrario *et al.*, 1999: 141-143, figs. 21-24.

Basiónimo: *Nitzschia pseudodelicatissima* Hasle 1976.

Sinónimo: *Nitzschia delicatula* Hasle 1965, no *N. delicatula* de Skvortzow 1946.

Localidad tipo: Estrecho de Dinamarca.

Holotipo: IMBB n° 23, Hasle *et al.* 1996: fig. 27.

Las colonias se forman por superposición de los extremos valvares de células contiguas, 1/8 a 1/9 del largo total del eje apical. Los frústulos son de estructura delicada, lineares en vista valvar y lanceolados en vista conectival, con los extremos aguzados. El eje apical es de 48 a 100 μm y el eje transapical de 1.2 a 2 μm .

Superficie valvar con mayor densidad de estrías, 28-40 en 10 μm , que de fíbulas, 17-26 en 10 μm . Interestrías ocasionalmente visibles, según el grado de silicificación de la pared. Las fíbulas delimitan un interespacio central de cuatro estrías de largo, que es distinguible en material tratado. Al MEB se observa que cada estría está compuesta por una hilera de grandes poroides cuadrangulares, con velo complejo, 5-6 en 1 μm .

El manto valvar posee sólo un poroide de alto, los poroides son estructuralmente semejantes a los situados en la superficie valvar. Cíngulo compuesto por tres bandas, ornamentadas por una hilera de poroides semejantes a los de la valva.

OBSERVACIONES

P. pseudodelicatissima fue descrita por Hasle en 1965 como *Nitzschia delicatula*, pero esta autora ya había publicado ilustraciones de la especie bajo el nombre de *Nitzschia* sp. (Hasle, 1964, figs.1a-b).

DISTRIBUCIÓN

P. pseudodelicatissima tiene amplia distribución y podría considerarse cosmopolita aunque no hay registros fehacientes para el Sector Antártico (Hasle & Syvertsen, 1997). Villac (1996) revisó la distribución de esta especie y señaló que fue reportada para aguas del Atlántico de Canadá, EEUU, Golfo de México, Mar de Noruega, Estrecho de Dinamarca y Portugal. Hasle (1965) describió a *P. pseudodelicatissima* como un elemento común en aguas alejadas de la costa noroeste de África; Hallegraeff (1994) la reportó para el Pacífico en la costa de California, Columbia Británica, Tasmania y Australia y Takano & Kuroki (1977) para la costa de Japón. *P. pseudodelicatissima* fue mencionada además para el Mar Índico, Mar Adriático y Mar Ártico (Hallegraeff, 1994) y para el Mar Negro (Davidovich & Bates, 1998).

En el Cono Sur Americano esta especie ha sido hallada en las costas del Pacífico, entre los 23° 50' S y 53° 13' S (Rivera, 1985; Hasle, 1965), Chile. En el Océano Atlántico fue reportada para la costa central y sur de Brasil (Villac & Tenenbaum, 2001; Odebrecht *et al.*, 2001) y para el Mar Argentino, en varios puntos de la costa de las Provincias de Buenos Aires, Río Negro y Chubut durante todo el año (Ferrario *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 2001).

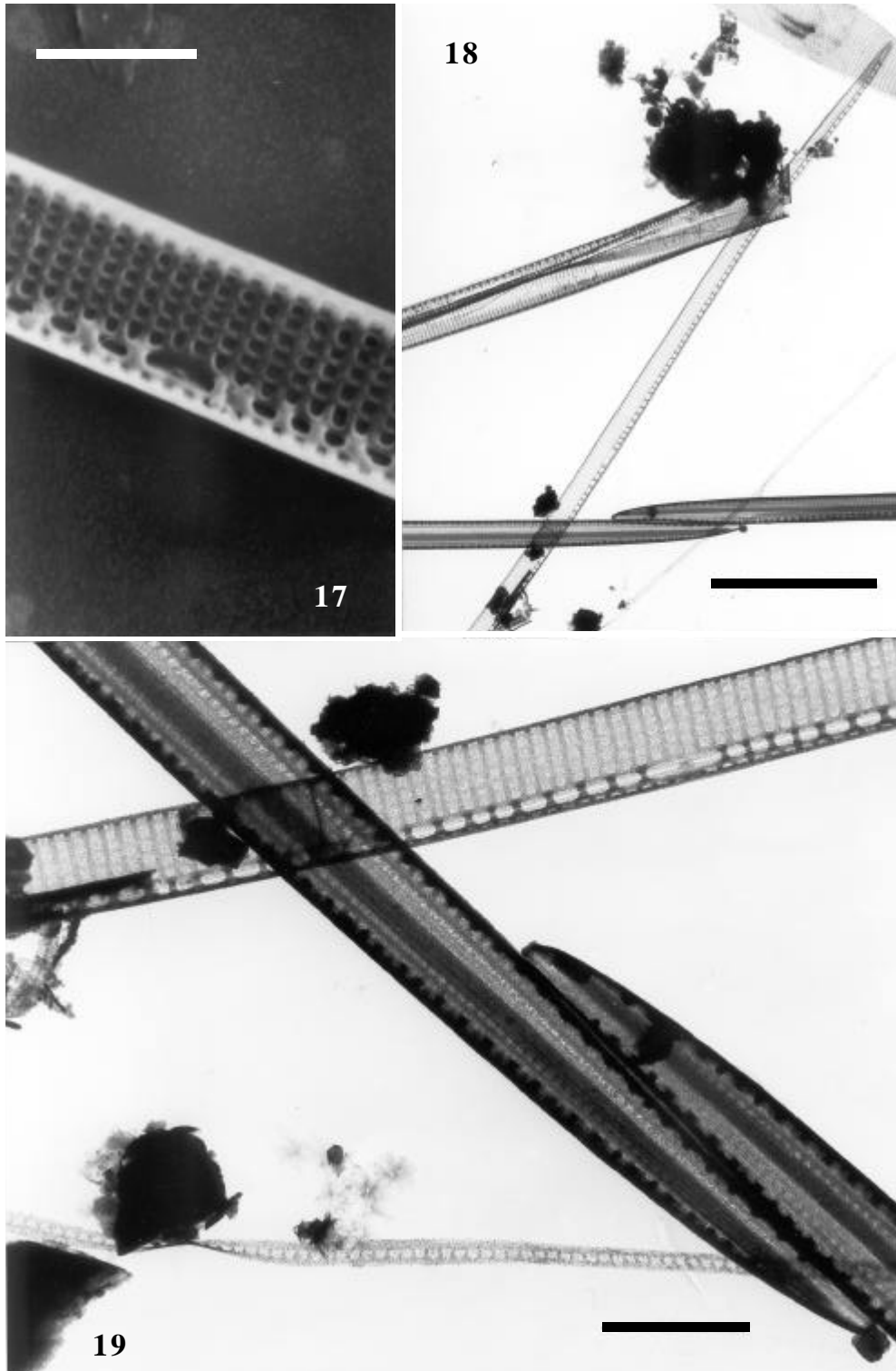
PRODUCCIÓN DE AD

Durante 1988 se detectó AD en almejas (*Mya arenaria*) y mejillón (*Mytilus edulis*) al Sudoeste de la Bahía de Fundy, Canadá, en concentraciones superiores al límite regulatorio para consumo humano. Martin *et al.* (1990) determinaron que el organismo implicado en la producción de la toxina era *P. pseudodelicatissima*. Hasta esa fecha esta especie no había sido señalada como productora de AD.

En el Cono Sur Americano, Proença & Villac (com. pers.), detectaron bajas concentraciones de AD (67 fg · cel⁻¹) en cepas de *P. pseudodelicatissima* aisladas del área costera de Brasil.

DATOS ECOLÓGICOS

Hallegraeff (1994) encontró a *P. pseudodelicatissima* como dominante en aguas costeras templadas de Tasmania, en concentraciones de 6.5 · 10⁷ cel · l⁻¹, y en aguas cálidas del noroeste y oeste de Australia.



Figs. 17-19. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. Fig. 17. (MEB). Detalle del interspacio central y estrías compuestas por una hilera de poroides. Figs. 18-19. (MET). Fig. 18. Aspecto general de la célula en vistas valvar y cingular. Fig. 19. Detalle del interspacio central, del nódulo y de la superposición de los extremos valvares. Escalas: Figs. 17 y 19 = 2 μ m; Fig. 18 = 10 μ m.

Martin *et al.* (1993), analizaron la distribución temporal de esta especie en el área de Bahía de Fundy, e indicaron que *P. pseudodelicatissima* se encuentra durante todo el año, alcanzando su máxima concentración cuando la temperatura del agua es elevada. Sastre *et al.* (2001) hallaron esta especie en la costa Patagónica en primavera y verano, las mayores concentraciones se detectaron con valores altos de amonio, nitratos, y una elevada relación nitrógeno/fósforo.

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. pseudodelicatissima* son: *P. delicatissima* (P.T Cleve) Heiden, *P. cuspidata* (Hasle) Hasle y *P. lineola* (P.T Cleve) Hasle. Las diferencias entre estos taxa son sutiles y en algunos casos están relacionadas con caracteres difíciles de observar aún al ME. A fin de facilitar la comparación de *P. pseudodelicatissima* con sus especies más allegadas presentamos una descripción abreviada de cada una de ellas.

P. pseudodelicatissima

- Valvas lineares.
- Extremos aguzados en vista valvar y vista cingular.
- Eje apical: 48-140 μm .
- Eje transapical: 1.2-2.5 μm .
- Estrías: 28-44.
- Fíbulas: 17-26.
- Estrías con una hilera de poroides cuadrangulares.
- Poroides: 4-6 en 1 μm .
- Manto valvar con un poroide de alto.
- Estrías de la *valvocopula*, 4-6 poroides de alto y 2-3 de ancho.

P. delicatissima

- Valvas linear-lanceoladas.
- Extremos redondeados en vista valvar y truncados en vista conectival.
- Eje apical: 27-88 μm .
- Eje transapical: 1.0-2.2 μm .
- Estrías: 36-40 en 10 μm .
- Fíbulas: 20-23 en 10 μm .
- Estrías con dos hileras de poroides hexagonales o triangulares.
- Poroides: 10-12 en 1 μm .
- Manto valvar con un poroide de alto.
- *Valvocopula* con 1 poroide de alto.

P. cuspidata

- Valvas linear-lanceoladas.
- Extremos aguzados en vista valvar.
- Extremos aguzados en vista conectival, suavemente sigmoideos.
- Eje apical: 30-80 μm .
- Eje transapical: 3 μm .
- Estrías: 36-37 en 10 μm .
- Fíbulas: 18-22 en 10 μm .
- Estrías con una hilera de poroides cuadrangulares.
- Poroides: 5-6 en 1 μm .
- Manto valvar: sin datos.
- *Valvocopula*: sin datos.

P. lineola

- Valvas lineares, ligeramente lanceoladas.
- Extremos redondeados-subrostrados en vista valvar y aguzados, suavemente sigmoideos en vista cingular.
- Eje apical: 56-112 μm .
- Eje transapical: 1.8-2.7 μm .
- Estrías: 22-28 en 10 μm .
- Fíbulas: 11-16 en 10 μm .
- Estrías con una o dos hileras de poroides circulares en el mismo espécimen.
- Poroides: 3-7 en 1 μm .
- Manto valvar: sin datos.
- *Valvocopula*: sin datos.

Pseudo-nitzschia pungens (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle Figs. 20-24

Hasle, 1993: 319; Hasle *et al.*, 1996: 138-140, figs. 3-6, 30-37; Ferrario *et al.*, 1999: 140, figs. 15-20.

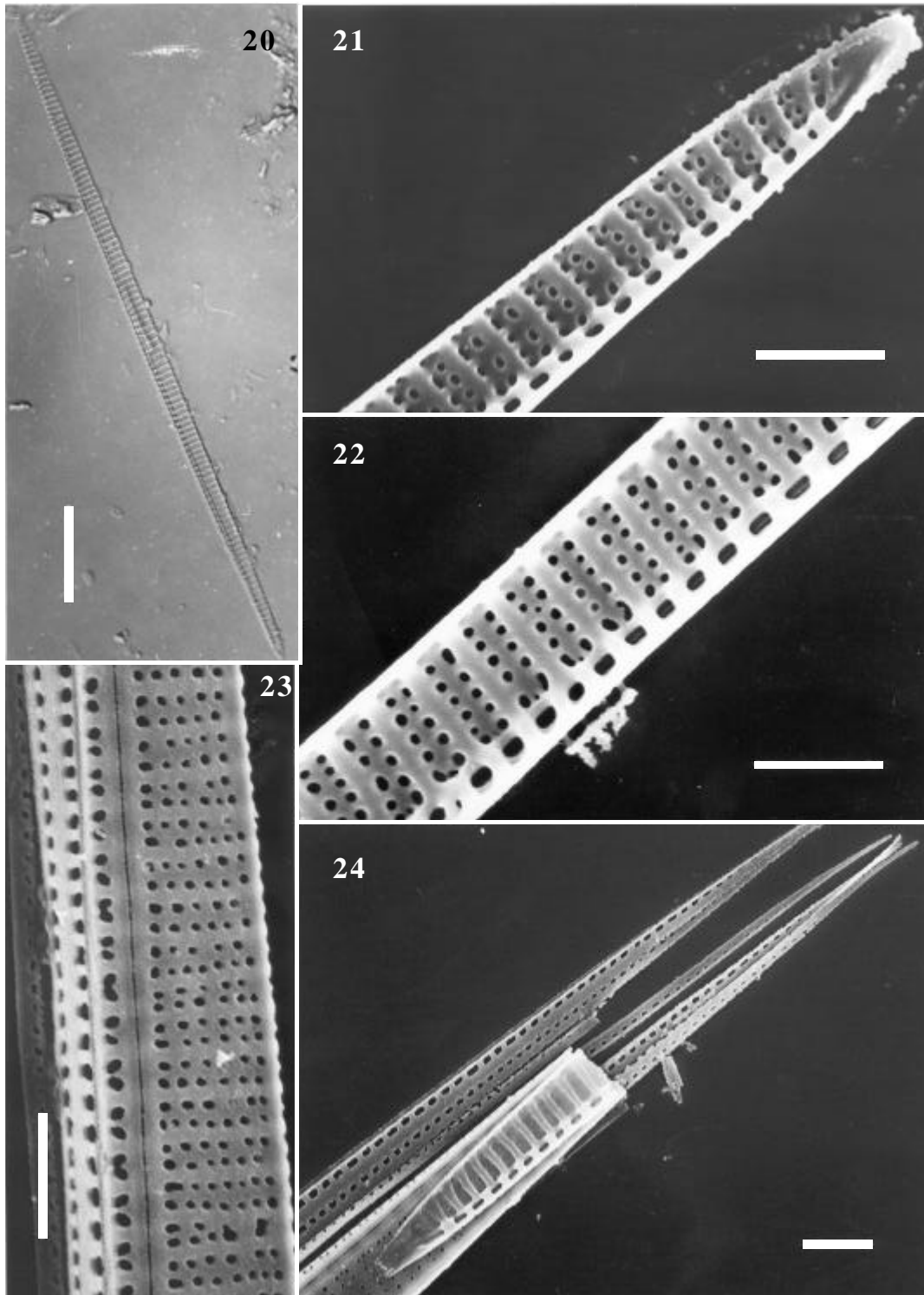
Basiónimo: *Nitzschia pungens* Grunow ex P.T. Cleve 1897.

Sinónimo: *Nitzschia pungens* var. *atlantica* Cleve.

Lectotipo: BRM W7/72 a, Finder: 624.4; Hasle, 1995, fig.1.

Localidad tipo: Bahía Yeddo, Japón.

Las células forman colonias por superposición de sus extremos valvares en aproximadamente 1/3 de su largo total. Los frústulos son fuertemente silicificados, linear-fusififormes, con los extremos marcadamente aguzados en vista valvar y lanceolados en vista cingular. El eje apical es de 86 a 145 μm y el eje transapical de 2.8 a 4.5 μm .



Figs. 20-24. *Pseudo-nitzschia pungens*. Fig. 20. (MO). Aspecto general de la valva. Figs. 21-24. (MEB). Fig. 21. Detalle de uno de los extremos valvares en vista interna. Fig. 22. Vista valvar interna. Detalle de las estrías con dos hileras de poroides. Fig. 23. Vista valvar externa. Detalle de la superficie valvar, rafe, manto y bandas. Fig. 24. Vista interna de uno de los extremos valvares y detalle de las bandas. Escalas: Fig. 20 = 10 μ m; Figs. 21-24 = 2.5 μ m.

La superficie valvar presenta aproximadamente el mismo número de fíbulas e interestrías, 12-18 en 10 μm . Las interestrías son visibles al MO en montajes con agua. Las estrías de la valva están formadas por dos hileras de poroides, visibles al MO en ejemplares muy silicificados y libres de materia orgánica. Al MEB se observa que las interestrías son internamente elevadas y las dos hileras de poroides de la estría están separadas por un espacio hialino. Ocasionalmente se encuentra algún poroide aislado entre las dos hileras de la estría o cercano al final de ella. La densidad de poroides es de 3 a 4 en 1 μm . Las estrías de ambos extremos valvares difieren en estructura, con menor número de poroides en uno. El rafe es continuo y carece de interespacio central.

El cingulo esta compuesto por bandas, con una hilera de poroides, 15-19 en 10 μm , y extremos puntiagudos. Las bandas varían entre sí en el ancho y en el tamaño de los poroides, siendo la *valvocopula* más ancha y con los poroides más grandes.

DISTRIBUCIÓN

P. pungens es cosmopolita según Hasle & Syvertsen (1997). Hasle (1972) señaló que esta especie ha sido mencionada desde los 62° N, en las costas de Noruega, hasta los 41° S, en Nueva Zelanda. A continuación mencionaremos algunas de las citas de la especie sin la pretensión de agotarlas completamente.

En aguas del Pacífico *P. pungens* está ampliamente distribuida a lo largo de las costas de América, en México (Hernández-Becerril, 1998), en Vancouver, en Baja California, en el Golfo de California y en el Golfo de Panamá (en Villac, 1996). Forbes & Denman (1991) estudiaron la distribución de *P. pungens* en el área de la Columbia Británica, Canadá, sobre la base de la revisión de muestreos realizados entre 1980 y 1988. Estos autores concluyeron que se trata de una especie de amplia distribución geográfica, que ocurre regularmente en las costas de la Bahía de Fundy. Yoo & Lee (1982) la encontraron en las costas de Korea y Takano & Kuroki (1977) al sudeste de Japón. Hallegraeff (1994) reportó esta especie para aguas tropicales y subtropicales de Australia y para Tasmania.

En el Océano Atlántico *P. pungens* fue encontrada en la costa de EEUU durante todo el año

(Marshall & Cohn, 1987) y en las costas de Europa, en Portugal (Hallegraeff, 1994) y en Noruega (Hasle *et al.*, 1996). Según Hallegraeff (1994) también fue citada para el noroeste de África y Navarro (1983) la reportó para el Mar Caribe.

En el Océano Atlántico del Cono Sur Americano la especie fue hallada en las costas de Brasil (Odebrecht *et al.*, 2001; Villac & Tenenbaum, 2001) y en las de Argentina en las Provincias de Buenos Aires, Río Negro y Chubut (Negri & Inza, 1998; Ferrario *et al.*, 1999; Sastre *et al.*, 2001). Según Hallegraeff (1994) *P. pungens* fue reportada también para el Océano Pacífico, en las costas de Perú y Chile.

PRODUCCIÓN DE AD

Rhodes *et al.* (1996) determinaron por primera vez a *P. pungens* como productora de AD. El hallazgo fue hecho a partir de cepas aisladas de muestras provenientes de aguas costeras de Nueva Zelanda y en aquella oportunidad, los niveles de toxina fueron bajos.

Trainer *et al.* (1998) detectaron AD en concentraciones del orden de los 70 fg \cdot cel⁻¹, en cepas de *P. pungens* aisladas de la costa del Estado de Washington, EEUU. Los autores sugirieron además que esta especie podría ser la responsable de niveles de toxicidad por encima de 20 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ detectados en navajas en 1991 y años subsecuentes, a pesar de no haberse presentado concurrentemente floraciones de fitoplancton tóxico. Basados en el hecho de que *P. pungens* está presente durante todo el año en el área, y considerando que la velocidad de depuración de las navajas es muy baja, ellos postularon que la exposición crónica a bajos niveles de toxinas puede ser suficiente para resultar en acumulación de AD por encima del nivel regulatorio.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1972) señaló que *P. pungens* fue encontrada en los Océanos Pacífico y Atlántico, con rangos de temperatura entre los 2 y 28 °C y de salinidad entre los (24) 30 y 36 psu. Hallegraeff (1994) la reportó para aguas tropicales, subtropicales y templadas de Australia y señaló que no era formadora de floraciones. En el Cono Sur Americano esta especie fue hallada a lo largo de todo el año en la costa del Mar Argentino. En la Provincia de Buenos Aires se

la encontró a temperaturas entre 7.8 y 21 °C y salinidades entre 33.6 y 33.87 psu (Ferrario *et al.*, 1999).

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. pungens* son: *P. pungens* var. *cingulata* Villac y *P. multiseries* (Hasle) Hasle. Las diferencias sobresalientes entre *P. pungens* y *P. multiseries* son discutidas en la correspondiente sección de esta última. Las diferencias con la variedad *cingulata* surgen del resumen de caracteres presentados para cada taxón a continuación:

P. pungens var. *pungens*

- Estrías formadas por 2 hileras de poroides visibles al MO.
- Manto somero, con un poroide de alto.
- *Valvocopula* con una hilera de grandes poroides.

P. pungens var. *cingulata*

- Estrías formadas por 2 (3) hileras de poroides.
- Manto con 2 pequeños poroides de alto.
- *Valvocopula* con estrías formadas por 2 ó 2 y 3 pequeños poroides de alto.

Recientemente, Villac & Fryxell (1998) crearon *P. pungens* var. *cingulata* sobre la base de material

de campo y de cultivo. Los caracteres que la diferencian de la variedad nominal y de *P. multiseries* son la morfología de las estrías y, principalmente, la de las bandas. La variedad *cingulata* presenta una tercera hilera incompleta de poroides por estría y sus bandas tienen entre 20 y 24 estrías en 10 µm, diferente de la variedad nominal 15-19, y de *P. multiseries*, 19-22.

Pseudo-nitzschia turgidula (Hustedt) Hasle Fig. 25

Hasle, 1993: 320; Hasle, 1965: 4, lam. 1, fig. 11; lam. 2, fig. 3; lam. 11, figs. 8-13; lam. 12, figs. 1-6; Hallegraeff, 1994: 405, figs. 5 a-d.

Basiónimo: *Nitzschia turgidula* Hustedt 1958.

Localidad tipo: Atlántico Sur (46° 32' S, 0° 02' W).

Las colonias están formadas por superposición de los extremos valvares en aproximadamente 1/6 a 1/8 del largo total de la valva. Los frústulos son estrechamente lanceolados, con extremos truncados en vista cingular. En vista valvar son romboidales a lanceolados, con extremos redondeados en los especímenes de menor tamaño y lineares con una expansión en la parte central en los de mayores dimensiones. El eje apical es de 30 a 80 µm y el eje transapical de 2.5 a 3.5 µm.

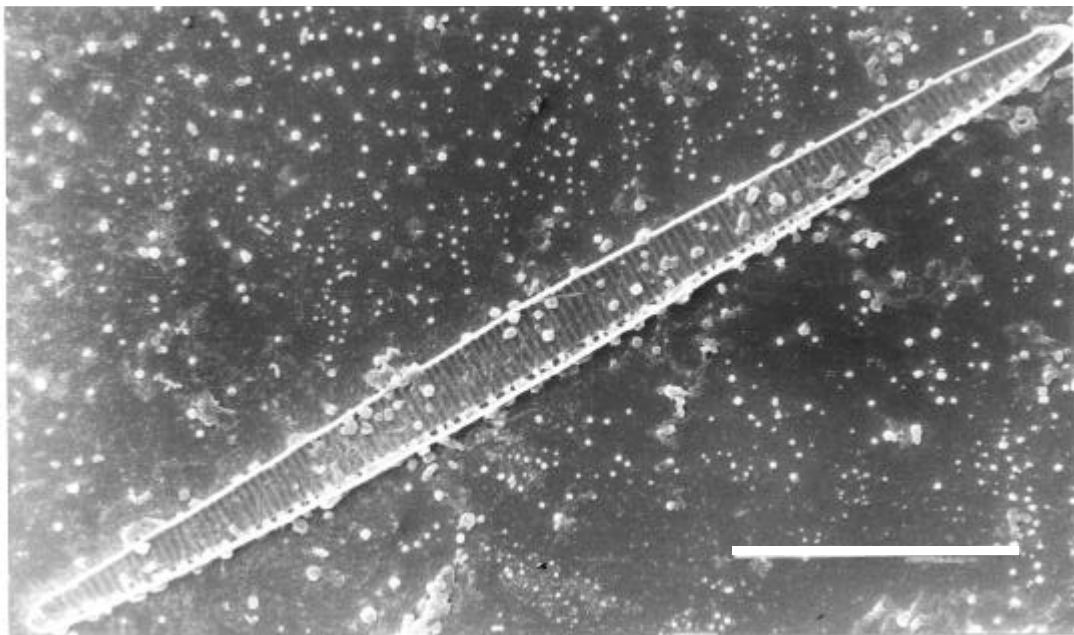


Fig. 25. *Pseudo-nitzschia turgidula*. (MEB). Aspecto general de la valva en vista interna. Escala = 10 µm. Foto facilitada por Daniela Inza y Rubén Negri.

La superficie valvar presenta estrías distribuidas en mayor número, 23-28 en 10 µm, que las fíbulas, 13-18 en 10 µm. Al MEB se observa que cada estría esta formada por dos hileras de poroides, 7-9 en 1 µm. Las fíbulas delimitan un interespacio central.

OBSERVACIONES

Hallegraeff (1994) observó que las células provenientes de cultivos aislados en aguas australianas, eran mucho más pequeñas, 30-40 µm, y presentaban una estructura valvar más delicada 32 (23-28) estrías en 10 µm, 21 (13-18) fíbulas en 10 µm. En cambio, el material subantártico tiene la misma cantidad de estrías y fíbulas que la de la diagnosis de la especie.

DISTRIBUCIÓN

P. turgidula es una especie cosmopolita según Fryxell *et al.* (1997) y Hasle & Syvertsen (1997). Esta especie ha sido reportada para aguas antárticas y subantárticas (Hasle, 1965), para aguas tropicales y templadas de Australia (Hallegraeff, 1994) y para aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1996). Takano & Kuroki (1977) citaron un material como *P. aff. turgidula* para la Bahía de Ofunato, Japón.

En el Cono Sur Americano la especie fue hallada por Negri & Inza (1998) en el Mar Argentino, frente a la Provincia de Buenos Aires.

PRODUCCIÓN DE AD

Rhodes *et al.* (1996) determinaron por primera vez que *P. turgidula* era productora de AD, sobre la base de cepas aisladas de aguas costeras de Nueva Zelanda. Estos autores comentaron que en 1994, habían sido detectados 2.8 ppm de AD en gónadas de bivalvos. La detección de la toxina fue coincidente con la presencia de *P. turgidula* en concentraciones de $6 \cdot 10^6$ cels \cdot l⁻¹, pero ellos no estuvieron en condiciones de afirmar que la toxicidad se debiera a esta especie durante aquel episodio, porque la información de campo era incompleta.

Hasta la fecha *P. turgidula* no ha sido registrada como especie productora de AD en el Cono Sur Americano.

DATOS ECOLÓGICOS

Hasle (1965) encontró a *P. turgidula* en muestras colectadas entre los 53° S y 62° S a temperaturas de 2.3-6 °C.

Para la costa del Mar Argentino, Negri & Inza (1998) detectaron floraciones de *P. turgidula* ($3.3 \cdot 10^6$ cels \cdot l⁻¹) en aguas de plataforma, fuertemente estratificadas, con alta disponibilidad de nutrientes, temperaturas de 8.9 a 9.7 °C y salinidad de 33.7 psu.

COMPARACIÓN CON LAS ESPECIES MÁS AFINES

Los taxa más relacionadas con *P. turgidula* son: *P. turgiduloides* (Hasle) Hasle y *P. lineola* (P.T. Cleve) Hasle. Las diferencias entre estos taxa surgen del resumen de caracteres presentados para cada uno a continuación:

P. turgidula

Datos obtenidos de Hasle (1965).

- Eje apical: 30-80 µm.
- Eje transapical: 2.5-3.5 µm.
- Extremos valvares truncados en vista cingular.
- Estrías: 23-30 en 10 µm.
- Estrías con dos hileras de poroides.
- Poroides: 6-9 en 1 µm.
- Fíbulas: 13-18 en 10 µm.

P. turgiduloides

Datos obtenidos de Hasle & Syvertsen (1997).

- Eje apical: 63-126 µm.
- Eje transapical: 1.2-2.8 µm.
- Extremos valvares truncados en vista cingular.
- Estrías: 17-21 en 10 µm.
- Estrías con una o dos hileras de poroides.
- Poroides: 8-10 en 1 µm.
- Fíbulas: 10-13 en 10 µm.

P. lineola

Datos obtenidos de Hasle (1965), Hallegraeff (1994) y Hasle & Syvertsen (1997).

- Eje apical: 56-112 µm.
- Eje transapical: 1.8-2.7 µm.
- Extremos puntiagudos a ligeramente sigmoideos en vista cingular.
- Estrías: 22-28 en 10 µm.
- Estrías con una o dos hileras de poroides.
- Poroides: 3-7 en 1 µm.
- Fíbulas: 11-16 en 10 µm.

**ESPECIE NO REPORTADA
FEHACIENTEMENTE PARA EL CONO
SUR AMERICANO**

Pseudo-nitzschia seriata (Grunow ex P.T. Cleve)
H. Peragallo

Peragallo, 1900 in Peragallo & Peragallo, 1897-1908: 300, lam. 72, fig. 28; Hasle, 1965: 8-10, lam.1, fig.1; lam.3, figs.1-7, 10; lam. 4, figs.1-2; lam. 6, fig. 2; Hasle *et al.*, 1996: 142-144, figs. 10-14, 45-50.

Basiónimo: *Nitzschia seriata* P.T. Cleve 1883.

Localidad tipo: Tindingen, Groenlandia.

Lectotipo: S405, Hasle, 1994, fig. 3.

Las células están unidas por sus extremos, superpuestas en 1/3 a 1/4 de su largo total, formando colonias. Los frústulos son linear-lanceolados en vista cingular con los extremos muy aguzados. El contorno valvar es asimétrico respecto del eje apical, las valvas presentan uno de los márgenes casi recto y el otro convexo y los extremos son redondeados. El rafe, sin interespacio central, se ubica indistintamente sobre el margen curvo o convexo de la valva. El eje apical es de 91 a 160 μm y el eje transapical de 5.5 a 8 μm . La superficie valvar presenta igual número de fíbulas que de estrías, 17 a 18 en 10 μm . Ambas son visibles al MO en material tratado y montado en medio con alto índice de refracción, las últimas con menos definición. Al MEB se observa que las estrías de la valva están formadas por 3 a 4 hileras de poroides, densamente dispuestos, 7 a 8 en 1 μm . Los poroides situados junto a la interestría son de mayor tamaño y están más regularmente distribuidos que los situados en el centro de la estría. Las estrías de los extremos valvares presentan un patrón de distribución diferente en cada extremo de una misma valva, siendo más ramificadas en uno de ellos. Las estrías del manto son semejantes a las de la superficie valvar y tienen de 2 a 3 poroides de alto. El *cingulum* presenta tres bandas conectivales diferentes en ancho y ornamentación, ocasionalmente puede estar presente una cuarta banda lisa.

OBSERVACIONES NOMENCLATURALES

Fryxell *et al.* (1991) tipificaron la Sección *Pseudo-nitzschia* del género *Nitzschia* con *N. seriata* Cleve. Estos autores, aunque no lo plantearon de un modo explícito, reconocieron como holotipo de dicha especie a la figura 75 de Cleve (1883), lo que está de acuerdo con el artículo 9.1 del ICNB

(Greuter *et al.*, 2000). Cuando Hasle (1994) reestableció el género *Pseudo-nitzschia* Peragallo, señaló que Fryxell *et al.* (1991) habían seleccionado a *N. seriata* Cleve como lectotipo de la Sección *Pseudo-nitzschia*, por lo que la especie tipo del género debía ser *P. seriata* (Cleve) H. Peragallo. Sin embargo Hasle (1994) no reconoció la figura 75 de Cleve (1883) como el holotipo de la especie y seleccionó el preparado S405 de la Colección Cleve como lectotipo de *P. seriata* (Cleve) H. Peragallo. En dicho preparado marcó con un círculo el espécimen ilustrado en su figura 3.

DISTRIBUCIÓN

P. seriata es una especie que sólo ha sido fehacientemente identificada en aguas frías a templadas del Hemisferio Norte (Hasle, 1964; Hasle & Syvertsen, 1997).

Según Fryxell *et al.* (1997), *P. seriata* no ha sido positivamente confirmada en la costa oeste de EEUU y sólo ha sido citada para Alaska por Cupp (1937, 1943). Stapleford & Smith (1996) aislaron esta especie a partir de muestras de hielo provenientes del Mar Ártico de Canadá y mencionaron que el taxón es frecuente en las comunidades de hielo. Lundholm *et al.* (1994) señalaron que hay hallazgos bien documentados de *P. seriata* en: las costas oeste y este de Groenlandia, hasta los 45° N en Canadá, el Mar de Barents y el Mar Báltico. Hasle *et al.* (1996) la citaron para la costa de Noruega, Atlántico Norte.

Los registros en el Cono Sur Americano (Uruguay, Chile, Brasil y Argentina) han sido realizados sobre la base de análisis con MO. Considerando que la determinación fehaciente de la especie requiere de la utilización de ME, es altamente probable que las citas para estas latitudes sean erróneas.

PRODUCCIÓN DE AD

Lundholm *et al.* (1994) realizaron estudios de laboratorio sobre el clon 1877C de *P. seriata*, aislado de muestras provenientes de la costa de Dinamarca, y reportaron por primera vez a esta especie como productora de AD. En aquella oportunidad las mayores concentraciones de toxinas fueron determinadas en la fase estacionaria de crecimiento del cultivo, mientras que en la fase exponencial sólo se detectaron trazas de AD. La producción de la toxina estuvo inversamente correlacionada con la temperatura, re-

sultando mayor a 4°C que a 15°C (Lundholm *et al.*, 1994). En 1994 fueron detectados bajos niveles de AD en bivalvos de la costa este del Océano Atlántico, Newfoundland, Canadá. En julio de 1996 en la costa de Nova Scotia, se detectaron valores de AD por encima de 90 µg · g⁻¹ de glándula digestiva de vieiras de cultivo. Bates (1997) señaló que aunque el organismo productor de AD no fue identificado en aquellos casos, éste podría ser *P. seriata*, ya que la especie estuvo presente en el área durante el desarrollo de ambos episodios.

DATOS ECOLÓGICOS

Esta especie, de aguas frías, llega a latitudes más bajas sólo en el invierno septentrional (Hasle, 1972; Hasle & Syvertsen, 1997). Hasle (1965) encontró a *P. seriata* a temperaturas de -0.5 a 10°C.

Caracteres diferenciales con las especies más afines:

Los taxa más relacionadas con *P. seriata* son: *P. seriata f. obtusa*, *P. australis* y *P. fraudulenta*. Las diferencias sobresalientes entre estos taxa fueron discutidas, en el caso de los dos primeros en la correspondiente sección de *P. australis*, y en el caso de *P. fraudulenta* en la correspondiente a dicha especie.

AMPHORA COFFEAIFORMIS MENCIONADA COMO PRODUCTORA DE ÁCIDO DOMOICO

Tal como señaláramos al comienzo de este capítulo, durante el episodio ocurrido en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, simultáneamente a la detección de AD en *P. multiseriata*, se detectó la toxina en una cepa aislada en el área (clon BPT 11) (Shimizu *et al.*, 1989; Maranda *et al.*, 1990), identificada como *Amphora coffeaeformis* (Agardh) Kützinger. Posteriormente Bates *et al.* (1989) chequearon la producción de AD en otras dos cepas de *A. coffeaeformis* provenientes del Pravasoli Guillard Center, obteniendo resultados negativos.

Por otra parte Sala *et al.* (1998) señalaron que la identidad del Clon BPT 11 es incierta ya que la fotografía tomada con MEB (figura 25 del mencionado trabajo), en la cual se basó la identificación, es insuficiente para observar los caracteres diagnóstico de la especie.

A posteriori de los trabajos de Shimizu *et al.* (1989) y Maranda *et al.* (1990) no hubo reportes que involucraran a *A. coffeaeformis* u otras especies del género en la producción de AD.

BIBLIOGRAFÍA

- Addison, R.F. & J.E. Stewart, 1989. Domoic acid and the eastern Canadian molluscan shellfish industry. *Aquaculture* 77: 263-269.
- Anónimo, 1991. Domoic acid found in Oregon and Washington shellfish. *Communicable Diseases Summary* 40 N° 24: 1-2. Oregon Health Division, Portland.
- Bates, S.S., 1997. Toxic phytoplankton on the Canadian East coast: implications for aquaculture. *Bull. Aquacult. Assoc. Canada* 97 (3): 9-18.
- Bates, S.S., 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg: 405-426.
- Bates, S.S., C.J. Bird, R.K. Boyd, A.S.W. De Freitas, M. Falk, R.A. Foxall, L.A. Hanic, W.D. Jamieson, A.W. McCulloch, P. Odense, M.A. Quilliam, P.G. Sim, P. Thibault, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1988. Investigations on the source of domoic acid responsible for the outbreak of amnesic shellfish poisoning (ASP) in eastern Prince Edward Island. *Atl. Res. Lab. Tech. Rep.* 57, NRCC 29086, 59 pp.
- Bates, S.S., C.J. Bird, A.S.W. De Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1203-1215.
- Bates, S.S., A.S.W. De Freitas, J.E. Milley, R. Pocklington, M.A. Quilliam, J.C. Smith & J. Worms, 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens f. multiseriata* in culture: nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1136-1144.
- Bates, S.S., D.J. Douglas, G.J. Doucette & C. Léger, 1995. Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia pungens f. multiseriata*. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard, P. Gentien & C. Marcaillou (eds.), *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, París: 401-406.
- Buck, K.R., L. Uttal-Cooke, C.H. Pilskaln, D.L. Roelke, M.C. Villac, G.A. Fryxell, L.A. Cifuentes & F.P. Chavez, 1992. Autoecology of the diatom *Pseudonitzschia australis*, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 293-302.
- Cleve, P.T., 1883. Diatom collected during the expedition of the Vega. *Vega-Expeditionens Vetenskapliga*

- Iakttagelser 3: 455-517.
- Cleve, P.T., 1897 a. Report on the phytoplankton collected on the expedition of H.M.S. «Research» 1896. Fifteenth Annual Report of the Fisheries Board for Scotland 3: 296-304.
- Cleve, P.T., 1897 b. A treatise on the phytoplankton of the Atlantic and its tributaries and on the periodical changes of the plankton of Skagerrak. Upsala Nya Tidnings Aktiebolags Tryckeri, Upsala, 27pp.
- Cupp, E.E., 1937. Seasonal distribution and occurrence of marine diatoms and dinoflagellates at Scotch Cap, Alaska. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Techn. Ser. 4: 71-100.
- Cupp, E.E., 1943. Marine planktonic diatoms of the west coast of North America. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. 5 (1): 1-238.
- Davidovich, N.A. & S.S. Bates, 1998. Sexual reproduction in the Pennate diatoms *Pseudo-nitzschiamultiseriis* and *P.pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 34: 44-54.
- Dickey, R.W., G.A. Fryxell, H.R. Granade & D. Roelke, 1992. Detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid in shellfish and phytoplankton in the Gulf of Mexico. Toxicon 30(3): 355-359.
- Ferrario, M.E. & N.M. Galván, 1989. Catálogo de las diatomeas marinas citadas entre los 36° y los 60° S con especial referencia al Mar Argentino. Dirección Nacional del Antártico, Instituto Antártico Argentino, Publ. 20: 1-327.
- Ferrario, M.E., E.A. Sar, C. Castaños & F. Hinz, 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. Nova Hedwigia 68 (1-2): 131-147.
- Forbes, J.R. & K.L. Denman, 1991. Distribution of *Nitzschia pungens* in coastal waters of British Columbia. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 960-967.
- Fraga, S., M.J. Álvarez, A. Míguez, M.L. Fernández, E. Costas & V. López Rodas, 1998. *Pseudo-nitzschia* species isolated from Galician waters: toxicity, DNA content and lectin binding assay. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernandez & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 270-273.
- Frenguelli J., 1939. XV Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas del Golfo San Matías (Río Negro). Rev. Mus. La Plata (n.s.) 2, Bot.: 201-226.
- Fritz, L., M.A. Quilliam, J.L.C. Wright, A.M. Beale & T.M. Work, 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. J. Phycol. 28: 439-442.
- Fryxell, G.A., S.A. Garza & D.L. Roelke, 1991. Auxospore formation in an Antarctic clone of *Nitzschia subcurvata* Hasle. Diatom Res. 6: 235-245.
- Fryxell, G.A., M.E. Reap & D.L. Valencic, 1990. *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseriis* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. Nova Hedwigia, Beih. 100: 171-188.
- Fryxell, G.A., M.C. Villac & L.P. Shapiro, 1997. The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920-1996: a review. Phycologia 36 (6): 419-437.
- Garrison, D.L., S.M. Conrad, P.P. Eilers & E.M. Waldron, 1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. J. Phycol. 28: 604-607.
- Greuter, W., J. McNeill, F.R. Barrie, H.M. Burdet, V. Demoulin, T. S. Filgueiras, D. H. Nicholson, P. C. Silva, J. E. Skog, P. Trehane, N. J. Turland & D. L. Hawksworth, 2000. International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code). Regnum Vegetabile, 131. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Hallegraeff, G.M., 1994. Species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Australian waters. Bot. Mar. 37: 397-411.
- Hargraves, P.E., J. Zhang, R. Wang & Y. Shimizu, 1993. Growth characteristics of the diatom *Pseudonitzschia pungens* and *P. fraudulenta* exposed to ultraviolet radiation. Hydrobiologia 269-270: 207-212.
- Hasle, G.R., 1964. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. I. Some marine species of the groups *Nitzschia* and *Lanceolatae*. Skr. Norske Vidensk.-Akad. Oslo, Mat.-Naturv. Kl. N.S. 16: 1-48.
- Hasle, G.R., 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. Skr. Norske Vidensk.-Akad. Oslo, Mat.-Naturv.. Kl. N.S. 18: 1-45.
- Hasle, G.R., 1972. The distribution of *Nitzschia seriata* and allied species. Nova Hedwigia, Beih. 39: 171-190
- Hasle, G.R., 1974. Validation of the names of some marine planktonic species of *Nitzschia* (Bacillariophyceae). Taxon 23: 425-428.
- Hasle, G.R., 1976. Examination of diatom type material: *Nitzschia delicatissima* Cleve, *Thalassiosira minuscula* Krasske and *Cyclotella nana* Hustedt. Br. Phycol. J. 11: 101-110.
- Hasle, G.R., 1993. Nomenclatural notes on marine planktonic diatoms. The family Bacillariaceae. Nova Hedwigia, Beih. 106: 315-321.
- Hasle, G.R., 1994. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 30: 1036-1039.
- Hasle, G.R., 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriis* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology and distribution. J. Phycol. 31: 428-435.
- Hasle, G.R. & G.A. Fryxell, 1995. Taxonomy of Diatoms. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual of Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33. UNESCO: 339-364.
- Hasle, G.R. & L.K. Medlin, 1990. Family Bacillariaceae: the genus *Nitzschia* section *Pseudonitzschia*. In Medlin,

- L.K. & J. Priddle (eds.), Polar marine diatoms. British Antarctic Survey, Natural Environment Research Council, Cambridge: 169-176.
- Hasle, G.R. & E.E. Syvertsen, 1997. Marine Diatoms. In Tomas, C.R. (ed.), Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, San Diego, California: 5-385.
- Hasle, G.R., C.B. Lange & E.E. Syvertsen, 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. Helgoländer Meeresunters. 50(2): 131-175.
- Hassall, A.H., 1845. A history of the British freshwater algae (including descriptions of the Diatomaceae and Desmidiaceae) with upwards of one hundred plates. Taylor, Walton and Maberly, London, 1: 1-462; 2, 103 pls. Second printing 1852.
- Heiden, H. & R.W. Kolbe, 1928. Die marinen Diatomeen der Deutschen Südpolar-Expedition. 1901-3. Dtsch. Südpol. Exped. 8: 447-715.
- Hernández-Becerril, D.U., 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. Hydrobiologia 379: 77-84.
- Horner, R.A. & J.R. Postel, 1993. Toxic diatoms in western Washington waters (U.S. West Coast). Hydrobiologia 269-270: 197-205.
- Horner, R.A., D.L. Garrison & F.G. Plumley, 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. West coast. Limnol. Oceanogr. 42: 1076-1088.
- Hustedt, F., 1958. Diatomeen aus der Antarktis und dem Südatlantik. Dtsch. Antarkt. Exped. 1938/39 2: 103-191
- Impellizzeri, G., S. Mangiafico, G. Oriente, M. Piattelli, S. Sciuto, E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce & D. Sica, 1975. Constituents of red algae. I. Amino acid and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. Phytochemistry 14: 1549-1557.
- Kotaki, Y., K. Koike, M. Yoshida, C-V. Thuoc, N.T. Minh Huyen, N.C. Hoi, Y. Fukuyo & M. Kodama. 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. J. Phycol. 36(6): 1057-1060.
- Lange, C.B., F.M.H. Reid & M. Vernet, 1994. Temporal distribution of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* at a coastal site in Southern California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 104(3): 309-312.
- Lewis, N.I., S.S. Bates, J.L. McLachlan & J.C. Smith, 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, New York: 601-606.
- Lundholm, N. & Ø. Moestrup, 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis-varingica*, sp. nov. (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. J. Phycol. 36(6): 1162-1174.
- Lundholm, N., J. Skov, R. Pocklington & Ø. Moestrup, 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. Phycologia 33(6): 475-478.
- Manhart, J.R., G.R. Fryxell, C. Villac & L.Y. Segura, 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriis* (Bacillariophyceae): nuclear ribosomal DNS and species differences. J. Phycol. 31: 421-427.
- Mann, D.G., 1986. *Nitzschia* subgenus *Nitzschia* (Notes for a monograph of the Bacillariaceae, 2). In Ricard, M. (ed.), Proc. 8th. Int. Diat. Symp. Koeltz, Koenigstein: 215-226.
- Maranda, L., R. Wang, K. Masuda & Y. Shimizu, 1990. Investigation of the source of domoic acid in mussels. In Granéli, E., B. Sundström, L. Edler & D.M. Anderson (eds.), Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York: 300-304.
- Marshall, H.G. & M.S. Cohn, 1987. Phytoplankton distribution along the eastern coast of the USA. Part VI. Shelf waters between Cape Henry and Cape May. J. Plankton Res. 9: 139-149.
- Martin, J.L., K. Haya, L.E. Burridge & D.J. Wildish, 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima*. A source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. Mar. Ecol. Prog. Ser. 67: 177-182.
- Martin, J.L., K. Haya & D.J. Wildish, 1993. Distribution and domoic acid content of *Nitzschia pseudodelicatissima* in the Bay of Fundy. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, New York: 613-618.
- Navarro, J.N., 1983. A survey of the marine diatoms of Puerto Rico. 7. Suborder Raphidaceae: Families Auriculaceae, Epithemiaceae, Nitzschiaceae and Surirellaceae. Bot. Mar. 26: 393-408.
- Negri, R.M. & D. Inza, 1998. Some potentially toxic species of *Pseudo-nitzschia* in the Argentine Sea (35°-39°S). In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernandez & T. Wyatt (eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 84-85.
- Odebrecht, C., M.E. Ferrario, A.M. Ciotti, D. Kitzmann & F. Hinz (2001). The distribution of *Pseudo-nitzschia* off Southern Brazil and relationships with oceanographic conditions. In Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO: 42-45.
- Parsons, M.L., C.A. Scholin, P.E. Miller, G.J. Doucette, Ch.L. Powell, G.A. Fryxell, Q. Dortch & T.M. Soniat, 1999. *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: molecular probe field trials, genetic variability, and domoic acid analyses. J. Phycol. 35: 1368-1378.
- Peragallo, H. & M. Peragallo, 1897-1908. Diatomées marines de France et des district maritimes voisins. M. J. Tempère, Micrographe-Editeur, Grez-sur-Loing, Text: 491 pp, Atlas: 137 lams.
- Proshkina-Lavrenko, A.I., 1955. Diatomplankton of the Black Sea. (In Russian). Akademiya NAUK SSSR

- Botanicheskii Institut, Moskva-Leningrad: 1-222.
- Reap, M.E., 1991. *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseries* Hasle: growth phase and toxicity of clonal cultures isolated from Galveston, Texas. M. Sc., Texas A & M University : 1-77.
- Rensel, J.E., 1993. Severe blood hypoxia of atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to the marine diatom *Chaetoceros concavicornis*. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 625-630.
- Rhodes, L., C. Scholin, I. Garthwaite, A. Haywood & A. Thomas, 1998. Domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species deduced by whole cell DNA probe-based and immunochemical assays. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernandez & T. Wyatt (eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 274-277.
- Rhodes, L., D. White, M. Syhre & M. Atkinson, 1996. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production *in vitro* and links with shellfish toxicity. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 155-158.
- Richardson, K., 1997. Harmful or exceptional phytoplankton blooms in the marine ecosystem. Adv. Mar. Biol. 31: 302-381.
- Rivera, P., 1985. Las especies del género *Nitzschia* Hassall, sección *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) en las aguas marinas chilenas. Gayana Bot. 42: 9-38.
- Sala, S.E., E.A. Sar & M.E. Ferrario, 1998. Review of materials reported as containing *Amphora coffeaeformis* (Agardh) Kützing in Argentina. Diatom Res. 13 (2): 323-336.
- Sar, E.A., M.E. Ferrario & C. Castaños, 1998. Authentication of the type materials of *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli. Diatom Res. 13: 183-185.
- Sarno, D. & J. Dahlmann, 2000. Production of Domoic Acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). Harmful Algae News 21, IOC of UNESCO: 5.
- Sastre, A.V., N.H. Santinelli, J.L. Esteves & M.E. Ferrario, (2001). Aspectos ecológicos de especies de *Pseudo-nitzschia* en aguas costeras patagónicas (Argentina). In Alveal, K & T. Antezana (eds.), Sustentabilidad de la biodiversidad. Universidad de Concepción, Concepción: 217-235.
- Scholin, C., 1999. A toxic bloom of *Pseudo-nitzschia australis* in Monterey Bay, California. Harmful Algae News 18, IOC of UNESCO: 6.
- Scholin, C., F. Gulland, G.J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F.P. Chavez, J. Cordaro, R. DeLong, A. De Vogelaere, J. Harvey, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L.J. Lowenstine, R. Marin, P.E. Miller, W.A. McLellan, P.D.R. Moeller, C.L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. Silver, T. Spraker, V. Trainer & F.M. Van Dolah, 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. Nature 403: 80-83.
- Shimizu, Y., S. Gupta, K. Masuda, L. Maranda, C.K. Walker & R. Wang, 1989. Dinoflagellates and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. Pure Appl. Chem. 61:513-516.
- Skvortzow, B.V., 1946. Species novae et minus cognitae Algarum, Flagellatarum et Phycomicetarum. Zap. Kharbin. Obshch. Estest. Ethnogr. 2: 1-34.
- Smith, J.C., R. Cormier, J. Worms, C.J. Bird, M.A. Quilliam, R. Pocklington, R. Angus & L. Hanic, 1989. Toxic blooms of the domoic acid containing diatom *Nitzschia pungens* in the Cardigan River, Prince Edward Island, in 1988. In Granéli, E., B.G. Sundström, L. Edler & D.M. Anderson (eds.), Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York: 227-232.
- Smith, J.C., K. Pauley, P. Cormier, R. Angus, P. Odense, D. O'Neil, M.A. Quilliam & J. Worms, 1991. Population dynamics and toxicity of various species of *Dinophysis* and *Nitzschia* from the Southern Gull of St. Lawrence. In Gordon, D.C. (ed.), Proceeding of the Second Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Can. Tech. Rep. Fish. Aquatic Sci. 1799: 25.
- Stapleford, L.S. & R.E.H. Smith, 1996. The interactive effects of temperature and silicon limitation on the psychrophilic ice diatom *Pseudonitzschia seriata*. Polar Biol. 16: 589-594.
- Subba Rao, D.V., M.A. Quilliam & R. Pocklington, 1988. Domoic acid - a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 2076-2079.
- Takano, H. & K. Kuroki, 1977. Some diatoms in the Section *Pseudo-nitzschia* found in coastal waters of Japan. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 91:41-51.
- Taylor, F.J.R. & R.A. Horner, 1994. Review of the marine environment and biota of Strait of Georgia, Puget Sound and Juan de Fuca Strait. In Wilson, R.C.H., R.J. Beanish, F. Aitkens & J. Bell (eds.), Proc. BC/Washington Symp. Mar. Environm. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1948: 175-186.
- Todd, E.C.D., 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning. A review. J. Food Protect. 56(1): 69-83.
- Trainer, V.L., J.C. Wekell, R.A. Horner, C.L. Hatfield & J.E. Stein, 1998. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia pungens*. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernandez & T. Wyatt (eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 337-340.
- Villac, M.C., 1996. Synecology of the genus *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from Monterey Bay, California, USA. PhD Thesis of Texas A & M University: 1-254.
- Villac, M.C. & G.A. Fryxell, 1998. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *cingulata* var. nov. (Bacillariophyceae) based on field and culture observations. Phycologia 37 (4): 269-274.
- Villac, C.M. & D.R. Tenenbaum, 2001. The coastal *Pseudo-nitzschia* from the State of Rio de Janeiro, Brazil. In In

- Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO: 34-37.
- Villac, M.C., D.L. Roelke, F.P. Chavez, L.A. Cifuentes & G.A. Fryxell, 1993a. *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli and related species from the West coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production. J. Shellfish Res. 12 (2): 457-465.
- Villac, M.C., D.L. Roelke, T.A. Villareal & G.A. Fryxell, 1993b. Comparison of two domoic acid producing diatoms: a review. Hydrobiologia 269-270: 213-224.
- Villareal, T.A., D.L. Roelke & G.A. Fryxell, 1994. Occurrence of the toxic diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in Massachusetts Bay, Massachusetts. Mar. Environm. Res. 37: 417-423.
- Vrieling, E.G., R.P.T. Koeman, C.A. Scholin, P. Scheerman, L. Peperzak, M. Veenhuis & W.W.C. Gieskes, 1996. Identification of a domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the Dutch Wadden Sea with electron microscopy and molecular probes. Eur. J. Phycol. 31(4): 333-340.
- Walz, P.M., D.L. Garrison, W.M. Graham, M.A. Catey, R.S. Tjeerdema & M.W. Silver, 1994. Domoic acid-producing diatom blooms in Monterey Bay, California: 1991-1993. Nat. Toxins 2 (5): 271-279.
- Wang R., L. Maranda, P.E. Hargraves & Y. Shimizu, 1993. Chemical variation of *Nitzschia pungens* as demonstrated by the co-occurrence of domoic acid and bacillariolides. In Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam: 637-649.
- Work, T.M., B. Barr, A.M. Beale, L. Fritz, M.A. Quilliam & J.L.C. Wright, 1993. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. J. Zoo Wildlife Med. 24: 54-62.
- Wright, J. L.C., R.K. Boyd, A.S.W. De Freitas, M. Falk, R.A. Foxall, W.D. Jamieson, M.V. Laycock, A.W. McCulloch, A.G. McInnes, P. Odense, V.P. Pathak, M.A. Quilliam, M.A. Ragan, P.G. Sims, P. Thibault, J.A. Walter, M. Gilgan, D.J.A. Richard & D. Dewar, 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from Eastern Prince Edward Island. Can. J. Chem. 67:481-490.
- Yoo, K.I. & J.H. Lee, 1982. Studies on the planktonic diatoms in the vicinity of Kori nuclear power plant. Bull. Korea Ocean Res. Dev. Inst. 4: 53-62.

**PARTE III. EPISODIOS REGIONALES:
ANTECEDENTES, PROYECTOS DE
SEGUIMIENTO E INVESTIGACIONES EN
CURSO**

CAPÍTULO 8: EPISODIOS DE ALGAS NOCIVAS EN LA PATAGONIA

ARGENTINA

NORMA SANTINELLI, VIVIANA SASTRE & JOSÉ LUIS ESTEVES

Laboratorio de Hidrobiología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia.
Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas. Centro Nacional Patagónico. CONICET.
Argentina.

INTRODUCCIÓN	199
METODOLOGÍA	200
ANÁLISIS DE LOS EPISODIOS REGISTRADOS EN LA ZONA COSTERA	201
COSTA DE CHUBUT (1980-1981)	201
COSTA DE CHUBUT (1981-1984)	201
ESTUARIO DEL RÍO CHUBUT (BAHÍA ENGAÑO) (DICIEMBRE 1984 - ENERO 1985)	202
BAHÍA ENGAÑO (1985-1991)	202
GOLFOS SAN JOSÉ Y NUEVO (1990-1996)	203
BAHÍA NUEVA (GOLFO NUEVO), VERANO 1987-1988	205
BAHÍA NUEVA (GOLFO NUEVO), DICIEMBRE DE 1993	205
CALETA VALDÉS (PENÍNSULA VALDÉS), 1989-1991	206
GOLFO SAN MATÍAS, 1992-1995	206
CONCLUSIONES	206
BIBLIOGRAFÍA	207

EPISODIOS DE ALGAS NOCIVAS EN LA PATAGONIA ARGENTINA

NORMA SANTINELLI, VIVIANA SASTRE & JOSÉ LUIS ESTEVES

Laboratorio de Hidrobiología. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia.
Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas. Centro Nacional Patagónico. CONICET.
9100 Trelew, Chubut, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Las proliferaciones de algas nocivas, en sentido estricto, son fenómenos naturales que han ocurrido a través de la historia; sin embargo, en las dos últimas décadas los impactos de tales eventos en la salud pública y en la economía, parecen haber incrementado en frecuencia, intensidad y distribución geográfica (Hallegraeff, 1993).

En los últimos diecisiete años se han intensificado los estudios en la zona costera patagónica sobre especies de microalgas nocivas, condiciones oceanográficas que se presentan durante su desarrollo, y efectos sobre las pesquerías y la salud humana. La intensificación de los muestreos, sumada a la estimulación de las proliferaciones algales por condiciones climatológicas inusuales y/o por un mayor impacto humano en las zonas costeras, podrían ser las causas del aparente incremento de los eventos tóxicos en esta zona.

La aparición de Veneno Paralizante de Moluscos (VPM), es un fenómeno recurrente en el mar Argentino. En el caso particular de los golfos norpatagónicos Nuevo y San José, el fenómeno se presenta periódicamente desde que se detectó por primera vez en 1980 (Carreto *et al.*, 1981; Carreto *et al.*, 1985). En aquella ocasión, los altos niveles de toxina en los mejillones produjeron la muerte de dos pescadores del B/P "Constanza" a 70 millas náuticas al este de Península Valdés (Elbusto *et al.*, 1981). A partir de entonces, los episodios tóxicos se han extendido por todo el litoral argentino. Se considera que el dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, cuya densidad se incrementa en primavera-verano en la zona costera, es el agente de estos eventos tóxicos que obligan a imponer vedas a la recolección de bivalvos. Las especies de moluscos de interés comercial más afectadas son: *Aequipecten tehuelchus* (vieira), *Aulacomya ater* (cholga) y *Mytilus edulis platensis* (mejillón).

La pesquería de bivalvos del Golfo San José, con una producción anual de 500-800 t, 150 personas involucradas en el sector y un valor de 500000 a 1000000 \$US anuales según Ciocco (1994), es de gran relevancia para la zona. La especie más importante ha sido la «vieira tehuelche», que se distribuye en aguas someras (0-50 m) alrededor de casi toda la costa del golfo. Le sigue en importancia la cholga, cuya concentración máxima se sitúa en la zona del infralitoral superior. El mejillón ha sido objeto de una explotación intensa y tras considerarse el mal estado del stock, se prohibió su recolección (Zaixo *et al.*, 1991).

Diversas instituciones nacionales, como el Centro Nacional Patagónico (CENPAT, CONICET), la Universidad Nacional de la Patagonia (UNPAT), el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), el Instituto de Biología Marina y Pesquera «Alte. Storni» y la Fundación Patagonia Natural (a través del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica) han dedicado esfuerzos a la investigación de los eventos tóxicos. Otros organismos, como la Dirección General de Intereses Marítimos y Pesca Continental (DGIMyPC), la Dirección de Medio Ambiente (DMA) del Sistema Provincial de Salud (SIPROSALUD) de la Provincia del Chubut y el Servicio Nacional de Salud (SENASA) han trabajado en la prevención de las consecuencias de estos eventos.

Desde 1980 hasta 1984, el CENPAT asumió el control de la presencia de toxicidad en los moluscos de la costa chubutense. En el año 1985 se iniciaron líneas de investigación entre el CENPAT y la UNPAT cuyo principal objetivo fue relacionar la toxicidad de los moluscos con las especies productoras de toxinas presentes en el plancton. Entre los años 1990 y 1996 se desarrolló el programa de «Monitoreo de Fitoplancton Tóxico y Toxicidad en Moluscos», que involucró al Laboratorio de Hidrobiología de la Universidad Nacional de la Patagonia (a cargo de las

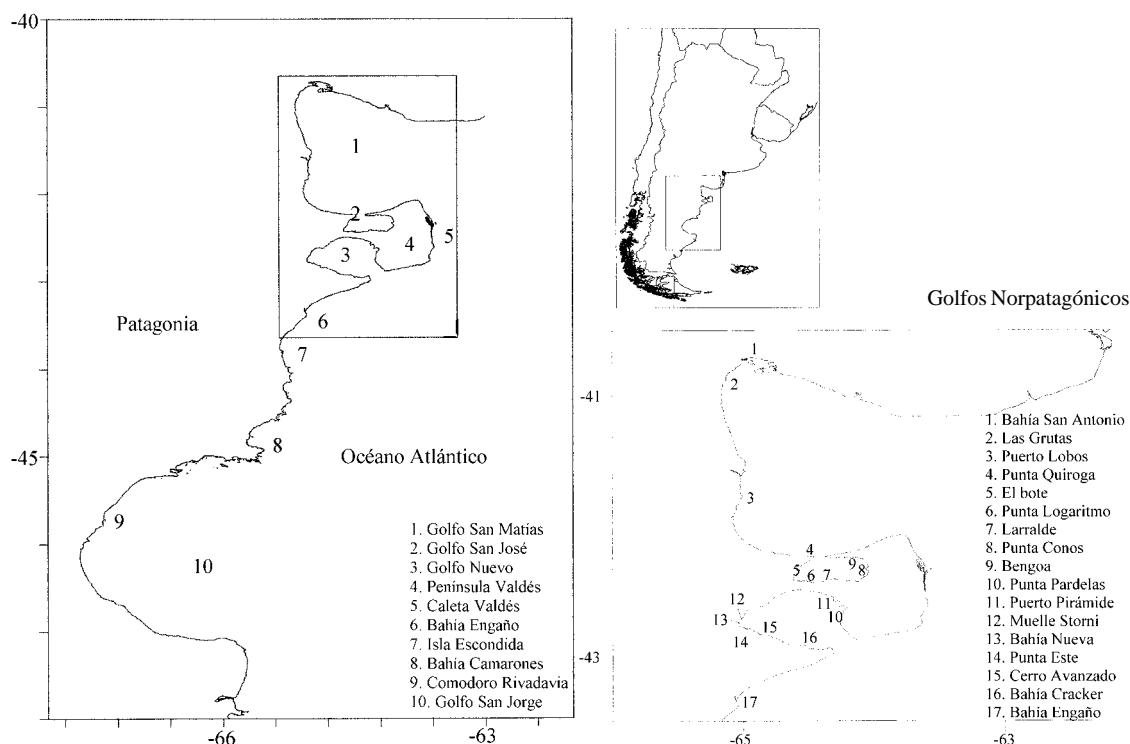


Fig. 1. Ubicación geográfica del área de estudio.

determinaciones taxonómicas y cuantificación de las especies nocivas presentes en el plancton del área), a la Dirección responsable de los análisis de VPM en Moluscos (DMA) y al ente regulador de las vedas por Mareas Rojas (DGIMyPC). Actualmente, el Laboratorio de Hidrobiología de la UNPAT y el Área de Oceanografía Química y Contaminación de Aguas del CENPAT, realizan estudios sobre fitoplancton nocivo y parámetros oceanográficos en la zona costera patagónica.

En esta recopilación de información se presentan los diferentes casos en los que se han producido floraciones algales nocivas y/o toxicidad de moluscos por VPM en la zona costera patagónica. Se presenta también información sobre los perfiles de toxinas de poblaciones de *A. tamarensis* y de distintas especies de moluscos, así como información sobre parámetros ambientales y efectos nocivos de los eventos sobre la población humana (casos registrados). Las zonas estudiadas por el grupo de trabajo comprenden el área costera de las Provincias del Chubut y Río Negro (Bahía Engaño, Golfo Nuevo, Península Valdés, Golfo San José y Golfo San Matías) (Fig. 1).

METODOLOGÍA

Se tomaron muestras con red de plancton de 25 μm de apertura de malla para el análisis cualitativo y con botellas Van Dorn para el análisis cuantitativo de las poblaciones fitoplanctónicas. Se midieron y dibujaron las especies con cámara clara y se tomaron fotomicrografías, en los casos de interés, con una cámara Leica-Wild MPS32. Para la identificación taxonómica de dinoflagelados se siguió la metodología de Balech (1988; 1995). La limpieza de los frústulos de diatomeas se realizó según Hasle (1978) y Round *et al.* (1990).

Los análisis cuantitativos se realizaron con cámara de recuento Sedgwick-Rafter de 1 ml de capacidad bajo microscopio estandar Zeiss (Guillard, 1978) y con Microcopio Invertido Leitz DMIL, siguiendo la técnica de Ütermohl (Lund *et al.*, 1958). Para la detección de quistes de dinoflagelados, se extrajeron sedimentos mediante dispositivo manual tipo Corer, y se sonicaron y lavaron las muestras antes de su observación microscópica siguiendo la técnica de Dale (1979).

Se obtuvieron muestras de las diferentes especies de moluscos bivalvos presentes en los bancos de explotación comercial, para la determinación de VPM. La metodología empleada fue la del bioensayo de ratón propuesta por Sommer y Meyer (1937) y la técnica estándar desarrollada por la AOAC (1975). Las muestras destinadas a la determinación de parámetros oceanográficos se tomaron con botellas Van Dorn y se aplicaron los métodos analíticos de Strickland y Parsons (1972). Los perfiles de toxinas se obtuvieron a partir de los análisis cromatográficos (HPLC) de extractos de poblaciones naturales de *A. tamarense* y de moluscos, en el Centro de Vigo del Instituto Español de Oceanografía y en el Laboratorio de Biofísica de Membrana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

ANÁLISIS DE LOS EPISODIOS REGISTRADOS EN LA ZONA COSTERA

COSTA DE CHUBUT (1980-1981)

En noviembre de 1980, se produjo el primer registro de evento tóxico en las costas de Península Valdés (Carreto *et al.*, 1981). A consecuencia de ello se impuso una veda a la recolección, comercialización y consumo de bivalvos entre Carmen de Patagones y Puerto Rawson y se investigó la presencia de VPM en la zona costera de la Provincia del Chubut (entre 42° y 46°S), especialmente en los bancos comerciales del Golfo San José. Los mariscos analizados fueron: *Aulacomya ater* (cholga), *Mytilus edulis platensis* (mejillón), *Aequipecten tehuelchus* (vieira), *Ameginomya antiqua* (almeja), *Pododesmus rudi* (falsa ostra) y *Pleoticus muelleri* (langostino).

En la Tabla 1 se presentan algunos de los valores de toxicidad obtenidos, según bioensayo de ratón, de muestras provenientes de los golfos San José y Nuevo y de otras aportadas por empresas procesadoras de la zona costera de la Provincia de Chubut.

Los análisis se hicieron a partir de extractos de animales crudos o cocinados, completos o fraccionados. Las concentraciones de VPM en langostinos mostraron valores que oscilaron entre muy bajos y no detectables (ND), tanto en crudo como cocidos. Las vieiras presentaron concentraciones desde ND hasta 300 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne en animales

crudos, mientras que fueron ND en el músculo abductor o callo. La cholga presentó los valores más elevados en el Golfo San José y en los materiales aportados por las plantas procesadoras y mínimos en el Golfo Nuevo. Esto confirma que los moluscos de las plantas provenían exclusivamente del Golfo San José. No se observaron diferencias significativas entre animales crudos o cocidos, lo que indicó que se trataba de una toxina termoresistente. Los análisis efectuados en mejillones revelaron concentraciones de toxina muy elevadas (9067 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne) en muestras recogidas en la zona denominada «Banco Constanza» a 70 millas náuticas al este de Península Valdés, mientras que los valores observados en la zona costera fueron muy bajos o ND.

Las concentraciones máximas de toxina se hallaron en el Golfo San José. Los valores al sur de Península Valdés, incluido el Golfo Nuevo, se encontraron por debajo del límite máximo admitido para consumo humano (80 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne). Considerando la elevada toxicidad encontrada en los moluscos de la plataforma costera (9067 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne), y el valor máximo en la zona costera, observado en la boca del Golfo San José, Punta Quiroga, (667 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne), se hipotetizó que la iniciación de este fenómeno habría tenido lugar en la plataforma y que las microalgas tóxicas habrían sido transportadas desde la plataforma a las zonas costeras por mecanismos de advección física.

COSTA DE CHUBUT (1981-1984)

Entre 1981 y 1984 el Área de Productividad y Contaminación del Centro Nacional Patagónico desarrolló estudios de toxicidad en moluscos de los Golfos Nuevo y San José.

Entre los resultados más interesantes cabe mencionar la evolución de la concentración de VPM en cholgas del Golfo Nuevo y en vieiras del Golfo San José. La concentración de toxinas en cholgas mostró un máximo (1340 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne) en la primavera (septiembre-noviembre) de 1981, descendiendo en diciembre a niveles aptos para el consumo humano o por debajo de los límites de detección. Esta situación se mantuvo hasta la primavera de 1983, cuando de nuevo se alcanzaron valores ligeramente superiores a los niveles aptos para el consumo.

Tabla 1. Toxicidad por VPM medida en moluscos y crustáceos de la costa del Chubut.

Especie	Fecha	Toxicidad ($\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	Número de muestras	Lugar	Tipo de muestra
Langostino	12/1980	ND - 47	3	Isla Escondida y empresas de procesado	animales crudos
Viera	12/1980 – 1/1981	ND - 300	6	Golfo San José y empresas de procesado	animales crudos
		ND	4	Golfo San José y empresas de procesado	músculo abductor (callo)
Cholga	12/1980 – 2/1981	ND a 262 ± 300	5	Golfo San José	animales completos crudos
		316 ± 189	2	Empresas de procesado	animales completos cocidos
		ND a 58 ± 14	4	Golfo Nuevo	animales completos crudos
Mejillón	12/1980 – 2/1981	ND - 54	3	Golfo San José	animales completos crudos

Las vieiras del Golfo San José también presentaron elevadas concentraciones de VPM en la primavera de 1981, alcanzando valores de $1600 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne en extractos del animal completo. Los niveles disminuyeron en diciembre, en escalas de tiempo similares a las de la cholga. En agosto de 1982 se presentó un nuevo máximo ($1120 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne) y se mantuvieron concentraciones superiores a $200 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ durante el verano (enero-marzo) del 1982.

Se observaron importantes diferencias en los procesos de intoxicación y detoxificación entre las dos especies de bivalvos estudiados en 1980 y la primavera de 1981, períodos en que se presentaron elevados niveles de toxicidad en los moluscos de ambos golfos. Durante 1982, sólo se detectó toxicidad en vieiras del Golfo San José, mientras que en el Golfo Nuevo la cholga permaneció libre de toxicidad. Tanto Bahía Camarones como Comodoro Rivadavia mostraron bajos valores de toxina en cholgas en abril de 1982. En primavera de 1983, se observó un ligero aumento de toxicidad en ambas especies en los dos golfos, aunque en este caso las concentraciones se mantuvieron en el límite de $80 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne. Sin embargo, la concentración llegó a $180 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne en cholgas de Bahía Camarones en la zona norte del Golfo San Jorge.

ESTUARIO DEL RÍO CHUBUT (BAHÍA ENGAÑO) (DICIEMBRE 1984 - ENERO 1985)

Durante estos meses se produjo un brote de toxicidad por VPM en el que se alcanzaron valores de

$37400 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne y que provocó la intoxicación e incluso muerte de varias personas. Los casos registrados fueron 18 en total, 7 de ellos requirieron internación hospitalaria, de los cuales 5 resultaron con insuficiencia respiratoria aguda, 4 de ellos con desenlace fatal. Las muertes se produjeron en 3 de los casos antes de ingresar a terapia intensiva y en el restante a los 30 min de estar con asistencia respiratoria mecánica. Los 11 afectados restantes estuvieron en observación durante 24 h (Vecchio *et al.*, 1986).

BAHÍA ENGAÑO (1985-1991)

A partir del brote de toxicidad registrado en la zona del estuario del río Chubut (Vecchio *et al.*, 1986), se realizó el seguimiento de los parámetros químicos y biológicos en la bahía. Los dos años de muestreo demostraron la presencia de *Alexandrium tamarense* (= *A. excavatum*) productor de VPM, tanto en forma de quistes de resistencia como de células móviles planctónicas. Esta especie fue, posiblemente, la responsable de los episodios tóxicos ocurridos durante el verano 1984-1985. Investigaciones realizadas en el área por nuestro equipo evidenciaron el carácter estacional de la aparición de la fase vegetativa de *A. tamarense*, desde finales de la primavera hasta principios del otoño (Santinelli & Esteves, 1993). Los quistes se detectaron en sedimentos próximos a la desembocadura del Río Chubut y presentaron una correlación positiva con la temperatura cuando aparecieron en suspensión en la columna de agua. La fase vegetativa se correlacionó

positivamente con la salinidad, la temperatura y el nitrato. Asimismo, se detectaron en Bahía Engaño especies potencialmente productoras de toxinas diarreicas, como *Dinophysis acuminata*, o especies causantes de discoloraciones, como *Prorocentrum micans* de amplia distribución en el Mar Argentino (Akselman *et al.*, 1986).

Un estudio acerca de la estructura de la comunidad fitoplanctónica realizado en el estuario inferior del Río Chubut permitió identificar las especies dominantes, entre las que se encontraban *Odontella aurita* y *Aulacoseira granulata*, ambas formadoras de densas floraciones (Santinelli *et al.*, 1990). *A. granulata* fue responsable de la obturación de los filtros de las plantas potabilizadoras situadas aguas arriba del curso inferior del Río Chubut (Sastre *et al.*, 1994a, b). La comunidad fitoplanctónica estuvo dominada por *Paralia sulcata*, *Melosira varians*, *Gomphoneis herculeana*, *Alexandrium tamarense* y *Protoperdinium balechii*. Esta agrupación, característica del estuario inferior, estuvo presente todo el año (Sastre *et al.*, 1993).

Entre noviembre de 1990 y mayo de 1991 se siguió la evolución temporal del fitoplancton a intervalos semanales, detectándose *A. tamarense* en sus dos formas (móvil y quística). Las fases móviles apa-

recieron a mediados de noviembre y se mantuvieron en bajas concentraciones durante todo el período analizado, coincidiendo sus máximos con valores altos de salinidad (33,8 psu) y temperaturas del orden de los 20 °C (Lettieri, 1992).

GOLFOS SAN JOSÉ Y NUEVO (1990-1996)

Entre los años 1990 y 1996 se realizó el «Monitoreo de Fitoplancton Tóxico y Toxicidad en Moluscos» en los golfos San José y Nuevo, establecido por Decreto N°1654/85 del Gobierno de la Provincia del Chubut. Los muestreos de fitoplancton periódicos revelaron la presencia, aparentemente estacional, del dinoflagelado tóxico *A. tamarense*. Los valores máximos se registraron en primavera-verano. La Tabla 2 muestra las concentraciones de *A. tamarense* en los golfos San José y Nuevo durante el período de monitoreo.

La toxicidad en moluscos bivalvos fue recurrente durante el período bajo análisis, por lo que esta zona sufrió vedas para la extracción y comercialización de moluscos durante importantes períodos del año, generalmente entre septiembre y abril, aunque en algunos años se detectó VPM también en los meses de invierno. Los valores máximos de toxicidad registrados entre noviembre de 1990 y marzo de 1996 en mejillón, cholga y vieira se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Abundancia de la especie productora de Veneno Paralizante de Moluscos *Alexandrium tamarense* en los Golfos San José y Nuevo entre 1990 y 1996.

Localidad	Concentración Orden de magnitud (cel·l ⁻¹)	Fecha
Golfo San José	10 ³	11-12/1990
	10 ⁴	10-12/1993
	10 ³	2/1994
	10 ⁴	11-12/1994
	10 ²	2-7/1995
	10 ³	9/1995
	10 ³	11-12 /1995
	10 ³	2-5/1996
	10 ³	12/1990
	10 ²	10/1993
Golfo Nuevo	10 ²	2/1994
	10 ³	11-12/1994
	10 ²	2/1995
	10 ²	7/1995
	10 ³	9/1995
	10 ²	12/1995
	Detectada, sin cuantificar	3/1996

En colaboración con el Centro de Vigo, del Instituto Español de Oceanografía, se determinaron los perfiles de toxinas, mediante análisis por HPLC. Se analizaron muestras de fitoplancton que contenían poblaciones naturales de *A. tamarense*, y de cholga y vieira provenientes de bancos naturales, así como de mejillones cultivados, todas ellos recolectados en septiembre de 1995. Los resultados obtenidos fueron publicados (Reyero *et al.*, 1998) y se resumen a continuación.

El análisis de la composición de toxinas de *A. tamarense* reveló que las Gonyautoxinas (GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4) constituían más del 95% del contenido total de toxinas, mientras que las N-sulfocarbamoyl toxinas (C1 y C2) no representaban más del 5%. Las toxinas GTX1 y GTX2 eran más abundantes que sus epímeros GTX4 y GTX3, respectivamente. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Carreto *et al.* (1996) en cultivos de *A. tamarense* aislado de la zona costera bonaerense, en los que las toxinas C1 y C2 fueron dominantes.

Esta diferencia podría ser explicada por la rápida conversión de las sulfocarbamoyl toxinas, C1 y C2, más lábiles que las gonyautoxinas correspondientes (GTX2 y GTX3) en nuestras muestras. Otra posible explicación sería que las cepas, en condiciones de cultivo, presentarían un perfil de toxinas distinto.

Los perfiles de toxinas en moluscos, mostraron el mismo espectro en todas las especies, esencialmente GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, C1 y C2, y trazas de dcSTX y STX. Se encontró una gran variación en las concentraciones de toxinas, sin embargo pudieron reconocerse algunas características comunes en los perfiles. Un aspecto interesante fue la presencia de C1 y C2 (en algunos casos las más abundantes), en contraste con las muestras de *A. tamarense*.

En cooperación con el Laboratorio de Biofísica de Membrana, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se hizo un seguimiento de la detoxificación natural de VPM en moluscos muestrados entre noviembre de 1995 y mayo de 1996 (Andrinolo *et al.*, 1999). Los análisis por HPLC, mostraron que las toxinas más abundantes en los moluscos fueron las Gonyautoxinas 1-4. Estos epímeros fueron también los más abundantes en las muestras de agua que contenían *A. tamarense*. La toxicidad máxima en muestras de plancton (490 fmol de toxina/célula), y en moluscos (631 μg STX eq. \cdot 100 g^{-1}) se registró en noviembre de 1995, probablemente tras la aparición de un máximo de las poblaciones del dinoflagelado. Los valores de toxicidad

fueron disminuyendo hasta febrero de 1996, aunque se mantuvieron siempre por encima de los niveles de veda.

En los golfos estudiados también se registraron especies de diatomeas potencialmente productoras de Veneno Amnésico de Moluscos (VAM) (Ferrario *et al.*, 1999), aunque la presencia de ácido domoico en los bivalvos no pudo comprobarse debido a que aún no se habían puesto en marcha las técnicas para su análisis. La identificación taxonómica de las diatomeas potencialmente tóxicas se realizó en cooperación con el Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, de la Universidad Nacional de La Plata. La Tabla 4 resume la presencia de las especies potencialmente productoras de VAM con sus abundancias durante el período de seguimiento.

Pseudo-nitzschia multiseriis y *P. pseudodelicatissima* se registraron en el Golfo San José, observándose sus máximos anuales a fines de primavera y en verano, a temperaturas que oscilaron entre 12 y 18,5 °C. La presencia de la primera, sin embargo, ha sido constante durante todo el período de seguimiento, mientras que la última sólo se detectó en casos aislados. *P. australis* se observó solamente en el Golfo Nuevo, a temperaturas entre 10-16 °C.

Otras especies potencialmente tóxicas detectadas en esta zona fueron *Dinophysis fortii* y *D. acuminata* (Gil *et al.*, 1989), siendo las densidades

Tabla 3. Valores máximos de toxicidad por Veneno Paralizante de Moluscos en los Golfos Nuevo y San José entre 1990 y 1996.

Localidad	Especie	Toxicidad (μg STX eq. \cdot 100 g^{-1})	Período
Golfo San José	<i>M. edulis platensis</i>	4440	11/90-4/91
	<i>A. ater</i>	441	10/93-2/94
	<i>A. tehuelchus</i>	516	11/94-7/95
	<i>M. edulis platensis</i>	440	9/95-5/96
Golfo Nuevo	<i>M. edulis platensis</i>	2887	11/90-4/91
	<i>A. ater</i>	669	10/93-2/94
	<i>A. ater</i>	306	11/94-7/95
	<i>A. ater</i>	1601	9/95-5/96

máximas ($2000 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) durante el verano 1994-1995 en el Golfo San José. *Prorocentrum lima* (Santinelli *et al.*, 1995) fue citado por primera vez para el mismo golfo en concentraciones de $100 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Estas especies pueden ser responsables de episodios de toxicidad por Veneno Diarreico de Moluscos (VDM).

BAHÍA NUEVA (GOLFO NUEVO), VERANO 1987-1988

El Golfo Nuevo fue considerado, hasta el año 1987, como una zona aparentemente libre de toxicidad. En el verano de 1987/88 se detectó en la Bahía Nueva un pico de $13230 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne, que produjo intoxicación aguda por VPM de dos personas que necesitaron hospitalización (Esteves *et al.*, 1992). A raíz de este episodio se realizó un estudio intensivo de la evolución del fitoplancton y de los parámetros ambientales. El organismo responsable fue identificado como *Alexandrium tamarense*. Las mayores densidades registradas fueron de $7.5 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$, decreciendo 20 días más tarde hasta $3100 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Esta floración fue seguida de una población dominada por *Prorocentrum micans* y varias especies de diatomeas, y tres meses más tarde por una floración de *Skeletonema costatum*.

El afloramiento de aguas frías, a comienzos del verano, pudo haber sido una de las causas que favoreció las floraciones de *A. tamarense* y *P. micans*. Este afloramiento se produjo por la persistencia de

vientos de componente suroeste, con velocidades medias superiores a $20 \text{ Km} \cdot \text{h}^{-1}$, durante más de 15 días. La toxicidad por VPM decreció con el tiempo siguiendo una cinética de primer orden con una constante de detoxificación de $0,0916 \text{ día}^{-1}$ ($r = 0,992$).

BAHÍA NUEVA (GOLFO NUEVO), DICIEMBRE DE 1993

Durante el mes de diciembre de 1993, se realizó una campaña en la Bahía Nueva en la que se muestreó un retículo de estaciones separadas entre sí por aproximadamente 1 milla náutica. Se seleccionaron estaciones ubicadas en la zona costera frente a la ciudad de Puerto Madryn y otras alejadas de la zona de influencia de la ciudad. En la zona más costera se detectaron concentraciones superiores a $2 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de *A. tamarense* y de $6.6 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de *P. pseudodelicatissima*. Esta especie fue la más abundante, constituyendo hasta el 75% del total (Esteves *et al.*, 1996). En la zona norte de la bahía se observó también *P. australis* en órdenes de magnitud de $10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Las condiciones oceanográficas de la masa de agua revelaron valores relativamente altos de salinidad y nutrientes (nitrato, nitrito, amonio, fosfato y silicato) y tensiones menores de oxígeno disuelto. Estas condiciones están asociadas a un aporte continental de agua dulce enriquecida en nutrientes y con insaturación de oxígeno disuelto, que se confirma con los valores encontrados en los efluentes que llegan a la Bahía (Esteves *et al.*, 1997). Los valores de *A. tamarense* y de *P. pseudodelicatissima*

Tabla 4. Especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de Veneno Amnésico de Moluscos registradas en los Golfos San José y Nuevo entre 1990 y 1996.

Localidad	Especie	Concentración Orden de magnitud ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$)	Fecha
Golfo San José	<i>P. pseudodelicatissima</i>	10^4	10/1993
		10^4	12/1994
		10^3	3-5/1995
		10^5	11/1995
Golfo San José	<i>P. multiseriis</i>	10^4	10/1993
		10^5	12/1994
		10^5	2/1995
		10^5	12/1995
		10^5	2-5/1996
Golfo Nuevo	<i>P. australis</i>	10^4	7/1995
		10^3	11/1995
		10^3	3-5/1996

detectados fueron los máximos que han sido registrados para el área de estudio. En primavera es destacable la existencia de quistes de resistencia de *A. tamarense* inoculados en la columna de agua, que podrían favorecer el desarrollo de poblaciones móviles si las condiciones ambientales fueran propicias, tal como sucedió en los veranos de 1988 y 1993 (Esteves *et al.*, 1992; Santinelli *et al.*, 1995).

CALETA VALDÉS (PENÍNSULA VALDÉS), 1989-1991

En el mes de diciembre de 1989, los resultados de una campaña realizada en la Caleta Valdés, revelaron la presencia en muestras de fitoplancton de la especie tóxica *A. tamarense* en concentraciones de $10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Santinelli *et al.*, 1993).

GOLFO SAN MATÍAS, 1992-1995

A pesar de su cercanía con el frente de Península Valdés, el Golfo San Matías se mantuvo libre de toxicidad hasta la primavera de 1990, cuando se registró una floración inusual de *A. tamarense* (Carreto, 1994). Estudios posteriores demostraron la presencia de bajas densidades de *A. tamarense* ($10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) en puntos cercanos a la boca del golfo San José, en la zona sur, y de *P. pseudodelicatissima* ($10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), en la zona noroeste, ambas en noviembre de 1992. *P. australis* se registró en septiembre de 1993 en la zona norte del golfo, a temperaturas de alrededor de 10°C , alcanzando densidades de $10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$, (Sastre *et al.*, 1997). Posteriormente, en la Bahía de San Antonio y playas adyacentes, *P. pseudodelicatissima* presentó valores del orden de $10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en diciembre de 1994, y de $10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en octubre de 1995 (Esteves *et al.*, 1997), con temperaturas entre 13°C y $19,5^\circ\text{C}$ y salinidades entre 34 y 35,4 psu.

CONCLUSIONES

En la zona costera norpatagónica se han detectado, desde 1980 varias especies de microalgas tóxicas. Entre ellas, la especie productora de VPM, *Alexandrium tamarense*, ha ocasionado impactos negativos en la salud pública hasta el extremo de haber causado la muerte de varias personas y serios perjuicios económicos al sector privado dedicado a la explotación del recurso marisquero. Tales perjuicios se produjeron como consecuencia de las vedas a la recolección y comercialización impuestas por

las autoridades competentes. Los estudios realizados en esta zona demuestran la importancia y estacionalidad del fenómeno (Santinelli *et al.*, 1994). Se han observado además, tres especies productoras potenciales de VDM (*Dinophysis acuminata*, *D. fortii* y *Prorocentrum lima*) y tres especies potenciales productoras de VAM (*Pseudo-nitzschia australis*, *P. multiseriis* y *P. pseudodelicatissima*).

Entre los episodios de toxicidad registrados en la zona costera patagónica, están aquellos asociados al frente de mareas de Península Valdés, donde se registró el primer florecimiento de *A. tamarense*. Desde el registro de dicha floración, el área afectada por los episodios tóxicos se ha expandido progresivamente, hasta abarcar en la actualidad a la casi totalidad de las costas del Mar Argentino. Estos eventos se han vuelto crónicos y todos los años, con mayor o menor intensidad, se producen floraciones tóxicas de esta especie (Carreto, 1994).

En el área de Península Valdés (Golfo San José y Norte del Golfo Nuevo), relativamente libre de impacto antrópico, las floraciones se producen recurrentemente, presentándose en general con bajas concentraciones celulares, aun cuando el contenido tóxico puede llegar a valores elevados. Los florecimientos de origen natural podrían intensificarse por la eutroficación, lo que explicaría las observaciones hechas en las Bahías de San Antonio, Nueva y Engaño, que sufren el impacto antrópico de las ciudades situadas en sus costas (Esteves *et al.*, 1996). Estos efectos suelen manifestarse en un incremento de nitrógeno y fósforo, aumento de la productividad primaria, descenso del oxígeno disuelto, deterioro de la calidad del agua, y desarrollo de floraciones oportunistas (Aubert, 1992).

Teniendo en cuenta que en la zona costera patagónica existe una gran diversidad de actividades económicas -como pesca, acuicultura, turismo y recreación- y un importante asentamiento de colonias de aves y mamíferos marinos, es necesario intensificar los estudios y controles de la presencia de microalgas nocivas, y de las distintas toxinas que integran el complejo del VPM.

La información registrada hasta el presente en la zona patagónica procede fundamentalmente de la zona norte (golfos norpatagónicos y desembocadura del río Chubut) y de la zona sur (Canal de Beagle). Se dispone de muy poca información sobre otras

áreas de la Patagonia donde podrían presentarse floraciones de especies nocivas así como toxicidad en moluscos. Se debería ampliar la cobertura de estudios y controles a zonas costeras en donde la recolección no comercial y consumo de moluscos constituye una actividad habitual de carácter familiar.

BIBLIOGRAFÍA

- Akselman, R., H.R. Benavides, R.M. Negri & J.I. Carreto, 1986. Observaciones sobre especies causantes de discoloraciones en el Mar Argentino. *Physis* 44: 73-74.
- Andrinolo, D., N. Santinelli, S. Otaño, V. Sastre & N. Lagos, 1999. Paralytic shellfish toxins in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdés Peninsula, Chubut, Patagonia Argentina: Kinetic of a natural depuration. *J. Shellfish Res.* 18: 203 - 209.
- AOAC, 1975. Paralytic Shellfish Poison. Biological Methods. In Horwitz, W. (ed.), *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington DC: 319-321.
- Aubert, M., 1992. Sanitary consequences of eutrophication and related ecological disequilibria in the marine environment. In Vollenweider, R.A., R. Marchetti & R. Viviani (eds.), *Marine Coastal Eutrophication*. Elsevier, Amsterdam: 615-629.
- Balech, E., 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publ. Esp. Inst. Español Ocean.* 1: 1-310.
- Balech, E., 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellate). *Sherkin Island Marine Station, Special Publication*. Cork, Ireland, 151pp.
- Carreto, J.I., 1994. Estado actual del conocimiento de los florecimientos de dinoflagelados productores de VPM en el Mar Argentino. In Taller Regional COI-FANSA sobre Planificación Científica de Floraciones Algas Nocivas. Informes de reuniones de trabajo N° 101, Anexo III. COI de la UNESCO: 5-6.
- Carreto, J.I., C. Elbusto, H. Sancho, M. Carignan, T. Yasumoto & Y. Oshima, 1996. Comparative studies on Paralytic Shellfish Toxin profiles of marine snails, mussels and an *Alexandrium tamarense* isolate from the Mar del Plata coast (Argentina). *Rev. Invest. Des. Pesq.* 10: 101-107.
- Carreto, J.I., M. Lasta, R.M. Negri & H.R. Benavides, 1981. Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el Mar Argentino. *Contrib. INIDEP* 399, 101pp.
- Carreto, J.I., R.M. Negri, R.H. Benavides & R. Akselman, 1985. Toxic dinoflagellate blooms in the Argentine Sea. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 147-152.
- Ciocco, N., 1994. La pesquería de vieiras mediante buceo del Golfo San José (Chubut, Argentina). In Taller «Diagnóstico y perspectivas de las pesquerías artesanales en América Austral (Chile-Argentina)».
- IFOP-MAAF Fundación Tinker. Puerto Montt, Resúmenes: 7-8.
- Dale, B., 1979. Collection, preparation and identification of dinoflagellate resting cysts. In Taylor, D.L. & H.H. Seliger (eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, North Holland: 443-452.
- Elbusto, C., A. Ballabene, C. Campero, E. Ramírez & C. Villanueva, 1981. Toxina Paralizante de Moluscos del Mar Argentino. *Acta Bioquim. Clin. L.* 15 (3): 447-456.
- Esteves, J.L., N. Santinelli, V. Sastre, R. Díaz & O. Rivas, 1992. A toxic dinoflagellate bloom and PSP production associated with upwelling in Golfo Nuevo, Patagonia Argentina. *Hydrobiologia* 242: 115-122.
- Esteves, J.L., M. Solís, M. Gil, N. Santinelli, V. Sastre, C. González Raies, M. Hoffmeyer & M. Commendatore, 1996. Dos bahías patagónicas: Bahía Nueva y Bahía Engaño. In Marcovecchio, J. (ed.), *Pollution Processes in Coastal Environments*. Foundation Mar del Plata Aquarium, Mar del Plata: 64-70.
- Esteves, J.L., M. Solís, M. Gil, N. Santinelli, V. Sastre, C. González Raies & M. Commendatore, 1997. Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía Nueva (Provincia de Chubut). *Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica - Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn, Argentina* 31: 1-32.
- Esteves, J.L., M. Solís, V. Sastre, N. Santinelli, M. Gil, M. Commendatore & C. Gonzalez Raies, 1996. Evaluación de la contaminación urbana de la Bahía de San Antonio (Provincia de Río Negro). *Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica - Fundación Patagonia Natural, Puerto Madryn, Argentina* 20: 1-25.
- Ferrario, M.E., E.A. Sar, C. Castaños & F Hinz, 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68 (1-2): 131-147.
- Gil, M., V. Sastre, N. Santinelli & J.L. Esteves, 1989. Metal content in seston from San José Gulf, Patagonia Argentina. *B. Environ. Contam. Tox.* 43 (3): 337-341.
- Guillard, R.R.L., 1978. Counting slides. In Sournia, A. (ed.), *Phytoplakton Manual*. UNESCO, Paris. 182-189.
- Hallegraeff, G. M., 1993. A review of harmful algae blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32 (2): 79-99.
- Hasle, G.R., 1978. Diatoms. In Sournia, A. (ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris: 136-142.
- Lettieri, A., 1992. Fitoplancton tóxico y toxicidad en moluscos en zonas costeras de la Provincia del Chubut. Seminario de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia. Biblioteca Gabriel Puentes, Universidad Nacional de la Patagonia, Sede Trelew, Argentina.
- Lund, J.W.G., C. Kilpling & E.D. Le Cren, 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of stimation by counting. *Hydrobiologia* 11 (2): 143-170.

- Reyero, M., N. Santinelli, S. Otaño, V. Sastre, E. Maroño, J.M. Franco & A. Andrade, 1998. Toxin profiles of PSP from molluscs and phytoplankton containing *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech in two Patagonian gulfs (Argentina). In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO: 507-508.
- Round, R.E., R.M. Crawford & D.G. Mann, 1990. The diatoms. Biology and morphology of genera. Cambridge University Press, Cambridge, 747pp.
- Santinelli, N., G. Caille & A. Lettieri, 1995. Harmful algae and PSP toxicity along the Northern Patagonian coast. Harmful Algae News, IOC of UNESCO 9:6.
- Santinelli, N. & J.L. Esteves, 1993. Características químicas y fitoplanctónicas del estuario del río Chubut, Patagonia, Argentina. Naturalia Patagónica 1 (1): 22-34.
- Santinelli N., V. Sastre & G. Caille, 1990. Fitoplancton del estuario inferior del río Chubut y su relación con la salinidad y la temperatura. Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral 21 (1): 69-79.
- Santinelli, N., V. Sastre & J.L. Esteves, 1993. Sistema Caleta Valdés-Laguna Punta Cero. 5. Composición y variación estacional del fitoplancton. In Caille, G., E.A. Crespo & J.L. Esteves (eds), Actas de las Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar 1991. Universidad Nacional de la Patagonia-Centro Nacional Patagónico (CONICET), Puerto Madryn: 50-58.
- Santinelli, N., V. Sastre & S. Otaño, 1994. Monitoreo de fitoplancton tóxico y toxicidad en moluscos en el litoral de la provincia del Chubut (Patagonia, Argentina). In Taller Regional COI-FANSA sobre Planificación Científica de Floraciones Algales Nocivas. Informes de reuniones de trabajo N° 101, Anexo III. COI de la UNESCO:6-9.
- Sastre, V., N. Santinelli & G. Caille, 1993. Diatomeas y dinoflagelados del estuario del río Chubut, Patagonia, Argentina. II. Estructura de las comunidades. In Anales II Congreso Latinoamericano de Ficología Marina. Rev. Fac. Oceanog. Pesq. Cienc. Alim. Universidad Nacional Federico Villarreal 2: 181-192.
- Sastre, A.V., N.H. Santinelli & J.L. Esteves, 1997. Fitoplancton del Golfo San Matías de tres campañas de muestreo (Noviembre'92, Septiembre'93 y Marzo'94). Physis, A, 53 (124-125): 7-12.
- Sastre, A.V., N.H. Santinelli, S.H. Otaño & M.E. Ivanissevich, 1994a. Water quality of lower run of Chubut river, Patagonia, Argentina. Verh. Int. Ver. Limnol. 25: 1974-1978.
- Sastre, V., N. Santinelli & M.E. Sendin, 1994b. Floración de *Aulacoseira granulata* (Ehr.) Simonsen (Bacillariophyceae) en el curso inferior del río Chubut. Rev. Bras. Biol. 54 (4): 641-647.
- Sommer, H. & K.F. Meyer, 1937. Paralytic Shellfish Poisoning. Arch. Pathol. 24: 560-598.
- Strickland, J. & T. Parsons, 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Bd. Can. Bull. 167: 1-310.
- Vecchio, J., J. Tartaglione, J. Orozco, O. Gómez & G. Grikman, 1986. Intoxicación por V.P.M. (Marea Roja). Medicina 6:705-707.
- Zaixo, H., L. Bala, J. Berón, M. Dacar, S. Laurenti, G. Pagnoni, C. Pastor & P. Ortega, 1991. Bases para la utilización del Golfo San José y Península Valdés. Informe del Centro Nacional Patagónico (CONICET), Puerto Madryn, Argentina, 47pp.

**CAPÍTULO 9: EL PROYECTO «MAREA ROJA» DEL INSTITUTO
NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PESQUERO
(INIDEP)**

**JOSÉ I. CARRETO, RUT AKSELMAN, HUGO R. BENAVIDES, NORA G. MONTOYA &
RUBÉN M. NEGRI**

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600
Mar del Plata, Argentina.

OBJETIVOS DEL PROYECTO	211
PARTICIPANTES	211
ACTIVIDADES	211
CAPACITACIÓN E INTERCAMBIO	212
SÍNTESIS DE LOS LOGROS ALCANZADOS	212
PROYECTOS PREVIOS	212
PROYECTO «MAREA ROJA»	213
BIBLIOGRAFÍA	214

EL PROYECTO «MAREA ROJA» DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO PESQUERO (INIDEP)

JOSÉ I. CARRETO, RUT AKSELMAN, HUGO R. BENAVIDES, NORA G. MONTOYA & RUBÉN M. NEGRI

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo, 1. 7600 Mar del Plata, Argentina.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Establecer posibles relaciones causales entre la ocurrencia e intensidad de las floraciones de microalgas tóxicas y la variabilidad de parámetros ambientales, especialmente el efecto de la radiación ultravioleta (RUV). Con este proyecto se ampliará el conocimiento y se desarrollará la capacidad para la predicción y el manejo de las mareas rojas tóxicas en diferentes ecosistemas del Mar Argentino.

PARTICIPANTES

INSTITUCIÓN: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Paseo Victoria Ocampo Nº 1, 7600 - Mar del Plata.

Casilla de correo 175. TE 54 223 4862586.

Correo electrónico (Responsable del proyecto) jcarreto@inidep.edu.ar

LABORATORIO: Laboratorio de Producción Primaria y Biotoxicidad

PERSONAL: Responsable del proyecto: José I. Carreto
Investigadores: Rut Akselman, Hugo R. Benavides, Nora G. Montoya, Rubén M. Negri

Técnicos: Mario O. Carignan

Auxiliar Ingeniero: Daniel A. Cucchi Colleoni

OTRAS INSTITUCIONES: Como tareas integrantes del proyecto se han desarrollado actividades de intercambio y capacitación con el Centro Oceanográfico de Vigo perteneciente al Instituto Español de Oceanografía.

FINANCIACIÓN: INIDEP; durante los años 1996 y 1997 el proyecto contó con financiación parcial de la Unión Europea. En los años 1998-2001 el proyecto contó con financiación parcial del programa INCO-DC de la Comisión Europea.

PERÍODO: Este proyecto se inició en mayo de 1994 y continúa hasta la actualidad.

ACTIVIDADES

- Realización de campañas periódicas de muestreo en una estación fija (EF) a 30 km de la costa de Mar del Plata con el objeto de conocer el ciclo anual de la abundancia de la especie tóxica *Alexandrium tamarense* y su relación con: a) los niveles de toxicidad en el mejillón *Mytilus edulis*; b) algunos factores ambientales (temperatura, salinidad, nutrientes, pigmentos fotosintéticos, RUV); y c) el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica. Los datos se obtienen de muestras de agua, plancton, sedimentos y bivalvos.
- Elaboración de una base de datos de toxicidad por veneno paralizante de moluscos (VPM) en el Mar Argentino por regiones geográficas consideradas.
- Realización de campañas oceanográficas en la plataforma bonaerense durante el período de primavera-verano con el objeto de evaluar la respuesta de las poblaciones fitoplanctónicas naturales, en condiciones variables de intensidad luminosa y composición espectral de la luz.
- Realización de una campaña anual en la región del Canal Beagle (Ushuaia) durante el período de decrecimiento estacional de la capa de ozono, con el objeto de evaluar el efecto del incremento de la radiación RUV-B sobre la fotosíntesis de poblaciones fitoplanctónicas naturales.
- Evaluar la respuesta *in vitro* de especies de dinoflagelados tóxicos en cultivos sometidos a condiciones variables de intensidad luminosa y composición espectral de la luz.

El proyecto cuenta para la realización de estas actividades con buques de investigación oceanográfico-pesquera con los cuales se realizan tanto los muestreos periódicos en la EF como las campañas en el sector de la plataforma bonaerense en el que se ubica dicha estación.

CAPACITACIÓN E INTERCAMBIO

Con el objeto de implementar nuevas técnicas se incorporó equipamiento que requirió el desarrollo de actividades específicas de capacitación. En este marco y con el objeto de poner a punto los equipos y aplicar nuevas metodologías, personal del proyecto efectuó estadías y cursos en laboratorios europeos especializados, recibiendo asimismo la visita de expertos.

Entre el equipamiento adquirido debe mencionarse el siguiente: cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC), radiómetro sumergible (PUV), medidor de irradiancia cuántica escalar, simulador solar y microscopio de epifluorescencia.

SÍNTESIS DE LOS LOGROS ALCANZADOS

El proyecto Marea Roja constituye la última formulación de una serie iniciada en el INIDEP por el grupo de trabajo en 1980, con ocasión de la detección del primer brote de toxicidad por VPM en la plataforma argentina. Estos estudios han dado origen a una serie de trabajos, cuyo listado se presenta en el último apartado.

PROYECTOS PREVIOS

La primera detección de una floración tóxica de VPM en la plataforma argentina se efectuó en el área frontal de Península de Valdés en la primavera de 1980 y fue producida por el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (Carreto *et al.*, 1981). La asociación de esta primera floración a un sistema frontal y la observación de quistes de resistencia en los sedimentos del área, permitieron plantear la hipótesis del desarrollo de otras floraciones en temporadas subsiguientes. El estudio de un segundo episodio en esa área frontal (Carreto *et al.*, 1986) señaló la importancia del nivel de disponibilidad de nutrientes y del grado de estabilidad de la columna de agua para un rápido crecimiento en el sector estratificado del frente.

El estudio de la distribución espacial y temporal de los registros de VPM y de *A. tamarense* permitió señalar que a partir del brote inicial en la Península de Valdés, el área tóxica se expandió a través de pasos sucesivos hasta cubrir gran parte de la plataforma argentina (Carreto *et al.*, 1985). Esta área abarcó en un período de tres años desde el límite con Uruguay hasta la latitud de la ría de San Julián (49° 15'S), postulándose que la expansión se vinculó a cen-

tros de dispersión asociados a sistemas frontales (Carreto *et al.*, 1985).

El ciclo de vida de *A. tamarense* estudiado en cultivo (Benavides *et al.*, 1983) permitió observar quistes transitorios, gametos y quistes permanentes (hipnozigos), sugiriéndose que la formación de gametos se vincula a un mecanismo dependiente de la densidad de células. Análisis semicuantitativos de los quistes de reposo de esta especie en sedimentos de un sector de la plataforma patagónica señalaron una amplia distribución (42-47°S), poniendo de manifiesto el elevado potencial de toxicidad en el área (Orozco & Carreto, 1989).

El análisis de la variación estacional de VPM en *M. edulis* de bancos de la plataforma bonaerense y su relación con ciertas variables ambientales señalaron la tendencia a presentar los mayores niveles de toxicidad durante la primavera, mencionándose la asociación de los mayores valores de VPM con la radiación solar y la velocidad del viento (Carreto *et al.*, 1993a).

En el Canal Beagle, durante el verano 1991-1992, se registró un brote extraordinario de VPM producido por *Alexandrium catenella*, en el que tanto los niveles de toxicidad en bivalvos como los contenidos celulares de toxinas en el dinoflagelado fueron notablemente elevados (Carreto & Benavides, 1993; Benavides *et al.*, 1995).

En aguas de la plataforma se han detectado floraciones de dinoflagelados de los géneros *Gymnodinium* y *Gyrodinium* que presentan afinidades morfológicas con especies productoras de compuestos con actividad hemolítica (Negri *et al.*, 1992a, b). Estas floraciones no se relacionaron con eventos nocivos. Se han citado, asimismo, discoloraciones producidas por especies no tóxicas de dinoflagelados (*Noctiluca scintillans*, *Prorocentrum micans*) y de un ciliado (*Mesodinium rubrum*) (Akselman *et al.*, 1987).

A. tamarense y *P. micans* producen una serie de compuestos que absorben en la región espectral del UV (Carreto *et al.*, 1989). Estos compuestos, identificados como micosporinas, actúan como fotoprotectores (Carreto *et al.*, 1990a). Su síntesis es activada a altas intensidades luminosas, lo que fue interpretado como una adaptación genética que confiere una ventaja competitiva frente a radiaciones de corta longitud de onda (Carreto *et al.*, 1990b). El

decrecimiento de la capa de ozono tiene como consecuencia el incremento de la radiación ultravioleta UV-B sobre los ecosistemas marinos, pudiendo ser un factor regulador adicional sobre las floraciones de dinoflagelados que presentan características adaptativas debido a la presencia de micosporinas (Carreto *et al.*, 1990b). Se ha observado así, en comunidades fitoplanctónicas naturales, una marcada fotoinhibición debido a la radiación UV-A, UV-B y en menor medida a la radiación fotosintéticamente activa (Carreto *et al.*, 1996a).

En la región costera de la Provincia de Buenos Aires se demostró la presencia de VPM en hígado de caballa (Carreto *et al.*, 1993a) y en vísceras de anchoíta (Montoya *et al.*, 1998). En la primavera de 1993, se detectó una importante mortandad de caballa en el sur de la plataforma bonaerense debido a la transferencia trófica de VPM asociada a una floración de *A. tamarense* (Montoya *et al.*, 1995). En el contenido estomacal de ejemplares muertos se observó un perfil de toxinas diferente al de *A. tamarense*, lo que sugiere mecanismos de transformación (Montoya *et al.*, 1996). La propagación de toxicidad en la cadena trófica fue estudiada a través de los perfiles de toxinas de *A. tamarense*, de *M. edulis* y de varios gasterópodos marinos, revelándose diferencias significativas entre la composición tóxica del dinoflagelado y la acumulada en los tejidos de los consumidores primarios y secundarios (Carreto *et al.*, 1996b).

PROYECTO «MAREA ROJA»

Carreto *et al.* (1998a) efectuaron un estudio de revisión de las floraciones de *A. tamarense* y de los patrones de toxicidad por VPM en relación con aspectos oceanográficos, sobre la base de datos históricos de la distribución y abundancia de la especie y de los registros de toxicidad en la plataforma argentina en el período comprendido entre los años 1980-1995. Se observó un señalado sincronismo en la etapa de iniciación del fenómeno de toxicidad (invierno tardío-comienzo de primavera) en la amplia área entre 35° y 45°S, registrándose los mayores niveles de toxicidad en la región frontal de Península de Valdés. Al norte de la latitud 41°S el crecimiento de *A. tamarense* se inicia en los frentes costeros, originado en la germinación de los quistes de reposo en invierno tardío. En esta región puede producirse esporádicamente la advección hacia la costa de las poblaciones de *A. tamarense*, afectando a los

moluscos de la zona costera.

El análisis del promedio de los máximos mensuales de toxicidad en la plataforma presenta un ciclo bimodal con un primer incremento al comienzo de la primavera y un segundo, mucho mayor, al final de la primavera-comienzos del verano. Si bien la primera moda comienza en toda el área en la primavera temprana, la expresión del máximo principal presenta un desplazamiento temporal en sentido norte-sur registrado desde mediados de la primavera hasta el verano.

En la plataforma bonaerense, en adición al máximo primaveral de VPM causado por *A. tamarense*, durante algunos años se registra un incremento otoñal asociado a la presencia en el plancton de *Gymnodinium catenatum*, otra especie productora de toxinas paralizantes (Carreto & Akselman, 1996; Akselman *et al.*, 1998).

El análisis de los resultados del estudio del primer ciclo anual de *A. tamarense*, factores ecológicos y toxicidad en la EF y el área adyacente (Carreto *et al.*, 1998a) permitió señalar que:

- La abundancia de quistes de reposo en sedimentos, la presencia de las primeras células vegetativas a fines de invierno y la concentración de *A. tamarense* en la columna de agua hasta comienzos del verano, indican que el crecimiento *in situ* es el factor principal en la etapa de iniciación del florecimiento;
- La especie productora de toxinas compite con las diatomeas durante la floración primaveral;
- Las poblaciones de dinoflagelados están sujetas a la variabilidad de las condiciones hidrológicas y meteorológicas, que se reflejan como pulsos de toxicidad en las poblaciones bentónicas de bivalvos.

En referencia a toxinas amnésicas de moluscos y en una primera evaluación de la presencia e importancia de las especies de *Pseudo-nitzschia* en el área bonaerense (Negri & Inza, 1998), se identificaron *P. pungens*, *P. australis*, *P. fraudulenta*, *P. turgidula* y *P. cf. pseudodelicatissima*. En la mayor parte de los casos fueron encontradas en bajas concentraciones celulares, salvo *P. turgidula* que alcanzó concentraciones de $3.3 \cdot 10^6 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en las proximidades del borde de la plataforma. Recientemente (julio de 2000), durante una floración de *P. australis* se detectó por primera vez la presencia de ácido domoico

en el plancton, mejillones y contenido estomacal de anchoítas en un sector de la plataforma de la Provincia de Buenos Aires (Montoya *et al.*, datos no publ.).

BIBLIOGRAFÍA

- Akselman, R., 1994. Especies fitoplanctónicas toxigénicas o potencialmente nocivas detectadas en el Mar Argentino. In COI-Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101, Anexo III: 2-4.
- Akselman, R. 1999. Dinofíceas toxigénicas o potencialmente nocivas en la plataforma argentina: un reporte actualizado sobre su estudio. Notas Botánicas, Soc. Arg. Bot., Conferencias sobre aspectos metodológicos en algas: 13-20.
- Akselman, R., H.R. Benavides, R.M. Negri & J.I. Carreto, 1987. Observaciones sobre especies causantes de discoloraciones en el Mar Argentino. *Physis*, Sec. A, 44(107): 73-74.
- Akselman, R., J.I. Carreto & N.G. Montoya, 1998. *Gymnodinium catenatum* and autumn toxicity in northern shelf waters of Argentina. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO Publishers: 122-123.
- Benavides, H.R., R.M. Negri & J.I. Carreto, 1983. Investigaciones sobre el ciclo de vida del dinoflagelado tóxico *Gonyaulax excavata* (Braarud) Balech (Dinophyceae). *Physis*, Sec. A, 41(101): 135-142.
- Benavides, H., L. Prado, S. Díaz & J.I. Carreto, 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-LeDenn, P. Gentien, C. Marcaillou-LeBaut (eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Paris: 113-119.
- Carreto, J.I., 1987. Red tides and toxic algal blooms in the South western Atlantic. IOC Workshop on International Cooperation in the Study of Red Tides and Oceans Blooms. IOC Workshop Report N°57.
- Carreto, J.I., 1994a. Estado actual del conocimiento de los florecimientos de dinoflagelados productores de VPM en el Mar Argentino. In COI-Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101. Anexo III: 5-6.
- Carreto, J.I., 1994b. Respuestas del fitoplancton marino a la radiación ultravioleta. Deplección de ozono y probables cambios en la estructura de las comunidades fitoplanctónicas. In COI-Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101. Anexo III: 6.
- Carreto, J.I., R. Akselman, M.O. Carignan, A.D. Cucchi Colleoni & M. Pájaro, 1993a. Presencia de veneno paralizante de moluscos en hígado de caballa de la región costera bonaerense. *INIDEP Doc. Cient.* 2: 53-59.
- Carreto, J. I. & R. Akselman, 1996. *Gymnodinium catenatum* and autumn toxicity in Mar del Plata, *Harmful Algae News* 15, IOC of UNESCO: 1, 3.
- Carreto, J. I., R. Akselman, N. G. Montoya, R. M. Negri, H. R. Benavides, M. O. Carignan & A. D. Cucchi Colleoni, 1998b. *Alexandrium tamarense* bloom dynamics and *Mytilus edulis* toxicity in the coastal waters off Mar del Plata (Argentina). In Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 135-138.
- Carreto, J.I., H.R. Benavides, R.M. Negri & P.D. Glorioso, 1986. Toxic red tide in the Argentine Sea: Phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. *J. Plankton Res.* 8(1): 15-28.
- Carreto, J.I. & H. R. Benavides, 1989. Phytoplankton nutrients and fertilization mechanisms. In Second IOC Workshop on Sardine/Anchovy Recruitment Project (SARP) in the Southwest Atlantic. IOC Workshop Report: 65.
- Carreto, J.I. & H. R. Benavides, 1993. World record of PSP in southern Argentina. *Harmful Algae News* 5, IOC of UNESCO: 2.
- Carreto, J.I., H.R. Benavides, M.O. Carignan, R.M. Negri, R. Akselman & A.D. Cucchi Colleoni, 1996a. Photosynthetic response of natural phytoplankton populations to environmental ultraviolet radiation. In Yasumoto, T., Y. Oshima, & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 325-328.
- Carreto, J.I., M.O. Carignan, G. Daleo & S.G. De Marco, 1990a. Occurrence of mycosporine-like aminoacids in the red tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. UV-protective compounds?. *J. Plankton Res.* 12: 909-921.
- Carreto J.I., M.O. Carignan. & N.G. Montoya, 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 223: 49-60.
- Carreto, J.I., S.G. de Marco & V.A. Lutz, 1989. UV-Absorbing pigments in the dinoflagellates *Alexandrium excavatum* and *Prorocentrum micans*. Effects of light intensity. In Okaichi, T., D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.), *Red Tides: Biology, environmental science and toxicology*. Elsevier, New York: 333-336.
- Carreto, J.I., C. Elbusto, H. Sancho, M.O. Carignan, A.D. Cucchi Colleoni, S.G. De Marco & A. Fernández, 1993a. An exploratory analysis of the Mar del Plata shellfish toxicity area (1980-1990). In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam: 377-382.
- Carreto, J.I., C. Elbusto, H. Sancho, M.O. Carignan, T. Yasumoto & Y. Oshima, 1996b. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profiles of marine snails,

- mussels and an *Alexandrium tamarense* isolate from the Mar del Plata coast (Argentina). Rev. Invest. Des. Pesq. 10: 101-107.
- Carreto, J.I., M. Lasta, R.M. Negri & H.R. Benavides, 1981. Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el Mar Argentino. Contr. INIDEP 399: 1-55.
- Carreto, J.I., V. A. Lutz, S. G. de Marco & M.O. Carignan, 1990b. Fluence and wavelength dependence of mycosporine-like amino acids synthesis in the dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. In Granéli, E., B. Sundström, L. Edler & D. M. Anderson (eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, N. York: 275-279.
- Carreto, J.I., N.G. Montoya, A.D. Cucchi Colleoni & R. Akselman, 1998a. *Alexandrium tamarense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine Sea: a retrospective view. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 131-134.
- Carreto, J.I., R.M. Negri, H.R. Benavides & R. Akselman, 1985. Toxic dinoflagellates blooms in the Argentine Sea. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), Toxic dinoflagellates. Elsevier, New York: 147-152.
- Carreto J.I., M. Seguel, N.G. Montoya, A. Clément & M.O. Carignan, 2001. Pigment profile of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. from a massive bloom in southern Chile. J. Plankton Res. 23: 1171-1175.
- Elbusto, C., J.I. Carreto, H.R. Benavides, H. Sancho, A.D. Cucchi Colleoni, M.O. Carignan & A. Fernández, 1993. Paralytic shellfish toxicity in the Argentine sea in 1990: An extraordinary year. In Smayda, T. J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam: 229-233.
- Montoya, N. G., 1994. Determination of algal toxins in Argentine. IOC Workshop Report 2: 1-2.
- Montoya, N.G., R. Akselman, M. Pájaro, R. Perrotta & J.I. Carreto, 1995. Mortalidad de caballa (*Scomber japonicus*) en la plataforma bonaerense (Mar Argentino) asociada a un florecimiento del dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense*. Rev. Invest. Des. Pesq. 11: 145-152.
- Montoya, N.G., R. Akselman, J.M. Franco & J.I. Carreto, 1996. Paralytic shellfish toxins and mackerel (*Scomber japonicus*) mortality in the Argentinian Sea. In Yasumoto, T., Y. Oshima, & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 417-420.
- Montoya, N.G., M. I. Reyer, R. Akselman, J.M. Franco & J.I. Carreto, 1998. Paralytic shellfish toxins in the anchovy *Engraulis anchoita* from the Argentinian coasts. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Microalgae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 72-73.
- Negri, R.M., R. Akselman & H.R. Benavides, 1992a. Floración excepcional de un dinoflagelado en aguas de plataforma de Argentina y Uruguay. Com. Tec. Mix. Frente Marit., 11 (A): 115-122.
- Negri, R.M., J.I. Carreto, H.R. Benavides, R. Akselman & V.A. Lutz, 1992b. An unusual bloom of *Gyrodinium* cf. *aureolum* in the Argentine Sea: community structure and conditioning factors. J. Plankton Res. 14 (2): 261-269.
- Negri, R.M. & D. Inza, 1998. Some potentially toxic species of *Pseudo-nitzschia* in the Argentine Sea (35°-39°S). In Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 84-85.
- Orozco, F.E. & J.I. Carreto, 1989. Distribution of *Alexandrium excavatum* resting cysts in a Patagonic shelf area (Argentina). In Okaichi, T., D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.), Red Tides: biology, environmental science and toxicology. Elsevier, New York: 307-311.
- Perrotta, R.G., A. Madirolas, M.D. Viñas, R. Akselman, R. Guerrero, M.F. Sánchez, F. López, F. Castro-Machado & G. Macchi, 1999. La caballa (*Scomber japonicus*) y las condiciones ambientales en el área de «El Rincón» (39°- 40°30'S). Agosto, 1996. INIDEP Inf. Tec. N°26, 29 pp.
- Santos, B.A. & J.I. Carreto, 1992. Migraciones verticales de *Alexandrium excavatum* (Braarud) Balech et Tangen en columnas experimentales. Bol. Oceanogr. Sao Paulo 40(1/2):15-25.

CAPÍTULO 10: FLORACIONES DE MICROALGAS NOCIVAS EN BRASIL: ESTADO DEL ARTE Y PROYECTOS EN CURSO

CLARISSE ODEBRECHT¹, SANDRA M.F.O. AZEVEDO², VIRGINIA M.T. GARCIA¹,
VERA L.M. HUSZAR³, VALERIA F. MAGALHAES², MARIÁNGELA MENEZES³, LUÍS
A.O. PROENÇA⁴, LEONARDO R. RÖRIG⁴, DENISE R. TENENBAUM^{5,6}, MARIA CÉLIA
VILLAC⁵ & JOÃO S. YUNES¹

¹Fundação Universidad Federal do Rio Grande. Caixa Postal 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil.

²Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade
Universitária, CCS-Bloco H, Rio de Janeiro, RJ, 21949-590, Brasil.

³Museu Nacional, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 21940-
540, Brasil.

⁴Universidad do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Terra e do Mar, Caixa Postal 360, Itajaí, SC, 88302-
202, Brasil.

⁵Instituto de Biologia, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco A, Rio de
Janeiro, RJ, 21949-900, Brasil.

⁶Departamento de Oceanografia, Instituto de Geociências, Universidad do Estado do Rio de Janeiro, Rua
São Francisco Xavier, 524, sala 4020 E, Rio de Janeiro, RJ, 20550-900, Brasil.

ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	219
PROYECTOS FAN EN CURSO EN EL BRASIL	222
I. Microalgas Marinas	222
DIATOMEAS POTENCIALMENTE TÓXICAS EN EL ESTADO DE RIO DE JANEIRO	222
PROGRAMA PILOTO DE MONITOREO DE ALGAS NOCIVAS EN EL LITORAL DE SANTA CATARINA, BRASIL	223
INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS EN LA GERMINACIÓN DE QUISTES Y CRECIMIENTO DE DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE NOCIVOS EN EL EXTREMO SUR DE BRASIL	225
FLORACIONES DE FITOPLANCTON EN EL EXTREMO SUR DE BRASIL	226
II. Cianobacterias continentales con efectos en los ecosistemas marinos	226
CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DE CIANOBACTERIAS TÓXICAS EN ECOSISTEMAS BRASILEÑOS .	226
FITOPLANCTON DE LAGUNAS COSTERAS DEL ESTADO DE RIO DE JANEIRO	228
EFEECTO DEL BALANCE DE NUTRIENTES Y DE LOS FACTORES FÍSICOS EN LAS FLORACIONES DE CIANOBAC- TERIAS TÓXICAS EN EL ESTUARIO DE LA LAGUNA DE LOS PATOS, RS, BRASIL	229
PROYECTOS ACTUALES Y FUTUROS	230
BIBLIOGRAFÍA	230

FLORACIONES DE MICROALGAS NOCIVAS EN BRASIL: ESTADO DEL ARTE Y PROYECTOS EN CURSO

CLARISSE ODEBRECHT¹, SANDRA M.F.O. AZEVEDO², VIRGINIA M.T. GARCIA¹,
VERA L.M. HUSZAR³, VALERIA F. MAGALHAES², MARIÁNGELA MENEZES³, LUÍS
A.O. PROENÇA⁴, LEONARDO R. RÖRIG⁴, DENISE R. TENENBAUM^{5,6}, MARIA CÉLIA
VILLAC⁵ & JOÃO S. YUNES¹

¹Fundação Universidad Federal do Rio Grande. Caixa Postal 474, 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil.

²Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco H, Rio de Janeiro, RJ, 21949-590, Brasil.

³Museu Nacional, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ, 21940-540, Brasil.

⁴Universidad do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Terra e do Mar, Caixa Postal 360, Itajaí, SC, 88302-202, Brasil.

⁵Instituto de Biologia, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-Bloco A, Rio de Janeiro, RJ, 21949-900, Brasil.

⁶Departamento de Oceanografia, Instituto de Geociências, Universidad do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, sala 4020 E, Rio de Janeiro, RJ, 20550-900, Brasil.

ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

En los estudios de floraciones de algas nocivas (FAN) en Brasil se pueden identificar dos fases:

1) Fase Descriptiva, en la que se registraron episodios acaecidos desde principios del siglo XX hasta la fecha;

2) Fase Descriptivo-Experimental, a partir de 1995, en la que se incluyeron estudios sobre las toxinas.

La transición de la primera fase a la segunda coincide con la puesta en marcha del programa *Harmful Algal Blooms* de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI, UNESCO) en 1991 y la participación de investigadores brasileños en actividades de este programa. Esto condujo a una intensificación de las actividades de formación y capacitación mediante la participación en cursos intensivos, colaboración entre los investigadores y formación de estudiantes en líneas de investigación relacionadas con las FAN.

En la Tabla 1 se relacionan episodios de mortandades masivas de fauna marina, principalmente de peces, moluscos y crustáceos, registrados en diversos puntos de la costa brasileña y asociados a la presencia de especies potencialmente nocivas; en algunos casos se añade información sobre las condicio-

nes ambientales. El primer registro histórico detallado de episodio de algas nocivas en Brasil data de principios de siglo. En este primer trabajo (Faria, 1914) se relatan mortandades de peces en la Bahía de Guanabara en junio de 1913, asociadas a floraciones superficiales del dinoflagelado *Glenodinium trochoideum* (= *Scrippsiella trochoidea*). Faria concluyó que posiblemente el dinoflagelado producía sustancias tóxicas que causarían la muerte de ciertos peces por ingestión de la microalga o tal vez por secreción de toxinas al agua circundante. Hoy día *S. trochoidea* ya no se incluye en la lista de especies productoras de toxina; lo más probable es que la mortandad de 1913, relatada por Faria, se debiera a problemas de anoxia (reducción de la concentración de oxígeno disuelto) debido a la elevada densidad alcanzada por el dinoflagelado (10^8 cel \cdot l⁻¹, según estimaciones obtenidas por contajes de muestras de agua centrifugada). Años después se observaron eventos similares en la Bahía de Guanabara asociados a floraciones de la misma especie (Oliveira, 1947, 1950).

El examen detallado de la Tabla 1 y la figura 1 muestra que el número de registros de floraciones de algas nocivas en Brasil, que se concentran entre la costa sur y sureste, es relativamente pequeño. Estos datos son sorprendentes si se considera el período de tiempo analizado y la extensión de la costa brasileña, desde 4° 30' N a 33° 44' S, lo que corresponde a 8500 km de costa (Fig. 1). La existencia de mayor

Tabla 1. Lugar, fecha, observaciones y microalgas presentes durante los problemas ambientales observados en regiones costeras de Brasil (N.D. No determinado).

Nº Referencia autor / Localidad	AÑO (mes)	OBSERVACIONES	MICROALGA	PROBLEMA AMBIENTAL
1/Bahía de Guanabara (RJ)	1913 (6)	Manchas color ocre rojo	<i>Glenodinium</i> (= <i>Scripsiella</i>) <i>trochoideum</i>	Mortandad de peces
2/Cananéia (SP)	1920 (12)	Agua betuminosa	N. D.	Mortandad de peces
3/Bahía de Guanabara (RJ)	1946 (8)-1948 (4)		<i>Glenodinium</i> (= <i>Scripsiella</i>) <i>trochoideum</i>	Mortandad de peces
4/Tamandaré y Recife (PE)	1963 (10)	Manchas color crema, verde claro o rojizas	<i>Trichodesmium erythraeum</i> (= <i>Oscillatoria erythraeum</i>)	Relacionado con la "febre de Tamandaré" = "doença de Tingui"
5/Lagunas costeras (RJ)	1966-1971	Manchas rojizas, amarillentas o anaranjadas	<i>Gymnodinium</i> sp.	Mortandad de peces
6/Itanhaém (SP)	1978 (4)	Manchas marrones en la playa	<i>Asterionellopsis glacialis</i>	Mortandad de peces
7/Hermenegildo (RS)	1978 (4)	Después de fuerte resaca	<i>Gymnodinium</i> sp.	Mortandad de bivalvos Irritación de vías respiratorias en humanos
8/Hermenegildo (RS)	1981 (7)	Después de fuerte resaca	<i>Gyrodinium aureolum</i>	Mortandad de moluscos, cnidarios y equinodermos Intoxicación por bivalvo e irritación de vías respiratorias
9/Litoral de São Paulo (SP)	1983 (8)	Manchas marrones	<i>Gymnodinium breve</i>	Mortandad de peces Resultados negativos en los tests de toxicidad
10/Lagoa de la Barra (RJ)	1990 (1)	Cociente N/P bajo, pH alto.	<i>Synechocystis aquatilis</i>	Mortandad de peces. Tests de toxicidad positivos
11/Litoral de Santa Catarina (SC)	1990	N.D.	<i>Dinophysis</i> spp.	Intoxicación por Veneno Diarreico de Moluscos (DSP)
12/Litoral de Rio Grande do Sul (RS)	1993 (3)	Después de fuerte resaca	<i>Gyrodinium cf. aureolum</i>	Mortandad de crustáceos y moluscos (<i>Mesodesma mactroides</i>)
13/Chuí y Hermenegildo (RS)	1994 (12)	N.D.	Dinoflagelados, silicoflagelados y diatomeas	Mortandad de moluscos bivalvos <i>Mesodesma mactroides</i>
14/Bahía de Sepetiba (RJ)	1998 (1/2)	Mancha verdosa	<i>Chattonella</i> sp.	Dermatitis por contacto primario
15/Arraial do Cabo y Búzios (RJ)	1998 (10-11)	Epífita en algas bentónicas	<i>Prorocentrum</i> sp.	Mortandad de erizos (<i>Echinometra lacuniter</i>)
16/Costas de Rio de Janeiro (RJ)	1991-2 1996-7 1999-2000 (12-1)	Manchas marrones	<i>Tetraselmis</i> sp.	Contaminación visual que afectó al turismo
17/Laguna Rodrigo de Freitas (RJ)	2000 (3)	Cociente N/P bajo, pH alto, transparencia baja.	<i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>salina</i>	Mortandad de peces

1 Faria, 1914; 2 Dias, 1992; 3 Oliveira, 1947, 1950; 4 Satô *et al.*, 1963/4; 5 Semeraro & Costa, 1972; 6 Zavala-Camin & Yamanaka, 1980; 7 Machado, 1979; Tommasi, 1983; 8 Rosa & Buselato, 1981; 9 Anónimo, 1983; 10 Azevedo & Carmouze, 1994; Domingos *et al.*, 1994; 11 Zenebon & Pregnolato, 1992; 12 Garcia *et al.*, 1994; Odebrecht *et al.*, 1995a; 13 Méndez, 1995; 14 Tenenbaum *et al.*, 1998; 15 C.E.L. Ferreira (com. pers., Inst. Est. Mar Alte. Paulo Moreira, RJ); 16 M. Menezes (com. pers., Museu Nacional, UFRJ); 17 Huszar y colaboradores (datos no publicados).

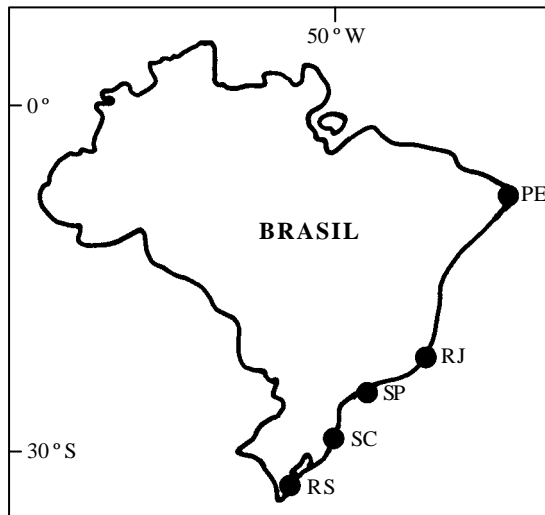


Fig. 1. Localización de las floraciones de microalgas observadas durante los efectos nocivos registrados en la costa de Brasil. PE Pernambuco; RJ Río de Janeiro; SP São Paulo; SC Santa Catarina; RS Río Grande do Sul.

información sobre la región sur-sudeste se debe, sin duda, a la mayor concentración de investigadores en esta zona.

La relación entre la presencia de microalgas y los problemas ambientales relacionados en la Tabla 1 fue dudosa o equívoca en algunos casos. Así pues, la observación de *Gymnodinium breve* en el litoral de São Paulo (Tabla 1, ref. 9) puede ser cuestionada, ya que la identificación precisa de especies del género *Gymnodinium* requiere con frecuencia el uso de microscopía electrónica. Además, se trata de una especie común en el Golfo de México y poco frecuente en el resto del mundo. Otro caso ambiguo es la presencia de la diatomea *Asterionellopsis glacialis* asociada con la mortandad de peces en el litoral de São Paulo en 1978 (Tabla 1, ref. 6). Esta especie no ha sido reconocida como productora de toxinas; por el contrario, constituye una importante fuente de alimento para la fauna de zonas de rompiente en las playas de la costa sur de Brasil (Gianuca, 1985; García & Gianuca, 1997), donde frecuentemente alcanza elevadas densidades como resultado de una combinación de factores hidrográficos y meteorológicos: los vientos fuertes de componente sur-suroeste causan un aumento de la energía del oleaje y suspenden las células del sedimento, concentrándolas en la superficie de la zona de rompiente en las playas arenosas expuestas (Odebrecht *et al.*, 1995b; Odebrecht & Abreu, 1997a; Rörig, 1997; Rörig *et al.*, 1997). Por otro lado, en cuatro ocasiones se re-

gistraron mortandades de fauna en el extremo sur de Brasil (refs. 7, 8, 12 y 13 de la tabla) asociadas con la presencia de flagelados, entre ellos el dinoflagelado *Gyrodinium cf. aureolum* (Odebrecht *et al.*, 1995a), especie responsable de mortandades de moluscos bivalvos en otras regiones del mundo (Shumway, 1990).

El síndrome conocido como «febre de Tamandaré», también denominado «Tingui» ha sido asociado con la presencia de la cianobacteria marina *Trichodesmium erythraeum* en la costa nordeste de Brasil. Este episodio, que causa grandes molestias a la población, generalmente en verano, fué descrito la primera vez por Satô *et al.* (1963-1964). Posteriormente se han observado densas floraciones de esta cianobacteria en 1996, 1997 y 1999 (Carvalho *et al.*, 1999).

Se han registrado floraciones nocivas de rafidofíceas en las costas de Rio de Janeiro (*Chatonella* sp., Sevrin-Reyssac *et al.*, 1979; Tenenbaum *et al.*, 1998), y de Rio Grande do Sul (*Fibrocapsa japonica* y *Chatonella* sp., Odebrecht & Abreu, 1995). La observación de dermatosis por contacto primario representa una alerta de riesgo ante posibles problemas futuros asociados a la presencia de estos organismos. Se han encontrado otras microalgas marinas potencialmente tóxicas, como diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Rörig, 1997; Villac *et al.*, 1996; Villac & Tenenbaum, en prensa; Odebrecht *et al.*, en prensa), especies no identificadas de haptofíceas (*Chrysochromulina* spp., *Prymnesium* spp., Bergesch, com. pers.) y rafidofíceas (*Heterosigma* spp., Persichet *et al.*, 1998), así como cianobacterias del género *Trichodesmium* (Rörig *et al.*, 1998a) en aguas esturinas y/o costeras de Brasil. Se requieren estudios más detallados para establecer el riesgo de episodios nocivos asociados a estas especies. Además de las anteriores, hay que tener en cuenta a la cianobacteria límnic *Microcystis aeruginosa*, productora de toxinas (microcistinas), y que puede ser transportada hasta estuarios y regiones costeras (Yunes *et al.*, 1996) donde sus consecuencias aún no se conocen.

Los estudios epidemiológicos asociados a algas marinas nocivas en Brasil son casi inexistentes. La única referencia disponible para el litoral de Santa Catarina describe una intoxicación de personas con síntomas semejantes a los producidos por toxinas del grupo DSP, asociada a la presencia de dinoflagelados

del género *Dinophysis* (ref. 11). Estudios posteriores confirmaron la presencia de ácido okadaico en moluscos, lo que sumado a la distribución conocida de especies potencialmente productoras de toxinas en Brasil sugiere que las toxinas DSP son comunes en las costas de Santa Catarina (Proença *et al.*, 1998 a,b). Así pues, la información disponible muestra sin lugar a dudas que existen problemas asociados a las floraciones de especies nocivas de microalgas marinas en Brasil, pero su descripción no es lo suficientemente precisa como para permitir emprender un estudio de evaluación de su impacto, sobre todo en lo que se refiere a daños a la salud pública.

La segunda fase, de carácter descriptivo-experimental, sobre las FAN en Brasil, está en pleno desarrollo, como se puede apreciar en la lista de proyectos y referencias relacionados a continuación. El gran impulso dado recientemente al desarrollo de cultivos de moluscos bivalvos en la costa sur del país (Estado de Santa Catarina, Proença & Rörig, 1995), motivó el desarrollo de un trabajo pionero en Brasil. Los análisis de toxinas mediante bioensayos y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) revelaron la presencia de toxinas diarreas (DSP, Proença *et al.*, 1998 a, b, 1999a) y paralizantes (PSP, Proença *et al.*, 1999b) en los moluscos de esta región, donde se identificaron cuatro especies del género *Dinophysis*, potencialmente productoras de DSP. Los análisis de ficotoxinas por HPLC se aplican hoy día a los estudios sobre diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* en las costas de Rio de Janeiro y Rio Grande do Sul, para identificar las especies potencialmente tóxicas previamente descritas mediante microscopía electrónica.

Hay experimentos en curso encaminados a esclarecer la influencia de los factores físico-químicos en la germinación y crecimiento de dinoflagelados potencialmente nocivos en el extremo sur de Brasil. En esta región se detectaron por primera vez altas densidades de *Alexandrium tamarense* en agosto de 1996. En Rio de Janeiro y Rio Grande do Sul se llevan a cabo estudios sobre cianobacterias de agua dulce que afectan a los ecosistemas costeros aplicando metodologías de bioensayos y HPLC. En un experimento piloto realizado por PETROBRAS sobre la renovación del agua de lastre de los barcos y su relación con la diseminación de organismos, se incluyó el estudio de quistes de microalgas (Villac *et al.*, en prensa).

En los últimos años se ha observado en Brasil un aumento del número de registros de floraciones de cianobacterias en aguas continentales, principalmente como respuesta al accidente ocurrido en 1996 en Caruaru, en el que murieron pacientes con afecciones renales por intoxicación con microcistinas (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998). Las floraciones con efectos hepatotóxicos de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* son frecuentes en los embalses de Brasil, y recientemente se demostró la producción de microcistinas por cepas de cianobacterias picoplanctónicas aisladas de mantiales de Pernambuco (Domingos *et al.*, 1999). Recientemente se han registrado floraciones del género *Cylindrospermopsis*, incluyendo cepas productoras de toxinas paralizantes, en varias regiones del país (Molica, en prensa). Se identificaron microcistinas en los músculos de peces de la Laguna de Jacarepaguá y en la Bahía de Sepetiba (Magalhães *et al.*, 1999a, b), y es muy probable que el impacto de las cianobacterias tóxicas se extienda a los ecosistemas costeros, donde la producción pesquera es elevada.

PROYECTOS FAN EN CURSO EN EL BRASIL

I. Microalgas Marinas

DIATOMEAS POTENCIALMENTE TÓXICAS EN EL ESTADO DE RIO DE JANEIRO

Responsables: M.C. Villac y D.R. Tenenbaum

Esta línea de investigación está dirigida al estudio de las diatomeas potencialmente tóxicas de algunas localidades de la costa del Estado de Rio de Janeiro, mediante dos aproximaciones complementarias:

1) Análisis de la composición específica y de la distribución espacio-temporal de *Pseudo-nitzschia* spp.;

2) Bioensayos a partir de extractos de *Pseudo-nitzschia* spp. en el laboratorio. De esta forma, los datos de campo inspiran las hipótesis que serán probadas en condiciones controladas, y como contrapartida, los datos experimentales suministran información que ayuda a interpretar la dinámica ambiental. Este proyecto se realiza en el Laboratorio de



Fig. 2. Localización de las tres áreas de estudio en Río de Janeiro.

Fitoplancton del Departamento de Biología Marina del Instituto de Biología (UFRJ).

Las tres áreas de estudio (Fig. 2), ecológicamente distintas, son: 1) Bahía de Guanabara, estuario muy eutrofizado, y contaminado; 2) Bahía de la Ribeira, con aguas poco eutrofizadas, expuestas a los efluentes térmicos de la central nuclear Angra I y II); 3) Cabo Frío, área de afloramiento.

El estudio del fitoplancton de la Bahía de Guanabara se realiza desde 1985 y actualmente está incluido en un programa de "Apoyo a Núcleos de Excelência" (PRONEX), con muestreos semanales en 2 puntos estratégicos con aguas de características diferenciadas. El estudio de la Bahía de la Ribeira forma parte de un programa de monitoreo mensual realizado desde 1987, y que se lleva a cabo mediante un convenio entre ELETRONUCLEAR y FUJB-Instituto de Biología/UFRJ. El estudio de la región de Cabo Frío se realiza a partir de una colección de datos primarios obtenidos en proyectos de cooperación con el Instituto de Estudios del Mar Almirante Paulo Moreira en el período de 1973-78 y 1988-90.

La evaluación de las poblaciones de *Pseudo-nitzschia* se basa en contajes de los organismos, a nivel de género, en las muestras de agua e incluye análisis de la flora acompañante. La interpretación de los resultados se hace relacionando el fitoplancton con parámetros ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, materia particulada en suspensión, clorofila y nutrientes). Las muestras de red suministran material para estudios más detallados de la composición específica de *Pseudo-nitzschia*, así como para el aislamiento de células y establecimiento de cultivos. Se determina la posible presencia de ácido domoico (AD) en los cultivos a través de la coopera-

ción con L.A.O. Proença (Anónimo, 1997). Los experimentos en condiciones controladas ya implantados permitirán establecer la influencia de parámetros como la salinidad y los nutrientes en el crecimiento de las especies en cultivo.

En estos tres sistemas, el género *Pseudo-nitzschia* es un componente constante del microfitoplancton (70-80% de presencia en 300 muestras analizadas) (Villac, 1990; Villac *et al.*, 1996; Villac & Tenenbaum, en prensa). La densidad celular varió entre $10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (concentración media en Cabo Frío) y $10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (constante en la Bahía de Guanabara, frecuente en la Bahía de la Ribeira). En Cabo Frío (1973-78, 1988-90) las especies del género *Pseudo-nitzschia* contribuyeron significativamente en los primeros estadios de la sucesión fitoplanctónica condicionados por los fenómenos de afloramiento, pero también estuvieron presentes en otras condiciones oceanográficas. En la Bahía de Guanabara (1985-87, 1998 en adelante), la presencia y distribución de las especies de *Pseudo-nitzschia* reflejan el gradiente de salinidad de esta masa de agua estuarina, con concentraciones más bajas en las regiones más internas de la Bahía y durante la estación de lluvias (verano). En la Bahía de la Ribeira (desde 1987 en adelante), las condiciones hidrológicas homogéneas están asociadas a la presencia de este género durante todo el período de estudio, con contribuciones superiores al 50% del microfitoplancton total.

Se han identificado 6 especies hasta la fecha (Villac & Tenenbaum, en prensa): *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. heimii*, *P. cf. multiseriis* y *P. cf. subfraudulenta*, de las cuales las tres primeras ya han sido analizadas en cuanto a la producción de ácido domoico en cultivo. *P. pseudodelicatissima* presentó bajas concentraciones de toxina amnésica, $67 \text{ fg AD} \cdot \text{cel}^{-1}$ (Proença & Villac, datos no public.).

PROGRAMA PILOTO DE MONITOREO DE ALGAS
NOCIVAS EN EL LITORAL DE SANTA CATARINA,
BRASIL

Responsable: L.A.O. Proença

Desde finales de 1994 se realizan muestreos de fitoplancton en las costas de Santa Catarina como parte de diversos proyectos oceanográficos. Se han detectado floraciones de especies potencialmente tóxicas. Las floraciones de las cianobacterias

Trichodesmium spp. se dan entre octubre y abril, especialmente a partir de la isóbata de 40 m; *T. hildebrandtii* es la especie dominante, con la presencia de *T. erythraeum* y *T. thiebautii*. Tanto los tests de toxicidad por bioensayos como los análisis por HPLC realizados con extractos de muestras de floraciones de *T. hildebrandtii* (noviembre de 1995) resultaron negativos en cuanto a presencia de microcistinas (Guimarães & Rörig, 1997; Rörig *et al.*, 1998a). En primavera, además de cianobacterias del género *Trichodesmium*, se presentan diatomeas potencialmente tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*. Se pueden observar densidades relativamente altas de dinoflagelados tanto en verano (*Alexandrium fraterculus* y *Prorocentrum* spp.) como en invierno (*Prorocentrum* spp. y *Dinophysis* spp.) (Guimarães & Rörig, 1997; Rörig *et al.*, 1998b; Anónimo, 1997). Además de los géneros de especies potencialmente tóxicos, se pueden encontrar densas acumulaciones de la diatomea *Anaulus australis* en zonas de rompiente de la Playa de Navegantes cuando aumenta el oleaje tras el paso de frentes fríos (Rörig *et al.*, 1997).

Los resultados anteriores sirvieron de base para la planificación de las actividades de monitoreo de especies tóxicas y toxicidad en moluscos en un programa estatal entre 1997 y 1998. Este programa forma parte del proyecto multidisciplinar «Desarrollo sostenible de la producción de moluscos en el estado de Santa Catarina (1997-1998)», y tiene como objetivo mejorar las condiciones del cultivo de moluscos en una extensión de 400 km de litoral en este estado (Fig. 3). El proyecto incluye acciones que consideran todas las fases del proceso productivo, y que se desarrollan en el ámbito de tres subproyectos:

- 1) Sistema de control de calidad del agua y del producto;
- 2) Sistema de ordenación del litoral para el cultivo, concienciación ambiental y difusión de sistemas alternativos para el tratamiento de efluentes;
- 3) Sistemas sostenibles para la obtención de semilla de moluscos, formación profesional de los acuicultores, y apoyo y estructuración de asociaciones.

La coordinación general del proyecto multidisciplinar está a cargo de la Empresa de Investigación y Extensión Agropecuaria Regional-EPAGRI, SC. Otras instituciones, situadas todas ellas en el estado de Santa Catarina, que actúan como coejecutores

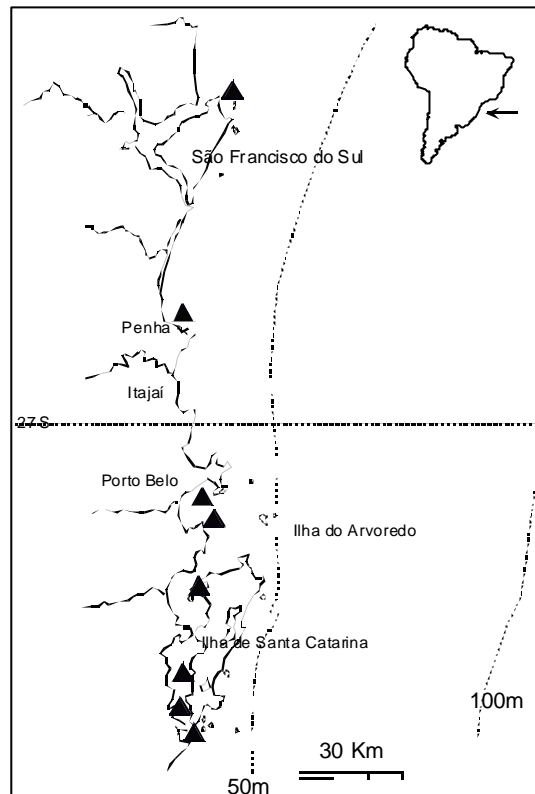


Fig. 3. Litoral del estado de Santa Catarina con las estaciones de muestreo del programa piloto de monitoreo de algas nocivas a lo largo de 400 km de costa (1997-1998).

del proyecto son: la Universidad del Vale do Itajaí-UNIVALI, la Universidad Federal de Santa Catarina-UFSC, la Fundación del Medio Ambiente-FATMA y el Laboratorio Central del Ministerio de Salud-LACEN.

Como parte del proyecto multidisciplinar, el subproyecto “Sistema de Control de Calidad del Agua y del Producto” tiene como objetivos generales:

- a) Sistematizar el cultivo de moluscos bivalvos, con implantación de conductas para controlar la evaluación de la calidad del agua de cultivo y de los productos;
- b) Conceder subsidios para la elaboración de una propuesta para un programa integrado de sanidad de moluscos bivalvos.

Entre los objetivos específicos, destaca el programa de monitoreo de FAN en áreas de cultivo, así como el de niveles de toxicidad de moluscos cultivados en relación con toxinas diarreas de moluscos

(DSP), toxinas paralizantes de moluscos (PSP) y toxinas amnésicas de moluscos (ASP). En el ámbito de este programa, se han recogido y procesado muestras de agua y de moluscos en diez puntos de la zona, con frecuencia semanal en los meses de verano, y quincenal el resto del año. La presencia de algas potencialmente tóxicas en las zonas de cultivo se monitoreó a partir de muestras recogidas con botellas y con redes de plancton, para realizar los análisis microscópicos cuantitativos y cualitativos respectivamente. También se estimaron los parámetros físicos y químicos, tales como temperatura, salinidad, transparencia, clorofila *a* y nutrientes inorgánicos disueltos. El monitoreo de los niveles de toxinas se hizo mediante bioensayo y análisis químicos, siguiendo los métodos adoptados por la Unión Europea para el control sanitario de moluscos.

Uno de los principales resultados del proyecto fue la divulgación de los problemas relacionados con las algas nocivas. Técnicos y pescadores implicados en maricultura adquirieron mayor información sobre el tema, tanto desde el punto de vista ecológico como epidemiológico. De este modo se tomó contacto con los responsables en el ámbito de la producción, asesoramiento, gestión, control sanitario y otros, lo cual permitirá mejorar la gestión en situaciones de crisis. Durante el proyecto, se pusieron a punto metodologías de análisis de toxinas cuyos resultados confirmaron la presencia de diversas especies tóxicas y de toxinas paralizantes y diarreicas en los moluscos cultivados (Proença & Oliveira, 1999; Proença *et al.*, 1998 a, b; Costa *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1997; Proença *et al.* 1999 a,b,c). Si bien presentes, las toxinas encontradas se observaron siempre en concentraciones inferiores a los niveles de regulación establecidos por otros países productores de moluscos, tales como la Unión Europea, y no fue necesario poner en marcha planes de contingencia. Una vez acabado el proyecto, se ha mantenido hasta la fecha un monitoreo con muestreos semanales en la Ensenada de la Armación do Itapocoroy, con fondos de la Universidad del Vale do Itajaí.

Se aislaron varias microalgas -incluidas *Alexandrium fraterculus*, *Gonyaulax* sp., *Prorocentrum obtusum*, *P. micans* y *P. minimum* - que se mantuvieron en cultivo y se analizaron para detectar su posible toxicidad mediante bioensayos de los extractos hidrosolubles y metanólicos. Se identificaron las especies *Dinophysis acuminata* y *Gymnodinium catenatum* como los posibles produc-

tores de las toxinas detectadas (Proença *et al.* 1999a; Proença *et al.*, en prensa). Otras especies nocivas aisladas en la zona de cultivo fueron: *Chattonella* sp., *Heterosigma akashiwo*, y *Phaeocystis* cf *globosa*. Las pruebas preliminares de los extractos hidrosolubles y metanólicos de estos organismos, mediante bioensayos de ratón, indicaron ausencia de toxinas. Actualmente se trabaja en los siguientes proyectos:

- «Presencia de quistes de resistencia del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* en las costas de Itajaí»;
- «Bioacumulación de PSP en la fauna asociada al cultivo de moluscos bivalvos en Armación do Itapocoroy»;
- «Identificación de especies tóxicas del género *Alexandrium* presentes en la Ensenada de Armación do Itapocoroy»;
- «Estudio de la toxicidad del dinoflagelado *Alexandrium fraterculus*»;
- «Efecto de la salinidad en el crecimiento y producción de toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*».

INFLUENCIA DE LOS FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS EN LA GERMINACIÓN DE QUISTES Y CRECIMIENTO DE DINOFLAGELADOS POTENCIALMENTE NOCIVOS EN EL EXTREMO SUR DE BRASIL

Responsable: V.M.T. Garcia

Los objetivos de este proyecto son:

- a) Determinar los parámetros óptimos para la germinación de quistes de dinoflagelados potencialmente nocivos encontrados en sedimentos de la plataforma continental del extremo sur de Brasil;
- b) Desarrollar cultivos unialgales a partir de quistes y/o células móviles de dinoflagelados;
- c) Conocer, a partir de experimentos con cultivos, los requerimientos óptimos de algunos factores físico-químicos tales como nutrientes, temperatura, luz y salinidad de algunas especies nocivas de dinoflagelados presentes en las costas de Rio Grande do Sul.

El proyecto está en marcha desde agosto de 1996, y parte del mismo se ejecuta como trabajo de tesis de doctorado del Curso de Post-Graduación en Oceanografía Biológica (FURG). Se realizaron muestreos de sedimento en la región costera próxi-

ma a la desembocadura de la Laguna de los Patos. Las muestras ya procesadas revelaron la presencia de quistes de dinoflagelados potencialmente nocivos, como *Alexandrium tamarense* (hasta 100 quistes/cm³), *Gymnodinium catenatum* y *Scropsiella trochoidea*.

Los análisis de toxinas en cultivos de *A. tamarense*, obtenidos a partir de células móviles y quistes, mostraron que algunas de estas cepas son extremadamente tóxicas. Mediante cooperación con personal de la "Woods Hole Oceanographic Institution", se están estudiando las características genéticas de estas cepas, y se comparan con especímenes recogidos en América del Norte.

FLORACIONES DE FITOPLANCTON EN EL EXTREMO SUR DE BRASIL

Responsable: C. Odebrecht

El objetivo de este proyecto es caracterizar la presencia de floraciones de fitoplancton en el extremo sur de Brasil comprendido entre el estuario de la Laguna de los Patos y la región de su desembocadura, zona de rompiente de la Playa del Cassino y la plataforma continental adyacente. Los análisis de la concentración y composición taxonómica del fitoplancton, con énfasis en las especies nocivas, se acompañan de los análisis de parámetros oceanográficos como temperatura, salinidad, transparencia, concentración de clorofila *a* y nutrientes inorgánicos disueltos. Los experimentos de laboratorio se desarrollan para determinar la influencia de los nutrientes inorgánicos y el efecto de los herbívoros en el crecimiento y biomasa fitoplanctónica. Se encuentran en marcha los análisis más detallados de grupos particulares de organismos, como nanoflagelados (Bergesch, datos no publ.) y diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Moreira, datos no publ.).

Desde el inicio del programa (1994) se detectaron floraciones de diversas especies de fitoplancton en la región, algunas de las cuales eran tóxicas o potencialmente nocivas. Destacan las especies de diatomeas (*Pseudo-nitzschia multiseriata*, *P. pungens*, *P. pseudodelicatissima* y *P. australis*, Odebrecht *et al.*, en prensa), rafidofíceas (*Chatonella cf. antiqua*, *Fibrocapsa japonica*, Odebrecht & Abreu, 1995), y dinoflagelados (*Gyrodinium cf. aureolum*, *Dinophysis acuminata*,

Noctiluca scintillans y *Alexandrium tamarense*, Garcia *et al.*, 1994; Odebrecht *et al.*, 1995a, 1997). *Alexandrium tamarense* se observó por primera vez en grandes cantidades (10⁵ cel · l⁻¹) en la costa brasileña en agosto de 1996 (Odebrecht *et al.*, 1997), durante un período de entrada de frentes fríos muy marcados en la región sur de Brasil. Esta observación condujo a la hipótesis de que *A. tamarense* era transportado hacia el norte por las corrientes marinas, ya que las floraciones de esta especie son comunes en las costas de Uruguay y Argentina.

Se han observado floraciones de otras especies, no tóxicas, que se pueden presentar en elevadas concentraciones, como *Dictyocha fibula*, *Mesodinium rubrum* y la diatomea *Asterionellopsis glacialis*, típica de zonas de rompiente. Se observó *D. fibula* en asociación con una muerte masiva del bivalvo *Mesodesma mactroides*, mientras que *A. glacialis* se considera una especie beneficiosa, pues constituye una importante fuente de alimento para la fauna litoral del extremo sur de Brasil.

En muestras vivas de plancton se han podido observar varias especies de nanoflagelados (prasinofíceas, haptofíceas y criptofíceas), tanto en el estuario de la Laguna de los Patos como en la región costera. La identificación de estos organismos requiere la aplicación de técnicas especiales en el material vivo, aislamiento de los especímenes y utilización de microscopía electrónica. El conocimiento de su composición taxonómica requerirá trabajos más detallados, pero se sabe que su contribución a la biomasa es importante durante casi todo el año en el estuario de la Laguna de los Patos (Odebrecht & Abreu, 1997b) y en aguas de la plataforma continental (Odebrecht & Garcia, 1997).

II. Cianobacterias continentales con efectos en los ecosistemas marinos

CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DE CIANOBACTERIAS TÓXICAS EN ECOSISTEMAS BRASILEÑOS

Responsables: S.M.F.O. Azevedo y V. Freitas de Magalhães

Los objetivos de esta línea de investigación del Laboratorio de Ecofisiología y Toxicología de Cianobacterias (LETC) del NPPN-UFRJ son:

- a) Determinar los factores ambientales relacionados con la producción de toxinas por cianobacterias;
- b) Aislar y cultivar cepas de cianobacterias que aparecen en cuerpos de agua de Brasil;
- c) Realizar estudios fisiológicos y ecotoxicológicos;
- d) Purificar y caracterizar las toxinas;
- e) Realizar estudios de bioacumulación en animales acuáticos;
- f) Realizar estudios sobre la degradación de microcistinas en condiciones ambientales.

Los estudios se han desarrollado en lagunas costeras del Municipio y del Estado de Rio de Janeiro (Laguna de Jacarepaguá y Laguna de la Barra), donde se dan frecuentes floraciones de cianobacterias. Las cuatro condiciones principales que se presentan durante la formación de estos «blooms» son: a) vientos de intensidad media-baja o calma; b) temperatura del agua entre 15-30 °C; c) pH entre neutro y alcalino, d) abundancia de nutrientes, principalmente de nitrógeno y fósforo. De los estudios desarrollados se ha podido comprobar que la Laguna de Jacarepaguá, frecuentemente utilizada para pesca y actividades de recreación, se encuentra en proceso acelerado de eutrofización artificial, con elevadas concentraciones de nutrientes (nitrógeno amoniacal y fósforo total) y presentando, pues, condiciones óptimas para la aparición de «blooms» de cianobacterias. Los ríos y cursos de drenaje de Jacarepaguá reciben efluentes de industrias de procesamiento de alimentos, farmacéuticas, químicas, de productos electrónicos y metalúrgicos, además de residuos domésticos provenientes de la región de Jacarepaguá y de Barra de la Tijuca. Los vertidos industriales y domésticos, ligados a obras que limitan el régimen de circulación de agua y rellenos ilegales, provocados por la especulación inmobiliaria, generan alteraciones físicas, químicas y biológicas en estos cuerpos de agua, disminuyendo o incluso imposibilitando el uso para actividades recreativas y pesca.

Los estudios sobre bioacumulación de microcistinas en peces de la Laguna de Jacarepaguá (Magalhães & Azevedo, 1998) mostraron la presencia de esta hepatotoxina en todas las muestras de músculo animal, 70% de las cuales presentaron niveles superiores al límite recomendado por la OMS de 0.04 µg de microcistina por kg de peso corpóreo por

día (Chorus & Bartram, 1999). Los estudios desarrollados por Ferrão-Filho *et al.* (2000), permitieron demostrar que durante una floración de *Microcystis aeruginosa* las poblaciones de cladóceros presentaban síntomas de limitación alimenticia, así como descenso de la fertilidad. Se observó que los efectos tóxicos de *M. aeruginosa*, aislada de la Laguna de Jacarepaguá, dependen de: la concentración de células tóxicas, el tamaño de las colonias, la disponibilidad de recursos alimenticios de alto valor nutritivo y la sensibilidad específica del cladóceros.

Tanto la intensidad luminosa como la edad del cultivo afectan a la producción de microcistinas por célula de *M. aeruginosa*. Partiendo de células en fase estacionaria de crecimiento, la concentración de toxina por célula disminuyó en todas las condiciones de iluminación comprendidas entre 40 y 180 µmol foton · m⁻² · s⁻¹ de intensidad (Molica & Azevedo, 1996), observándose el valor mínimo en condiciones de máxima intensidad luminosa. Las células en fase exponencial presentaron una concentración de toxina 1.5 veces mayor con la intensidad luminosa más baja.

La relación entre condiciones nutritivas y producción de toxinas por cianobacterias también se estudió en experimentos de laboratorio (Aguiar & Azevedo, 1998). El aumento de concentración de nutrientes no causó un aumento significativo de la producción de toxina por célula, pero sí aumentó el crecimiento y producción de biomasa de los cultivos. De esta forma, el aumento de concentración de nutrientes en ecosistemas acuáticos puede resultar en un aumento de la concentración de hepatotoxina por unidad de volumen de agua debido al aumento de biomasa de cianobacterias.

Los estudios ecofisiológicos de *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, aislada de la Laguna de la Barra, y cultivada con distintos cocientes N:P (Nascimento & Azevedo, 1998) mostraron que con valores bajos de N:P, esta cianobacteria aumenta su tasa de fotosíntesis y disminuye su tasa de crecimiento, como estrategia para el mantenimiento de la cuota de nitrógeno celular, consiguiendo de este modo que haya reservas para los períodos de ausencia de nitrógeno. Se comprobó la producción de microcistinas por cepas de esta especie.

Entre las cepas de cianobacterias aisladas de diferentes cuerpos de agua brasileños, el 86% resultaron tóxicas y de ellas, el 10% fueron neurotóxicas y

el resto hepatotóxicas (Tabla 2). La especie más común es *Microcystis aeruginosa*, 48% de cuyas cepas son tóxicas. Actualmente se llevan a cabo estudios de degradación de microcistinas como parte de una tesis de doctorado.

FITOPLANCTON DE LAGUNAS COSTERAS DEL ESTADO DE RIO DE JANEIRO

Responsables: V.L.M. Huszar y M. Menezes

Este proyecto se incluye en la línea de investigación «Sistemática y Ecología de Algas Continentales», en desarrollo por el equipo de docentes, investigadores y estudiantes de Grado y Postgrado del Laboratorio de Ficología del Departamento de Botánica (Museo Nacional, Universidad Federal de Rio de Janeiro). Tiene como objetivos estudiar la taxonomía de las microalgas y analizar la composición, estructura y dinámica de las comunidades fitoplanctónicas de distintos ecosistemas acuáticos brasileños, incluyendo las lagunas costeras del Estado de Rio de Janeiro (dulces y salobres). El equipo reúne condiciones para actuar de forma eficiente y rápida en la identificación de especies y en la comprensión de los factores ambientales que regulan la dominancia de las poblaciones fitoplanctónicas.

Algunas de las floraciones de especies de algas potencialmente tóxicas, asociadas o no con mortandades de peces, que se han registrado en algunas lagunas costeras del Estado de Rio de Janeiro son:

1) *Synechocystis aquatilis* f. *salina* ($1.7 \cdot 10^6$ cel · ml⁻¹; 55 mm³ · l⁻¹, febrero de 1991), en la Laguna de la Barra (oligohalina), asociada con coloración rojiza del agua, bajo cociente N/P, pH elevado, y mortandad de peces filtradores como *Brevoortia tyrannus* (savelha) (Domingos *et al.*, 1994). Se realizaron estudios detallados sobre el metabolismo de esta laguna durante tres años (muestreos semanales), además de la descripción de un episodio de mortandad de peces.

2) *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, especie dominante ($4 \cdot 10^5$ cel · ml⁻¹; 15 mm³ · l⁻¹, marzo de 2000), en la Laguna Rodrigo de Freitas (oligomesohalina), asociada con bajos cocientes de N/P, pH elevado, baja transparencia y muerte de 11 t de *Brevoortia tyrannus*. Esta laguna costera está localizada en el corazón del área urbana de la ciudad de Rio de Janeiro y la mortandad tuvo lugar durante la temporada alta de turismo, con considerables efectos negativos en la actividad económica de la ciudad. El estudio sobre el fitoplancton fué solicitado por la Secretaría de Medio Ambiente de la Ciudad de Rio de Janeiro, a través de «Tecnologia em Meio Ambiente Ltda.».

3) *Synechocystis aquatilis* f. *salina*, especie dominante ($1.7 \cdot 10^6$ cel · ml⁻¹; 35 mm³ · l⁻¹; diciembre de 1987), en la Laguna de Saquarema (mesoaurihalina) en los meses de verano, cuando se intensifican las actividades turísticas con el consiguiente incremento de aportes de nutrientes (Domingos,

Tabla 2. Cepas aisladas y analizadas de la colección de cultivos del Laboratorio de Ecofisiología y Toxicología de Cianobacterias.

Cepa	Género/Especie	Hepatotóxica	Neurotóxica
NPBR-2; NPBF-1; NPTA-1; NPCD-1; NPJB-1; NPJT-1; NPLJ-1; NPLJ-2; NPLJ-30; NPLJ-33; NPLJ-37; NPLJ-42; NPLJ-47	<i>Microcystis aeruginosa</i>	X	
NPRI-1	<i>Microcystis viridis</i>		
NPLJ-34; NPLJ-35	<i>Leptolyngbya</i> sp.	X	
NPLJ-36	<i>Leptolyngbya</i> sp.		
NPBR-1	<i>Anabaena flos-aquae</i>	X	
NPLB-2	<i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>salina</i>	X	
NPBS-3	<i>Synechocystis</i> sp.	X	
NPLB-1	<i>Synechococcus elongatus</i>	X	
NPRE-2	<i>Pseudoanabaena</i> sp.	X	
NPBF-2	<i>Oscillatoria</i> sp.	X	
NPRG-1	<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	X	
NPBR-3	<i>Nostoc muscorum</i>	X	
NPCA-5; NPCA-10; NPCA-15; NPCA-16; NPCA-19; NPCA-23; NPCA-29	picoplancton	X	
NPLP-1; T3; NPCO-1	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		X

1991). Se estudió la composición del fitoplancton y su dinámica durante un ciclo anual, así como la interacción de los aportes de agua dulce de la laguna al mar.

4) *Cylindrospermopsis raciborskii* ($88 \cdot 10^3$ cel. \cdot ml $^{-1}$; 50 mm 3 \cdot l $^{-1}$) en la Laguna Imboassica (oligomesohalina) en los meses de junio-julio de 1999, y marzo de 2000, asociada con coloración verdosa del agua y elevado pH, sin que se verificaran mortandades de peces (S. Melo, com. pers. Lab. Plancton, Dpto. Ecología, Inst. Biología, UFRJ). La taxonomía de las especies planctónicas de la Laguna Imboassica se ha estudiado a partir de muestras tomadas mensualmente durante un ciclo anual.

En las lagunas costeras del Estado de Rio de Janeiro se han registrado especies de otros grupos taxonómicos citadas en la literatura como potencialmente tóxicas en el curso de estudios realizados por el Laboratorio de Ficología. Entre ellas cabe señalar: *Amphidinium carterae*, *Dinophysis caudata*, *D. acuta* y *Prorocentrum minimum*.

EFFECTO DEL BALANCE DE NUTRIENTES Y DE LOS FACTORES FÍSICOS EN LAS FLORACIONES DE CIANOBACTERIAS TÓXICAS EN EL ESTUARIO DE LA LAGUNA DE LOS PATOS, RS, BRASIL

Responsable: J. S. Yunes

Entre diciembre de 1993 y mayo de 1996 se desarrolló un programa de monitoreo, con énfasis en el área estuarina de la Laguna de los Patos, RS, cuyos resultados han sido publicados (Matthiessen, 1996; Salomon *et al.*, 1996; Yunes *et al.*, 1994, 1996, 1998a, b). En marzo, mayo y diciembre de 1994 y diciembre de 1995 y 1996 se observaron elevadas biomásas de *Microcystis aeruginosa* ($> 9 \cdot 10^3$ μ g clor \cdot l $^{-1}$) en el estuario. Las condiciones típicas de las aguas del estuario antes de las floraciones fueron: temperatura elevada (> 20 °C), pH aproximadamente 8.0, cociente de nutrientes disueltos N:P aproximadamente 13:1 y baja salinidad. Estas condiciones se emplean para predecir la aparición de las floraciones, que son controladas por la asociación de estos cuatro parámetros. Así pues, mientras que la temperatura determina la variación estacional de las floraciones, la penetración de agua salada oceánica controla y limita el desarrollo de las floraciones hasta la región central de la Laguna de los Patos. *M. aeruginosa* está siempre presente en el estuario en concentraciones entre 0.5 y $1.5 \cdot 10^6$ cel \cdot l $^{-1}$.

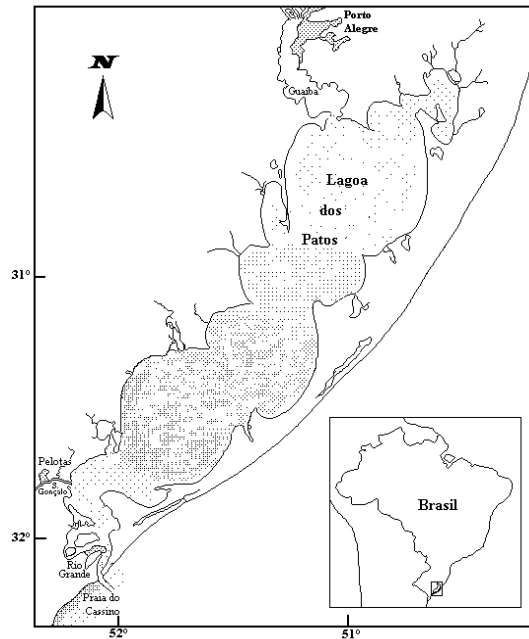


Fig. 4. Mapa de la Laguna de los Patos, situada en la costa Atlántica al sur de Brasil, y de la zona de influencia de las floraciones tóxicas de *Microcystis aeruginosa* (La intensidad del sombreado corresponde al grado de impacto).

Durante los muestreos norte-sur de la Laguna de los Patos, incluyendo el Océano Atlántico, se detectaron diversas formas coloniales (*status*), tanto de crecimiento como de depósito, de la especie *Microcystis aeruginosa*. La abundancia de estos *status* y su desarrollo dependen de condiciones ambientales favorables. Se comprobó que las formas senescentes (o de depósito), introducidas continuamente en el estuario, también eran tóxicas. Las muestras donde sólo existían *status* senescentes presentaron una toxicidad máxima de $3 \cdot 10^{-2}$ μ g equiv. MC-LR \cdot mg p.s. $^{-1}$. Este valor ascendió hasta $19 \cdot 10^{-2}$ μ g equiv. MC-LR \cdot mg p.s. $^{-1}$ cuando se encontraban todos los *status* coloniales de crecimiento en floraciones visibles.

Todas las muestras tomadas de *Microcystis* resultaron ser tóxicas según los bioensayos o los análisis químicos. La LD $_{50}$ -24h de las muestras varió entre 32 - 353.6 mg \cdot kg $^{-1}$ en los ratones y la LC $_{50}$ -18h entre 0.70 - 43.96 mg \cdot ml $^{-1}$ en el microcrustáceo *Artemia salina*. Los extractos obtenidos también resultaron tóxicos para las postlarvas de *Farfantepenaeus paulensis*, el principal recurso pesquero de la región. El contenido de toxinas (microcistinas) encontradas en las muestras de material liofilizado de las floraciones y de las natas de

superficie varió entre $44-1121 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$. La toxicidad varió entre localidades y fechas, y sobre todo en la medida que variaba el desarrollo e intensidad de las floraciones. La toxina (microcistina) también se detectó en estado libre en el agua (máximo de $289 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) durante las floraciones de verano y en las capas sumergidas de sedimentos de la Bahía do Casamento ($0.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sedimento), al nordeste de la Laguna de los Patos. La variante microcistina-LR se encontró sobretodo en el material liofilizado de las floraciones o de las natas de superficie, mientras que la forma microcistina-FR constituyó la principal variante libre en el agua durante las floraciones. En la Playa del Cassino (Fig. 4), contigua a la desembocadura de la Laguna de los Patos, se depositaron altas concentraciones de *Microcystis aeruginosa* cuando se observaban densas floraciones en el estuario. Se encontraron valores máximos de $592 \mu\text{g} \text{clor } a \cdot \text{m}^{-2}$, y $0.8 \mu\text{g} \text{equiv. MC-LR} \cdot \text{l}^{-1}$ en las aguas rasas de la playa.

Se puede concluir que los resultados de este proyecto han contribuido a mejorar el conocimiento de los efectos del balance de nutrientes y de los factores físicos sobre el desarrollo de las floraciones de cianobacterias (*Microcystis*) en la Laguna de los Patos. Además de registrarse por primera vez la toxicidad de las floraciones y las natas, se identificó y cuantificó el perfil de toxinas producidas.

PROYECTOS ACTUALES Y FUTUROS

Otros impactos del desarrollo y toxicidad de las floraciones de *Microcystis*, incluyendo sus efectos sobre los organismos estuarinos, el control de las floraciones por la salinidad, y su contribución a la biomasa del estuario de la Laguna de los Patos, se investigan actualmente en los proyectos:

1) Presencia y toxicidad de cianobacterias (algas cianofíceas) en el Delta del Guaíba y en el estuario de la Laguna de los Patos, RS y

2) Efecto del aumento gradual de la salinidad sobre las floraciones de *Microcystis aeruginosa* en el estuario de la Laguna de los Patos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguiar, D.G. & S.F.M.O Azevedo, 1998. Effects of different nutrient concentration on growth and hepatotoxin production by *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). Verh. Int. Ver. Limnol. 26: 1657-1658.
- Anónimo, 1983. Relatório sobre a ocorrência de "maré vermelha" no litoral do Estado de São Paulo, em agosto de 1983. São Paulo, CETESB, Relatório Técnico, 88 pp.
- Anónimo, 1997. Projeto Integrado da Bacia do Rio Itajaí-açu e Área Costeira Adjacente - Diagnóstico e Avaliação Ambiental. Relatório Final. Faculdade de Ciências do Mar - Universidade do Vale do Itajaí (FACIMAR-UNIVALI) e Fundação Banco do Brasil (FBB). Itajaí-SC, Brasil, Vol. 2, 178 pp.
- Azevedo, S.M.F.O & J.-P. Carmouze, 1994. Une mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophyceae. Coincidence ou conséquence? Rev. Hydrobiol. Trop. 27 (3): 265-272.
- Carvalho, I.M.C.M.M., I. Eskinazi-Leça & J.D. Nogueira-Paranhos, 1999. Novo registro da cianofícea *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg em águas costeiras do litoral do Estado do Piauí. In VIII Reunião Brasileira de Ficologia. Porto de Galinhas-PE, Resumos: 59.
- Chorus, I & J. Bartram, 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, 416 pp.
- Costa, T.A., F. Schmitt & L.A. Proença, 1997. Comparação entre 3 métodos de preparação de amostras para análise de ácido okadaico, uma toxina diarreica, por CLAE-DF, em moluscos. In X Semana Nacional de Oceanografia. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí-SC, Resumos: 322-324.
- Dias, E.R.A, 1992. Mortandade de peixes causada por maré vermelha em Cananéia. Ass. Bras. Patol. Org. Aquat., Bol. Inf. 1:5.
- Domingos, P., 1991. Estrutura da comunidade fitoplanctônica e produção primária na Lagoa de Saquarema, Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Geoquímica, Universidade Federal Fluminense, 156pp.
- Domingos, P., V.L. Huszar & J.-P. Carmouze, 1994. Composition et biomasse du phytoplancton d'une lagune tropicale (Brésil) au cours d'une période marquée par une mortalité de poissons. Rev. Hydrobiol. Trop. 27 (3): 235-250.
- Domingos, P., T.K. Rubim, R.J.R. Molica, S.M.F.O. Azevedo & W.W. Carmichael, 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. Environ. Toxicol. 14: 31-35.
- Faria, J.G., 1914. Um ensaio sobre o plankton, seguido de observações sobre a ocorrência de plankton monótono, causando mortandade de peixes na Bahia do Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 10: 99-103.
- Ferrão-Filho, A., S.M.F.O. Azevedo & W.R. DeMott, 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. Freshwat. Biol. 45: 1-9.
- Garcia, V.M.T. & N.M. Gianuca, 1997. The beach and surf

- zone. In Seeliger, U., C. Odebrecht & J.P. Castello (eds.), Subtropical Convergence Environments: the coast and sea in the Southwestern Atlantic. Springer Verlag, Berlin, 308 pp.
- Garcia, V.M.T., C. Odebrecht & L.R. Rörig, 1994. Florações nocivas do fitoplâncton na costa brasileira. In COI-Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algas Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101, Anexo III: 9-14.
- Gianuca, N.M., 1985. The ecology of a sandy beach in southern Brazil. PhD Thesis. University of Southampton, Inglaterra, 330 pp.
- Guimarães, S.C.P. & L.R. Rörig, 1997. Microorganismos associados a florações de *Trichodesmium hildebrandtii* na costa de Santa Catarina, Brasil. Notas Técnicas da FACIMAR 1: 43-48.
- Jochimsen, E.M., W.W. Carmichael, J. An, D.M. Cardo, S.T. Cookson, C.E.M. Holmes, B.C. Antunes, D.A. Melo Filho, T.M. Lyra, V.S.T. Barreto, S.M.F.O. Azevedo & W.R. Jarvis, 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. New Engl. J. Med. 338 (13): 873-878.
- Machado, P.A., 1979. Dinoflagellate bloom on the Brazilian South Atlantic coast. In Taylor, D.L. & H.H. Seliger (eds), Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier, Amsterdam: 29-32.
- Magalhães, V.F. & S.M.F.O. Azevedo, 1998. Ecological implications of hepatotoxic *Microcystis aeruginosa* in Jacarepaguá Lagoon, Brazil. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 26-28.
- Magalhães, V.F., A.C. Oliveira, M.M. Marinhos, P. Domingos, S.M. Costa & S.M.F.O. Azevedo, 1999a. Bioacumulação de microcistinas em pescado da Baía de Sepetiba. In VIII Reunião Brasileira de Ficologia. Porto de Galinhas-PE, Resumos: 166.
- Magalhães, V.F., R.M. Soares & S.M.F.O. Azevedo, 1999b. Bioacumulação de microcistinas (hepatotoxinas de cianobactérias) em músculos de peixes: risco potencial para saúde humana. In VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Florianópolis, Resumos: 536.
- Matthiensen, A., 1996. Ocorrência, distribuição e toxicidade de *Microcystis aeruginosa* (Kütz. emend. Elenkin) no estuário da Lagoa dos Patos. Tese de mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande, 116 pp.
- Méndez, S.M., 1995. Bivalve mortality on southwest Atlantic shores. Harmful Algal News, IOC of UNESCO 10/11: 12.
- Molica, R., en prensa. Informe nacional: Brasil. In Fourth IOC Regional Science Planning Workshop on Harmful Algal Blooms in South America. IOC Workshop Report, Annex III. IOC of UNESCO, Paris.
- Molica, R.J.R. & S.M.F.O. Azevedo, 1996. Changes in microcystin production by *Microcystis aeruginosa* under different light intensities. In IV Congresso Latino-Americano de Ficologia. Caxambu-MG, Resumos: 140.
- Nascimento, S.M. & S.M.F.O. Azevedo, 1998. Growth of *Synechocystis aquatilis* f. *salina* (blue-green algae) on different nitrogen: phosphorus rates-ecophysiological approach. Verh. Int. Ver. Limnol. 26: 1764-1765.
- Odebrecht, C. & P.C. Abreu, 1995. Raphidophyceae in southern Brazil. Harmful Algal News 12/13, IOC of UNESCO: 4.
- Odebrecht, C. & P.C. Abreu, 1997a. Microorganismos em praias arenosas expostas: importância, aspectos metodológicos e estado da arte para o sul do Brasil. Oecologia Brasiliensis, Rio de Janeiro 3: 1-17.
- Odebrecht, C. & P.C. Abreu, 1997b. Environment and Biota of the Patos Lagoon Estuary: microalgae. In Seeliger, U., C. Odebrecht & J.P. Castello (eds.), Subtropical Convergence Environments: the Coast and Sea in the Southwestern Atlantic. Springer Verlag, Berlin: 34-36.
- Odebrecht, C., M. Ferrario, A.M. Ciotti, D.I. Kitzmann, M.O.P. Moreira & F. Hinz, 2001. The distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* off southern Brazil and relationships with oceanographic conditions. In Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO: 42-45.
- Odebrecht C & V.M.T. Garcia, 1997. Coastal and Marine Environments and their Biota: Phytoplankton. In Seeliger, U., C. Odebrecht & J.P. Castello (eds.), Subtropical Convergence Environments: the Coast and Sea in the Southwestern Atlantic. Springer Verlag, Berlin: 105-109.
- Odebrecht, C., S. Méndez & V.M.T. Garcia, 1997. Oceanographic processes and harmful algal blooms in the Southwestern Atlantic. In VIII International Conference on Harmful Algae. Vigo, Abstracts: 152.
- Odebrecht, C., L.R. Rörig, V.M.T. Garcia & P.C. Abreu, 1995a. Shellfish mortality and a red tide event in southern Brazil. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien, & C. Marcaillou-Le Baut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing, Paris: 213-218.
- Odebrecht, C., A.Z. Segatto & A.C. Freitas, 1995b. Surf zone chlorophyll *a* variability at Cassino Beach, southern Brazil. Estuar. Coast. Shelf Sci. 41: 81-90.
- Oliveira, L.P. 1947. Distribuição geográfica da Baía de Guanabara. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 45: 709-734.
- Oliveira, L.P. 1950. Levantamento biogeográfico da fauna e flora da Baía de Guanabara. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 48: 363-391.
- Persich, G.R., V.M.T. Garcia & C. Odebrecht, 1998. Microalgas potencialmente nocivas na costa do Rio Grande do Sul. In XI Semana Nacional de Oceanografia. Rio Grande-RS, Resumos: 262-263.
- Pouria, S., A. de Andrade, J. Barbosa, R.L. Cavalcanti, V.S.T. Barreto, C.J. Ward, W. Preiser, G.K. Poon, G.H. Neild &

- G.A. Codd, 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352: 21-26.
- Proença, L.A. & G. F. Oliveira, 1999. Análise de ácido domoico em moluscos cultivados no litoral de Santa Catarina. *Notas Técnicas da FACIMAR*, Itajaí: 3.
- Proença, L.A. & L. Rörig. 1995. Mussel production and toxic algal blooms in Santa Catarina State, Southern Brazil. *Harmful Algal News* 12/13, IOC of UNESCO: 5.
- Proença, L.A.O., N. Lagos, L.R. Rörig, M. Silva & S. Guimarães, 1999a. Occurrence of paralytic shellfish poisoning -PSP in southern Brazilian waters. *Ciência e Cultura*, Rio de Janeiro 51 (1): 16-21.
- Proença, L.A., L. Rörig, M.A. Barreiros & N. Lagos, 1998a. A possible case of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Southern Brazil. In IV Congresso Latino-Americano de Ficologia. Caxambú-MG, Anais 2: 259-263.
- Proença, L.A.O., F. Schmitt, T. Costa & L.R. Rörig, 1998b. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina, Brazil. *Ciência e Cultura*, Rio de Janeiro 50 (6): 458-462.
- Proença, L.A., F. Schmitt, S. Guimarães & L.R. Rörig, 1999b. Análise de toxinas diarreicas em duas espécies de *Prorocentrum* (Dinophyceae) isoladas em área de cultivo de moluscos. *Notas Técnicas da FACIMAR*, Itajaí: 3.
- Proença, L.A., F. Schmitt, M. Silva, S. Guimarães & L.R. Rörig, 1999c. Produção de ácido okadaico, uma toxina diarreica, por *Dinophysis acuminata* em Santa Catarina. *Atlântica* 21: 121-127.
- Proença, L.A.O., M.S. Tamanaha & N. P. Souza, 2001. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Atlântica* 23: 59-65.
- Rörig, L.R., 1997. Acumulações da diatomácea *Asterionellopsis glacialis* e sua relação com variáveis ambientais na Praia do Cassino, RS. M.Sc. em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, Brazil, 126 pp.
- Rörig, L.R., C. Resgalla Jr., P.R. Pezzuto, E.S. Alves & F. Morelli, 1997. Análise ecológica de um processo de acumulação da diatomácea *Anaulus* sp. na zona de arrebatamento da praia de Navegantes (Santa Catarina, Brasil). *Oecologia Brasiliensis* 3:29-43.
- Rörig, L.R., S.C.P. Guimarães, D.O. Lugli, L.A.O. Proença, G.C. Manzoni & A.C. Marenzi, 1998a. Monitoração de microalgas potencialmente tóxicas na área de maricultura da Enseada de Armação do Itapocoroy - Penha -SC. *Notas Técnicas da FACIMAR* 2: 71-79.
- Rörig, L.R., J.S. Yunes, K.N. Kuroshima, C.A.F. Schetinni, P.R. Pezzuto & L.A.O. Proença, 1998b. Studies on the ecology and toxicity of *Trichodesmium* spp. blooms in southern Brazilian coastal waters. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 22-25.
- Rosa, Z.M. & T.C. Buselato, 1981. Sobre a ocorrência de floração de *Gyrodinium aureolum* Hulburt (Dinophyceae) no litoral sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia* 28: 169-179.
- Salomon, P.S., J.S. Yunes, M. Parise & J.C.B. Cousin, 1996. Toxicidade de um extrato de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa dos Patos sobre camundongos e suas alterações sobre o tecido hepático. *Vittale*, Rio Grande 8: 23-32.
- Satô, S.S., M.N. Paranaguá & E. Eskinazi, 1963/64. On the mechanism of red tide of *Trichodesmium* in Recife, Northeastern Brazil, with some consideration of the relation to the human disease, "Tamandaré Fever". *Trabs. Inst. Oceanogr.*, Recife 5/6: 7-49.
- Schmitt, F., T. Costa & L.A. Proença, 1997. Florações de algas nocivas em área de cultivo de moluscos: análise de veneno diarreico de moluscos por cromatografia líquida em cultivos na Enseada de Armação do Itapocoroy, Penha, SC. In X Semana Nacional de Oceanografia. Itajaí-SC, Anais: 376-378.
- Semeraro, J. & A.F. Costa, 1972. O plâncton e a poluição nas Lagoas da Tijuca, Camorim e Jacarepaguá. Instituto de Engenharia Sanitária, Rio de Janeiro, Publ. 73: 1-31.
- Sevrin-Reyssac, J., M.C. Machado, M.L. Schutze, S.G. Bibas, I.C. de Lima, C.A. Lima & C.P. Esteves, 1979. Biomasse et production du phytoplancton de la Baie de Guanabara et du secteur océanique adjacent. Variations de mai à juillet 1978. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.*, section B, 4: 329-354.
- Shumway, S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacult. Soc.* 21 (2): 65-104.
- Tenenbaum, D.R., M.C. Villac, M.C. Menezes & G.A. Gômara, 1998. Floração de rafdofícea na Baía de Seperiba, Rio de Janeiro, Brasil. In V Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia e I Colóquio Brasileiro de Algas Nocivas. Itajaí-SC, Resumos:70.
- Tommasi, L.R., 1983. Observações sobre a irritação respiratória humana ocorrida em 1978 no litoral sul do Rio Grande do Sul. *Ciência e Cultura* 35 (2): 225-232.
- Villac, M.C., 1990. O fitoplâncton como um instrumento de diagnose e monitoramento ambiental: estudo de caso da Baía de Guanabara (RJ, Brasil). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 193 pp.
- Villac, M.C., G. Persich, L. Fernandes, R. Paranhos, S. Bonecker, V.M.T. Garcia, C. Odebrecht, D.R. Tenenbaum, M.L. Tristao, S. Andrade & A. Falde, 2001. Ballast water exchange: testing the dilution method (Petrobras, Brazil). In Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), *Harmful Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 470-473.
- Villac, M.C. & D.R. Tenenbaum, 2001. The coastal *Pseudo-nitzschia* from the State of Rio de Janeiro, Brazil. In

- Hallegraeff, G.M., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO: 34-37.
- Villac, M.C., D.R. Tenenbaum & G.A. Fryxell, 1996. Toxic and non-toxic diatoms, genus *Pseudo-nitzschia*, from Monterey Bay (USA) and from the Rio de Janeiro coast (Brazil). IV Congreso Latino-Americano, II Reunión Ibero-Americano, VII Reunión Brasileira de Ficología. Caxambu-MG, Resumos: 203.
- Yunes, J.S, A. Matthiensen, M. Parise, P.S. Salomon, K.A. Beattie, S.L. Raggett & G.A. Codd, 1998a. *Microcystis aeruginosa* colony-status and the occurrence of microcystins in the Patos Lagoon, Southern Brazil. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 18-21.
- Yunes, J.S, L.F.H. Niencheski, P.S. Salomon, M. Parise, K.A. Beattie, S.L. Raggett & G.A. Codd, 1994. Development and toxicity of cyanobacteria in the Patos lagoon estuary, Southern Brazil. In Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones Algales Nocivas. Informes de Reuniones de Trabajo N° 101, Anexo III, IOC of UNESCO: 14-19.
- Yunes, J.S, L.F.H. Niencheski, P.S. Salomon, M. Parise, K.A. Beattie, S.L. Raggett & G.A. Codd, 1998b. Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, Southern Brazil. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 26: 1796-1800.
- Yunes, J.S, P.S. Salomon, A. Matthiensen, K.A. Beattie, S.L. Raggett & G.A. Codd, 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 5: 223-229.
- Zavala-Camin, L.A. & N. Yamanaka, 1980. Notas sobre um caso de mortandade de peixes, ocorrida em Itanhaém, São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Oceanogr.*, S. Paulo 29: 377.
- Zenebon, O. & N.P. Pregnoatto, 1992. Memórias técnico-científicas da divisão de Bromatologia e Química. Instituto Adolfo Lutz: 100 anos do laboratório de Saúde Pública, Edição Comemorativa: 173-198.

CAPÍTULO 11: ALEXANDRIUM CATENELLA Y VENENO PARALIZANTE DE LOS MARISCOS EN CHILE

LEONARDO GUZMÁN, HERNÁN PACHECO, GEMITA PIZARRO & CÉSAR ALARCÓN
Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

INTRODUCCIÓN	237
ANTECEDENTES HISTÓRICOS: MAGALLANES Y AYSÉN	239
SITUACIÓN ACTUAL: LA DÉCADA DE LOS NOVENTA	241
Resultados de los Cruceros del B/I Abate Molina (1992 y 1993)	242
Otros Resultados	244
Distribución de la toxicidad en organismos vectores: núcleos geográficos de toxicidad.....	245
Distribución espacio-temporal de la fase móvil de <i>Alexandrium catenella</i>	249
Abundancia relativa de <i>Alexandrium catenella</i>	251
Estructura de la comunidad fitoplanctónica: El Índice G	252
Series temporales de toxicidad y abundancia relativa de <i>A. catenella</i>	252
CONCLUSIONES	254
BIBLIOGRAFÍA	255

ALEXANDRIUM CATENELLA Y VENENO PARALIZANTE DE LOS MARISCOS EN CHILE

LEONARDO GUZMÁN, HERNÁN PACHECO, GEMITA PIZARRO & CÉSAR ALARCÓN
Instituto de Fomento Pesquero, Zonal Magallanes, Waldo Seguel 677 interior, Punta Arenas, Chile.

INTRODUCCIÓN

Durante las tres últimas décadas se ha apreciado, a escala mundial, un notorio incremento aparente en la frecuencia, duración e intensidad de los fenómenos conocidos comúnmente como mareas rojas y que técnicamente han sido denominados «Floraciones Algales Nocivas» (FAN) *sensu* UNESCO (Anónimo, 1996). Entre los efectos negativos de las FAN sobre el hombre y sus actividades, se incluyen intoxicaciones por consumo de mariscos, que pueden ser fatales, efectos alérgicos por inhalación, mortandades masivas de organismos marinos en el ambiente natural y en sistemas de crianza o engorde, e incluso alteración del hábitat costero o de la estructura y organización de los ecosistemas. A ellos deben agregarse, además, los efectos económicos y sociales críticos que sobrevienen como consecuencia de estos episodios.

El litoral chileno, particularmente el extremo sur del país, esto es, las regiones administrativas de Los Lagos, Aysén y Magallanes (entre los 40° y 56° de latitud sur), no ha permanecido ajeno a estos fenómenos y sus implicaciones, que han sido especialmente relevantes durante la década del noventa. En la Fig. 1 se muestra el mapa de Aysén y Magallanes y la distribución de las estaciones de muestreo del Programa de Vigilancia y Monitoreo de Floraciones Algales Nocivas en el extremo sur de Chile. La Tabla 1 muestra la situación geográfica y los topónimos de las estaciones muestreadas. En la última década, la región de Aysén se ha visto afectada de forma simultánea por una serie de floraciones asociadas a los venenos de tipo diarreico (VDM) y paralizante (VPM) (Lembeye *et al.*, 1997), y la de Magallanes por episodios ligados a este último complejo tóxico (Guzmán *et al.*, 2001). Más recientemente las regiones de Atacama (Bahía Inglesa, 27°08'S) y Coquimbo (Bahía Tongoy, 30°15'S), en el norte del país, y la región de Los Lagos, en la costa este de la Isla de Chiloé (43°10'-43°40'S), han sido afectadas por Veneno Amnésico de los Ma-

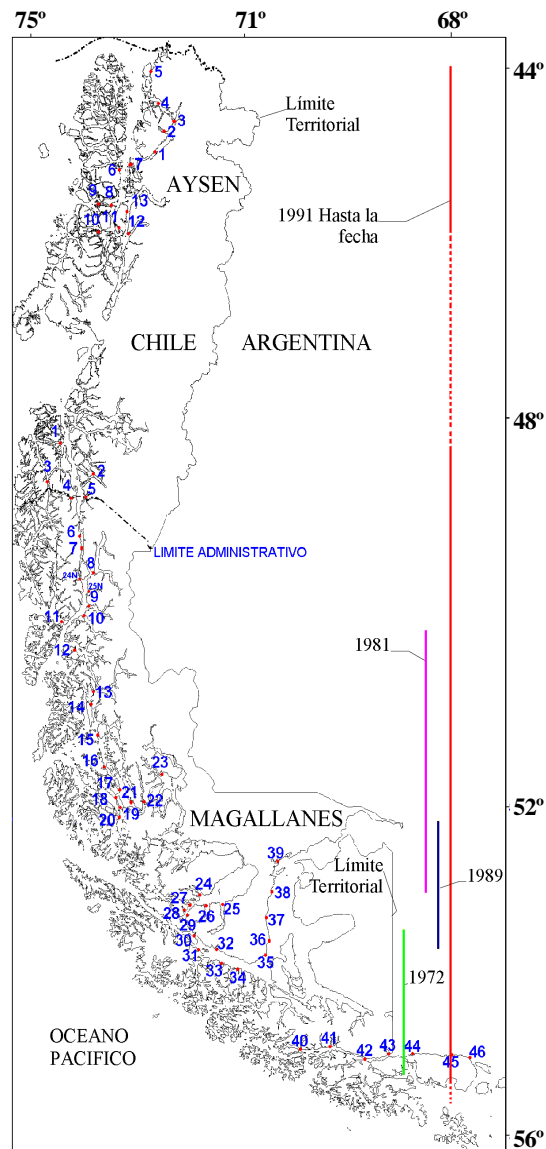


Fig. 1. Mapa de las regiones de Aysén y Magallanes y las estaciones de muestreo del Programa de Vigilancia y Monitoreo de Floraciones Algales Nocivas en el extremo sur de Chile. Las barras verticales a la derecha indican la extensión geográfica de los episodios de VPM en 1972, 1981, 1989 y de 1991 en adelante.

riscos (VAM) asociado a floraciones de *Pseudo-nitzschia* spp. (Suárez-Isla *et al.*, este volumen).

La ocurrencia de VDM ha sido señalada en reiteradas oportunidades desde 1970 en el área de Seno Reloncaví (Puerto Montt) y desde 1991 en Aysén (Anónimo, 1995). El VPM se ha registrado en Magallanes en 1972 (Guzmán *et al.*, 1975a), 1981 (Lembeye, 1981a,b), 1989 (Uribe*, 1988) y cada año desde 1991 hasta la fecha (Braun, 1992; Braun *et al.*, 1993; Uribe *et al.*, 1995, 1997, 1998; Guzmán *et al.*, 1999, 2000a, b, 2001), y en Aysén desde 1994 (Lembeye *et al.*, 1997). En los últimos dos años se ha detectado también VDM y VAM, en niveles que no constituyen un riesgo para las personas, en el extremo norte de la región de Magallanes (49°S) (Guzmán *et al.*, 2000b, 2001) y VAM en el extremo

sur de Aysén (48°) (Pizarro *et al.*, 2000). Sorprendentemente, existen pocas publicaciones sobre las floraciones nocivas asociadas al veneno paralizante de los mariscos que han afectado el litoral del extremo austral de Chile durante la última década y la mayor parte de los antecedentes se encuentran en informes técnicos.

En el presente capítulo se presenta una síntesis de los brotes de veneno paralizante de los mariscos ocurridos en el extremo austral de Chile, desde el primer fenómeno fehacientemente comprobado en 1972. Se incluyen los brotes de 1981, 1989, y desde 1991 hasta la fecha, que han afectado a la región de Magallanes, además de los sucedidos en la región de Aysén desde 1994 hasta hoy. La información brindada se amplía en referencia a la distribu-

*Nota de los autores: No obstante que el artículo tiene fecha de publicación previa (1988), la floración efectivamente ocurrió en 1989.

Tabla 1. Topónimos y coordenadas geográficas de las localidades de muestreo en Aysén y Magallanes.

AYSÉN						
Nº	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	Nº	LOCALIDAD	LONGITUD
1	PALENA	43°40'50"	72°57'25"	8	CANAL FERRONAVE	45°04'00"
2	SANTO DOMINGO	43°58'00"	73°07'00"	9	ISLOTE HERRERA	45°19'20"
3	ISLA TOTO	44°14'10"	73°13'00"	10	ISLOTES SMITH	45°28'00"
4	ISLA LARGA	44°23'08"	72°56'20"	11	ISLAS CANQUENES	45°43'55"
5	PUNTA TRIGUEÑA	44°31'20"	72°41'40"	12	ISLA ROJAS	45°45'20"
6	VALLE DEL MARTA	44°51'25"	72°56'00"	13	ESTERO QUITRALCO	45°46'15"
7	ISLA CANALAD	45°03'00"	73°21'40"			
MAGALLANES						
Nº	LOCALIDAD (NORTE)	LATITUD	LONGITUD	Nº	LOCALIDAD (CENTRO)	LONGITUD
1	ISLA SCHAFFER	48°06'09"S	74°43'05"W	24	BAHÍA FANNY	53°11'20"S
2	ISLA OFHIDRO	48°25'26"S	74°08'18"W	25	ESTERO SILVA PALMA	53°13'55"S
3	CANAL FALLOS	48°33'43"S	74°57'18"W	26	ESTERO WICKHAM	53°15'10"S
4	CANAL ADALBERTO	48°40'07"S	74°36'02"W	27	ESTERO SULLIVAN	53°15'22"S
5	BAHIA LIBERTA	48°54'54"S	74°22'14"W	28	ESTERO NUÑEZ	53°19'14"S
6	PUERTO EDEN	49°07'05"S	74°25'18"W	29	CUTTER COVE	53°22'10"S
7	ISLA CROSSOVER	49°17'17"S	74°22'59"W	30	BAHÍA MUSSEL	53°36'45"S
24N	PASO DEL ABISMO	49°35'48"S	74°26'37"W	31	BAHÍA NASH	53°41'45"S
8	ESTERO FALCON	49°33'37"S	74°08'50"W	32	BAHÍA CORDES	53°43'24"S
25N	ESTERO RINGDOVE	49°47'22"S	74°18'11"W	33	BAHÍA BELL	53°53'09"S
9	ESTERO PENGUIN	49°55'01"S	74°19'58"W	34	SENO PEDRO	53°55'48"S
10	SENO EUROPA	50°00'21"S	74°21'38"W	35	CABO SAN ISIDRO	53°47'11"S
11	ISLA TOPAR	50°06'45"S	74°41'58"W	36	BAHÍA BUENA	53°37'30"S
12	ISLA FIGUEROA	50°25'10"S	74°30'44"W	37	BAHÍA AGUA FRESCA	53°24'27"S
13	ESTERO PEEL	50°51'05"S	74°05'55"W	38	RÍO SECO	53°06'20"S
14	PUERTO BUENO	50°59'32"S	74°13'23"W	39	PUERTO ZENTENO	52°48'48"S
15	ISLA VANCOUVER	51°21'33"S	74°05'25"W			
16	ISLA PIAZZI	51°41'43"S	73°58'14"W			
				LOCALIDAD (SUR)	LATITUD	LONGITUD
17	CALETA WILLIAMS	51°58'41"S	73°41'30"W	40	SENO VENTISQUERO	54°49'31"S
18	BAHIA ENSENADA	52°05'57"S	73°43'51"W	41	VENTISQUERO ESPAÑA	54°49'38"S
19	BAHIA ISTHMUS	52°10'07"S	73°36'31"W	42	VENTISQUERO HOLANDA	54°56'31"S
20	ISLA LARGA	52°11'39"S	73°36'55"W	43	BAHÍA YENDEGAIA	54°53'02"S
21	PUERTO FONTAINE	52°04'28"S	73°28'09"W	44	PUERTO NAVARINO	54°54'37"S
22	EST. DE LAS MONTAÑAS	52°05'38"S	73°15'45"W	45	PUERTO WILLIAMS	54°55'28"S
23	ISLA BALLESTEROS	51°48'29"S	72°54'28"W	46	PUERTO EUGENIA	54°55'42"S

ción espacio-temporal del VPM y del principal agente productor de la toxina, el dinoflagelado *Alexandrium catenella*.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS: MAGALLANES Y AYSÉN

Los primeros registros de veneno paralizante, en los años 1972, 1981 y 1989, ocurrieron en la región de Magallanes y el primero de ellos precede en más de dos décadas a la detección de este complejo tóxico en Aysén. Los extensos territorios de ambas regiones, Magallanes (48°30' -56°S) desde 1991 y Aysén (41°-48°30' S) desde 1994, han sido afectados por una serie de floraciones toxígenas que continúan presentándose hasta la fecha. Adicionalmente en esta última región se presentan floraciones asociadas al veneno diarreico de los mariscos.

Los datos históricos de Magallanes muestran que las floraciones nocivas han incrementado su frecuencia de aparición, duración, extensión e intensidad en los últimos años. Tras la fundación de Punta Arenas, a mediados del siglo XIX, los antecedentes disponibles no muestran que Magallanes presentara la impronta reiterada de este tipo de fenómeno. Los grupos nativos canoeros que poblaron este territorio por un lapso de unos 6500 años y cuya dieta incluía en forma importante el consumo de mariscos, no han dejado evidencias del eventual impacto de floraciones nocivas asociadas al veneno paralizante. No obstante existen datos de un par de intoxicaciones para el Canal Beagle ocurridas a fines del siglo XIX adjudicables a este veneno. En una de ellas, sucedida en Isla Navarino, se registró la muerte de 9 yámanas un 17 de octubre de 1894 asociada a consumo de bivalvos (Peric, 1985). La otra intoxicación, ocurrida en Ushuaia (Argentina), afectó a 4 yámanas que presentaron síntomas característicos de intoxicación por veneno paralizante en 1896 (citado en Benavides *et al.*, 1995). Ya en tiempos recientes, en octubre de 1970, se comunicó la intoxicación de tres personas que habían ingerido bivalvos en el área de Cutter Cove, al norte de Punta Arenas, cuya sintomatología indicaba un envenenamiento con toxina paralizante (Guzmán & Campodonico, 1978).

El organismo identificado como fuente primaria del VPM en el sur de Chile es el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, citado por primera vez en 1972 para la región de Magallanes (Guzmán *et al.*, 1975a; Guzmán & Campodonico, 1975, 1978) y en

1992 para la de Aysén, donde se reportaron cadenas aisladas de esta especie en la boca del fiordo del mismo nombre frente a la Isla Churrecuc (Muñoz *et al.*, 1992). En la Tabla 2 se presenta el número de intoxicados y casos fatales por veneno paralizante registrados en Chile entre 1972 y 2000. Los casos ascienden a 387, y el 90,4% se ha producido desde 1991 hasta la fecha. Un 83,2% de estos casos ha ocurrido en Magallanes, y de ellos 20 fueron fatales (6,2% del total de intoxicados de esta región) y en su mayoría acontecieron entre 1991 y 1994, especialmente en 1992. En 1995, 1996 y 1998 ocurrieron otros 6 casos mortales en Aysén. La mayoría de los casos de intoxicación tuvieron lugar por consumo del bivalvo *Aulacomya ater* (cholga) y el período del año en que ocurrió la mayor parte fue el verano (56,2%).

Actualmente los límites de distribución de esta especie en Chile son: Cailin (43°09' S; 73°31' W), en el sector meridional de la región de Los Lagos (X región), por el norte (Lembeye *et al.*, 1998) y Seno Ponsonby, en la región de Magallanes (55°08' S; 68°43' W), por el sur (Guzmán *et al.*, 1975b). No obstante, existen sectores de los cuales no se dispone de información en el extremo sur de Aysén, entre 45°40' y 48°06' S (Isla Schafer), y en el sector meridional de Magallanes, al sur de Seno Ponsonby, incluyendo las Islas Wollaston, el archipiélago del Cabo de Hornos y las Islas Diego Ramírez (Lembeye & Sfeir, 1997; Uribe *et al.*, 1995).

Alexandrium catenella presenta una amplia distribución mundial, aunque restringida a determinadas áreas geográficas, y ha sido citada como fuente del mismo complejo tóxico del VPM en Corea, Japón, Hong Kong, Sudáfrica, Argentina (Canal Beagle) y la costa Pacífica de Norteamérica, entre Alaska y California (Balech, 1995; Taylor *et al.*, 1995). En años recientes se registró en Cataluña (España) (Vila *et al.*, 2001) y desde su primera cita, en 1998, aparece asociada cada año a episodios de VPM en esta región de la costa mediterránea.

Las floraciones chilenas de *A. catenella* en 1972, 1981, 1989 y desde 1991 hasta la fecha, han presentado una gran variabilidad en su distribución espacio-temporal. A partir de 1994 su distribución geográfica se extendió hasta la región de Aysén, y en la última década ha afectado extensas áreas costeras de las dos regiones más australes de Chile. Estas expansiones se representan en la Fig. 1. Las floraciones de 1972 (Guzmán *et al.*, 1975a, b) y 1981

(Lembeye, 1981a), aunque se produjeron en áreas diferentes del litoral de la región de Magallanes, conllevaron la presencia de toxinas en los bivalvos durante todo el año. Por el contrario, el episodio de 1989 tuvo una distribución más restringida (Uribe, 1988) y una persistencia de la toxicidad en los bivalvos de 3-4 meses. De estas tres primeras floraciones, es la de 1972 sobre la que se dispone de mayor información

Tabla 2. Casos de intoxicación en humanos con veneno paralizante de los mariscos, registrados en las regiones de Aysén y Magallanes (1972-2000). (Actualizado de Suárez & Guzmán, 1999). *Magallanes; **Aysén. Cholga=*Aulacomya ater*; Chorito=*Mytilus chilensis*; Caracol piquilhue=*Adelomelon ancilla*

CASO	AÑO	MES	NUMERO DE INTOXICADOS	NUMERO DE MUERTES	LUGAR	RECURSO
1	1972	10	3	3	Bahía Bell*	Cholga
2	1981	2	26	2	Seno Unión*	Cholga
3	1989	4	8	0	Estero Núñez*	Cholga
4	1991	3	95	2	Bahía Nash*	Chorito
5	1991	11	125	2	Seno Unión?*	Cholga
6	1991	12	2	1	Seno Nevado*	Cholga
<i>Subtotal</i>			259	10		
7	1992	1	14	6	Bahía Woodsworth*	Chorito
8	1992	1	5	0	Estero Asia*	Chorito
9	1992	2	3	0	Km. 49 Sur*	Chorito
10	1992	3	1	1	Caleta La Olla*	Chorito
11	1992	5	3	0	Paso Nuevo*	Cholga
12	1992	7	1	0	Isla Vancouver*	Cholga
13	1992	7	3	1	Paso Shoal*	Cholga
14	1992	12	6	0	Puerto Williams*	Chorito
<i>Subtotal</i>			36	8		
15	1994	1	8	0	San Juan*	Chorito
16	1994	1	1	0	Los Ñires*	Chorito
17	1994	1	2	1	Punta Arenas*	Chorito
18	1994	1	1	0	Punta Arenas*	Chorito
19	1994	2	1	0	Punta Arenas*	Chorito
20	1994	4	1	0	Bahía Gente Grande*	Cholga
21	1994	6	1	1	Seno Ringdove*	Cholga
<i>Subtotal</i>			15	2		
22	1995	1	4	0	Chabunco*	Chorito
23	1995	2	1	0	Seno Profundo*	Cholga
24	1995	5	14	1	Isla Toto**	Cholga
<i>Subtotal</i>			19	1		
25	1996	?	21	2	Aysén**	?
26	1997	?	1	0	Aysén**	?
27	1997	1	2	0	Isla Isabel*	Cholga
28	1997	1	1	0	Fuerte Bulnes*	Cholga
29	1997	1	1	0	Santa María*	Cholga
<i>Subtotal</i>			26	2		
30	1998	2	9	1	Aysén**	?
31	1998	3	10	1	Aysén**	Cholga
32	1998	4	1	0	Aysén**	Cholga
33	1998	?	2	1	Aysén**	Cholga
34	1998	11	2	0	Canal Magdalena*	Caracol piquilhue
<i>Subtotal</i>			24	3		
35	1999	?	1	0	Aysén**	Cholga
36	2000	?	6	0	Aysén**	Cholga
37	2000	11	1	0	Isla Lucía*	Cholga
<i>Subtotal</i>			8	0		
Total			387	26		

(Guzmán, 1976; Guzmán & Campodonico, 1975, 1978; Guzmán & Lembeye, 1975; Guzmán *et al.*, 1975a, b; Lembeye *et al.*, 1975). La toxicidad se extendió desde el sector occidental del Estrecho de Magallanes hasta el Canal de Beagle, abarcando aproximadamente desde los 53°30' hasta los 55°30'S y tuvo una duración de al menos un año. La toxicidad máxima registrada fue de 96000 U.R. (17280 µg STX eq.·100 g⁻¹), si bien la muestra que presentó este valor fue colectada el 11 de noviembre de 1972 en Bahía Bell (Isla Clarence, 53°S), casi tres semanas después de la ocurrencia de tres casos fatales, el 22 de octubre. La floración se inició posiblemente en octubre de 1972 y tuvo una duración de al menos cinco semanas. Las densidades de *A. catenella* registradas en esa ocasión continúan siendo las más altas encontradas hasta la fecha, con valores que oscilaron entre 2.4 y 6 · 10⁵ cel · l⁻¹ y formaron manchas subsuperficiales. Entre 5 y 10 m de profundidad, se registraron densidades entre 15700 y 320100 cel · l⁻¹, siendo escasa la concentración de otras especies fitoplanctónicas (Guzmán *et al.*, 1975a). La floración coincidió con notorias diferencias en la salinidad y temperatura del agua de Bahía Bell respecto de otros sectores muestreados, y con una marcada estratificación termohalina. Se supone que el fenómeno fue precedido o coincidió con un período anormal de insolación y calmas. Los organismos vectores que alcanzaron las concentraciones más altas de toxina fueron *Aulacomya ater* (cholga) y *Mytilus chilensis* (chorito). En el contenido digestivo de ambas especies se identificó la presencia de quistes temporales de *A. catenella*, cuya apariencia es muy diferente a la forma vegetativa de esta especie, y cuya identificación, en especímenes teñidos, fue posible por su característico núcleo en forma de "U" (Guzmán, 1976). En enero de 1973, cuando la densidad de *A. catenella* se había reducido notablemente (100-2200 cel · l⁻¹), en Bahía Bell aún se mantenía una toxicidad elevada de 30000 U.R. (~5400 µg STX eq.·100 g⁻¹). En una zona del Estrecho de Magallanes, *A. catenella* co-ocurió con una floración de *Amphidoma* sp. (Campodonico & Guzmán, 1974), especie que no volvió a ser detectada.

El 12 de febrero de 1981 se detectó el segundo brote tóxico de veneno paralizante asociado a *A. catenella* al producirse una intoxicación masiva y dos casos fatales por consumo de cholgas (Tabla 2). En este caso la distribución geográfica del episodio de toxicidad se ubicó más al norte que en 1972-1973 y abarcó un área menos extensa, entre Paso Tres Ce-

rros (50°S) y Canal Abra (53°S) (Lembeye, 1981 a, b) (Fig. 1). El nivel de toxinas en las cholgas se estimó en 6730 U.R. (~1211 µg STX eq.· 100 g⁻¹). Los contenidos digestivos de estos bivalvos presentaron entre 8900 y 28940 quistes temporales de *A. catenella* por individuo. A fines de febrero de 1981, el fitoplancton estuvo caracterizado por una gran diversidad de especies con un leve predominio de las diatomeas sobre los dinoflagelados. Al momento de detectarse la floración se observó una clara inversión térmica, la temperatura de superficie era de 8.2 °C y la de 50 m, de 10.3°C, encontrándose los valores más altos entre 5 y 30 m de profundidad. La mayoría de los muestreos se hicieron a menos de 10 m por razones topográficas. Las temperaturas encontradas fueron altas para el área, coincidiendo con lo sucedido en el episodio de Bahía Bell (Guzmán & Lembeye, 1975; Guzmán & Campodonico, 1978). Las salinidades reflejaron el aporte de aguas continentales, pues en general fueron bajas, con un claro incremento en profundidad. Los valores extremos oscilaron entre 8.14 (superficie) y 31.51 (50 m) PSU.

El tercer brote tóxico fue detectado tras una intoxicación masiva, ocurrida en Punta Arenas el 15 de abril de 1989 (Tabla 2), por consumo de cholgas recolectadas en Estero Núñez, al norte de Punta Arenas (Uribe, 1988). Las concentraciones de VPM en cholga variaron entre 9250 y 11560 U.R. (~1665-2081 µg STX eq.·100 g⁻¹). En muestras de *M. chilensis* recolectadas nueve meses más tarde, se encontraron niveles cercanos al límite de detección del bioensayo, con valores entre 190 y 320 U.R. (~34-58 µg STX eq.·100 g⁻¹). No se dispuso de información de las poblaciones fitoplanctónicas, aunque sí del contenido digestivo de las cholgas, que presentaban tecas de *Prorocentrum micans* junto con quistes temporales de *A. catenella*. Se sugirió que la aparición de mareas rojas tóxicas y los consecuentes altos niveles de VPM en Magallanes, existirían a causa de una interacción de tipo climático-hidrográfica de baja frecuencia (*ca* 10 años).

SITUACIÓN ACTUAL: LA DÉCADA DE LOS NOVENTA

La reaparición de mariscos tóxicos en el litoral de Magallanes fue detectada el 29 de marzo de 1991 tras una intoxicación masiva por consumo de choritos (*Mytilus chilensis*) extraídos de Bahía Nash, en el área central de la región de Magallanes (Fig. 1, Tabla 2). A pesar de decretarse una veda cautelar para

toda la región (hasta que no se dispusiera de una apreciación de la distribución del VPM), y de advertirse que todo producto susceptible de contener estas toxinas debía ser analizado antes de su consumo, el 17 de noviembre y 26 de diciembre de 1991 ocurrieron dos nuevos episodios de intoxicación por consumo de marisco que incluyeron tres casos fatales. Del primer episodio, el más intenso registrado en la región hasta la fecha, no se pudo recabar información precisa sobre la procedencia de los mariscos que lo causaron, aunque se presume que provenían de Seno Unión. El segundo episodio fue causado por marisco procedente de Seno Nevado (Estrecho de Magallanes).

Resultados de los Cruceros del B/I Abate Molina (1992 y 1993)

La Subsecretaría de Pesca encomendó al Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) la realización de dos cruceros oceanográficos, llevados a cabo a bordo del B/I Abate Molina, para obtener una visión amplia de la distribución y abundancia de *Alexandrium catenella* y de los niveles de VPM en los organismos vectores.

Entre el 26 de febrero y el 2 de abril de 1992 se realizó el primer crucero, que abarcó desde Puerto Edén (49°00'S) hasta las Islas Wollaston (55°43'S) e incluyó 74 estaciones oceanográficas (Braun, 1992). Aunque la cobertura geográfica fue muy extensa, *A. catenella* sólo fue detectada, en densidades muy moderadas (máximo 432 cel · l⁻¹ en superficie), en Seno Ventisquero (Canal Beagle), lo que sugiere que la floración se encontraba ya en fase de declive. Se registraron temperaturas de 4.88-4.91°C y salinidad de 22.056-23.77 PSU entre 0 y 25 m. De los nueve recursos marisqueros analizados mediante bioensayo de ratón, sólo cinco presentaron resultados positivos: *Aulacomya ater* (cholga), *Mytilus chilensis* (chorito), *Eurhomalea exalbida* (almeja), *Ensis macha* (navaja), y una especie de caracol no identificada. Las toxicidades más altas se registraron en los caracoles (8019 µg STX eq. · 100 g⁻¹) y en las cholgas (7114 µg STX eq. · 100 g⁻¹). El sector menos tóxico durante el crucero estuvo entre Puerto Edén (49°S) y Canal Smyth (52°S), donde sólo un 17% de las muestras (N=89) presentaron toxicidad, con valores que oscilaron entre el límite de detección del bioensayo y 176 µg STX eq. · 100 g⁻¹. El valor máximo fue detectado en Estero Ringdove, en el extremo norte del sector, si bien en esta loca-

lidad las cholgas no presentaron toxicidad. Entre el Islote Fairway (52°S) y Punta Santa Ana (53°S) se analizaron 19 muestras, de las cuales el 68% resultaron positivas, con toxicidades comprendidas entre 30 y 6660 µg STX eq. · 100 g⁻¹, aunque la mayor parte (9 muestras) presentaron valores próximos a 1134 µg STX eq. · 100 g⁻¹. En el sector sur, entre Puerto Arturo e Islas Wollaston (54°S-55°S), se analizaron 70 muestras, 41% de las cuales no presentaron toxicidad según el bioensayo de ratón. Las muestras positivas arrojaron valores entre 31 y 7114 µg STX eq. · 100 g⁻¹ y de ellas un 52% presentaron toxicidades superiores a 1026 µg STX eq. · 100 g⁻¹. El sector más tóxico fue el área comprendida entre la boca occidental del Estrecho de Magallanes y Seno Año Nuevo.

Un año más tarde, entre 10 de febrero y 5 de marzo de 1993, se realizó un segundo crucero, el más amplio en cuanto a cobertura geográfica (43°-45°S en la región de Aysén y 49°-55°S en la región de Magallanes) y parámetros analizados (oceanográficos, climatológicos, fitoplanctónicos, zooplanctónicos, toxinas en especies vectores y quistes en sedimentos) (Braun *et al.*, 1993). En total se fijaron 111 estaciones (26 en Aysén y 85 en Magallanes). En Aysén se evaluó la presencia de VDM mediante bioensayo, pero no la de VPM, presumiblemente porque hasta ese momento el paradigma era que el VPM se restringía a la región de Magallanes. Los análisis cualitativos de fitoplancton (N=109 muestras) mostraron la práctica ausencia de *A. catenella* en la región de Aysén, donde se detectó la especie tan sólo en la estación de Canal Darwin (45°S). Por el contrario, en la región de Magallanes *A. catenella* estuvo presente en el 54% de las muestras, siendo muy abundante (>50 células según la escala empleada por Braun *et al.*, 1993) entre Canal Grappler y Bahía Islas (51° S), en la Provincia de Última Esperanza (zona norte de Magallanes). A partir de ahí la abundancia de la especie fue disminuyendo paulatinamente hasta los 54°S para incrementarse de nuevo a partir de esta latitud. En los análisis cuantitativos (N=216) de muestras tomadas en superficie y a 10m, *A. catenella* se detectó sólo en Magallanes, entre Canal Grappler (est. 30, 49°S) y Puerto Toro (55°S). En este sector, 24.7% de las muestras de superficie presentaron densidades de 200-1400 cel · l⁻¹, y 14.8% de las muestras de 10 m, de 20-15384 cel · l⁻¹, correspondiendo el máximo a Estero Falcon (est. 33).

En cuanto a la toxicidad, 42% de las 86 muestras analizadas (bioensayo de ratón) resultaron positivas. Entre las 17 especies de interés comercial analizadas, se encontró VPM en tres especies de bivalvos (*Aulacomya ater*, *Mytilus chilensis* y *Chlamys vitrea*), tres de gasterópodos (*Adelomelon ancilla*, *Trophon* sp. y *Argobuccinum* sp.), y un crustáceo (*Megabalanus psittacus*). Los valores de toxicidad variaron entre 30 y 5692 $\mu\text{g STX eq}\cdot 100\text{ g}^{-1}$, y se distribuyeron en un amplio espacio geográfico, entre Estero Falcon y Puerto Toro, coincidiendo con las áreas en las cuales se detectó *A. catenella*. Los valores máximos de VPM se registraron en *Argobuccinum* sp.

Durante este segundo crucero se analizaron por primera vez muestras de sedimentos para detectar quistes de *A. catenella*. En todas las muestras recogidas entre Canal Moraleda (44°S, Aysén) y Puerto Toro, tan sólo se detectaron quistes, y en baja concentración, en Canal Ballenero (54°S, Magallanes). Trabajos posteriores de distribución y abundancia de quistes de *A. catenella* (Uribe *et al.*, 1995, Lembeye & Sfeir, 1997, 1999a, b) destacaron que las áreas con abundancia de quistes de la especie eran escasas. Los resultados de los primeros trabajos (Braun *et al.*, 1993; Uribe *et al.*, 1995) han permitido mostrar que en determinadas regiones someras, con sedimentos de limo y arcilla, es factible encontrar quistes de esta especie, pero aún no se han detectado lechos que permitan explicar la distribución del VPM y de la células vegetativas de *A. catenella*. En Magallanes, de 22 estaciones muestreadas, sólo se encontraron quistes en Bahía Borja (Paso Tortuoso) (1.3 ± 1.33 quis. ml^{-1} ; $n=3$) y Canal Ballenero (Puerto Engaño) (72.7 ± 19.54 quis. ml^{-1}), en tanto que en Aysén se detectaron quistes de la especie en cuatro de las 12 estaciones: Punta Tortuga (2.7 ± 1.33 quis. ml^{-1}), Punta San Emilio (Canal Darwin) (5.0 ± 4.51 quis. ml^{-1}), Puerto Harchy (28.0 ± 16.56 quis. ml^{-1}) y Estero Quitralco (76.7 ± 13.68 quis. ml^{-1}) (Lembeye & Sfeir, 1997, 1999a, b). Así pues, tanto en Aysén como en Magallanes se han detectado zonas con concentraciones de quistes semejantes, como Estero Quitralco y Canal Ballenero, pero en la mayor parte de las estaciones muestreadas se detectaron concentraciones inferiores a las esperadas. A pesar de los resultados obtenidos los autores señalaron que éstos serían los probables centros de generación del inóculo para las floraciones de esta especie.

Finalmente, Braun *et al.* (1993) plantearon que la duración y cobertura geográfica de este tipo de fenómeno no puede ser explicada por factores locales, punto de vista con el que concordaron Uribe (1988) y Benavides *et al.* (1995). Estos autores sugirieron que las floraciones son una respuesta a cambios globales de corto término, y básicamente a la variación de condiciones ambientales asociadas a los fenómenos de gran escala de «El Niño», que presentan una periodicidad de casi 10 años. Con esta perspectiva, los autores hipotetizaron que el aumento de las precipitaciones durante un largo período de tiempo, como consecuencia de alteraciones globales, produce un notorio descenso de la salinidad de superficie y un aumento de la estratificación. El descenso de salinidad conlleva una disminución de la concentración de nutrientes en el estrato superior, mientras que el estrato subsuperficial presentaría una alta concentración de nutrientes no utilizados por encontrarse bajo la capa fótica (Uribe, 1988). La disminución de las precipitaciones durante primavera-verano reduce la estratificación y como consecuencia ascienden aguas ricas en nutrientes a la zona fótica, favoreciendo el desarrollo de floraciones de fitoplancton subsuperficiales.

Un análisis detallado de los datos obtenidos durante episodios ocurridos en los últimos 30 años permite señalar que el inicio y mantenimiento de las floraciones de *A. catenella* asociadas a brotes de VPM en el extremo sur de Chile, muestran correspondencia con el término de un fenómeno de «La Niña» y el inicio de un «El Niño» intenso. Cuatro de los siete eventos históricos más fuertes de «El Niño», desde 1950 hasta la fecha, muestran correspondencia con la presencia de VPM, como es el caso de los fenómenos de «El Niño» de los años 72-73, 82-83, 91-92 y 97-98. Además, parece que el nivel de toxicidad en los mariscos, la abundancia de *A. catenella* y la duración de los brotes tóxicos, está en correspondencia con la duración de las desviaciones positivas del índice multivariado de la oscilación del sur (MEI) (Wolter, 1987; Wolter & Timlin, 1993). Las floraciones de *A. catenella* ocurren en situaciones de calma, alta insolación y en una columna de agua estable (Guzmán *et al.*, 1975a; Guzmán & Campodonico, 1978; Benavides *et al.*, 1995). Se ha mostrado mediante análisis de componentes principales que el incremento de la temperatura del agua es un factor asociado a la aparición de floraciones de *A. catenella*, lo que ha sido puesto en evidencia en

Puerto Zenteno (Pizarro *et al.*, 1997) y en el área norte de Magallanes (Guzmán *et al.*, 2000a, b).

Otros Resultados

Aunque durante 1991 y 1992 se efectuaron reconocimientos de amplia cobertura geográfica que abarcaron la región de Magallanes (Braun, 1992) en el primer caso, y las dos regiones más australes de Chile, Aysén y Magallanes, en el segundo (Braun *et al.*, 1993), las acciones sistemáticas de monitoreo de ficotoxinas, fitoplancton y variables oceanográficas y meteorológicas se iniciaron en 1994. La información que se presenta está referida a toxicidad detectada en los moluscos, densidad y abundancia relativa de *Alexandrium catenella* y estructura fitoplanctónica para el período 1994 y 2000.

La mayor parte de estos antecedentes corresponden a la región de Magallanes (48 estaciones fijas de muestreo), pero se incluyen también resultados obtenidos en la región de Aysén en el transcurso de trabajos financiados por el Fondo de Investigación Pesquera y que abarcan el monitoreo de ficotoxinas y de *A. catenella* en 13 estaciones de muestreo (Tabla 2; Fig. 1) (Uribe *et al.*, 1995, Lembeye *et al.*, 1997 y 1998). En menor grado, también se incluyen resultados del Programa de Vigilancia Epidemiológica, que aborda exclusivamente el monitoreo de organismos vectores y que se ejecuta desde 1995 bajo la responsabilidad del Servicio de Salud de Aysén. Éste cuenta con una red de 77 estaciones, que han sido repartidas en 5 sectores: Norte (28 estaciones), Sur (18), Raúl Marín Balmaceda (11), Melinka (9) y Caleta Tortel (11) (Fernández & Tocornal, 2000).

Con el paso del tiempo, las técnicas de muestreo se han estandarizado, y se ha mejorado la cobertura de la red de estaciones, ya sea mediante la eliminación de estaciones antiguas o con la incorporación de otras nuevas, de tal forma que se han elegido los puntos más representativos. Asimismo se han aplicado criterios de muestreo diferentes, redes de fitoplancton de diferente apertura de malla, muestreos discretos o integrados y contajes de fitoplancton con técnicas distintas, entre otros. No obstante se ha intentado homogeneizar la información, lo cual se ha logrado en la mayoría de los casos.

La toxicidad en especies vectores (*Aulacomya ater* o *Mytilus chilensis*) (2 réplicas por estación) se estimó mediante bioensayo ratón y se expresa en

forma logarítmica ($\ln X+1$) en μg equivalentes de STX por 100 g de carne de marisco (μg STX eq. $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Las estimaciones inferiores a 30-40 (μg STX eq. $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) o no detectables se hicieron equivalentes a cero. Las muestras para estimar la densidad de *Alexandrium catenella* se recolectaron aplicando distintos métodos: muestreos discretos a profundidades estándares (Uribe *et al.*, 1995; Lembeye *et al.*, 1998), arrastres verticales (Lembeye *et al.*, 1997), y muestreos integrados a 0-5 m y 5-10 m (Uribe *et al.*, 1997, 1998; Guzmán *et al.*, 1999, 2000a) o a 0-10 m y 10-20 m (Guzmán *et al.*, 2000b, 2001). Los contajes se realizaron con cámaras Sedgewick-Rafter (Uribe *et al.*, 1995, Lembeye *et al.*, 1997, 1998) y mediante el método de Utermöhl (Uribe *et al.*, 1997, 1998; Guzmán *et al.*, 1999, 2000a, b). Los datos se presentan como densidad promedio en la columna de agua en $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$, transformados logarítmicamente ($\ln X+1$).

Para estimar la abundancia relativa de *A. catenella*, se contabilizó el número de células en 0.1 ml bajo un cubreobjeto de 18x18 mm (promedio de 3 réplicas) y se aplicó un escalafón de abundancia de siete rangos, establecido según la abundancia de esta especie en la naturaleza (Tabla 3). Las muestras fueron recolectadas mediante arrastres verticales entre 30 m y superficie (muestra integrada de 6 réplicas). En Magallanes, durante 1994 y 1996, los muestreos se efectuaron con red de 65 μm , pero actualmente se utiliza de 23 μm . La estructura de la comunidad fitoplanctónica fue evaluada según el índice G (Clément & Guzmán, 1989) a partir de los resultados del análisis del fitoplancton de red, usando la siguiente expresión:

$$G = \frac{(A - B)}{(A + B)}$$

donde, A= número de especies de diatomeas y B= número de especies de dinoflagelados. El rango del índice es de +1 a -1, tomando valores positivos cuando dominan las diatomeas y negativos cuando son más importantes los dinoflagelados, en número de especies. En las situaciones en que la composición específica de la muestra fue inferior a 6 especies, el índice fue estimado según la tendencia de la serie temporal sobre la base del promedio entre el muestreo previo y el siguiente, teniendo en cuenta la tendencia del índice en estaciones adyacentes.

La información presentada ha sido tomada de informes técnicos de monitoreos financiados por el

Tabla 3. Escala de abundancia relativa para *A. catenella*.

	ESCALA	NÚMERO DE CÉLULAS
AUSENTE	0	0
RARO	1	1- 2
ESCASO	2	3 - 10
REGULAR	3	11 - 42
ABUNDANTE	4	43 - 170
MUY ABUNDANTE	5	171 - 683
EXTREMADAMENTE ABUNDANTE	6	>683

*Número de células promedio bajo un cubreobjeto de 18x18mm en 3 alicuotas de 0.1 ml cada una.

Fondo de Investigación Pesquera y Fondo Nacional de Desarrollo Regional, tanto para la región de Aysén (Lembeye *et al.*, 1997, 1998; Fernández & Tocornal, 2000), como para la de Magallanes (Uribe *et al.*, 1995, 1997, 1998; Guzmán *et al.*, 1999, 2000a, b, 2001).

Distribución de la toxicidad en organismos vectores: núcleos geográficos de toxicidad

Al analizar la distribución de la toxicidad en los moluscos vectores en Aysén y Magallanes, se aprecian importantes diferencias entre regiones, así como entre zonas de la misma región. Por ello, no es posible extrapolar resultados de unas áreas a otras, sobre:

- períodos en que se incrementa la abundancia de *Alexandrium catenella* y consecuentemente la toxicidad en los mariscos;
- tendencias de expansión, mantenimiento o contracción de la cobertura geográfica;
- sectores con mayores probabilidades de presentar toxina.

No obstante, a pesar de estas variaciones interanuales, se observaron patrones espaciales y temporales que han permitido caracterizar sectores con mayores probabilidades de presentar mariscos tóxicos, así como tendencias de la concentración de toxicidad y/o de la abundancia de *A. catenella* durante determinados períodos del año.

En las distintas etapas del programa de monitoreo, particularmente para Magallanes, se fueron configurando sectores geográficos que

recurrentemente y en forma característica, reflejaban una mayor probabilidad de presentar niveles de VPM detectables mediante el bioensayo del ratón. Denominaremos en lo sucesivo “núcleos de toxicidad” a aquellos sectores con mayores probabilidades de ocurrencia de la forma vegetativa de *A. catenella* y de toxicidad detectable mediante bioensayo. Se trata, por tanto, de focos con una persistencia espacial y temporal recurrente de la toxina y del dinoflagelado, que puede ser detectada en mapas de distribución o mediante técnicas de agrupación objetivas (e.g. análisis de conglomerados, análisis de componentes principales). En este trabajo, para Aysén se dispone de menos datos que para Magallanes. No obstante, los análisis de tendencias temporales del porcentaje de muestras positivas para esta región ($>80 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), según resultados del programa de vigilancia epidemiológica sobre una base de 2500 a 6000 muestras anuales entre 1995 y 2000 (Fernández y Tocornal, 2000) muestran, al igual que en Magallanes, importantes variaciones interanuales y entre sectores.

En las Figs. 2 y 3 se muestra la distribución de los núcleos de toxicidad en la región de Magallanes en los años 1994 y 2000, los dos años que presentan un mayor contraste durante el período estudiado (1994-2000). Los máximos de toxicidad se observaron en Magallanes en 1994. Estos valores están muy por debajo de los $127000 \mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ señalados para el Canal Beagle (Argentina) por Benavides *et al.* (1995), y que constituyen un récord histórico y mundial; estas muestras fueron recolectadas de un sector que coincide geográficamente con el área sur del programa “Marea Roja” de Magallanes. En esta última región, y hasta 1999, se observó:

- una tendencia al descenso de los niveles de toxina y proporción de muestras tóxicas;
- la existencia de determinados períodos del año con mayores probabilidades de incremento de la toxicidad (patrón temporal de la toxicidad);
- la existencia de sectores geográficos con mayores probabilidades de presentar toxicidad (patrón espacial de la toxicidad).

Para Aysén hay datos disponibles entre octubre de 1995 y abril de 1998, período en el que también se aprecia una tendencia a la disminución en la proporción de muestras tóxicas. No obstante, durante 2000 se observaron cambios de la tendencia general de descenso en ambas regiones. En Aysén se confirmó la existencia de sectores de mayor riesgo de toxicidad, y el único núcleo definido en esta región fue

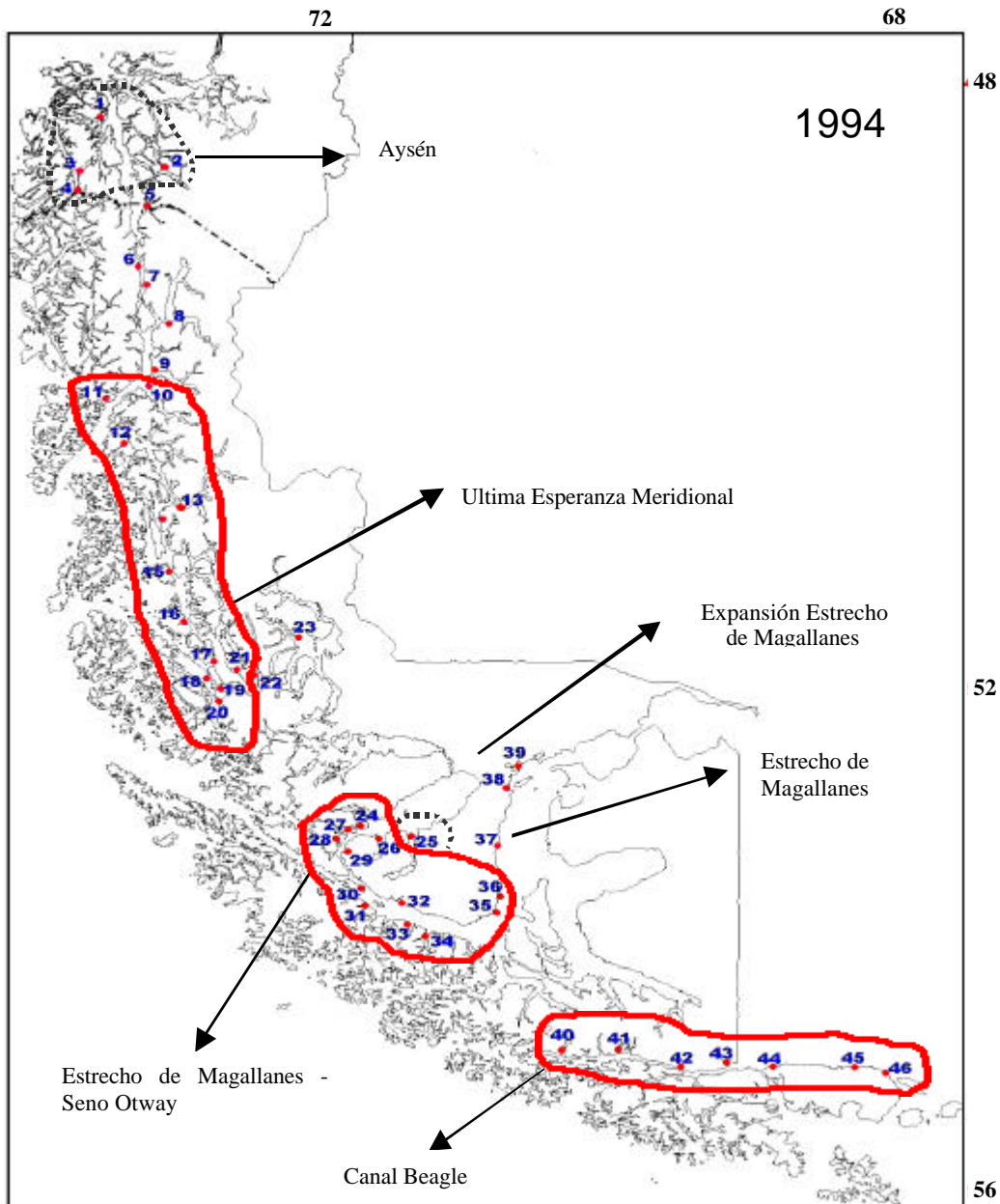


Fig. 2. Núcleos de toxicidad en determinados sectores geográficos de las Regiones de Aysén Meridional y Magallanes durante 1994. (Línea continua: núcleos permanentes; línea punteada: núcleos esporádicos).

detectado por el monitoreo de Magallanes (Fig. 3, est. 2-5). En Magallanes, el registro máximo se presentó en un sector distinto de los habituales en los mapas de toxicidad previos.

En cuanto al patrón temporal de toxicidad, se apreció que las dinámicas eran distintas entre ambas regiones. En Aysén, los máximos de toxicidad se re-

gistraron hacia fines de verano (febrero-marzo) (Lembeye *et al.*, 1997, 1998), pero se pudieron encontrar células de *A. catenella* en la columna de agua durante todo el año. En Magallanes, la forma vegetativa de esta especie desaparecía del plancton o se encontraba con una abundancia relativa muy baja entre finales de otoño e invierno (junio – agosto).

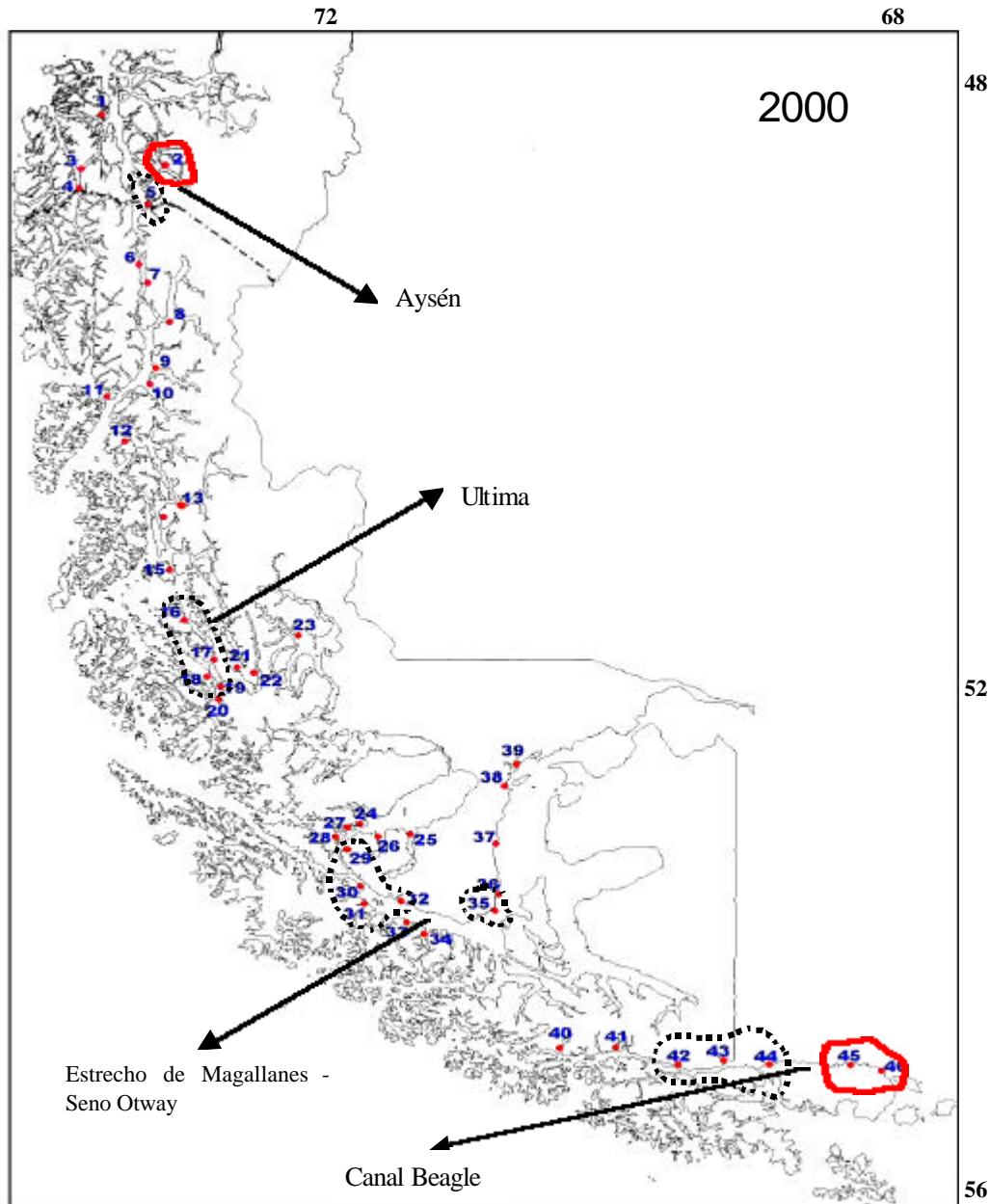


Fig. 3. Núcleos de toxicidad en determinados sectores geográficos de las Regiones de Aysén Meridional y Magallanes durante el año 2000. (Línea continua: núcleos permanentes; línea punteada: núcleos esporádicos).

Aunque los núcleos han sido definidos sobre la base de la toxicidad, es importante entenderlos como un binomio dinoflagelado-toxicidad, cuya interacción es la que le confiere la dinámica y persistencia primaria al núcleo. La información muestra que la extensión geográfica de estos núcleos es variable, y que en el sistema de fiordos y canales de Magallanes, entre 1994 y 1999 se distinguieron tres núcleos, que de norte a sur son: Última Esperanza, Estrecho de Magallanes-Seno Otway y Canal Beagle. Inicialmente a estos núcleos se les otorgaron configuraciones espaciales distintas e incluso recibieron nombres diferentes a los aceptados actualmente. Todos ellos están caracterizados por distintas dinámicas temporales en la concentración de toxina, en los niveles máximos detectados y en la extensión geográfica del VPM. La cobertura se expande o se contrae según las características hidrodinámicas locales que harán incrementar o disminuir la abundancia de la fase móvil de *A. catenella* y consecuentemente de la toxicidad en los organismos vectores. Durante 2000 el patrón tóxico observado permitió agregar un cuarto núcleo, ya señalado en un párrafo previo, que está situado administrativamente en la región de Aysén y por ello se le ha nominado núcleo de Aysén Meridional (Fig. 3).

Sobre la base de los eventos de marea roja ocurridos, se ha mostrado que en Aysén el nivel de riesgo por presencia de VPM y *A. catenella* disminuye hacia la zona norte (Sfeir, 1999), que incluye los sitios de Palena, Santo Domingo e Isla Toto (Tabla 1). Los registros máximos se han observado en el área sur de esta región en Islotes Smith y Estero Quitalco (Tabla 4), ambos en marzo.

En el área norte de Magallanes, los registros máximos ocurrieron durante la primavera de 1994, particularmente en diciembre, y en ese año la toxicidad se distribuyó de manera persistente a lo largo de todo el año entre dos conjuntos de estaciones, uno representado entre Isla Piazzzi (est. 16) e Isla Larga (est. 21) y que actualmente constituyen el núcleo de toxicidad de Última Esperanza, y otro representado por un conjunto de sitios en el sector septentrional de esta área de muestreo, entre Isla Schafer (est.1) y Canal Adalberto (est. 4). Estos datos constituyen un antecedente que refuerza la definición del núcleo de Aysén Meridional establecido en 2000, pero al mismo tiempo se aprecia que la dinámica de la toxicidad en dicho sector no muestra la misma persistencia que el núcleo de Última Esperanza. A modo de ejemplifi-

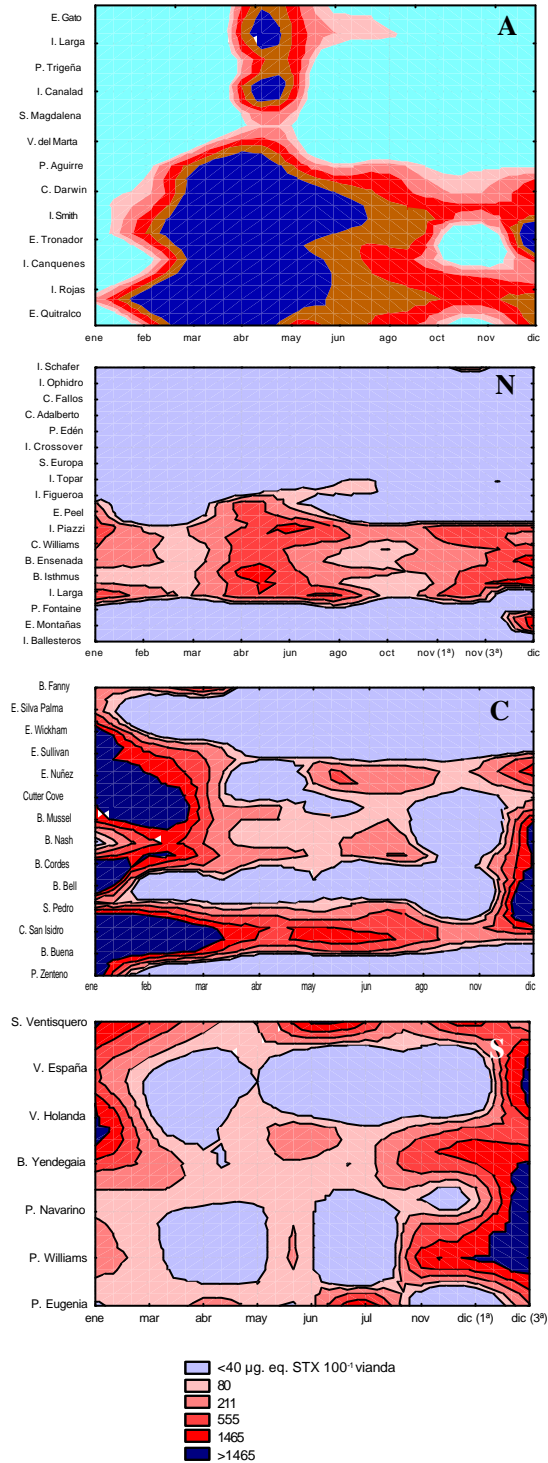


Fig. 4. Distribución espacio-temporal de la toxicidad en mejillones en Aysén durante 1996 (A) y en las áreas norte (N), centro (C) y sur (S) de Magallanes en 1997 (en Aysén: *Aulacomya ater* o *Mytilus chilensis*; en Magallanes: área norte = *Aulacomya ater*, en áreas centro y sur = *Mytilus chilensis*).

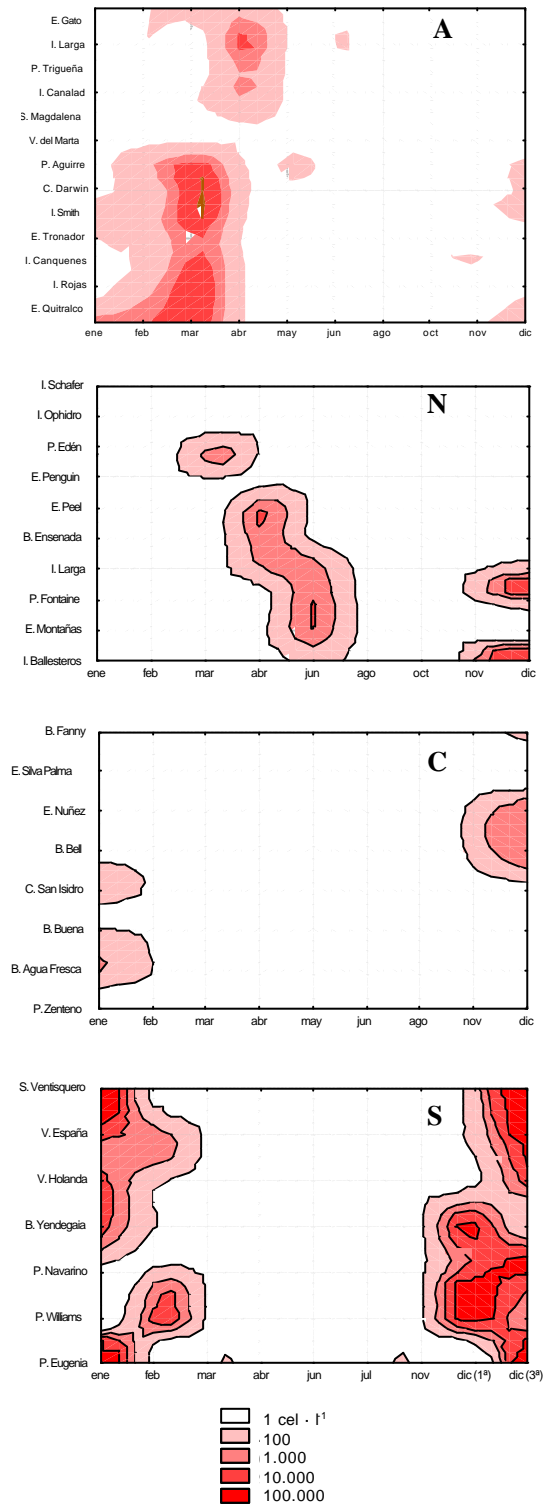


Fig. 5. Variación espacio-temporal de la densidad promedio de *Alexandrium catenella* en Aysén durante 1996 (A) y en las áreas norte (N), centro (C) y sur (S) de Magallanes durante 1997.

cie en 1972, en la que se alcanzaron concentraciones de $6 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$.

En la región de Aysén, los valores máximos se registraron en 1996 en Islotes Smith ($5808 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) y en 1998 en Estero Quitralko ($4199 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), en ambos casos durante los primeros días de marzo. Estos valores son sensiblemente mayores que los registrados en 1994, en que se detectó un máximo de 287 cel

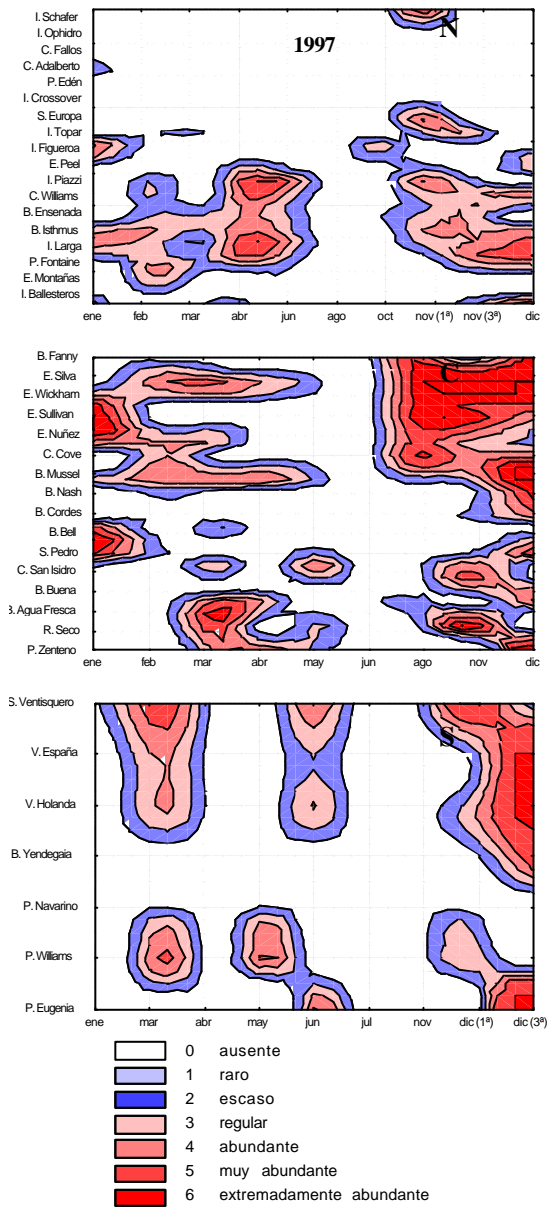


Fig. 6. Distribución espacio-temporal de la abundancia relativa de *Alexandrium catenella* en las áreas norte (N), centro (C) y sur (S) de Magallanes durante 1997.

**Estructura de la comunidad fitoplanctónica:
El Índice G**

El índice G es una buena herramienta de descripción de la taxocenosis fitoplanctónica, que en el caso de las extensas áreas estudiadas, muestra importantes variaciones temporales y espaciales, asociadas al comportamiento de la toxicidad y abundancia de *A. catenella*. Este índice muestra que la riqueza específica de dinoflagelados frente a aquella de las diatomeas también presentó importantes diferencias interanuales y entre sectores. En la Fig. 7 se ilustra el caso para las tres áreas de Magallanes durante 1997, resaltando el área sur que muestra predominio de la riqueza de especies de dinoflagelados en ese año para el periodo de verano, que estuvo asociado a incrementos de la toxicidad, de la abundancia relativa y densidad de *A. catenella* (Figs 4 - 6).

**Series temporales de toxicidad y abundancia
relativa de *A. catenella***

La Fig. 8 muestra series temporales que ejemplifican la relación de la abundancia relativa de *A. catenella* y toxicidad en los mariscos en Magallanes. La información corresponde a sitios de muestreo de las áreas norte, centro y sur de Magallanes, respectivamente.

Para el área norte cabe destacar: a) la tendencia a la disminución de los máximos de toxicidad registrados en el período analizado; b) las variaciones estacionales de la abundancia relativa de *A. catenella*, que muestran una mayor abundancia periódica en primavera, verano y otoño, interrumpidas por períodos de ausencia, particularmente durante los meses de invierno (aunque también puede estar ausente en algunos meses de otoño y verano); c) no se aprecia una tendencia a la disminución de la abundancia relativa durante el período analizado, registrándose todos los años niveles altos de la escala de abundancia relativa (4-5); d) se aprecia una buena correlación entre el incremento de la abundancia relativa de *A. catenella* y el incremento de toxicidad. Ambos aumentos ocurren simultáneamente o con un desfase de uno o dos períodos de muestreo.

En el área centro, la correlación entre la abundancia relativa y la toxicidad es tan notable como en el área norte, a pesar de que a inicios de 1999 el leve incremento de la abundancia relativa no mostró una correspondencia con la variación de la toxicidad.

En el área sur, los picos más altos de toxicidad se registraron en enero de 1997, y también se aprecia una clara tendencia de disminución hacia 1999. De forma similar al área norte, la abundancia relativa de *A. catenella* muestra un patrón sostenido el cual se ve interrumpido por periodos de ausencia. Esta situación cambia drásticamente a partir de febrero de 1999 en que la fase móvil de *A. catenella* en la co-

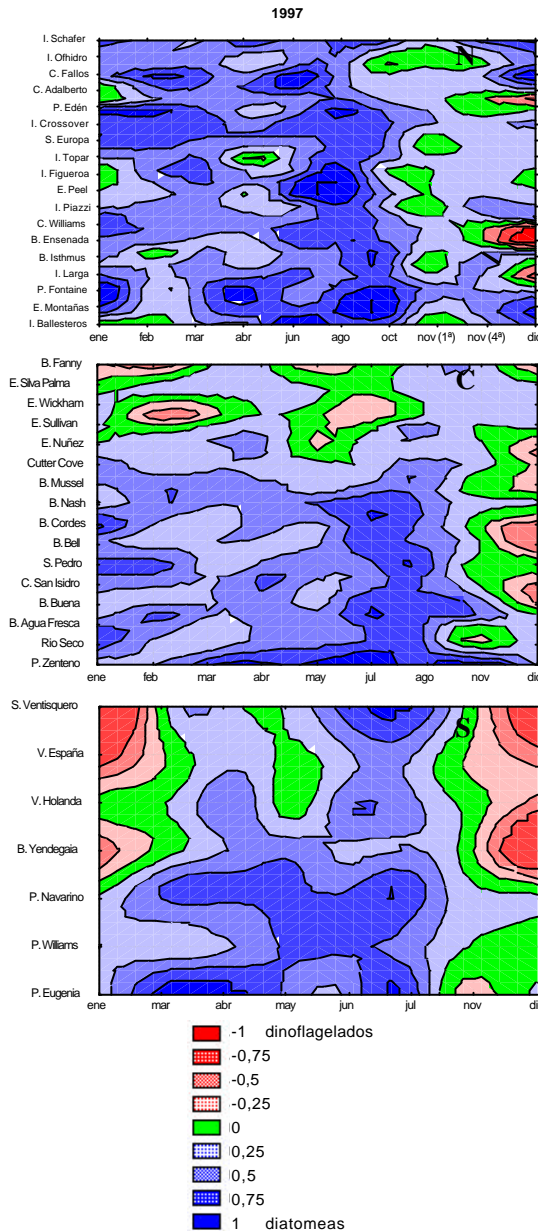


Fig. 7. Variación espacio-temporal del Índice G en las áreas norte (N), centro (C) y sur (S) de Magallanes durante 1997.

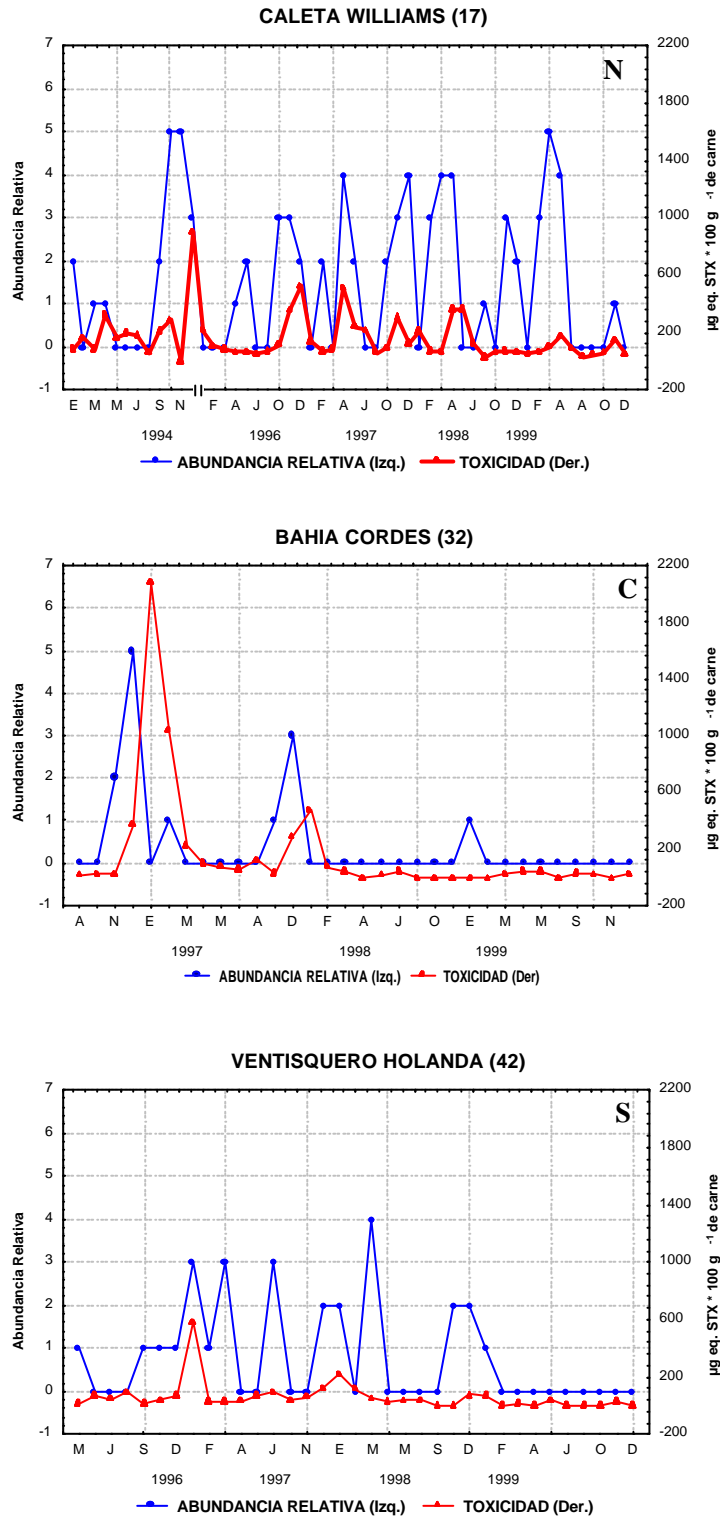


Fig. 8. Series temporales de la abundancia relativa de *Alexandrium catenella* y la toxicidad encontrada en mejillones (*Mytilus chilensis*) en sitios selectos de los núcleos de Última Esperanza, Estrecho de Magallanes-Seno Otway y Canal Beagle de las áreas norte (N), centro (C) y sur (S) de Magallanes, respectivamente.

lumna de agua, estuvo ausente. Considerando todos los años, los máximos de abundancia relativa se observaron a finales de primavera o comienzos de verano (a excepción de un registro inusual en junio de 1997). En concordancia con lo ya señalado para el área norte y centro, se observa aún una correlación entre las variaciones temporales de la toxicidad y la abundancia relativa, aunque ésta es mucho más débil.

CONCLUSIONES

En Chile se han detectado veneno paralizante (VPM), veneno diarreico (VDM) y veneno amnésico (VAM) de los mariscos, cuyas presencias se restringen fundamentalmente al sur del país (41-55° S), si bien el VAM ha sido detectado recientemente entre los 27° y 30°S. Las floraciones asociadas a VPM, son las que han ocasionado los mayores impactos, sobretodo en la primera mitad de la década de los 90.

Las floraciones de *A. catenella* y la consecuente presencia de veneno paralizante de los mariscos han incrementado en frecuencia, intensidad y cobertura geográfica desde la primera ocurrencia en 1972, constituyéndose actualmente en un problema permanente desde 1991, que abarca una extensa área geográfica que comprende las dos regiones más australes del país, Aysén y Magallanes (43-55° LS).

El año que mostró los niveles más altos de toxina en organismos vectores fue 1994, pero también *A. catenella* mostró las densidades más altas de la década y un fitoplancton con una mayor proporción de dinoflagelados, con respecto al grupo dominante, las diatomeas. Las densidades más altas de *A. catenella* se registraron en 1972, con $6 \cdot 10^5$ cel.l⁻¹.

Las floraciones de *A. catenella* y la distribución del VPM han sido diferentes en densidad, cobertura geográfica, duración y niveles de toxicidad. En Magallanes los registros más altos de toxina en vectores y la mayor cobertura geográfica fueron en 1994, año en que el VPM fue detectado en Aysén. La proporción de muestras tóxicas con VPM en vectores de Magallanes, muestra una tendencia a la disminución.

La dinámica espacial y temporal de la distribución y abundancia de *A. catenella* y las concentraciones de VPM en vectores difiere tanto entre regiones, como entre sectores dentro de una misma región. Por ello, no es posible extrapolar resultados entre

áreas sobre períodos en los que incrementa la abundancia de *A. catenella* y consecuentemente la toxicidad en los mariscos. Pero a pesar de las variaciones interanuales, existen configuraciones temporales que permiten caracterizar tendencias durante determinados períodos del año.

Existen sectores con mayores probabilidades de ocurrencia de la fase vegetativa de *A. catenella* y de mariscos tóxicos. Al sur de los 48°06'S se han identificado cuatro "núcleos de toxicidad": Aysén meridional, Última Esperanza, Estrecho de Magallanes-Seno Otway y Canal Beagle. Estos presentan distinta extensión y según las características particulares de cada año, pueden aumentar o disminuir su cobertura, llegando incluso a segregarse.

En Magallanes, los períodos con mayores probabilidades de incrementar la abundancia de *A. catenella* y por consiguiente la concentración de VPM en los mariscos fueron primavera, verano y el primer mes de otoño para el área norte; desde mediados del invierno (agosto) hasta mediados de otoño para el área centro; y desde mediados de primavera hasta el primer mes de otoño para el área sur. Por tanto, los períodos de verano y otoño de las tres áreas de Magallanes presentan un patrón temporal más amplio que el de Aysén, el cual se inicia en verano medio y se extiende hasta fines de otoño (cinco meses). De forma resumida se puede decir que en el área norte de Magallanes existen ocho meses de riesgo de aparición de VPM, en el área centro, diez meses, y en el área sur, siete.

Aunque se han identificado quistes de *A. catenella* en sectores localizados del extenso litoral de Aysén y Magallanes, el número de sitios y la densidad en que se han encontrado no es suficiente para explicar la actual distribución de la forma vegetativa de esta especie y del veneno paralizante en vectores.

La duración y cobertura geográfica de las floraciones de *A. catenella* y la presencia de VPM no puede ser explicada por factores locales, cuya presencia está vinculada con la finalización de un episodio «La Niña» y el inicio de un «El Niño» intenso. La temperatura relativamente alta del agua es un factor asociado a las floraciones de *A. catenella*.

Expresamos nuestro agradecimiento al Consejo Directivo del Fondo de Investigación Pesquera, por autorizar el uso de los resultados de los estudios siguientes: «Monitoreo de la Marea Roja en las Aguas Interiores de la X y XI Regiones» (FIP 93-16);

«Seguimiento de la Toxicidad en Recursos Pesqueros de Importancia Comercial en la X y XI Regiones» (FIP-IT/97-49); «Monitoreo Mensual de la Marea Roja en la XI y XII Regiones» (FIP 95-23B); «Monitoreo de la Marea Roja en Aguas Interiores de la XII Región» (FIP 95-23A); «Seguimiento de la Toxicidad en Recursos Pesqueros de Importancia Comercial en la XII Región» (FIP 97-48); y al Gobierno Regional de Magallanes y Antártica Chilena, por autorizar el uso de la información del estudio «Difusión Programa Marea Roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena» en sus distintas etapas (BIP 20092815-0).

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo, 1995. COI-Segundo Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones de Algas Nocivas en Sudamérica. Informes de Reuniones de Trabajo 123, Anexo IV: 19-20.
- Anónimo, 1996. Design and Implementation of Some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC Technical Series N° 44, IOC of UNESCO, 102 pp.
- Balech, E., 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Special Publication. Cork, Ireland, 151 pp.
- Benavides, H., L. Prado, S. Díaz & J.I. Carreto, 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-LeDenn, P. Gentien & C. Marcaillou-LeBaut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, París: 113-119.
- Braun, M., 1992. Programa básico de monitoreo de marea roja en la XII Región. Instituto de Fomento Pesquero Informe Final, 82 pp. + anexos.
- Braun, M., J.L. Blanco & J. Osses, 1993. Investigación monitoreo de marea roja en la XII Región. Instituto de Fomento Pesquero, Informe a la Subsecretaría de Pesca, 181 pp.
- Campodonico, I. & L. Guzmán, 1974. Marea roja producida por *Amphidoma* sp. en el Estrecho de Magallanes. An. Inst. Pat. 5 (1-2): 209-213.
- Clément, A & L. Guzmán, 1989. Red tides in Chilean fjords. In Okaichi, T., D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.), Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Elsevier, New York: 119-122.
- Fernández, R. & A. Tocornal, 2000. Marea roja, desafío para la salud pública. In II Seminario-Taller de floraciones de algas nocivas: enfoque interdisciplinario e intersectorial en la búsqueda del desarrollo humano. Punta Arenas, Chile, 9-10 noviembre. Disco Compacto de Resúmenes y Presentaciones.
- Guzmán, L., 1976. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. V. El probable cisto ecdísico de *G. catenella*. An. Inst. Pat. 7: 201-206.
- Guzmán, L & G. Lembeye, 1975. Una discoloración causada por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. II. Algunas condiciones hidrográficas asociadas. An. Inst. Pat. 6: 185-195.
- Guzmán, L. & I. Campodonico, 1975. Marea roja en la Región de Magallanes. An. Inst. Pat., Ser. Monogr. 9, 44pp.
- Guzmán, L & I. Campodónico, 1978. Mareas rojas en Chile. Interciencia 3: 144-151.
- Guzmán, L., I. Campodonico & M. Antunovic, 1975b. Estudios sobre un florecimiento causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. IV. Distribución y niveles de toxicidad del Veneno Paralítico de los Mariscos (Noviembre de 1972-Noviembre de 1973). An. Inst. Pat. 6: 209-223.
- Guzmán, L., I. Campodonico & J. Hermosilla, 1975a. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes. I. Distribución espacial y temporal de *G. catenella*. An. Inst. Pat. 6: 173-183.
- Guzmán, L., G. Pizarro, M. Banciella, R. Igor, C. Alarcón, H. Pacheco, O. Oyarzo, M. Fauré & N. Butorovic, 2001. In: L. Guzmán & E. Almonacid (eds.), Difusión Programa marea roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, IV Etapa. Informe Final Subprograma de Monitoreo. Tomo I, 129 pág. + figuras + anexos.
- Guzmán, L., G. Pizarro, R. Igor, A. Atalah, O. Oyarzo, E. Barticevic, C. Alarcón, J. Foppiano, N. Butorovic, E. Almonacid & M. Ruiz, 2000b. Difusión Programa marea roja en la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena, Tercera Etapa. Tomos I-IV, 274 pp. + figuras + fotografías + anexos.
- Guzmán, L., G. Pizarro, J.C. Uribe., O. Oyarzo, R. Victoriano, E. Barticevic, C. Alarcón, S. Cuevas, A. Atalah, V. Chacón & M. Santana, 1999a. Difusión Programa marea roja en la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena, Segunda Etapa. Tomos I-IV. 176 pp. + figuras + anexos.
- Guzmán, L., J.C. Uribe, G. Pizarro, B. Suárez, A. López, C. Alarcón & R. Igor, 2000a. Seguimiento de la toxicidad en recursos pesqueros de importancia comercial en la XII Región. Informe final FIP N° 97-48, 133 pp + figuras.
- Lembeye, G., 1981a. Segunda aparición del veneno paralítico de los mariscos (VPM) asociado a *Gonyaulax catenella*, en Magallanes (Chile), 1981. An. Inst. Pat. 12:273-276.
- Lembeye, G., 1981b. Estructura del fitoplancton asociado a la presencia del veneno paralítico de los mariscos en Seno Unión y áreas adyacentes (Magallanes, Chile), 1981. An. Inst. Pat. 12: 277-288.
- Lembeye, G., A. Clément, N. Marcos, C. Molinet, X. Rojas & A. Sfeir, 1997. Monitoreo de la marea roja en las aguas interiores de la X y XI Regiones. Universidad Austral. Fondo de Investigación Pesquera. Informe Final, 126 pp.
- Lembeye, G., L. Guzmán & I. Campodónico, 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por *Gonyaulax catenella* en Magallanes III. Fitoplancton asociado. An. Inst. Pat. 6: 197-208.
- Lembeye, G., N. Marcos, A. Sfeir, C. Molinet, F. Jara, A.

- Clement & X. Rojas, 1998. Seguimiento de la toxicidad en recursos pesqueros de importancia comercial en la X y XI región. Universidad Austral. Fondo de Investigación Pesquera. Informe Final, 86 pp. + figuras + anexos.
- Lembeye, G. & A. Sfeir, 1997. Distribución de quistes de *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en sedimentos de canales y fiordos someros entre los 47° y 52°S. In Resultados Crucero CIMAR-FIORDO 2. Comité Oceanográfico Nacional, Chile: 64-69.
- Lembeye, G. & A. Sfeir, 1999a. Distribución del quiste de *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en sedimentos recolectados entre el Estrecho de Magallanes y el Cabo de Hornos. In Resultados Crucero CIMAR-FIORDO 3. Comité Oceanográfico Nacional, Chile: 73-77.
- Lembeye, G. & A. Sfeir, 1999b. Distribución del quiste *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en sedimentos de la XI región (Proyecto continuación). In Resultados Crucero CIMAR-FIORDO 4. Comité Oceanográfico Nacional, Chile: 57-59.
- Muñoz, P., S. Avaria, H. Sievers & R. Prado, 1992. Presencia de dinoflagelados tóxicos del género *Dinophysis* en el Seno Aysén, Chile. Rev. Biol. Mar., Valparaíso, 27 (2): 187-212.
- Peric, J., 1985. Extinción indígena en la Patagonia. Hersaprint, Punta Arenas, 193 pp. + ilustraciones.
- Pizarro, G., M. Fauré, C. Salgado, L. Guzmán, H. Pacheco, C. Alarcón, M. Banciella & R. Igor, 2000. Análisis de VAM en vectores de la región de Magallanes. In II Seminario-Taller de floraciones de algas nocivas: enfoque interdisciplinario e intersectorial en la búsqueda del desarrollo humano. Punta Arenas, Chile, 9-10 noviembre. Resúmenes y Presentaciones (en CD).
- Pizarro, G., L. Guzmán, M. Frangópulos & C. Alarcón, 1997. Environmental conditions associated with phytoplankton blooms in a remote area of PSP detection (Bahía Pecket, Strait of Magellan, Chile). In VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo, Abstracts: 163.
- Sfeir, A., 1999. Creación de base de datos e identificación de zonas con riesgo de ocurrencia de marea roja en la XI región. In resúmenes del seminario internacional sobre marea roja. Riesgos para la salud humana y el desarrollo de los países. Puerto Varas, Chile.
- Suárez-Isla, B. & L. Guzmán, 1999. Mareas rojas y toxinas marinas. Serie "Orientaciones en Ciencias, Tecnología y Cultura", Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 77 pp.
- Taylor, F.R.J., Y. Fukuyo & J. Larsen, 1995. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Manual and Guides N° 33. UNESCO:283-317.
- Uribe, J.C., 1988. Antecedentes sobre el tercer brote tóxico de veneno paralizante de mariscos en la región de Magallanes. An. Inst. Pat., Ser. Cs. Nat. 18: 97-101.
- Uribe, J.C., L. Guzmán & S. Jara, 1995. Monitoreo Mensual de la Marea Roja en la XI y XII regiones. Fondo de Investigación Pesquera, 282 pp. + 3 láminas.
- Uribe, J.C., L. Guzmán, G. Pizarro, C. Alarcón & J.L. Iriarte, 1997. Monitoreo de la Marea Roja en las aguas interiores de la XII región. Fondo de Investigación Pesquera, 204 pp.
- Uribe, J.C., L. Guzmán, H. Pacheco, R. Igor, G. Pizarro, E. Barticevic, M. Frangópulos, C. Alarcón, T. Hromic, C. Labbe, A. Atalah & P. Chang, 1998. Difusión Programa marea roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena. Primera Etapa. Informe Final. Tomos I-III. Fondo Nacional de Desarrollo Regional, 604 pp.
- Vila, M., E. Garcés, M. Masó & J. Camp, 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast?. Mar. Ecol. Progr. Ser. 222: 73-83
- Wolter, K., 1987. The Southern Oscillation in surface circulation and climate over the tropical Atlantic, Eastern Pacific, and Indian Oceans as captured by cluster analysis. J. Clim. Appl. Meteorol. 26: 540-558.
- Wolter, K. & M.S. Timlin, 1993. Monitoring ENSO in COADS with a seasonally adjusted principal component index. In: Proceedings of the 17th Climate Diagnostics Workshop, Norman, OK, NOAA/NMC/CAC, NSSL, Oklahoma Clim Survey, CIMMS and the School of Meteor., Univ. Oklahoma: 52-57.

CAPÍTULO 12: IMPACTO ECONÓMICO DE LAS FLORACIONES DE MICROALGAS NOCIVAS EN CHILE Y DATOS RECIENTES SOBRE LA OCURRENCIA DE VENENO AMNÉSICO DE LOS MARISCOS

**BENJAMÍN A. SUÁREZ ISLA¹, AMÉRICO LÓPEZ¹, CRISTIÁN HERNÁNDEZ²,
ALEJANDRO CLÉMENT³ & LEONARDO GUZMÁN⁴**

¹Laboratorio de Toxinas Marinas, Programa de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile, Casilla 70005. Santiago, Chile.

²Invertec IGT, Román Díaz 1271, Santiago, Chile.

³Plancton Andino Ltda. Casilla 823, Puerto Montt, Chile.

⁴Instituto de Fomento Pesquero, Casilla 101, Punta Arenas, Chile

INTRODUCCIÓN	259
PROGRAMAS DE MONITOREO DE TOXINAS MARINAS EN CHILE	259
Productos de consumo interno	259
Productos de exportación	260
Programas especiales en las regiones de Aysén y Magallanes	260
IMPACTO ECONÓMICO DE LAS FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN CHILE ..	261
BROTOS RECIENTES DE VENENO AMNÉSICO DE LOS MARISCOS (VAM)	264
PROTOCOLO SEGUIDO EN LOS ANÁLISIS DE VAM	264
RESULTADOS	266
CONCLUSIONES	267
BIBLIOGRAFÍA	267

IMPACTO ECONÓMICO DE LAS FLORACIONES DE MICROALGAS NOCIVAS EN CHILE Y DATOS RECIENTES SOBRE LA OCURRENCIA DE VENENO AMNÉSICO DE LOS MARISCOS

BENJAMÍN A. SUÁREZ ISLA¹, AMÉRICO LÓPEZ¹, CRISTIÁN HERNÁNDEZ²,
ALEJANDRO CLÉMENT³ & LEONARDO GUZMÁN⁴

¹Laboratorio de Toxinas Marinas, Programa de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina,
Universidad de Chile, Casilla 70005. Santiago, Chile

²Invertec IGT, Román Díaz 1271, Santiago, Chile

³Plancton Andino Ltda. Casilla 823, Puerto Montt, Chile

⁴Instituto de Fomento Pesquero, Casilla 101, Punta Arenas, Chile

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han detectado niveles tóxicos de veneno paralizante (VPM) y veneno diarreico de los mariscos (VDM) en regiones del sur de Chile (41- 55° LS) (Fig. 1) y se han determinado las principales especies tóxicas de dinoflagelados involucradas (Uribe *et al.*, 1999; Suárez-Isla & Guzmán, 1999; Vélez *et al.*, 2001). La primera intoxicación paralizante fue detectada en Bahía Bell, región de Magallanes en 1972 (52° LS) y la primera intoxicación diarreica fue registrada en el estuario de Reloncaví, región de Los Lagos (41° LS), en marzo de 1970. A la fecha de este trabajo, las floraciones algales asociadas a VPM y VDM son las que han causado los mayores impactos económicos y en salud humana. Desde 1997 se suma a las observaciones anteriores la detección de ácido domoico, causante de la intoxicación amnésica de los mariscos (VAM), en zonas al norte y al sur del país. Esta toxina no ha causado intoxicaciones humanas, pero constituye una amenaza potencial a la salud pública y a las economías locales.

Las floraciones de *Alexandrium catenella* y los brotes de veneno paralizante de los mariscos (VPM) han ocurrido en Magallanes (50-55° LS) en 1972, 1981 y 1989. Desde 1991 se han producido una serie de floraciones anuales que persisten hasta la actualidad (ver Guzmán *et al.*, este volumen). Un fenómeno semejante se ha producido desde 1994 en Aysén (44-55° LS), región contigua al norte de Magallanes, en la que además se detecta VDM. Entre 1972 y 2000 se han registrado 387 intoxicaciones por VPM en seres humanos, incluyendo 26 casos fatales. Ade-

más de la presencia de dinoflagelados tóxicos de los géneros *Alexandrium* y *Dinophysis* (Guzmán *et al.*, este volumen), las floraciones de diatomeas pennadas potencialmente tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* son frecuentes y se distribuyen ampliamente en las costas de Chile (18-54° LS). Algunas especies de estas diatomeas pueden sintetizar ácido domoico (AD) (Bird *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1989; Seguel, 1991), un ácido tricarbóxico análogo al ácido kaínico, que se une a receptores glutamatérgicos en neuronas del sistema nervioso central. El ácido domoico puede producir la Intoxicación Amnésica de los Mariscos (Perl *et al.*, 1990; Teitelbaum *et al.*, 1990). En este capítulo se analizan los impactos de las floraciones algales nocivas en Chile en años recientes, en especial los causados por brotes de Veneno Amnésico de los Mariscos, se describen los programas de monitoreo y prevención y se analizan los impactos económicos de las floraciones algales nocivas en Chile.

PROGRAMAS DE MONITOREO DE TOXINAS MARINAS EN CHILE

Productos de consumo interno

El Ministerio de Salud es la autoridad nacional que controla el consumo interno de alimentos a través de los Servicios de Salud Regionales. Estos servicios regionales están distribuidos según la división administrativa del país en trece unidades de gestión autónoma y poseen la autoridad necesaria para decretar vedas y su cese en las zonas afectadas, para determinar las especies incluídas en las prohibiciones de extracción y comercialización y pueden deco-

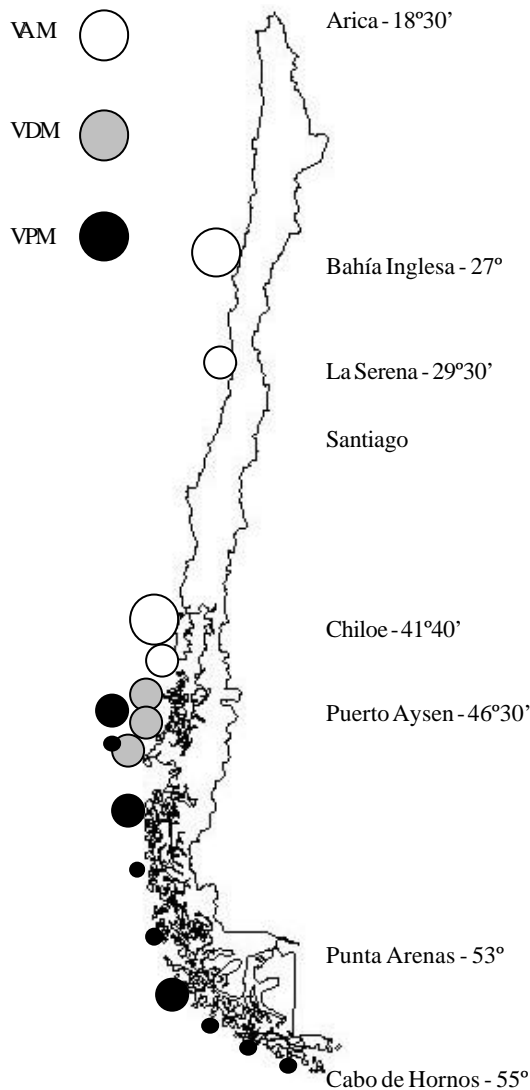


Fig. 1. Distribución de VPM, VDM y VAM en las regiones del sur de Chile durante el período 1997-2000.

misar partidas de mariscos que sean transportadas contraviniendo las normas. El manejo de contingencias está regido por un «Plan Nacional de Manejo de Mareas Rojas» que incluye normas administrativas como la exigencia de emisión de certificados de origen de la materia prima, pases de tránsito y control de transporte de mercancías en aduanas sanitarias. Los Servicios de Salud del sur del país (Los Lagos, Aysén y Magallanes) utilizan rutinariamente bioensayos para VPM y VDM para controlar partidas de mariscos destinadas al consumo interno. La intercalibración de los bioensayos es realizada por el Instituto de Salud Pública, entidad dependiente del

Ministerio de Salud, la que además coordina el programa de acreditación de estas técnicas en otros laboratorios universitarios o privados.

Productos de exportación

El Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) es la autoridad nacional dependiente del Ministerio de Economía para el control de la exportación de productos del mar. Es la entidad regulatoria que representa al país para la puesta en práctica de los convenios bilaterales internacionales. Uno de los principales convenios suscritos es el acordado con la Comunidad Económica Europea bajo el cual Chile se ha comprometido a cumplir con las Directivas CEE 91/492 y 493, estableciendo un Programa de Sanitización de Moluscos Bivalvos (PSMB). Este programa considera además del análisis regular de muestras de mariscos para VPM, VDM y VAM, el análisis de coliformes fecales y metales pesados y la implementación de normas ISO en plantas procesadoras. Otro convenio importante proviene de un «Memorandum of Understanding» con el gobierno de los Estados Unidos. En este caso las empresas deben demostrar el cumplimiento de las normas contenidas en el «National Shellfish Sanitation Program» (NSSP). Para el análisis de fitoplancton y de toxinas marinas en partidas de exportación, el Servicio Nacional de Pesca se apoya en un grupo de laboratorios universitarios y privados como el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile, el Laboratorio del Instituto de Fomento Pesquero de Punta Arenas y la empresa «Plancton Andino» entre otros.

Programas especiales en las regiones de Aysén y Magallanes

En las dos regiones más australes del país (véase Fig. 1) el impacto ocasionado por la presencia continua de floraciones nocivas asociadas a los venenos paralizante y/o diarreico, desde los inicios de la década de los noventa, determinaron el desarrollo de programas especiales que son gestionados y dirigidos localmente. El Programa de «Vigilancia Epidemiológica de Aysén», está a cargo del Servicio de Salud de esa región y cuenta con apoyo financiero del Ministerio de Salud (Fernández & Tocornal, 2000). Su propósito es disminuir el riesgo de intoxicación por toxinas marinas a través del monitoreo de organismos filtradores, certificación de mariscos para consumo, acciones de fiscalización y educación sanitaria e información permanente a la comunidad.

Para su desarrollo se han establecido 77 estaciones fijas de muestreo, distribuidas en cinco subzonas, desde las cuales se extraen mariscos para medición de toxicidad con bioensayos para VPM y VDM.

En la región de Magallanes se estructuró el Programa de «Marea Roja de la Región de Magallanes y Antártida Chilena», que incluye acciones de monitoreo, difusión, capacitación y educación. Se ejecuta bajo la responsabilidad del Instituto de Fomento Pesquero y se realiza con el apoyo del Servicio de Salud de Magallanes. Los recursos financieros provienen del Gobierno Regional.

El objetivo general de este programa es desarrollar acciones integradas de prevención encaminadas a disminuir los riesgos sobre la salud pública y minimizar los trastornos sobre el sector pesquero, desarrollando, además, cambios en la conducta de grupos particulares y de la comunidad en general.

Para el monitoreo se ha establecido una red de 48 sitios fijos de muestreo, repartidos en tres áreas, desde los cuales se recolectan mariscos, muestras cualitativas y cuantitativas de fitoplancton e información meteorológica y oceanográfica. El programa genera la información necesaria para adoptar decisiones eficaces de protección de la salud pública y para disminuir los impactos sobre el entorno social y económico. También promueve la conformación de un grupo de profesionales y técnicos con experiencia multidisciplinaria en el tema y con asiento en la región.

IMPACTO ECONÓMICO DE LAS FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN CHILE

Las Floraciones Algas Nocivas (FAN) han tenido un alto impacto económico y social en las zonas afectadas a nivel mundial. Chile no ha sido una excepción y es así como desde ya hace unos años existen amplias zonas del extremo sur del país (44-55° LS) cerradas a la extracción de mariscos que potencialmente acumulan toxinas marinas. La presencia de toxinas marinas ha ocasionado además el cierre temporal de áreas de extracción y cultivo de especies afectables por las FAN, ubicadas en otras zonas al norte y al sur del país. Sin embargo, el establecimiento de programas de vigilancia nacionales para controlar el consumo interno y los productos de exportación han permitido mantener la producción a

pesar de las extensas vedas cautelares en el extremo sur del país y disminuir significativamente los casos de intoxicaciones humanas (Suárez-Isla & Guzmán, 1999).

La observación de aumentos de la incidencia de las FAN de diatomeas potencialmente tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*, la detección de ácido domoico en 1997 y la detección de niveles sub-tóxicos de saxitoxinas en zonas costeras del norte del país no afectadas, indican que el riesgo de extensión de las FAN está siempre presente y podría afectar la actual producción de moluscos potencialmente transvectores de toxinas. Es por lo tanto relevante dimensionar el impacto económico que tendría la presencia de las FAN a lo largo de las costas de Chile en zonas no afectadas.

El dimensionamiento de estos impactos pasa por definir qué mercados específicos se verían afectados y en qué cuantía. La teoría microeconómica permite identificar el efecto que sobre el equilibrio de un mercado específico puede tener algún tipo de variación en los factores productivos o en la producción misma de un determinado bien o servicio.

La presencia de las FAN significa no comercializar o dejar de explotar áreas con potencial productor, lo que en términos económicos implica una disminución de la oferta de mariscos.

Las exportaciones de los últimos 6 años de mariscos potencialmente transvectores han alcanzado un promedio de US\$ 83 millones anuales (sin considerar el consumo interno de otros US\$ 30 millones anuales), un ingreso importante que podría verse amenazado por la eventual extensión de las FAN (ver Tabla 1). El riesgo de la aparición de FAN en Chile se multiplica, si se considera que la actividad extractora o cultivadora de los mariscos que pueden ser afectados por las FAN, está altamente concentrada en algunas regiones. Es así como hay amplios cultivos de especies en las regiones III (Bahía Inglesa) y IV (La Serena), y cultivos cercanos a bancos naturales concentrados en la región X (Chiloé, ver Fig. 1).

Existen alrededor de 110 empresas autorizadas para procesar mariscos y cerca de 300 empresas que se dedican a su comercialización, pero el 70% de las exportaciones chilenas está controlada por 18 empresas. En 1999 se exportaron mariscos a 58 países,

Tabla 1. Volumen de exportaciones nacionales por tipo de recursos susceptibles de contener biotoxinas. Valores en miles de dólares. s/e = sin especificar (Fuente: Estadísticas de Exportaciones Pesqueras de Chile. Boletines Informativos. Instituto de Fomento Pesquero, 1995-2000).

RECURSO	1995	1996	1997	1998	1999	2000	TOTAL
<i>Concholepas concholepas</i> (loco)	24098	15417	21724	14245	14932	9151	99567
<i>Argopecten purpuratus</i> (osti6n del norte)	10497	8421	12007	21382	24545	19326	96178
<i>Ensis macha</i> (navaja de mar o huepo)	10128	10717	10295	9302	10388	8461	59292
<i>Venus antiqua</i> (almeja)	8179	9746	7764	9048	8626	7828	51192
<i>Gari solida</i> (culengue-almeja)	10005	9590	9517	4440	7615	6123	47290
<i>Fisurella spp</i> (lapa)	4726	5219	6473	6125	7742	8625	38910
<i>Mesodesma donacium</i> (macha)	3803	3547	4873	4969	1350	621	19164
<i>Tagelus dombeii</i> (navajuela)	3110	4342	4831	4454	4332	4303	25373
<i>Mytilus chilensis</i> (chorito)	1652	1640	2072	3599	5362	8311	22635
<i>Chlamys vitrea</i> (osti6n del sur)	1532	1751	3231	3675	1206	331	11726
<i>Thais chocolata</i> (caracol locate)	1065	1016	1670	1155	677	392	5974
<i>Semele solida</i> (tumbao)	121	559	138	736	63	1914	3532
<i>Trophon geversianus</i> (caracol trophon)	212	225	626	137	211	509	1920
<i>Rapana giganteus</i> (caracol trumulco)	243	262	71	324	0	225	1125
<i>Aulacomya ater</i> (cholga)	232	164	193	201	161	133	1084
<i>Adelomelon ancilla</i> (caracol piquilhue)			395	56	76	85	612
<i>Argobuccinum argus</i> (caracol palo palo)	32	243	119		9	97	500
<i>Mulinia spp</i> (taquilla)	30	51	89	73	75	45	362
<i>Ostrea chilensis</i> (ostra chilena)	3	35	45	34	38	21	177
<i>Odontocymbiola magellanica</i> (caracol picuyo)	0	106				42	148
<i>Megabalanus psittacus</i> (picoroco)	0	18			4	26	48
<i>Choromytilus chorus</i> (choro)	0	7	2	8	0	0	18
<i>Pyura chilensis</i> (piure)	0	8	2	2	1	1	13
<i>Tegula atra</i> (caracol negro)					92	1	93
<i>Xantochorus cassidiformis</i> (caracol rubio)					10	1	11
<i>Crassostrea gigas</i> (ostra del pacífico)					6	1988	1994
<i>Haliotis rufescens</i> (abal6n rojo)					697	1208	1905
caracol s/e					3230	3912	7142
moluscos s/e					767	1000	1767
TOTAL ANUAL	79668	73084	86137	83965	92252	84862	499968

de los cuales s6lo 6 concentraban el 80% de las ventas.

Es importante destacar que las principales empresas procesadoras dependen en parte significativa del suministro de materia prima por parte de un alto n6mero de proveedores. Estos intermediarios contratan buzos y operadores, organizan las faenas de pesca y trasladan la materia prima a los puntos de desembarque. Las consecuencias potenciales de la aparici6n de una FAN, considerando los datos anteriores, son las siguientes:

- Efectos inmediatos: Disminuci6n de la oferta de mariscos, con la consiguiente p6rdida de ventas, debido a restricciones a la cosecha o extracci6n.

Este efecto es inmediatamente posterior a la detecci6n de una FAN, y resulta de las resoluciones que restringen la cosecha, procesamiento y comercializaci6n decretadas por los Servicios de Salud Regionales y por SERNAPESCA.

- Efectos a medio plazo: Como consecuencia de lo anterior, y dependiendo de lo prolongado de la restricci6n impuesta y de la ubicaci6n del 6rea, se puede producir a medio plazo una disminuci6n de la demanda de mano de obra.
- A m6s largo plazo, y si la situaci6n se convierte en cr6nica, se puede producir un desincentivo a las inversiones en el sector productor de mariscos y, en el peor de los casos, cambios en los h6bitos de los consumidores, lo que significa una disminuci6n de la demanda a largo plazo.

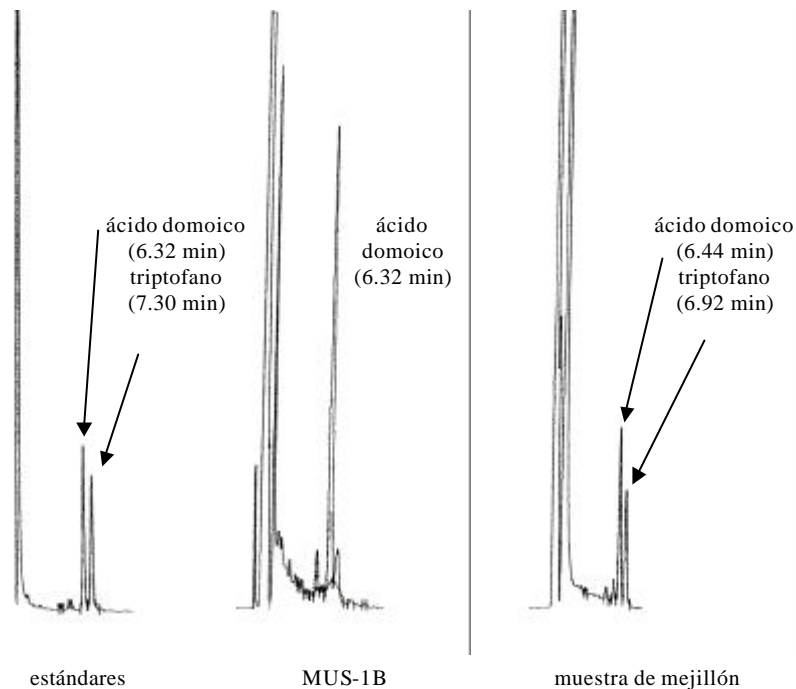


Fig. 2. Cromatograma de estándar de AD y muestras de marisco chileno con AD. Identificación del AD confirmada por el Dr S. Bates, del Department of Fisheries and Oceans (Canadá) mediante HPLC-DAD, por el Dr M. Quilliam, del National Research Council (Canadá) mediante HPLC-MS y por el Dr G. Doucette, del Ocean Services, Charleston, SC, EEUU), mediante radioensayo.

A estos impactos predecibles se suma el riesgo de que el sistema nacional de monitoreo no detecte una partida de exportación que resultara ser tóxica. Si se diese esta catastrófica situación, lo más probable es que se suspendería una parte importante de las compras de mariscos chilenos, incluyendo a la empresa responsable y a las que compartieran la región geográfica.

Estas consideraciones indican que la presencia no detectada de una FAN en Chile podría comprometer la continuidad productiva de una industria que exporta productos por valor de cerca de US\$ 80 millones anuales, sin considerar el consumo interno. Este impacto se expresaría sucesivamente como restricción de cosecha y procesamiento, como disminución de la necesidad de mano de obra y finalmente como disminución de inversiones en este subsector productivo y cambios en hábitos de consumo. Por ello los impactos económicos iniciales son inseparables de los impactos o costos sociales que se expresan a escala nacional más allá de sus efectos específicos en los grupos sociales directamente afectados en las regiones. Estos corresponden a productores, operarios, buzos, pescadores artesanales y sector de servicios

asociados, como las empresas turísticas. En este contexto, los costos de los programas de vigilancia y monitoreo de variables asociadas a las FAN, son varios órdenes de magnitud menores que el valor total de la producción en riesgo potencial. Un ejemplo pertinente de lo anteriormente analizado lo constituyen las experiencias recientes de manejo de brotes tóxicos de VAM en algunas zonas con importantes instalaciones de acuicultura y que se revisan a continuación.

Durante el año 2000 en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile se procesaron 3301 muestras de mariscos para análisis de VAM. El precio por análisis de VAM mediante la técnica de HPLC-UV es de aproximadamente US\$ 40. Esto significa un gasto anual para todos los productores de US\$ 132040. Si se considera que las ventas anuales de exportación del año 2000 superaron los US\$ 80 millones, los gastos por análisis de VAM equivalen sólo al 0.16% de las ventas totales de todo el sistema. Se estima que los costos de análisis de fitoplancton, toxinas marinas, coliformes fecales y metales pesados no superan en la actualidad el 0.7% de las ventas totales de exportación.

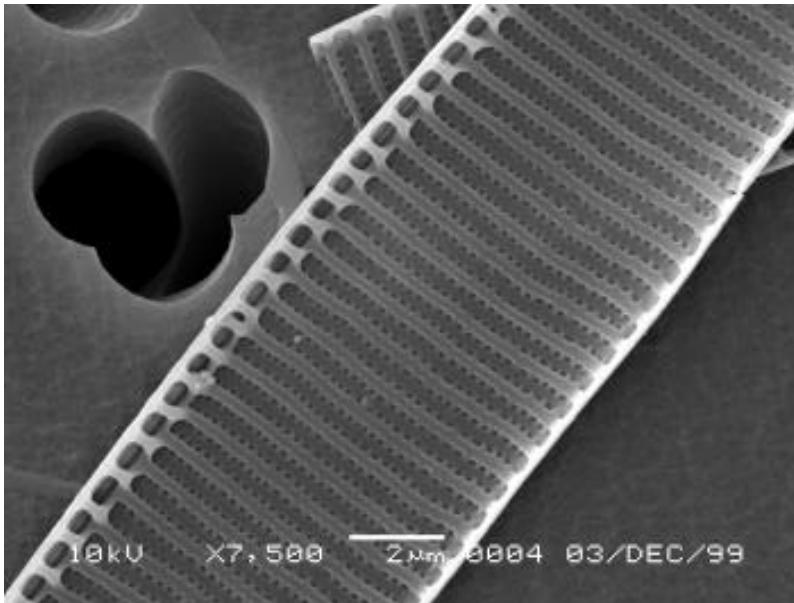


Fig. 3. Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Pseudo-nitzschia australis*. Muestras colectadas en el Sur de Chiloé, el 2 de Noviembre de 1999. (Fotografía tomada por el Dr. Steve Ehrman, del Department of Fisheries and Oceans, Canadá)

BROTOS RECIENTES DE VENENO AMNÉSICO DE LOS MARISCOS (VAM)

Los primeros efectos registrados de Veneno Amnésico de los Mariscos (VAM) en el mundo se observaron a fines de 1987 en las provincias canadienses de Quebec y New Brunswick en el este de Canadá (Bird *et al.*, 1988; Perl *et al.*, 1990; Teitelbaum *et al.*, 1990). Esta intoxicación masiva se caracterizó por síntomas gastrointestinales y anomalías neurológicas poco usuales que afectaron a unas 250 personas y que se produjeron con posterioridad a la ingesta de mejillones (blue mussels o *Mytilus edulis*) provenientes de sitios de cultivo de tres estuarios de la Prince Edward Island. Fallecieron 3 pacientes de edad avanzada y con problemas renales y cardiovasculares y algunos de los supervivientes mostraron signos de perturbación severa en su memoria de hechos recientes. Los estudios multidisciplinarios (Bird *et al.*, 1988) permitieron llegar a la definición del caso clínico específico, a la determinación del ácido domoico como toxina causante, a la identificación de la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* como especie causante y al diseño de las medidas de protección de la salud pública (Perl *et al.*, 1990; Teitelbaum *et al.*, 1990). En las investigaciones mencionadas se definió como caso prototipo de intoxicación por Veneno Amnésico la ocurrencia de:

- uno o más síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, cólicos abdominales) dentro de las 24 horas posteriores a la ingesta de mariscos o bien,
- al menos uno de los siguientes síntomas neurológicos a las 48 horas de la ingesta: confusión, pérdida de memoria, desorientación u otros signos graves como convulsiones o coma.

El ácido domoico (AD) fue detectado en Chile por primera vez en enero de 1997 en extractos de mariscos provenientes de bancos naturales y sitios de cultivo de importancia comercial (López *et al.*, datos no publ.). La determinación de AD se realizó mediante HPLC en fase reversa (Hatfield *et al.*, 1994; Wright & Quilliam, 1995) (Fig. 2). Las concentraciones de AD excedieron el nivel regulatorio de $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido en varios casos. La presencia de AD estuvo asociada a florecimientos con alta dominancia (>90%) de *Pseudo-nitzschia australis* (Fig. 3).

PROTOCOLO SEGUIDO EN LOS ANÁLISIS DE VAM

1. Obtención de muestras de mariscos: Las muestras para análisis de AD fueron enviadas por las empresas acreditadas para exportar a Europa cumpliendo el monitoreo oficial del Programa de Sanitización de Moluscos Bivalvos entre Chile y la Comunidad Económica Europea.

2. Preparación de las muestras: Las muestras fueron preparadas y extraídas según el procedimiento de Wright & Quilliam (1995). Una parte del tejido del marisco se mezcló con 4 partes de la solución de extracción. Se homogeneizaron 10 g de tejido en 40 ml de metanol/H₂O (1:1). La suspensión resultante se centrifugó por 10 min a 5000g. El sobrenadante (extracto crudo) se filtró por filtro de 0.45 µm y se almacenó transitoriamente a 4°C. Análisis de muestras de tejido congeladas a -20°C, después de 6 a 10 meses de almacenamiento, indicaron que no se producía una disminución significativa de la concentración de AD, lo que es consistente con la estabilidad observada en soluciones salinas de AD (Johannessen, 2000). Todos los extractos crudos que mostraron picos en el cromatograma obtenido del análisis por HPLC con tiempos de retención característicos de AD, se sometieron a una extracción en fase sólida usando minicolumnas SAX-SPE y fueron reanalizadas (Hatfield *et al.*, 1994, Wright & Quilliam, 1995). Este método de HPLC dió resultados lineales en el rango 0.25 a 20.0 µg · g⁻¹ de ácido domoico en el tejido de marisco.
3. Cromatografía líquida: El ácido domoico fue detectado por absorción UV a 242 nm (SpectraSYSTEM UV1000) con posterioridad a su separación por HPLC a 40 °C en columna C18 (Phenomenex, tamaño de partícula, 250 x 4.6 mm). Se empleó como fase móvil 15% acetonitrilo, 85% agua y 0.1% TFA, a una velocidad de flujo de 1.4 ml · min⁻¹ (Thermo Separation Spectra SYSTEM P1000). Los cromatogramas fueron integrados automáticamente (Thermo Separation, modelo Cromojet). El tiempo de retención para AD fue de 5 a 7 min (ver Fig. 2). Para controlar y excluir interferencias por triptófano, que eluye en las cercanías del AD en las condiciones descritas, se inyectaron al comienzo de cada corrida cromatográfica 50 µL de una mezcla de AD y triptófano (2.5 y 5.0 µg · ml⁻¹, respectivamente) para así determinar las posiciones relativas de cada pico (la Fig. 3 muestra trazas del HPLC típicas). La confirmación de la presencia de AD se realizó rutinariamente por co-elución de una cantidad conocida de AD estándar añadida a las muestras en estudio.
4. Curvas de calibración. Las curvas de calibración se obtuvieron regularmente por dilución de AD estándar en concentraciones de 0.2, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 y 25.0 µg · ml⁻¹. Las curvas de calibración fueron lineales en ese rango para AD puro. La calibración del HPLC se verificó regularmente con extractos control de especímenes fortificados con 2.5 y 5.0 µg · ml⁻¹ AD y con el material de referencia MUS-1A del National Research Council de Canadá.

Tabla 2. Sinopsis de los brotes de Veneno Amnésico de los Mariscos, entre 1997 y 2000. (Almeja = *Protothaca taca*, choritos = *Mytilus chilensis*, ostión = *Argopecten purpuratus*, ostras = *Ostrea chilensis*).

AÑO	MESES	REGIÓN (L.S.)	RECURSO	Rango de Concentración de AD (µg/g)	Nº de Muestras con AD (microalga asociada)
1997	enero-marzo	X (42°) Chiloé	almejas	0.2 a 15.7	6 (<i>P. australis</i>)
1998	septiembre-octubre	X (42°) Chiloé	almejas choritos	8.3 a 57.2	6
1999	abril	X (42°) Chiloé	almejas	2.3 a 2.7	2
1999	junio	IV (30°) La Serena	ostiones	3.6 a 62.4	6 (<i>P. australis</i>)
1999	julio	III (27°) Caldera	ostiones	2.8	1
1999	noviembre	X (42°) Chiloé	almejas choritos ostiones	0.9 a 59.0	6 (<i>P. australis</i>)
1999	diciembre	X (42°) Chiloé	choritos	0.3 a 16.6	9
Resumen período			1997 a 1999	Nº de muestras >20 µg · g ⁻¹ Nº de muestras <20 µg · g ⁻¹	8 de 1137 (0.15%) 42 de 1137 (3.69%)
2000	septiembre-octubre	III (27°) Bahía Inglesa	ostiones	0.2 a 46.0	2 (<i>P. australis</i>)
2000	noviembre-diciembre	X (42°) Chiloé	almejas choritos ostras ostiones	0.2 a 330	74 (<i>P. australis</i>)
Resumen del año			2000	Nº de muestras >20 µg · g ⁻¹ Nº de muestras <20 µg · g ⁻¹	76 de 3301 (2.30%) 742 de 3301 (22.5%)

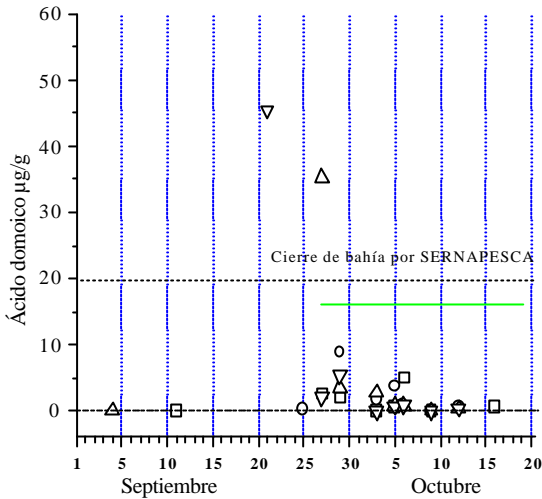


Fig. 4. Ocurriencia de brotes de veneno amnésico en Bahía Inglesa durante septiembre-octubre de 2000.

Se estableció un límite de cuantificación de $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tejido de marisco. Para establecer la variabilidad del método se midió el coeficiente de variación (CV) para cada set de réplicas (3). La variabilidad observada fue menor del 8%.

RESULTADOS

De un total de 1137 muestras de mariscos analizadas entre enero de 1997 y diciembre de 2000, se determinó AD en niveles superiores al nivel regulatorio de $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ solamente en 8 muestras (0.15%) y en otras 42 muestras (3.7%) se detectó AD en concentraciones inferiores (ver Tabla 2).

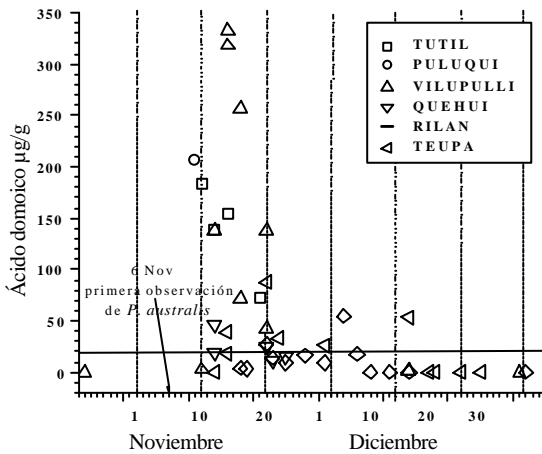


Fig. 5. Ocurriencia de brotes de veneno amnésico en la Isla de Chiloé durante noviembre-diciembre de 2000.

Debido a la alta frecuencia de aparición y amplia distribución de *Pseudo-nitzschia* spp., el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) modificó en 1999 el programa de monitoreo de VAM, determinando mayores frecuencias de muestreo en las áreas previamente afectadas. En el año 2000 el monitoreo preventivo contempló el análisis más frecuente de fitoplancton y de toxinas en mariscos. Esto permitió la detección temprana de dos importantes floraciones de *Pseudo-nitzschia* spp. que ocurrieron durante septiembre y octubre en Bahía Inglesa en el norte del país (27°LS) (Fig. 4) y en la Isla de Chiloé en noviembre ($41^\circ 40'$ a $42^\circ 20' \text{LS}$), en el sur de Chile (Fig. 5).

En algunos casos las floraciones mostraron una dominancia superior al 90% de *Pseudo-nitzschia australis* y alcanzaron valores máximos de densidad a los 7 a 10 días de su detección. Las floraciones fueron seguidas por un rápido incremento transitorio de las concentraciones de AD presentes en mariscos de sitios de cultivo, llegando a niveles superiores a $300 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Estas observaciones determinaron el cierre de Bahía Inglesa por 5 semanas y vedas de 5 a 6 semanas en numerosos sitios de cultivos y áreas de bancos naturales de la Isla de Chiloé. De un total de 3301 muestras analizadas entre enero y diciembre de 2000, 76 muestras (2.3%) contenían concentraciones de AD superiores a $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ y otras 742 muestras (22%) mostraron AD por debajo del nivel regulatorio (0.25 a menos de $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) (Tabla 2). El total de muestras con concentraciones de AD por encima del nivel regulatorio en el año 2000 (76 de 3301) representa un aumento de 15 veces con respecto a los 3 años anteriores (8 de 1137 muestras). Durante el año 2001 no se observaron niveles de AD superiores al nivel de regulación.

A estas observaciones se suma la detección de bajos niveles de AD en el sur de la región de Aysén y en el norte de Magallanes durante el año 2000 en concentraciones no superiores a $0,67 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, cercanas al límite de detección (Pizarro *et al.*, 2000). El análisis del fitoplancton indicó presencia de bajas densidades de *P. australis* y *P. pseudodelicatissima*

El rápido curso temporal del proceso de intoxicación y detoxificación de AD en los choritos (mejillones) durante los brotes del año 2000, que se puede estimar de los cuadros sinópticos de las Figuras 4 y 5, confirma lo observado previamente en dos

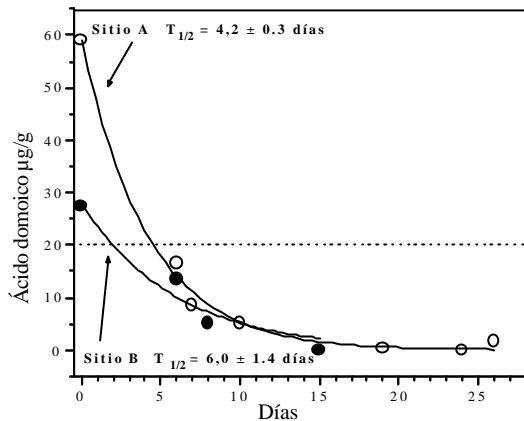


Fig. 6 Detoxificación *in situ* de ácido domoico en mejillones (*Mytilus chilensis*) de sitios de acuicultura.

sitios de cultivos de choritos (*Mytilus chilensis*) a fines de 1999 durante el seguimiento de un brote local de VAM (Fig. 6). Los datos indican que la tasa de detoxificación en choritos es rápida, con $T_{1/2}$ de 4 a 6 días. Este hecho facilitó la definición de la duración de los períodos de muestreo frecuente posteriores al brote para confirmar la desaparición de niveles detectables de AD. Es interesante destacar que el AD también es liberado rápidamente con tasas semejantes del músculo y gónada de ostiones chilenos (*Argopecten purpuratus*) (López *et al.*, datos no publ.) (Fig. 4).

CONCLUSIONES

A diferencia de los casos de VPM y VDM, las floraciones de *Pseudo-nitzschia* en Chile no han sido asociadas a casos registrados de intoxicaciones humanas por VAM, pero han impactado seriamente durante algunos períodos la producción de mariscos y constituyen una amenaza potencial permanente a la salud pública.

La extensión geográfica y la complejidad de los ecosistemas marinos costeros en Chile representan un desafío especial para los programas de monitoreo. Para responder a estas características específicas del país es mandatorio el poder aplicar métodos alternativos confiables pero más simples que aseguren la inocuidad de los alimentos, la protección de la salud pública, el aumento de la producción y que permitan el control de calidad expedito en plantas procesadoras, puntos de desembarque y acopio. La aplicación estricta de las normas establecidas en los Programas de Sanidad de Moluscos Bivalvos no de-

bieran representar un costo excesivo para los productores, toda vez que los montos involucrados constituyen menos del 0.8% de las ventas totales.

En este sentido es muy promisorio la disponibilidad de un método ELISA para la cuantificación de AD desarrollado por Garthwaite *et al.* (1998) que debiera validarse e intercalibrarse con la técnica HPLC reglamentaria (Garthwaite *et al.*, datos no publ.). Esta técnica puede tener costos fijos menores que la técnica HPLC-UV y podría aplicarse en lugares sin acceso a equipos analíticos.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los Proyectos FONDEF-CONICYT Chile N° 2-37 y FONDEF de Transferecia D97T1008 y aportes del Proyecto de Certificación N° 5129 a B.S.I.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcayaga, C., M. Seguel & B.A. Suárez-Isla, 1998. The ion channels of membranes of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* incorporated in planar lipid bilayers. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 598-601.
- Bates, S.S., C.J. Bird, A.S.W. De Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter & J.L.C. Wright, 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci 46: 1203-1215.
- Bird, C.J., R.K. Boyd, D. Brewer, C.A. Craft, A.S.W. De Freitas, E.W. Dyer, D.J. Embree, M. Falk, M.G. Flack, R.A. Foxall, C. Gillis, M. Greenwell, W.R. Harstaff, W.D. Jamieson, M.V. Laycock, P. Leblanc, N.I. Lewis, A.W. McCulloch, G.K. McCully, M. McInerney-Northcott, A.G. McInnes, J.L. McLachlan, P. Odense, D. O'Neil, V.P. Pathak, M.A. Quilliam, M.A. Ragan, P.F. Seto, P.G. Sim, D. Tappen, P. Thibault, J.A. Walter, J.L.C. Wright, A.M. Backman, A.R. Taylor, D. Dewar, M. Gilgan & D.J.A. Richard, 1988. Identification of domoic acid as the toxic agent responsible for the Prince Edward Island contaminated mussel incident. Atlantic Research Laboratory Tech. Rep. 56.
- Fernández, R. & A. Tocornal. 2000. Marea Roja, Desafío para la Salud Pública. II Seminario-Taller de Floraciones de Algas Nocivas: In Enfoque Interdisciplinario e Intersectorial en la Búsqueda del Desarrollo Humano. Punta Arenas, Chile, Noviembre 2000: 9-10.
- Garthwaite I., K.M. Ross, C.O. Miles, R.P. Hansen, D.R.P. Foster, A.L. Wilkins & N.R. Towers, 1998 Polyclonal antibodies to domoic acid, and their use in

- immunoassays for domoic acid in sea water and shellfish. *Natural Toxins* 6 (3-4): 93-104.
- Hatfield, C.L., J.C. Wekell, E.J. Gauglitz Jr. & H.J. Barnett, 1994. Salt clean-up procedure for the determination of domoic acid by HPLC. *Natural Toxins* 2: 206-211.
- Johannessen, J.N., 2000. Stability of domoic acid in saline dosing solutions. *J. AOAC Int.* 83 (2): 411-412.
- Perl, T.M., L. Bédard, T. Kosatsky, J.C. Hockin, E. Todd & R.S. Remis, 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England J. Med.* 322: 1775-1780.
- Pizarro, G., M. Fauré, C. Salgado, L. Guzmán, H. Pacheco, C. Alarcón, M. Banciella & R. Igor, 2000. Análisis de VAM en vectores de la región de Magallanes. In II Seminario-Taller de Floraciones de Algas Nocivas: Enfoque Interdisciplinario e Intersectorial en la Búsqueda del Desarrollo Humano. Punta Arenas, Chile, Noviembre 2000: 9-10.
- Seguel, M.R. 1991. Interactive effects of temperature-light and temperature-salinity on growth of five phytoplanktonic species isolated from a shallow-water embayment of Nova Scotia. M.Sc. Thesis, Acadia University, Wolfville, Nova Scotia, Canada, 218 pp.
- Suárez-Isla, B.A. & P. Vélez, 2000. Paralytic shellfish poisoning (PSP). Biological detection methods. In L. Botana (ed.), *Seafood Toxicity: Mode of Action, Pharmacology and Physiology*. Marcel Dekker Inc., New York: 187-202.
- Suárez-Isla, B.A. & F.L. Guzmán, 1999. Floraciones de Algas Nocivas. Orientaciones en Ciencias, Tecnología y Cultura. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 98 pp.
- Teitelbaum, J.S., R.J. Zatorre, S. Carpenter, D. Gendron, A.C. Evans, A. Gjedde & N.R. Cashman, 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *New England J. Med.* 322: 1781-1787.
- Uribe, P., B.A. Suárez-Isla, B.A. & R.T. Espejo, 1999. Ribosomal RNA heterogeneity and identification of toxic dinoflagellate cultures by heteroduplex mobility assay. *J. Phycol.* 35 (4): 884-888.
- Vélez, P., J. Sierralta, C. Alcayaga, M. Fonseca, H. Loyola, D.C. Johns, G.F. Tomaselli, E. Marban & B.A. Suárez-Isla, 2001. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels. *Toxicon* 39:929-935.
- Wright, J.L.C. & M.A. Quilliam, M.A. 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poison. In Hallegraef, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), *IOC Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides 33. UNESCO: 97-113.

CAPÍTULO 13: FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN URUGUAY: ANTECEDENTES, PROYECTOS EN CURSO Y REVISIÓN DE RESULTADOS

SILVIA MÉNDEZ & GRACIELA FERRARI

Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Constituyente 1497, CP11200, Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN	271
PROGRAMA NACIONAL DE MONITOREO DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS Y TOXICIDAD EN MOLUSCOS	271
Muestreos de fitoplancton y análisis de laboratorio	272
FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS EN URUGUAY	274
<i>Alexandrium tamarense</i> (Lebour) Balech	274
<i>Gymnodinium catenatum</i> Graham	276
Toxinas producidas por cepas de <i>A. tamarense</i> y <i>G. catenatum</i> de Uruguay	278
<i>Dinophysis acuminata</i> Claparède Lachmann y <i>D. caudata</i> Saville Kent	280
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	282
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing	282
OTRAS ESPECIES POTENCIALMENTE NOCIVAS	282
<i>Trichodesmium erythraeum</i> Ehrenberg	283
<i>Nodularia</i> sp.	283
<i>Alexandrium fraterculus</i> (Balech) Balech	283
<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller	283
DISCOLORACIONES	283
QUISTES DE MICROALGAS EN LOS SEDIMENTOS COSTEROS	283
PRINCIPALES CONSIDERACIONES SOBRE LA PROBLEMÁTICA DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN URUGUAY	286
BIBLIOGRAFÍA	286

FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN URUGUAY: ANTECEDENTES, PROYECTOS EN CURSO Y REVISIÓN DE RESULTADOS

SILVIA MÉNDEZ & GRACIELA FERRARI

Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, Constituyente 1497, (CP11200), Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Si bien existen floraciones de microalgas que causan discoloraciones en el agua, los principales problemas relacionados con ellas en Uruguay, se deben a especies, que sin necesidad de alcanzar elevadas concentraciones, producen potentes toxinas que se transmiten a niveles superiores de la cadena trófica e incluso al hombre.

En Uruguay se registró la primera floración de microalgas tóxicas en 1980, cuando se determinó por primera vez la causa de intoxicaciones humanas con sintomatología de toxinas paralizantes (PSP). En esa ocasión, 60 personas resultaron intoxicadas, y 25 de ellas requirieron asistencia médica u hospitalización (Davison & Medina, 1982, 1986; Davison & Yentsch, 1985). No se llegó a la determinación taxonómica de la especie causante de ese episodio aunque se citó la presencia de *Gonyaulax* sp. y *Gymnodinium* sp. Como consecuencia de este primer registro de PSP, se estableció el «Programa Nacional de Monitoreo de Floraciones Algas Nocivas y Toxicidad en Moluscos» en Uruguay en 1980.

Desde entonces, la costa uruguaya y el Frente Marítimo del Río de la Plata, han sido afectados en forma reiterada por floraciones de algas nocivas, con sus consecuentes efectos sanitarios en algunos recursos pesqueros, la salud pública, la economía de las comunidades que viven de la pesca artesanal, las actividades turísticas, e incluso en la gastronomía de la zona costera (Medina *et al.*, 1993; Méndez, 1993; Méndez *et al.*, 1993).

Las áreas afectadas por las floraciones de dinoflagelados tóxicos se sitúan en la margen norte del Río de la Plata y en la costa Atlántica uruguaya, que mide aproximadamente 250 km, mientras que el Río de la Plata interior y los cuerpos de agua continentales están afectados fundamentalmente por floraciones de cianofíceas.

En este trabajo se presenta una síntesis de las floraciones de microalgas que han producido episodios tóxicos en Uruguay, contemplando los aspectos taxonómicos, ecológicos y toxicológicos más relevantes de las principales especies.

PROGRAMA NACIONAL DE MONITOREO DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS Y TOXICIDAD EN MOLUSCOS

El Programa Nacional de Monitoreo de Floraciones Algas Nocivas y Toxicidad en Moluscos está a cargo de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA ex INAPE), del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) de Uruguay, e incluye análisis simultáneos de la toxicidad de los moluscos bivalvos costeros y del fitoplancton.

Por otra parte, la Base Aeronaval Carlos Curbelo brinda su apoyo para el avistamiento de manchas o discoloraciones del agua en la zona costera, y alerta a la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) sobre la presencia de discoloraciones, a fin de realizar las investigaciones pertinentes. El esquema de funcionamiento de este programa de monitoreo se describe en la Fig. 1. Ante la detección de una floración de algas tóxicas cerca de bancos de moluscos de explotación comercial, se establece una veda preventiva mientras dura la floración. Si se detectan niveles de toxicidad por toxina paralizante (PSP) o por toxina diarreica (DSP) en moluscos, superiores a los límites permitidos para el consumo humano, se establece una veda hasta que dos muestreos consecutivos den resultados aptos para consumo. Inmediatamente tras la implantación de la veda, se comunica a las prefecturas locales de Piriápolis, Punta del Este, La Paloma y Barra del Chuy, al Ministerio de Salud Pública y al Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIAT), para que estén alertas ante la situación y brinden colaboración dentro de sus competencias.

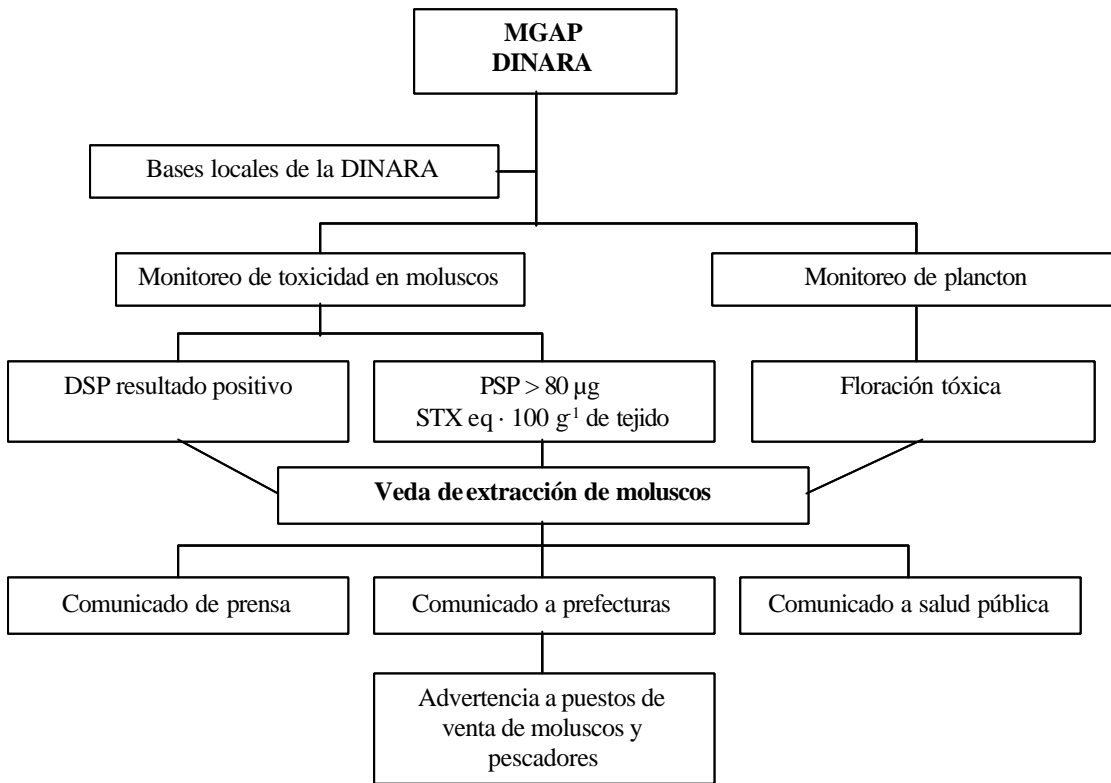


Fig. 1. Esquema del funcionamiento del programa de Monitoreo de Floraciones Algas Nocivas y Toxicidad en Moluscos en Uruguay.

El monitoreo se realiza sobre la base de muestreos periódicos de plancton y de moluscos durante todo el año, a lo largo de la costa, en las áreas de extracción de moluscos para consumo humano. Las estaciones de muestreo que se mantienen fijas, son Piriápolis, Punta del Este y La Paloma (Fig. 2). Cercano a Punta del Este se agrega en verano una estación en el balneario José Ignacio y se monitorean



Fig. 2. Estaciones de muestreo en el Programa de Monitoreo de Floraciones Algas Nocivas y Toxicidad en Moluscos de Uruguay.

moluscos procedentes de la Isla de Lobos y de la Isla Gorriti, durante todo el año, excepto en las épocas en que la extracción del recurso está vedada para su conservación. Los monitoreos de Punta del Diablo y Barra del Chuy a partir de 1998 son esporádicos debido a que no se están extrayendo comercialmente mejillones ni almejas de esa zona. A partir del año 2000 DINARA comenzó un programa de monitoreo de fitoplancton y toxinas PSP, DSP y ASP en bivalvos, en un área situada a 30-40 millas de la costa atlántica uruguaya donde la flota comercial se dedica a la extracción de la almeja *Pitar rostrata* ante la ocurrencia de una floración algal nociva y/o la detección de toxicidad en moluscos se alerta también a los países vecinos a través de los puntos focales del «Grupo de Trabajo Regional COI-FANSA sobre Floraciones Algas Nocivas en Sudamérica».

Muestreos de fitoplancton y análisis de laboratorio

Las muestras para estudio cuantitativo del plancton se toman en superficie, en envases plásticos y se fijan inmediatamente con lugol. Para el estudio cualitativo de la comunidad planctónica se to-

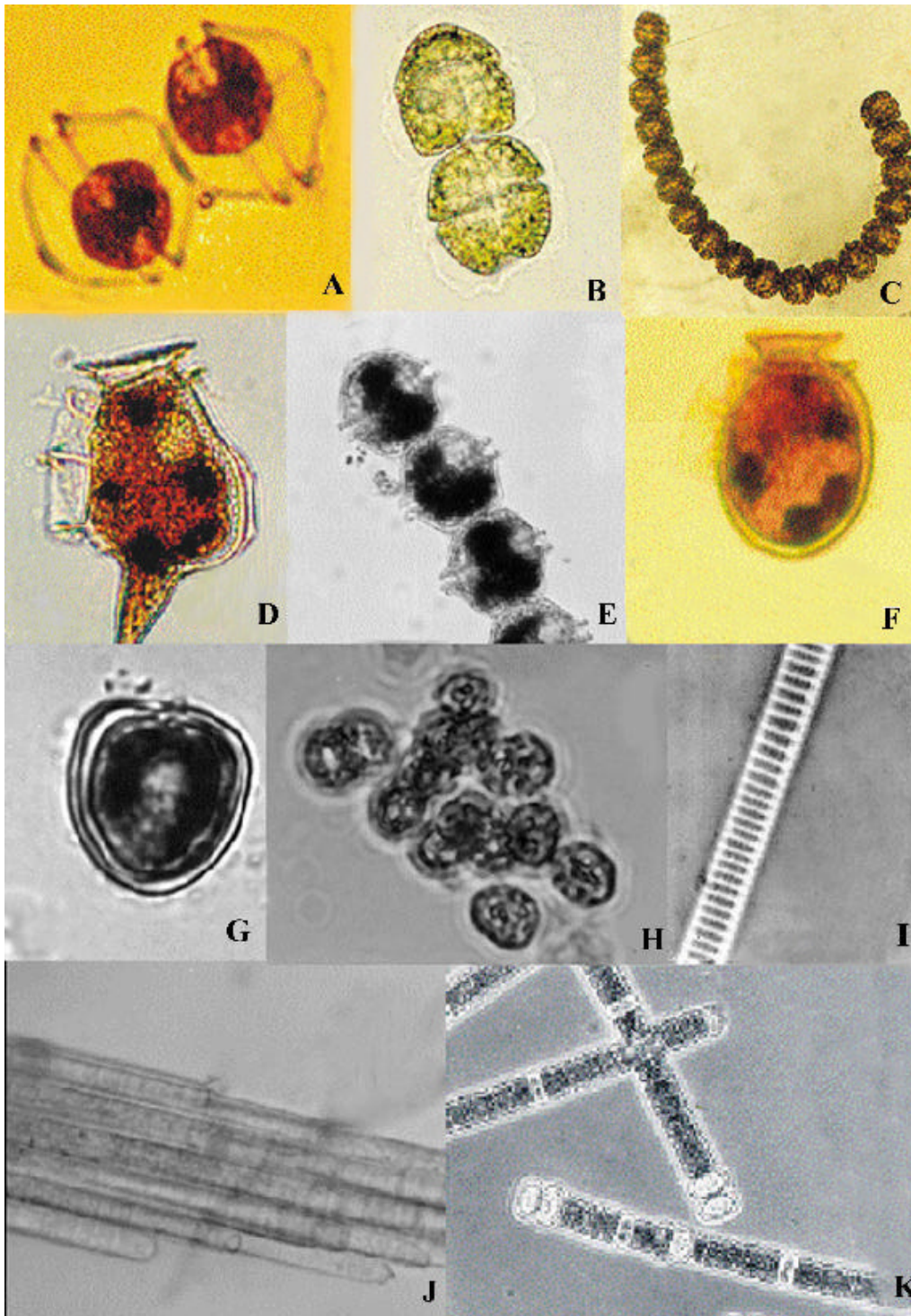


Fig. 3. Imágenes de microalgas de las costas de Uruguay: A) *Alexandrium tamarense*. B-C) *Gymnodinium catenatum*. D) *Dinophysis caudata*. E) *Alexandrium fraterculus*. F) *Dinophysis acuminata*. G) *Prorocentrum minimum*. H) *Microcystis aeruginosa*. I) *Pseudo-nitzschia pungens*. J) *Trichodesmium erythraeum*. K) *Nodularia* grupo *baltica spumigena*.

man muestras integradas de la columna de agua mediante arrastre vertical con red de malla de 25 μm y se fijan con formol neutro. La frecuencia de muestreo de plancton es semanal. Una vez llegadas al Laboratorio de Fitoplancton de la DINARA, las muestras se examinan al microscopio invertido, según el método de Utermöhl (1958), tras sedimentar un volumen de 10 o 25 ml dependiendo de la concentración de células presente.

Los datos de temperatura, salinidad, dirección del viento y turbidez del agua así como del estado y color del mar se registran en cada estación de muestreo.

Para el monitoreo de las zonas de explotación de *Pitar rostrata* las muestras destinadas a estudios cuantitativos de fitoplancton nocivo, se toman con una manguera integradora de 15 m de longitud y 2.5 cm de diámetro.

La toxicidad se determina en mejillones, berberchos y almejas colectados desde la costa en las estaciones fijas, con una frecuencia semanal en verano-otoño y quincenal en invierno-primavera. Las muestras se transportan vivas al laboratorio de Control y Certificación de la DINARA para determinar su toxicidad.

Para determinar la cantidad de toxina PSP presente en la muestra, se utiliza toda la pulpa del molusco y se realiza el bioensayo de ratón descrito en los Métodos Oficiales de Análisis por la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC, Association of Analytical Chemists, 1984).

El programa de monitoreo de toxicidad en Uruguay está dedicado fundamentalmente al control de PSP. Se controla DSP desde febrero de 1992 para lo cual se extrae del animal sólo la glándula digestiva y se realiza el bioensayo de ratón según el método de Yasumoto modificado (Yasumoto *et al.*, 1984). Se consideran muestras tóxicas aquellas que producen la muerte del ratón en menos de 24 horas. Se analiza DSP en moluscos de consumo interno durante las proliferaciones de *Dinophysis* spp. y rutinariamente en todos los moluscos destinados a exportación.

Desde el año 2000 se inició el monitoreo por métodos analíticos de toxina amnésica (ASP) en moluscos.

El bioensayo para determinación de microcystinas se realizó en concentrados de plancton durante episodios de floraciones de cianobacterias,

en colaboración con otras instituciones nacionales. Sin embargo, DINARA está interesado en poner a punto las técnicas para detectar toxicidad por microcystinas en productos pesqueros.

Hasta la fecha existían registros de aparición de toxinas paralizantes, diarreicas y microcystinas de origen microalgal en Uruguay (Medina *et al.*, 1993; Méndez *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2000; de León, 1999). Recientemente, en diciembre de 2001, se registró ácido domoico por primera vez en el país (Medina *et al.*, 2002).

FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS EN URUGUAY

Gracias al programa de monitoreo, se ha hecho un seguimiento de las especies de microalgas asociadas a eventos tóxicos o nocivos en las aguas costeras uruguayas.

Han podido constatarse floraciones de diversas especies, las cuales alcanzan densidades celulares muy elevadas que en algunos casos provocan discoloraciones del agua (ver Tabla 5). Otras especies no producen discoloraciones, y sin necesidad de alcanzar elevadas densidades, producen toxinas que se transmiten a otros organismos acuáticos filtradores, los cuales actúan como vector de intoxicación hacia el hombre.

Alexandrium tamarense (Lebour) Balech

El primer registro de floración de *A. tamarense* (Fig. 3A) en la costa uruguaya fue en el año 1991 y desde esa fecha se han reportado floraciones periódicas. Dado que la especie se observa en el plancton casi exclusivamente a fines del invierno y principios de primavera (agosto-septiembre) (Fig. 4), y teniendo en cuenta la hidrodinámica del área, se cree que ésta se desarrolla fuera de la zona costera uruguaya y el acceso a la costa depende de factores oceánicos, y del caudal y deriva de la descarga del Río de la Plata. El ciclo de vida incluye un estadio de quiste de resistencia que ha sido encontrado en sedimentos de la costa uruguaya en bajas concentraciones. Hipótesis generadas sobre la dinámica de esta especie en el área, permiten suponer que se desarrolla en el sur, asociada a aguas subantárticas de la plataforma bonaerense y es transportada por las corrientes hacia aguas uruguayas (Brazeiro *et al.*, 1997; Carreto *et al.*, 1998).

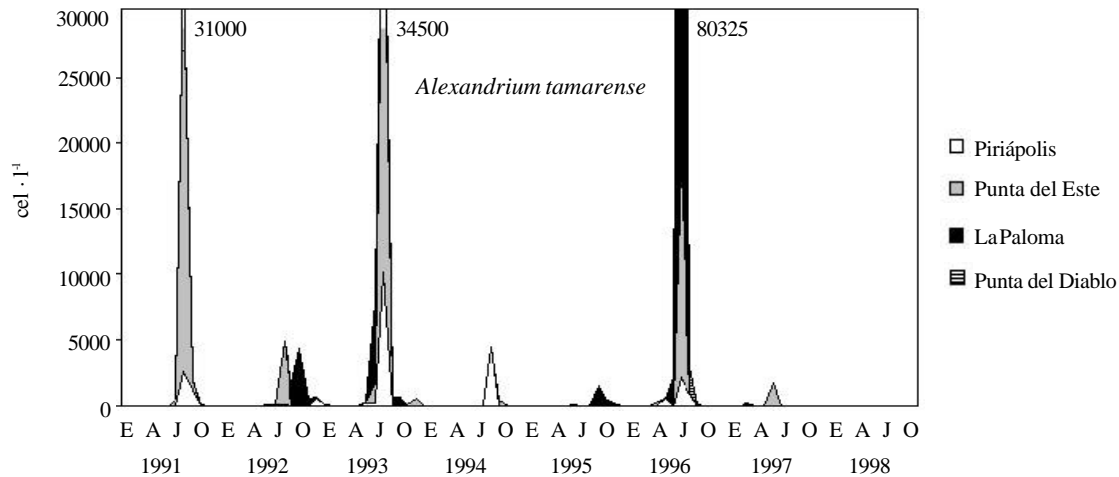


Fig. 4. Abundancia máxima mensual de *A. tamarense* en la costa uruguaya entre 1991 y 1998 en las localidades de Piriápolis, Punta del Este, La Paloma y Punta del Diablo.

Durante la floración de 1991 se alcanzaron niveles de PSP de 8285 $\mu\text{g STX eq.} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa de mejillones (Medina *et al.*, 1993; Méndez, 1993; Brazeiro *et al.*, 1997). En la figura 5 se muestran los niveles de toxicidad detectados durante las floraciones de *A. tamarense* en el período 1991-1998.

En invierno, la oscilación Norte/Sur (NS) de la convergencia subtropical y las aguas costeras subantárticas alcanzan nuestras latitudes. En esta época, durante el descenso de descarga del río, las aguas oceánicas invaden el estuario, permitiendo que *A. tamarense* tome contacto con los bancos costeros de moluscos bivalvos.

La figura 6 muestra la relación entre la aparición de floraciones de *A. tamarense*, la descarga del Río de la Plata y las fluctuaciones de salinidad en el período comprendido entre 1991 y 1994. Las floraciones de *A. tamarense* coincidieron con disminuciones en el caudal del Río de la Plata con el consiguiente aumento de salinidad (Méndez *et al.*, 1996).

Según estudios realizados en base a información de los años 1988 a 1994, el frente de convergencia oscila anualmente aproximadamente entre los 35 y 49° S (Fig. 7). La asociación de las floraciones de *A. tamarense* con los factores oceanográficos sugiere

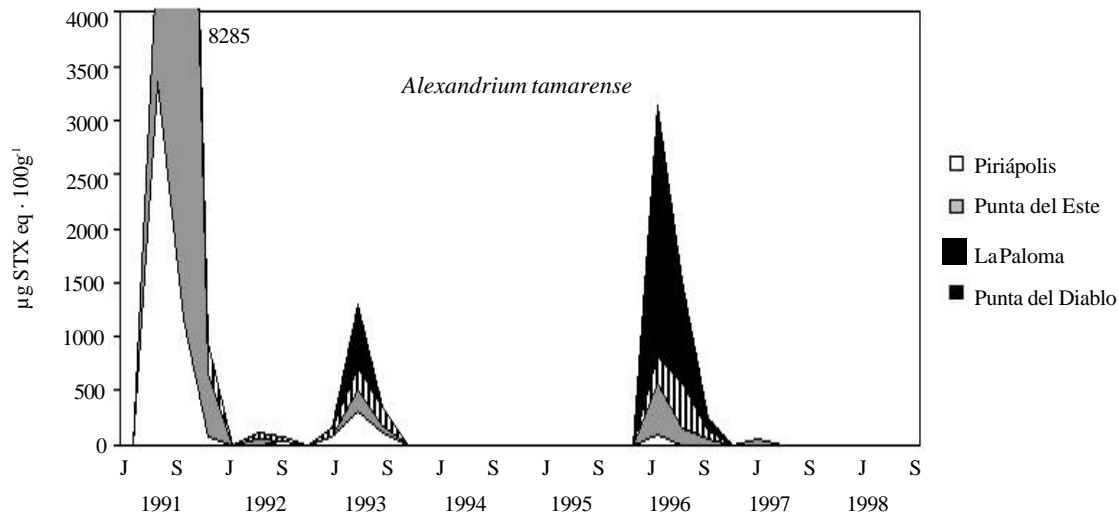


Fig. 5. Contenido de toxinas PSP en mejillones durante floraciones de *A. tamarense* en Uruguay en el período julio-octubre entre 1991 y 1998, en cuatro localidades de muestreo: Piriápolis, Punta del Este, La Paloma y Punta del Diablo.

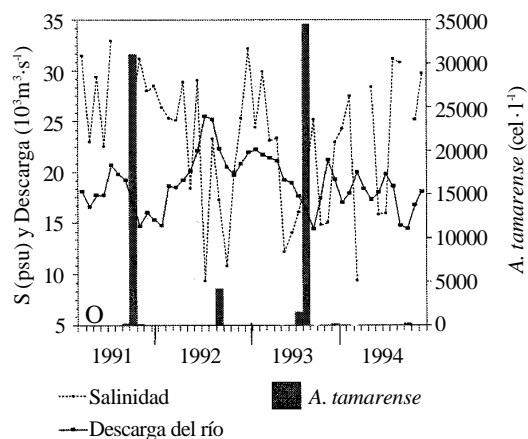


Fig. 6. Relación entre la descarga del Río de la Plata, la salinidad y la densidad de células de *A. tamarense* en el área de estudio (de Méndez *et al.*, 1996).

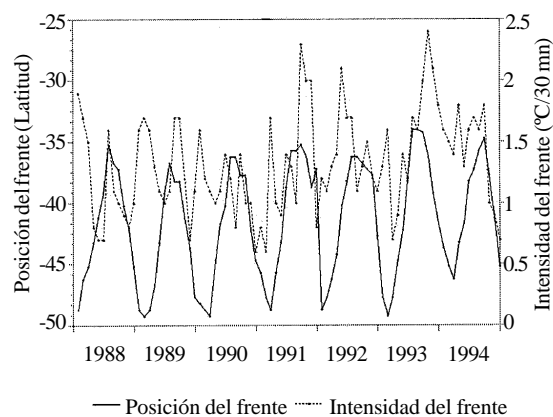


Fig. 7. Posición e intensidad del frente de convergencia entre 1988 y 1994 (de Méndez *et al.*, 1996).

Tabla 1. Floraciones tóxicas de *Alexandrium tamarense* en el período 1980-1999 en Uruguay.

Período tóxico (dd/mm/aa)	PSP máximo <i>M. edulis</i>	PSP máximo <i>D. hanleyanus</i>	Densidad máxima ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$)	Localidad	Sal. (psu)	Temp. (°C)
27/08/91	8285	-	31000	Pta. del Este	29.8	12.5
15/10/91	0	97.6	4300	La Paloma	27.7	17.5
03/10/92	0	97.6	4300	La Paloma	27.7	17.5
27/10/92	0	97.6	4300	La Paloma	27.7	17.5
05/08/93	157.6	-	34500	Pta. del Este	22.6	11
24/09/93	157.6	-	34500	Pta. del Este	22.6	11
6/12/95	40	73	440	La Paloma	32.2	21
14/08/96	473.5	940	16360	Pta. del Este	22.2	12.7
23/10/96	473.5	940	16360	Pta. del Este	22.2	12.7
16/10/97	60.6	0	40	La Paloma	26.1	17

que éstas ocurrieron cuando la posición del frente de convergencia (tomando como referencia la isoterma de los 11°C), alcanzó la posición más septentrional en su oscilación anual. Las floraciones más intensas se produjeron cuando la intensidad del frente, medida como la diferencia de temperatura en 30 millas, fue entre 2 y 2.5 °C (Méndez *et al.*, 1996).

La capacidad de predicción de situaciones de máximo riesgo para la ocurrencia de una nueva floración y sus efectos potenciales en los recursos bentónicos, aumenta cuanto mayor es el conocimiento de las condiciones que propician el desarrollo de las microalgas tóxicas. En la Tabla 1 se presentan, en orden cronológico, las floraciones tóxicas de *A. tamarense* que fueron registradas en Uruguay entre 1980 y 1999. Se incluye información sobre el lugar donde se registró la toxicidad, fecha, valor máximo

de toxicidad alcanzado, máxima densidad de células de la especie causante en ese período, salinidad y temperatura del agua.

Gymnodinium catenatum Graham

Se han registrado en aguas uruguayas cadenas de hasta 80 células de *G. catenatum* aunque lo más frecuente es encontrar cadenas de 4, 8 y 16 células. La ocurrencia de las floraciones de *G. catenatum* (Fig. 3 B,C) en Uruguay es estacional, de verano a otoño, tal como ocurre en otros países, como España (Bravo & Anderson, 1994), donde esta especie prolifera causando efectos nocivos. En la figura 8 se presentan los valores mensuales de abundancia ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *G. catenatum* en el período 1992-1998 y puede observarse que los máximos se registraron entre enero y abril.

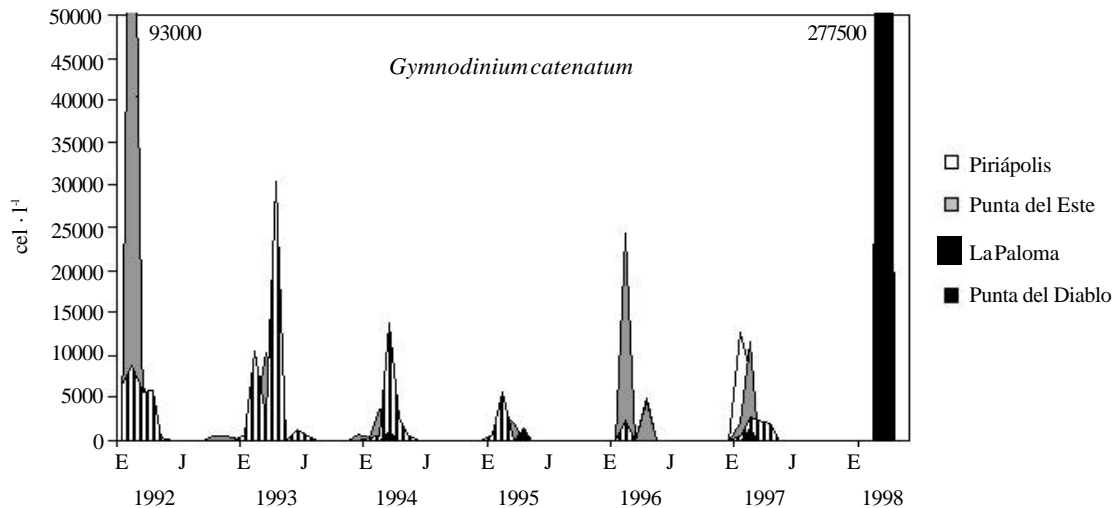


Fig. 8. Abundancia máxima mensual ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *G. catenatum* entre 1992 y 1998 en las estaciones costeras de Piriápolis, Punta del Este, La Paloma y Punta del Diablo.

En marzo de 1998, se observó la máxima densidad de *G. catenatum* ($277500 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) citada tanto para Uruguay como para toda la costa del Atlántico Sudoccidental (Tabla 2). Las condiciones ambientales en las que se desarrolla difieren en las distintas regiones, de ahí la importancia de registrar parámetros físico-químicos durante las floraciones de esta especie.

La temperatura del agua parece jugar un papel preponderante en la proliferación de esta especie en la costa oceánica uruguaya así como en otras partes del mundo. Se supone que los aportes del Río de la Plata influyen en la creación de un ambiente propicio para su crecimiento, ya que es la zona donde se registraron las mayores densidades y las primeras floraciones tóxicas del Cono Sur. Más recientemente *G. catenatum* se ha registrado en el sur de Brasil (Proença *et al.*, 1999).

Si bien los datos experimentales indican que el crecimiento óptimo de esta especie se da entre los 22 y 28 °C (Bravo & Anderson, 1994), las poblaciones naturales en Japón se producen en un rango de temperaturas entre 6 y 15 °C, en Tasmania entre 12 y 18 °C y en Filipinas entre 26 y 29 °C (Hallegraeff & Fraga, 1998).

El mayor desarrollo de *G. catenatum* en Uruguay está asociado a aguas cálidas de verano y principios de otoño y las densidades superiores a $5000 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ se han registrado a temperaturas del agua entre 17 y 25 °C (Fig. 9). Hallegraeff & Fraga (1998)

han considerado a *G. catenatum* como un complejo de especies, no sólo por las diferencias encontradas en la composición química de las toxinas que producen sino también por lo infructuoso del cruzamiento entre algunas cepas.

La primera floración tóxica por PSP producida por *G. catenatum* en la costa uruguaya se registró en febrero de 1992. Durante ésta, los berberechos (*Donax hanleyanus*) alcanzaron niveles de toxicidad de hasta $1478 \mu\text{g STX eq} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa, y los mejillones (*Mytilus edulis*) hasta $387 \mu\text{g STX eq} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pulpa (Méndez & Brazeiro, 1993; Méndez *et al.*, 2001). Nuevos picos de toxicidad por PSP fueron registrados durante floraciones de *G. catenatum* en abril de 1993, marzo de 1994, abril de 1996 y marzo de 1998 (Méndez & Ferrari, en prensa).

Estos fueron los primeros registros de floraciones tóxicas de *G. catenatum* en el Atlántico Sudoccidental a pesar de que esta especie ya había sido citada tiempo atrás por Balech (1964). Los eventos de toxicidad en moluscos asociados a floraciones de esta especie en la costa uruguaya tienen lugar entre febrero y abril (Fig. 10).

Considerando la ausencia de *G. catenatum* en el plancton durante el resto del año, y la presencia de quistes en los sedimentos (Méndez, 1995a; Méndez *et al.*, 2001), se ha hipotetizado que el inicio de las floraciones se puede desencadenar por la resuspensión de quistes en momentos de adecuada temperatura y nutrientes para su desarrollo.

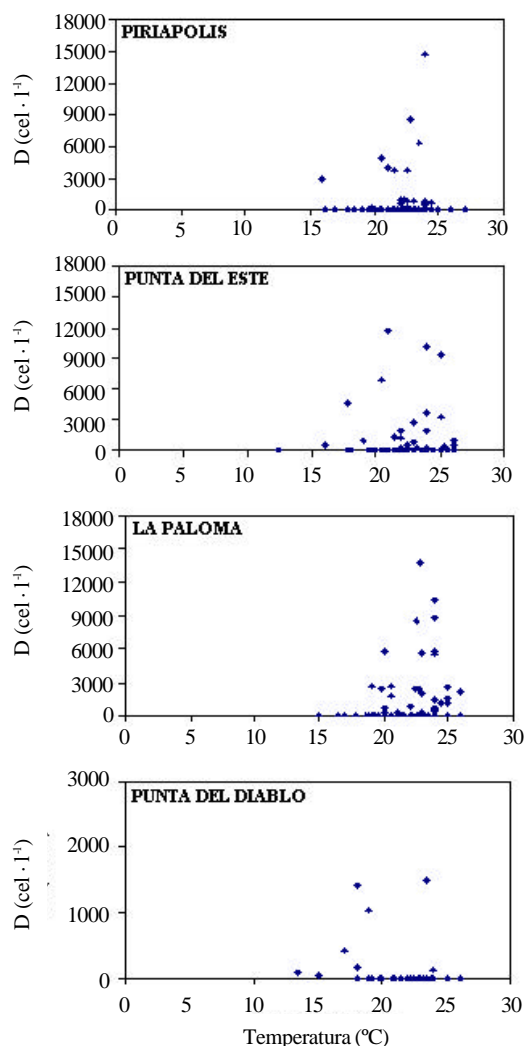


Fig. 9. Dispersión de la concentración de *G. catenatum* en función de la temperatura del agua en Uruguay, entre 1992 y 1998.

Toxinas producidas por cepas de *A. tamarense* y *G. catenatum* de Uruguay

Los estudios realizados en extractos de cinco cultivos establecidos a partir de quistes colectados en sedimentos de Uruguay, muestran que el contenido intracelular de toxinas de *G. catenatum* es mayor (153 y 233 μM) que el de *A. tamarense* (59, 44 y 106 μM). Sin embargo, la toxicidad de los cultivos de *A. tamarense* (10014; 9697 y 26332 fg STX eq. \cdot cel $^{-1}$) fue igual o mayor que la de *G. catenatum* (9801 y 15189 fg STX eq. \cdot cel $^{-1}$) (Méndez *et al.*, 2001).

Los bajos valores de toxicidad asociados a altas concentraciones molares de toxinas en los cultivos de *G. catenatum* resultan de la gran proporción (> 96% molar) de derivados N-sulfocarbamoylados, como C1-4, GTX5 y GTX6. Las toxinas más potentes, como GTX1,4 y GTX2,3 son detectadas en niveles muy bajos (Fig. 11 A).

El perfil de toxinas en cultivos de *A. tamarense* presenta niveles significativos de Gonyautoxinas (24% - 47% molar), pero está dominado por toxinas de baja potencia, como la C1 y C2 (49-67 %).

Los extractos de cultivos de *G. catenatum*, sometidos a hidrólisis ácida, presentaron concentraciones más elevadas (50597 y 102723 fg STX eq. \cdot cel $^{-1}$) de derivados carbamatos tóxicos, que los cultivos de *A. tamarense* (20681, 13875 y 29108 fg STX eq. \cdot cel $^{-1}$). Los extractos hidrolizados de *G. catenatum* presentan altas proporciones de GTX1,4 y GTX2,3 y NEO (Fig. 11 B) mientras que las Gonyautoxinas 1-4 constituyen entre el 83% y 95% de los extractos ácidos de *A. tamarense* (Méndez *et al.*, 2001).

Tabla 2. Floraciones tóxicas de *Gymnodinium catenatum* registradas en el período 1980-1999 en Uruguay.

Período tóxico (dd/mm/aa)	PSP máximo <i>M. edulis</i>	PSP máximo <i>D. hanleyanus</i>	Densidad máxima (cel \cdot l $^{-1}$)	Localidad	Salinidad (psu)	Temperatura (°C)
17/02/92	387	1478	40000	Punta del Este	31.1	24.5
16/03/92			93000	La Paloma		
12/03/93	290	150	10400	Punta del Este	26.7	24
13/04/93			26000	La Paloma		
25/02/94						
17/03/94		125	3600	Punta del Este	22.6	24
14/02/96	67.3		24000	Punta del Este	31.9	23
23/04/96	60		4800	La Paloma	16.2	20
17/03/98	167		277000	Punta del Diablo	19	23
23/04/98						

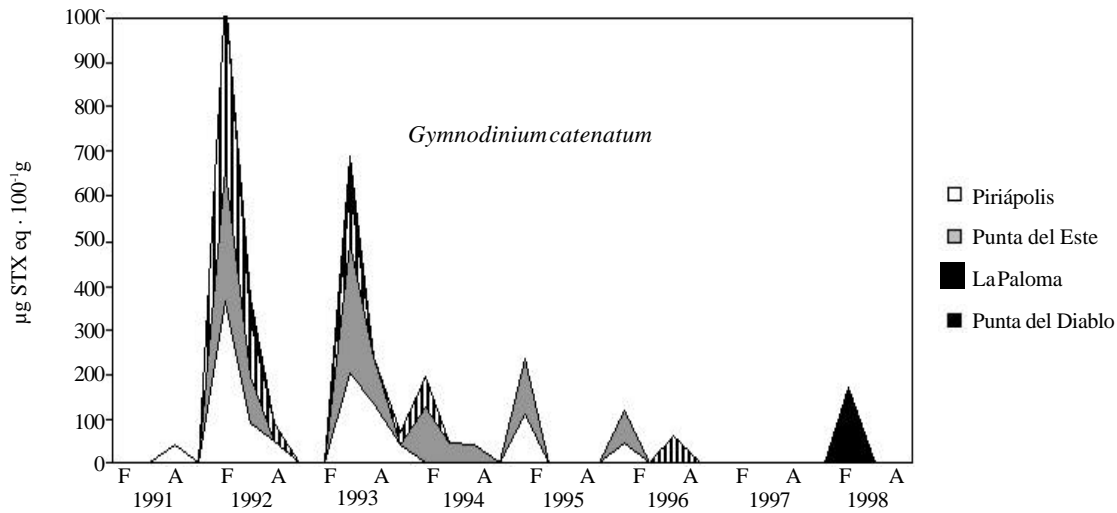


Fig. 10. Concentración de toxinas PSP en moluscos durante el verano y otoño (febrero-mayo) entre 1991 y 1998 en Piriápolis, Punta del Este, La Paloma y Punta del Diablo.

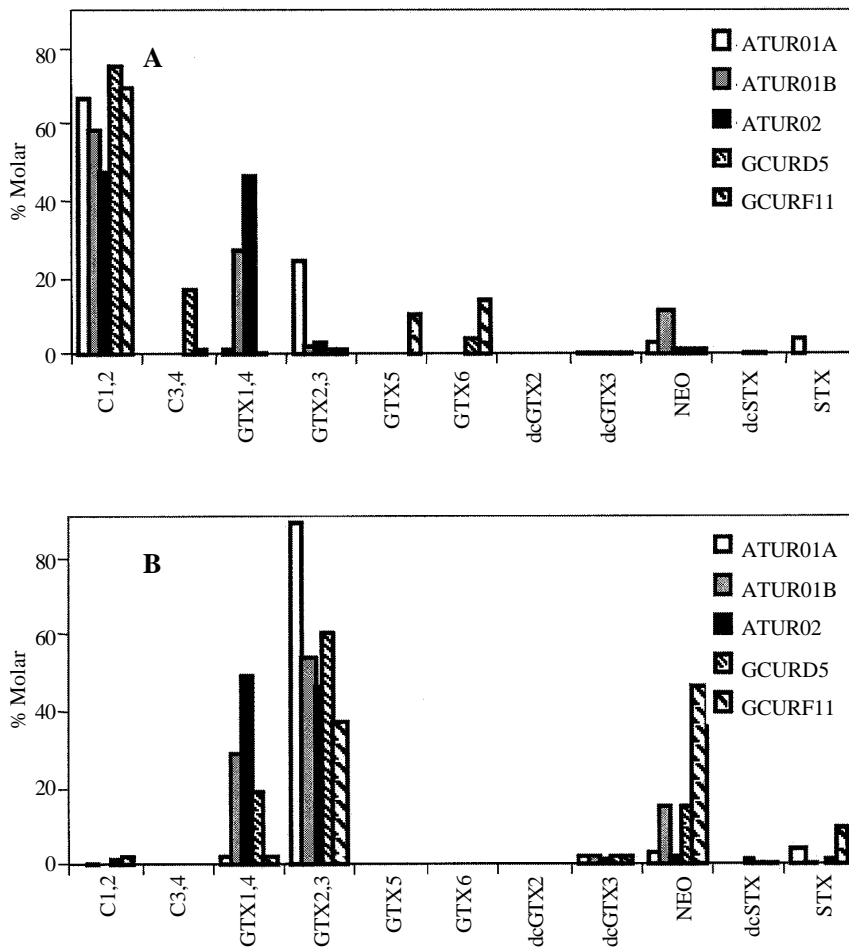


Fig. 11. Composición de toxinas de cepas de dinoflagelados de Uruguay. A) Extractos de cultivos de *A. tamarense* (ATUR01A, ATUR01B Y ATUR02) y de *G. catenatum* (GCURD5 y GCURF11) en ácido acético. B) Extractos de los cultivos en ácido hidrocórico.

Dinophysis acuminata Claparède Lachmann y
D. caudata Saville Kent

Existen varias especies del género *Dinophysis* potencialmente capaces de producir toxinas diarreicas (DSP). En Uruguay se ha detectado en el plancton la presencia de *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. rotundata*, *D. sacculus* y *D. acuta*, pero sólo dos de ellas, *D. caudata* y *D. acuminata* (Fig. 3D,F), han sido asociadas a episodios de DSP en moluscos en Uruguay (Ferrari *et al.*, 2000).

Aunque la presencia de *D. acuminata*, *D. fortii* y *D. rotundata* había sido citada por Balech (1988) para esta región del Atlántico Sudoccidental, no se habían registrado floraciones, ni veneno diarreico en la región previos a los de Uruguay. Durante los episodios de DSP en aguas uruguayas, en los años 1992, 1994 y 1996, se detectaron toxinas diarreicas en almejas (*Mesodesma mactroides*), berberechos (*Donax hanleyanus*) y mejillones (*Mytilus edulis*), en varias localidades de la costa (Tabla 3).

D. acuminata se detectó en distintas épocas del año, aunque su presencia en el plancton no es permanente. La densidad celular aumenta notablemente durante los períodos de verano y otoño (enero a mayo), asociada a condiciones oceanográficas caracterizadas por alta temperatura del agua (22 °C-25 °C) y alta salinidad (25-30 ‰) (Fig. 12). Esta mayor abundancia estacional verano-otoño se ha observado en otros países, como Italia (Sidari *et al.*, 1995), España (Reguera *et al.*, 1993), Noruega (Dahl *et al.*, 1996) y Holanda (Peperzak, 1996).

Las proliferaciones de *D. acuminata* son habitualmente precedidas por una comunidad dominada por diatomeas, tales como *Skeletonema costatum*, *Coscinodiscus* spp. y *Ditylum brightwellii*. Denominamos «proliferaciones» de *D. acuminata* a los aumentos notables de la densidad de células, pero las especies del género *Dinophysis* casi nunca son dominantes en la comunidad fitoplanctónica. Normalmente están acompañadas por floraciones de otras especies, como *Mesodinium rubrum*, *Gymnodinium sanguineum*, *G. catenatum*, *Polykrikos kofoidii*, *Scrippsiella trochoidea*, *Trichodesmium erythraeum* y *Pyramimonas* sp. La asociación de proliferaciones de *D. acuminata* con dominancia de otros dinoflagelados fue reportada en otros países como Francia, Suecia, Holanda y Portugal (Reguera *et al.*, 1995).

En Piriápolis, estación con aguas de carácter estuarino (salinidad, 7-33 ‰; temperaturas, 9-27 °C), no se registraron concentraciones de *D. acuminata* mayores que 5000 cel · l⁻¹ en este período, mientras que las concentraciones más elevadas, entre 5 y 15.5 · 10³ cel · l⁻¹ ocurrieron en condiciones más restrictas de salinidad (15-31 ‰) y temperatura (15-25 °C).

En el año 1994 se registró una mortalidad masiva de almejas y berberechos en la costa este de Uruguay sobre la playa de Barra del Chuy. Este evento coincidió con una proliferación de *D. acuminata*, *D. caudata* y resultados positivos de bioensayo en ratones para toxina diarreica (Méndez, 1995 b). No se considera que la presencia de DSP haya sido la causa de dicha mortandad sino una coincidencia, dado

Tabla 3. Floraciones de *Dinophysis acuminata* y *D. caudata* asociadas a episodios tóxicos de DSP registrados en el período 1980-1999 en Uruguay.

Localidad	Fecha (dd/mm/aa)	Molusco	DSP	Especies asociadas	Densidad (cel · l ⁻¹)	Salinidad (psu)	Temperatura (°C)
Piriápolis	07/02/92	<i>M. edulis</i>	+	<i>D. acuminata</i>	1500	31.3	25
P. del Este	07/02/92	<i>M. edulis</i>	+	<i>D. caudata</i>	40	30.2	26
La Paloma	07/02/92	<i>M. edulis</i>	+	<i>D. acuminata</i>	2000	26.8	25
P. del Diablo	21/01/92 07/02/92	<i>M. edulis</i>	+	<i>D. acuminata</i>	4480	31.5	22
Chuy	13/12/94	<i>M. mactroides</i>	+	<i>D. caudata</i>	4600	26.8	22
La Paloma	16/02/96 08/03/96	<i>D. hanleyanus</i>	+	<i>D. acuminata</i>	80	31.4	22.7
La Paloma	18/02/96	<i>D. hanleyanus</i>	+	<i>D. acuminata</i>	80	32.3	24

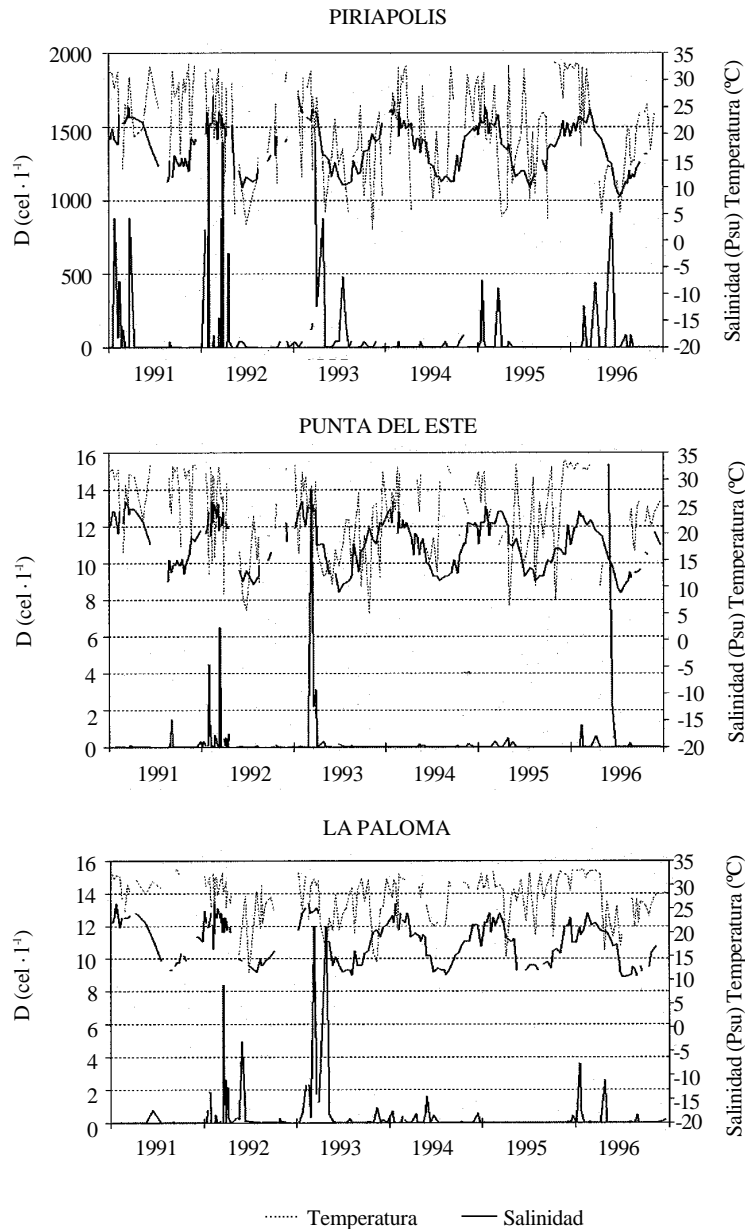


Fig. 12. Variación anual de la densidad de *Dinophysis acuminata* ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) la salinidad y la temperatura del agua en tres localidades de la costa Uruguaya: Piriápolis, Punta del Este y La Paloma (de Ferrari *et al.*, 2000).

que posteriormente se han vuelto a registrar mortandades de almejas sin relación con toxicidad. El mismo fenómeno de mortandad masiva ocurrió ese año en las playas contiguas de Brasil, y al año siguiente en Argentina (Fiori, 1996).

Hasta el momento no se han cultivado ninguna de estas dos especies en Uruguay, y existen grandes dificultades a nivel mundial para mantenerlas en cul-

tivo. No obstante, resultados preliminares parecen confirmar su toxicidad. Durante una proliferación de *D. acuminata* y *D. caudata* en la costa uruguaya, que alcanzó niveles de $7000 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de *Dinophysis* spp., en el invierno de 1998, se obtuvieron concentrados celulares multiespecíficos mediante arrastres de red de fitoplancton. En los cromatogramas obtenidos de los análisis por HPLC (con detección fluorimétrica) de los extractos de estos concentra-

dos, se observó un pequeño pico con el mismo tiempo de retención que el del ácido okadaico (M.L. Fernández, com. pers.).

Pseudo-nitzschia spp.

Varias especies del género han sido citadas por producir toxina amnésica y ocasionar daños a la salud humana en varias partes del mundo. Aunque la presencia de *P. australis*, *P. delicatissima* y *P. pungens* (Fig. 3I) había sido reportada en la región en varias oportunidades (Machado, 1976; Burone, 1984; Ferrario & Galván, 1989), la presencia de toxina amnésica (ácido domoico) en moluscos de Uruguay, en concentraciones por debajo de las admitidas para consumo humano, no fue registrada hasta diciembre de 2001 (Medina *et al.*, 2002).

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing

Microcystis aeruginosa es una especie de cianobacteria característica de agua dulce, pero ocasionalmente aparece en aguas de estuario. En el Río de la Plata las floraciones de cianobacterias, especialmente las de *M. aeruginosa* (Fig. 3H), se han registrado frecuentemente en verano, extendiéndose desde Colonia hasta la costa oceánica produciendo extensas manchas color verde brillante.

Durante el verano de 1997, en enero y marzo, se tomaron muestras de una floración de *M. aeruginosa* en Piriápolis y Punta del Este y se analizaron por

bioensayo en ratón, gracias a la colaboración del laboratorio de la Fundación Universidad de Río Grande (FURG- Brasil), detectándose resultados positivos con una Dosis Letal DL_{50} de 233 y 203 $mg \cdot kg^{-1}$ de ratón respectivamente, lo que equivale a valores de toxicidad medios.

Otra floración de *M. aeruginosa* fue registrada durante febrero de 1999 en la costa del Departamento de Colonia. El Departamento de Limnología de la Facultad de Ciencias realizó un seguimiento en el transcurso de la floración. La toxicidad, determinada por bioensayo de ratón en DINARA, dio resultados positivos. Los niveles de microcistina se estimaron entre 100 y 1000 $\mu g \cdot l^{-1}$ (de León, 1999).

Estos episodios constituyen los primeros registros de toxicidad de floraciones de cianobacterias en Uruguay.

OTRAS ESPECIES POTENCIALMENTE NOCIVAS

Las proliferaciones masivas de cianobacterias se han registrado en todas partes del mundo y se conocen al menos veinte géneros productores de toxinas y responsables de frecuentes envenenamientos de animales y de efectos nocivos para la salud humana por el uso de agua para consumo o recreación.

En Uruguay suelen proliferar en el período de verano, entre enero y marzo, como lo muestra la Tabla 4.

Tabla 4. Registro de Floraciones de Cianobacterias (n/d= no determinado).

Especie	Fecha (dd/mm/aa)	Toxicidad	Localidad	Salinidad (psu)	Temperatura (°C)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	16/3/92	n/d	Montevideo	n/d	n/d
	27/1/94	n/d	Montevideo - Punta del Este	2	23
	30/1/97	DL_{50} 233,3 mg Kg/ratón	Colonia - Punta del Este	n/d	n/d
	29/3/97	DL_{50} 203,1 mg Kg/ratón	Portezuelo Punta del Este		
	2/99	100-1000 $\mu g/l$	Colonia	n/d	n/d
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	30/1/95	n/d	La Paloma	29.2	23.5
<i>Nodularia baltica-spumigena</i>	30/1/96	n/d	35° 40' Lat S 54° 26' Long W	n/d	18
	3/1990	n/d	Laguna de Castillos	n/d	n/d

***Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg**

Trichodesmium erythraeum es una especie de amplia distribución geográfica. Si bien es considerada como potencial productora de neurotoxinas, en Uruguay se han registrado floraciones, que causaron discoloración del agua, sin registro de toxicidad en moluscos, ni afecciones respiratorias en humanos (Fig. 3J, Tablas 4 y 5). Las floraciones de esta especie ocurrieron en la costa oceánica de nuestro país en verano. Un nuevo registro de discoloración rojiza por una floración de esta especie se produjo en febrero de 2002, en La Paloma, en condiciones de 23 °C de temperatura y 30.6 psu de salinidad.

***Nodularia* sp.**

En el verano de 1990 se registró una floración de *Nodularia* sp. (Pérez *et al.*, 1999) en una laguna costera, con características morfológicas intermedias entre *N. baltica* y *N. spumigena* (Fig. 3K). Las floraciones de *N. spumigena* Mertens son bien conocidas en el Mar Báltico y en estuarios de Australia donde sus efectos hepatotóxicos, causados por la nodularina, producen mortandades de animales, pero en nuestro país no se han hecho estudios sobre la toxicidad de la especie.

***Alexandrium fraterculus* (Balech) Balech**

El primer episodio tóxico registrado en el Uruguay (1980) fue atribuido a *Gonyaulax* sp. y *Gymnodinium* sp. (Yentsch, 1982; Davison & Yentsch, 1985). En la revisión de este episodio se reidentificó a *Gonyaulax* sp. como *Alexandrium fraterculus* (Balech, 1995).

A. fraterculus ha proliferado durante el verano en aguas uruguayas co-ocuriendo con *Gymnodinium catenatum*, asociado a toxicidad tipo PSP en los moluscos (Méndez & Brazeiro, 1993). Sin embargo, aún no se han establecido cultivos monoespecíficos de esta especie para determinar su toxicidad. Recientemente ha sido registrada en Santa Catarina, en la costa sur de Brasil y se sospecha sobre su toxicidad (Proença, 1999).

***Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller**

En las costas uruguayas se han registrado altas concentraciones de *P. minimum* (10^6 cel · l⁻¹), pero en ninguna oportunidad se registró toxicidad en los moluscos del área de la floración, ni efecto en los

consumidores. No obstante en Argentina se registró toxicidad por bioensayo de ratón, en extractos de plancton y de mejillones durante una floración de *P. minimum* en 1998 (Montoya *et al.*, 1999).

DISCOLORACIONES

Existen varios registros de especies de microalgas que han producido cambios en el color del agua (discoloraciones) en aguas uruguayas, como es el caso de varias especies de diatomeas (*Asterionellopsis glacialis* y *Skeletonema costatum*), dinoflagelados (*Gymnodinium sanguineum*, *Noctiluca scintillans*, *Polykrikos kofoidii*, *P. schwartzii*, *Prorocentrum minimum*, *P. scutellum*, *Scrippsiella trochoidea*), cianobacterias (*Microcystis aeruginosa*, *Trichodesmium erythraeum*) y ciliados (*Mesodinium rubrum*).

La mayoría de ellas son dinoflagelados que florecen en verano-otoño en condiciones de mar calmo y vientos suaves (Ferrari & Méndez, 2000) (Tabla 5). Punta del Este y La Paloma son las áreas más afectadas por estas floraciones, que si bien no son tóxicas, provocan alarma social al presentarse cerca de la costa en los meses de mayor afluencia turística.

QUISTES DE MICROALGAS EN LOS SEDIMENTOS COSTEROS

El ciclo de vida de los dinoflagelados presenta una alternancia de estadios vegetativos móviles y estadios inmóviles o quistes de resistencia. Se han observado dinoflagelados que producen quistes o esporas de resistencia cuando las células vegetativas son expuestas a condiciones desfavorables y también los forman tras la fusión de los gametos, como parte de su ciclo reproductivo sexual.

Es sabido que los quistes pueden desempeñar un papel crucial en la dispersión, iniciación y finalización de la floración algal. Por ello, la información sobre la distribución y abundancia de quistes en sedimentos es esencial para comprender la ecología y la dinámica de las floraciones de dinoflagelados tóxicos. La zonas de mayor concentración de quistes podrían considerarse como áreas de mayor riesgo para la iniciación de futuras floraciones de microalgas tóxicas.

Durante el ciclo de vida, *G. catenatum* se divide vegetativamente por mitosis, formando cadenas. En

Tabla 5. Registro de discoloraciones en la costa uruguaya (1991-1997), temperatura, salinidad y densidad de células del organismo causante (n/d= no determinado).

Especie	Fecha (dd/mm/aa)	Color	Densidad (cel · l ⁻¹)	Localidad	Salinidad (psu)	Temperatura (°C)
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	15/03/91	Púrpura	18.8x10 ⁶	Piriápolis	28	25
<i>Gyrodinium</i> spp. <i>Gymnodinium catenatum</i>	20-23/02/94	Rojo	4x10 ⁷ y 3.6x10 ²	Punta del Este	22.5	24
<i>Polykrikos schwartzii</i> y <i>P. kofoidii</i>	24/2/92	Marrón	10 ⁶	Punta del Este	25	25
<i>Noctiluca scintillans</i>	24/10/92	Rosado	1.26x10 ⁴	La Paloma	16	24
	04/12/92		9.6x10 ⁶	La Paloma	-	-
	16/08/96		55.6x10 ³	La Paloma	12.6	-
<i>Scripsiella trochoidea</i>	08/01/93	Marrón	1.4x10 ⁷	Piriápolis	28	21
<i>Protoperidinium</i> sp.	28/04/93	Rojo	N/d	Punta del Este	17	17.8
<i>Prorocentrum scutellum</i>	14/05/94	Marrón	4.6x10 ⁵	Chuy	-	19
<i>Prorocentrum minimum</i>	15/08/95	Verde	10 ⁷	Piriápolis	20.4	11.5
<i>Chaetoceros</i> spp. <i>S. costatum</i> , <i>T. erythraeum</i>	12/11/92	Beige	n/d	La Paloma	27.5	18
	05/02/93			La Paloma	32	25
	11-17/03/93			La Paloma	31	24.5
<i>Thalassiothrix</i> sp.	23/09/93	Marrón	n/d	Piriápolis	25	13
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	24/09/93 - 14/03/94	Marrón	n/d	Chuy	18-30	14-23
<i>Mesodinium rubrum</i>	02/05/95	Marrón	2.5x10 ⁶	La Paloma	29.1	18.5

la fase sexual de su ciclo produce gametos de signo contrario, que al fusionarse forman una célula móvil y diploide, el planozigoto, que poco después pierde

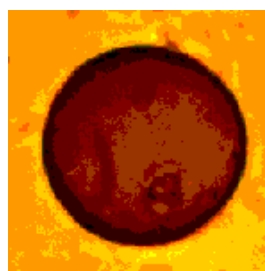


Fig. 13. Quiste de *Gymnodinium catenatum* de Uruguay.

movilidad, desarrolla nuevas cubiertas celulares y da lugar a un quiste de resistencia (hipnozigo). Al germinar el quiste, da lugar a un planomeiocito, de aspecto similar al planozigoto, que se divide por meiosis y produce células vegetativas (Blackburn *et al.*, 1989). Las células solitarias mi-

den 34-65 µm de largo y 27-43 µm de ancho, mientras que las células que forman parte de cadenas son más cortas (Taylor *et al.*, 1995).

El quiste de *G. catenatum* (Fig. 13), es de color marrón oscuro, superficie microreticulada, mide 38-60 µm de diámetro (Bravo, 1986; Anderson *et al.*, 1988) y es fácilmente reconocible en los sedimentos de la costa uruguaya. Estos quistes han sido encontrados en elevadas concentraciones en el área de la Bahía de Maldonado (Méndez, 1995a).

En 1998 se realizó un mapeo de quistes en dos zonas de la costa: Punta del Este (Bahía de Maldonado), área cercana al lugar de mayor extracción comercial de mejillones, y La Paloma, zona don-

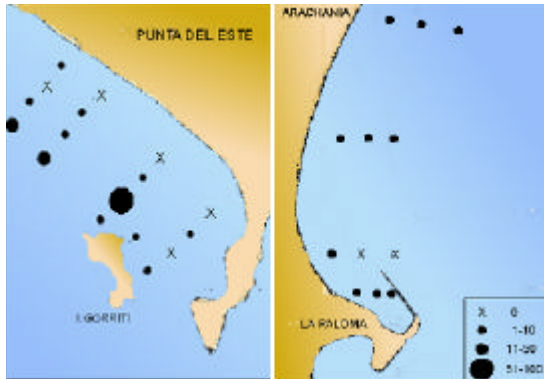


Fig. 14. Distribución de quistes en los sedimentos.

de hasta entonces se desarrollaba la mayor explotación de caracoles de Uruguay (Méndez *et al.*, en prensa).

Es importante destacar que la presencia de quistes es mayor en sedimentos finos como limos o arcillas y casi inexistente en las áreas arenosas, dado que las zonas de depósito de sedimentos finos son áreas más protegidas que facilitan la acumulación. El área de Punta del Este, presenta mayor densidad de quistes que el área comprendida entre el Puerto de La Paloma y Arachania.

En la localidad de Punta del Este, la densidad de quistes alcanzó valores de 60 q · ml⁻¹ y en La Paloma, no superó en ninguna de las estaciones los 10 q · ml⁻¹ (Fig. 14). Cabe señalar que las concentraciones de quistes encontradas en otoño de 1988, son sensiblemente menores que las registradas en muestras

piloto tomadas en el área de Punta del Este en mayo de 1994 (817 q · ml⁻¹, Méndez, 1995a).

Entre las especies de dinoflagelados atecados similares a *Gymnodinium catenatum*, se han descrito hasta la fecha tres especies formadoras de quistes microreticulados en rangos bien diferenciados: *Gymnodinium microreticulatum* (17-28 μm), *G. nolleri* (28-38 μm), y *G. catenatum* (36-62 μm) (Bolch *et al.*, 1999), y otra especie, *Gymnodinium impudicum*, formadora de quistes similares a los de las tres anteriores pero no reticulados (Kobayashi *et al.*, 2001). La distribución de tallas (diámetros) de los quistes *G. cf. catenatum* encontrados en Uruguay dio lugar a una curva multimodal, con dos modas principales de 39 y 20 μm respectivamente, aunque se observaron otras modas con valores intermedios que podrían indicar la presencia de quistes de varias de estas especies (Fig. 15).

Los quistes de menor talla podrían pertenecer a *Gymnodinium microreticulatum*, especie que ha germinado de quistes procedentes de sedimentos de esta zona (Bolch *et al.*, 1999), aunque se sospecha que podría haber quistes de *G. impudicum* entre éstos. Los tamaños de los quistes de ambas especies se solapan y la última especie ha producido floraciones en varias ocasiones en nuestras costas. Dado que se registró un gradiente de tallas de quistes, se aplicó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los resultados de este análisis sugieren claramente la existencia de dos poblaciones diferentes (U= 0.00; p<0.001) Méndez *et al.*, en prensa).

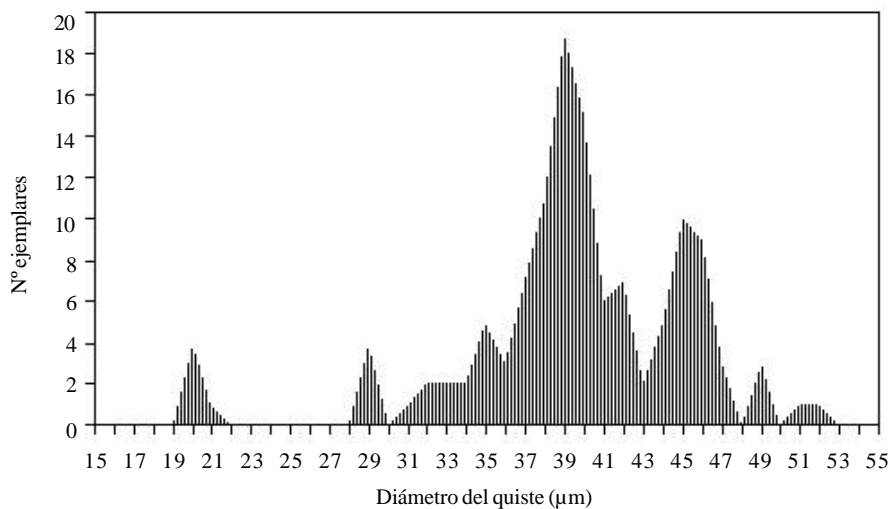


Fig. 15. Quistes de *G. cf. catenatum* encontrados en los sedimentos costeros de Uruguay.

PRINCIPALES CONSIDERACIONES SOBRE LA PROBLEMÁTICA DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN URUGUAY

La mayor parte de los resultados que se presentan en este trabajo sobre floraciones algales nocivas tiene aspectos que son fácilmente aplicables y que aumentan notablemente la capacidad de predicción de estos fenómenos.

La descripción de las condiciones ambientales en que se produjeron las floraciones de las diferentes especies tóxicas registradas hasta el momento y el conocimiento de la época más probable de aparición de éstas, son datos que facilitan enormemente la tarea de monitoreo y previenen al administrador de recursos bentónicos de los riesgos potenciales, tanto en lo que respecta a áreas geográficas, como a épocas del año. A modo de ejemplo, algunos datos relacionados con las microalgas asociadas con la producción de toxinas DSP en Uruguay indican que la especie *D. acuminata* se ha registrado en concentraciones mayores en aquellos lugares de la costa cuyo rango de salinidades y temperatura es más restringido. Por ello en Piriápolis, donde se producen grandes variaciones de salinidad, sería menos probable que proliferara esta especie.

Las máximas concentraciones celulares de *G. catenatum* se registraron en un ambiente caracterizado por un rango de temperaturas entre 17 y 25 °C, mientras que *A. tamarense* ha proliferado a temperaturas entre 11 y 14 °C. Ello nos brinda una posibilidad de predicción de momentos críticos cuando debería intensificarse el control de plancton y detección de toxinas PSP en Uruguay.

G. catenatum, que prolifera normalmente en los meses de verano y principios de otoño, y *A. tamarense*, a finales de invierno y primavera, aparecen ligadas directamente a los ciclos de temperatura del agua de esta zona templada.

La época estival es la de mayor riesgo para la aparición de floraciones tóxicas, cuando aumenta el consumo de moluscos en Uruguay, debido a que constituye uno de los platos típicos para la gran cantidad de turistas que visitan sus costas.

De acuerdo al conocimiento actual se genera la hipótesis de que la proliferación de *A. tamarense* es transportado hacia la costa uruguaya por las corrientes frías del sur, en momentos en que desciende el

caudal del Río de la Plata, mientras que *G. catenatum* podría proliferar a partir de la resuspensión de depósitos de quistes en los sedimentos locales.

Siendo la zona costera un área de escasa profundidad (10-15 m), el viento desempeñaría dos funciones importantes en la dinámica de *G. catenatum*:

- el transporte, acumulación y disgregación del florecimiento, dado que se trata de una especie con capacidad de formar cadenas que le permiten mantenerse en flotación en la capa superficial de agua,
- la resuspensión de los quistes por efecto del oleaje, que permitiría el ingreso de los mismos en las capas superficiales del agua donde las condiciones de luz y temperatura en la temporada estival serían propicias para su germinación e inicio de nuevas floraciones tóxicas.

El Programa Nacional de Monitoreo de Floraciones Algales Nocivas y Toxicidad en Moluscos ha permitido prevenir intoxicaciones, conocer las principales especies de microalgas tóxicas y realizar investigaciones complementarias, teniendo como meta mejorar la capacidad de predecir estos episodios y disminuir los riesgos.

Se ha corroborado la capacidad de algunas especies para producir toxinas. No obstante, existe mucha incertidumbre sobre la taxonomía y toxicidad de algunas especies potencialmente nocivas presentes en el área por lo cual se considera necesario ampliar las líneas de investigación actuales paralelamente al programa de monitoreo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D.M., D.M. Jacobson, I. Bravo & J.H. Wrenn, 1988. The unique, microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J. Phycol.* 24: 255-262.
- AOAC, 1984. Mouse bioassay for PSP toxins. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, secs 18086-18092.
- Balech, E., 1964. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961-1962. *Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata* 4: 1-49.
- Balech, E., 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.* 1: 1-310.
- Balech, E., 1995. The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Special Publication. Cork, Ireland, 151 pp.
- Blackburn, S.I., G.M. Hallegraeff & C.J. Bolch, 1989.

- Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.* 25: 577-590.
- Bolch, C.J.S., A.P. Negri & G.M. Hallegraeff, 1999. *Gymnodinium microreticulatum* sp. nov. (Dinophyceae): a naked, microreticulate cyst-producing dinoflagellate, distinct from *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium nolleri*. *Phycologia* 38 (4):301-313.
- Bravo, I. 1986. Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Invest. Pesq.* 50: 313-321.
- Bravo, I. & D.M. Anderson, 1994. The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. *J. Plankton Res.* 16: 513-525.
- Brazeiro, A., S.M. Méndez & G. Ferrari, 1997. First toxic bloom of *Alexandrium tamarense* in Uruguay: associated environmental factors. *Rev. Atlántica, Río Grande* 19: 19-29.
- Burone, F.S., 1984. Estudio taxonómico de las Bacillariophyceae de la Bahía de Maldonado (República Oriental del Uruguay). Tesis Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 227 pp.
- Carreto, J.I., N. Montoya, A.D. Cucchi Colleoni & R. Akselman, 1998. *Alexandrium tamarense* blooms and shellfish toxicity in the Argentine Sea: a retrospective view. In Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.), *Harmful algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers: 131-134.
- Dahl, E., T. Aune & B. Aase, 1996. Reddish water due to mass occurrence of *Dinophysis* spp. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 265-267.
- Davison, P. & D. Medina, 1982. Control de la toxina paralizante de los moluscos en el Uruguay. In III Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, Actas: 997-1007.
- Davison, P. & D. Medina, 1986. Control de la Toxina Paralizante de los Moluscos en el Uruguay. FAO FI 811/RLAC/37, Chile: 157-174.
- Davison, P. & C.M. Yentsch, 1985. Occurrence of toxic dinoflagellate and shellfish toxicity along the Uruguayan coast, South America. In Anderson, D.M., A.W. White & D.G. Baden (eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York: 153-158.
- De León, L., 1999. Floraciones tóxicas de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* Kützing en el Río de la Plata. In XIV Simposio Científico-Tecnológico de la Com. Tec. Mix. Frente Marit. Montevideo, Resúmenes: 61-62.
- Ferrario, M. & N.M. Galván, 1989. Catálogo de las diatomeas marinas citadas entre los 36° y los 60° S con especial referencia al mar argentino. Dirección Nacional del Antártico, Instituto Antártico Argentino. Publ. N° 20, 327 pp.
- Ferrari, G., S.M. Méndez & A. Brazeiro, 2000. *Dinophysis acuminata* associated to diarrhetic shellfish poisoning reports in Uruguay. *Publ. Com. Tec. Mix. Frente Marit.* 8: 91-95.
- Ferrari, G. & S.M. Méndez. 2000. Report of phytoplankton species producing coastal water discoloration in Uruguay. *Iheringia Sér. Bot., Porto Alegre*, N° 54. 3-18.
- Fiori, S.M., 1996. Massive mortality of yellow clams, *Mesodesma mactroides* in Monte Hermoso Beach, Argentina. *Harmful Algae News* 15, IOC of UNESCO: 9.
- Hallegraeff, G.M. & S. Fraga, 1998. Bloom dynamics of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with emphasis on Tasmanian and Spanish coastal waters. In Anderson, D.M., A.D. Cembella & G.M. Hallegraeff (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, G (41): 59-80.
- Machado, M.T., 1976. Observaciones sobre el plancton del Océano Atlántico Sudoccidental a través de Campañas Oceanológicas (abril de 1965 y abril de 1967). *Inf. Tec. INAPE* 5, 14 pp.
- Kobayashi, S., A. Kojima, I. Shigeru, I. Imai & K. Matsuoka, 2001. Cyst morphology of a chain-forming unarmored dinoflagellate *Gyrodinium impudicum* Fraga et Bravo. *Phycol. Res.* 49: 61-65.
- Medina D., G. Inocente & C. López, 1993. PSP in bivalve along the Uruguayan coast. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 425-428.
- Medina, D., G. Ferrari, S.M. Méndez, G. Inocente, H. Giudice, E. Méndez, M. Salhi, M. Odizzio & D. Otero, 2002. Shellfish monitoring program in Uruguay. Abstracts of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Santiago de Compostela, España.
- Méndez, S., 1993. Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results (1990-1991). In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 287-291.
- Méndez, S., 1995 a. Altas concentraciones de quistes del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* en los sedimentos costeros de Uruguay. *INFOPESSCA CC&I*, Montevideo 1: 3.
- Méndez, S., 1995 b. Bivalve mortality on southwest Atlantic shore. *Harmful Algae News* 10/11, IOC of UNESCO: 12.
- Méndez, S. & A. Brazeiro, 1993. *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium fraterculus* associated with a toxic period in Uruguay. In VI International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes, Abstracts: 139.
- Méndez, S., A. Brazeiro, G. Ferrari, D. Medina & G. Inocente, 1993. Mareas Rojas en el Uruguay. Programa de control y actualización de resultados. *Inf. Tec. INAPE* 46, 31 pp.
- Méndez, S., D. Severov, G. Ferrari & C. Mesones, 1996. Early spring *Alexandrium tamarense* toxic blooms in

- the uruguayan waters. In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 113-116.
- Méndez, S., M. Gómez & G. Ferrari, 1997. Plankton studies in the Río de la Plata and its oceanic front. In Wells, P.G. & G.R. Daborn (eds.), The Rio de la Plata. An environmental overview. An EcoPlata project Background Report. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia: 85-112.
- Méndez, S., D. Kulis & D.M. Anderson, 2001. PSP toxin production of Uruguayan isolates of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium tamarense*. In Hallegraeff, G., S. Blackburn, R. Lewis & C. Bolch (eds.), Harmful Algal Blooms. IOC of UNESCO. 352-355.
- Méndez, S., G. Ferrari & S. Svenson, en prensa. Primer mapeo de quistes de *Gymnodinium catenatum* en sedimentos de la costa uruguaya. Publ. Com. Tec. Mix. Frente Marit. Vol 19.
- Méndez, S. & G. Ferrari, en prensa. Floraciones tóxicas de *Gymnodinium catenatum* en aguas uruguayas. Publ. Com. Tec. Mix. Frente Marit. Vol 19.
- Montoya, N.G., R. Akselman, D. Cucchi Colleoni & J.I. Carreto, 1999. Primer evento tóxico en coincidencia con un florecimiento de *Prorocentrum minimum* en Argentina. In XIV Simposio Científico-Tecnológico de la Com. Tec. Mix. Frente Marit. Montevideo, Resúmenes: 18.
- Peperzak, L., G.J. Snoeijer, R. Dijkema, W.W.C. Gieskes, J. Joordens, J.C.H. Peters, C. Schol, E.G. Vrieling & W. Zevenboom, 1996. Development of a *Dinophysis acuminata* bloom in the River Rhine plume (North Sea). In Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO: 273-276.
- Pérez, M. del C., S. Bonilla, L. De León, J. Smarda & J. Komarek, 1999. A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. Algological Studies 93: 91-101.
- Proença, L.A.O., N. Lagos, L.R. Rorig, M. Silva & S.P. Guimarães, 1999. Occurrence of paralytic shellfish toxins – PST in southern Brazilian waters. Ciencia y Cultura 55 (1): 16–21.
- Reguera, B., J. Mariño, J. Campos, I. Bravo, S. Fraga & A. Carbonell, 1993. Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp. in Galician waters. In Smayda, T.J. & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 559-564.
- Reguera, B., I. Bravo & S. Fraga, 1995. Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. J. Plankton Res. 17: 999-1015.
- Sidari, L., S. Cook, M. Cabrini, A. Tubaro & G. Honsell, 1995. Temporal distribution of toxic phytoplankton in the gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) in 1991 and 1992. In Lassus, P., G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien & C. Marcaillou-Le Baut (eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, París: 231-236.
- Taylor, F.J.R., Y. Fukuyo & J. Larsen, 1995. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. In Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella (eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manual Guides N° 33, UNESCO: 283-319.
- Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9: 1-38.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto & J. Clardy, 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In Ragelis, E.P. (ed.), Seafood Toxins. Am. Chem. Soc., Washington D.C.: 207-214.
- Yentsch, C.M., 1982. Control e investigación de dinoflagelados y toxina parálitica de moluscos. Proyecto URU/78/005 FAO/PNUD, Montevideo, 36 pp.

**PARTE IV. INSTITUCIONES
RELACIONADAS CON LAS FLORACIONES
ALGALES NOCIVAS**

CAPÍTULO 14: ORGANIZACIONES INTERNACIONALES Y REGIONALES RELACIONADAS CON PROGRAMAS Y ACTIVIDADES SOBRE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS

HENRIK O. ENEVOLDSEN¹ & ÁNGELES AGUILERA²

¹ IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca.

² COI-IEO Centro Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas. Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apdo. 1552. 36280 Vigo, España.

INTRODUCCIÓN	293
ORGANIZACIONES GUBERNAMENTALES	293
Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO	293
<i>Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO</i>	293
PROGRAMA DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS DE LA COI (UNESCO)	294
DIRECCIONES DE CONTACTO	294
Agencia Internacional de Energía Atómica de las Naciones Unidas	295
<i>International Atomic Energy Agency of the United Nations (IAEA)</i>	295
DIRECCIONES DE CONTACTO	295
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)	296
<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO)</i>	296
DIRECCIONES DE CONTACTO	296
Organización Mundial de la Salud (OMS)	296
<i>World Health Organization (WHO)</i>	296
DIRECCIONES DE CONTACTO	297
Organización Marítima Internacional (OMI)	298
<i>International Maritime Organization (IMO)</i>	298
DIRECCIONES DE CONTACTO	299
Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM)	299
<i>International Council for the Exploration of Sea (ICES)</i>	299
DIRECCIONES DE CONTACTO	299
ORGANIZACIONES GUBERNAMENTALES NO ESPECIALIZADAS QUE FINANCIAN INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON HAB	300
Comisión de las Comunidades Europeas (CCE). Unión Europea	300
<i>Commission of the European Communities (CEC). European Union</i>	300
DIRECCIONES DE CONTACTO:	300
ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES	300
Sociedad Internacional para el Estudio de Algas Nocivas	300
<i>International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA)</i>	300
DIRECCIONES DE CONTACTO:	301

Comité Científico para la Investigación Oceanográfica	301
<i>Scientific Committee on Ocean Research (SCOR)</i>	301
DIRECCIONES DE CONTACTO	301
Sociedad Internacional de Toxinología (SIT)	301
<i>International Society for Toxinology (IST)</i>	301
DIRECCIONES DE CONTACTO	301
Unión Internacional para la Química Básica y Aplicada	302
<i>International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC)</i>	302
COMISIÓN SOBRE QUÍMICA DE LA ALIMENTACIÓN	302
COMMISSION ON FOOD CHEMISTRY	302
DIRECCIONES DE CONTACTO	302
Asociación de Químicos Analíticos Oficiales	302
<i>Association of Official Analytical Chemists (AOAC)</i>	302
COMITÉ DE METODOLOGÍA SOBRE TOXINAS NATURALES	302
METHODS COMMITTEE ON NATURAL TOXINS	302
DIRECCIONES DE CONTACTO	303
ORGANIZACIONES LATINOAMERICANAS INTERGUBERNAMENTALES	303
Organización de Estados Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Tecnología (OEI)	303
DIRECCIONES DE CONTACTO	304
ORGANIZACIONES NACIONALES LATINOAMERICANAS	304

ORGANIZACIONES INTERNACIONALES Y REGIONALES RELACIONADAS CON PROGRAMAS Y ACTIVIDADES SOBRE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS

HENRIK O. ENEVOLDSEN* & ÁNGELES AGUILERA**

* IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 2D, DK-1353, Copenhagen K, Dinamarca.

** COI-IEO Centro Científico y de Comunicación sobre Algas Nocivas. Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Cabo Estay, Canido. Apdo. 1552. 36280 Vigo, España.

INTRODUCCIÓN

El objetivo fundamental de este Capítulo es facilitar la comunicación de científicos y gestores con las distintas organizaciones, tanto regionales como internacionales, que poseen programas vigentes relacionados con microalgas nocivas. Debido a los continuos cambios que sufren estos programas, tanto a nivel de sus actividades, como de su alcance, hemos optado por incluir información básica, con el propósito de evitar que quede obsoleta incluso antes de su publicación. Para una información más detallada y actualizada es necesario contactar directamente con los organismos responsables. En este sentido, a lo largo del texto hemos preferido conservar la terminología inglesa de sílabas y acrónimos empleados en la denominación de las diferentes organizaciones, ya que es la que se emplea más frecuentemente, y por tanto, la más conocida.

Se han incluido tan sólo las organizaciones que tienen a las microalgas nocivas entre sus líneas prioritarias y que se encuentran en la actualidad desarrollando programas de larga duración relacionados con ellas. Existen otras organizaciones con programas a más corto plazo en los que se encuentran implicados los anteriores.

Una importante fuente de información, complementaria de este capítulo, es la página web del programa *Harmful Algal Blooms* (HAB), <http://ioc.unesco.org/hab>. En ella se pueden encontrar las últimas noticias sobre actividades en curso, tales como: a) Publicaciones del boletín *Harmful Algae News*; b) Directorio Internacional de Expertos en Algas Tóxicas; c) Cursos intensivos y otras actividades de capacitación y comunicación organizadas por

los COI-Centros Científicos y de Comunicación sobre Algas Nocivas de Copenhague y Vigo; d) Programas internacionales de investigación sobre ecología y oceanografía de las floraciones algales patrocinados por la COI (por ej. el incipiente programa GEOHAB), así como enlaces para visitar páginas webs de otros programas; d) Información sobre el Grupo de Trabajo ICES/COI sobre Dinámica de Floraciones de Algas Nocivas; Bases de datos de la COI sobre eventos tóxicos (HAEDAT) y sobre sistemas de monitoreo (MONDAT), etc.

ORGANIZACIONES GUBERNAMENTALES

Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO

Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO

La COI fué establecida por la UNESCO en 1960 para desarrollar, recomendar y coordinar programas internacionales para la investigación científica de los océanos, y para prestar servicios relacionados con la explotación de los océanos a los Estados Miembros (126 en la actualidad).

Dentro de Naciones Unidas (ONU), la COI es la única comisión responsable de la investigación oceánica básica. Es además la agencia focal de la ONU para la puesta en marcha de la Agenda 21, Capítulo 17, sobre los océanos. La COI es un cuerpo autónomo, dentro de la UNESCO, que colabora con otras organizaciones pertenecientes o no a la familia de Naciones Unidas.

PROGRAMA DE FLORACIONES ALGALES NOCIVAS DE LA COI (UNESCO)

Antecedentes: El Programa de «Floraciones Algas Nocivas» (Harmful Algal Blooms, HAB) fue iniciado por los Estados Miembros de la COI como un subprograma del Programa IOC-FAO Ocean Science in Relation to Living Resources Programme (OSLR). Como consecuencia de una serie de reuniones internacionales, se diseñó un programa que cubriera aspectos tanto científicos como educativos relacionados con las microalgas nocivas. El programa se encuentra en continuo desarrollo y, desde 1992, es llevado a cabo conjuntamente por los países miembros de la IOC, la Secretaría de la IOC y diversas organizaciones copatrocinadoras a través del Panel Intergubernamental de la IOC sobre HAB (IOC Intergovernmental Panel on HAB, IPHAB).

Objetivos: Promover la gestión eficiente de la investigación científica sobre las floraciones de algas nocivas, mejorar la comprensión de las causas que las producen, predecir su aparición y mitigar sus efectos.

Actividades: Las actividades educativas incluyen diversos cursos prácticos sobre taxonomía, determinación de toxinas y monitoreo de especies nocivas. Se convocan y conceden becas de estudio, y se editan manuales, guías prácticas y directorios sobre varios temas relacionados con microplancton marino nocivo, y una revista divulgativa sobre algas nocivas (Harmful Algal News).

La actividad científica incluye el programa internacional COI-SCOR sobre Ecología y Oceanografía Global de las Floraciones Algas Nocivas (GEOHAB); la organización de grupos de trabajo con el ICES (International Council for the Exploration of the Sea), como el ICES-IOC Grupo de Trabajo sobre Dinámica de HABs (WGHABD) y el desarrollo de proyectos piloto relacionados con el tema. Para facilitar la realización de los cursos y otras actividades educativas, se han establecido dos centros de la COI de apoyo al programa HAB, los «Science and Communication Centres on Harmful Algae» (SCCHA), situados en la Universidad de Copenhague y en el Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía (IEO).

Las actividades operacionales incluyen iniciativas dirigidas hacia la mejora de los sistemas de protección, monitoreo, salud pública y seguridad alimentaria.

A nivel regional, la COI organiza grupos de trabajo en el Pacífico Oeste (WESTPAC-HAB), Sudamérica (COI-FANSA), y Región de IOCaribe y Mareas Adyacentes (COI-ANCA).

Existen diversas publicaciones sobre temas relacionados con las HABs, editadas o coeditadas por la COI, que se pueden solicitar gratuitamente a través de la Secretaría o de los SCCHA de Copenhague y Vigo, o de los centros asociados WESTPAC (Japón), y ECOHAB (EEUU). Entre dichas publicaciones se encuentran la revista *Harmful Algae News*, el *IOC International Directory of Experts in Toxic and Harmful Algae*, el *IOC Manual on Harmful Marine Microalgae*, así como informes varios y actas de conferencias internacionales sobre las HABs.

Conexiones: La COI desarrolla actividades conjuntas con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM), la SCOR, la Sociedad Internacional de Toxinología (ITS), la Asociación Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), y diversas instituciones de los países miembros.

DIRECCIONES DE CONTACTO

Intergovernmental Oceanographic Commission
Harmful Algal Bloom Programme Office. UNESCO
1, rue Miollis. 75732 Paris cedex 15, Francia
Tel.: +33 1 45683983
Fax.: +33 1 40569316
e-mail: hab.ioc@unesco.org
Web: <http://ioc.unesco.org>

Adriana Zingone (Chair IPHAB)
Stazione Zoologica A. Dorhn
Villa Comunale, Napoli 80121, Italia
Tel.: +39 81 5833295
Fax.: +39 81 7641355
e-mail: zingone@alpha.szn.it

Oficina Regional de Ciencia y Tecnología para América Latina y el Caribe
Representación de la UNESCO ante el MERCOSUR
Av. Brasil 2697 p4, P.O. Box 859
11300 Montevideo, Uruguay
Tel: +598 2 7072023 / 2216
Fax: +598 2 7072140
e-mail: orcyt@unesco.org.uy
Web: www.unesco.org.uy

IOC Regional Secretariat for WESTPAC
196 Phaholyothin Road, Chatuchak, Bangkok 10900
Thailandia
Tel.: +66 2 5796000
Fax: +66 2 5796001
e-mail: westpac@samart.co.th

IOC/WESTPAC HAB Task Team Leader
Yasuwo Fukuyo
Asian Natural Environmental Science Center
University of Tokyo. 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8657, Japón
Tel.: +81 3 5841 2782
Fax: +81 3 38184597
e-mail: ufukuyo@hongo.ecc.u-tokyo.ac.jp

IOC Secretaría de la Sub-Comisión para el Caribe y
Regiones Adyacentes / IOCARIBE
Apartado Aéreo 1108
Casa del Marques de Valdehoyos
Calle de la Factoría, Cartagena de Indias
Colombia
Tel.: +575 6646399
Fax: +575 6600407
e-mail: siocarib@col3.telecom.com.co

COI-IEO Centro Científico y de Comunicación
sobre Algas Nocivas
Instituto Español de Oceanografía
Centro Oceanográfico de Vigo
Cabo Estay - Canido, P.O. box 1552
E-36280 Vigo, España
Tel.: +34 986 492111
Fax.: +34 986 492351
e-mail: vigohab@vi.ieo.es

IOC Science and Communication Centre on
Harmful Algae
Botanical Institute, University of Copenhagen
Oster Farimagsgade 2D, DK-1353 Copenhagen K
Dinamarca
Tel.: +45 33134446
Fax.: +45 33134447
e-mail: hab@bot.ku.dk

Leonardo Guzmán (Presidente COI-FANSA))
Instituto de Fomento Pesquero, Magallanes
Casilla de Correo 101, Waldo Seguel 677 Interior,
Punta Arenas, Chile
Tel: +56 61 246650 - 246555
Fax: +56 61 222 915
E-mail: lguzman@ifop.cl

Amelia La Barbera (Presidenta COI-ANCA)
Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
(INIA) - Laboratorio de Toxicología
Ministerio de Ciencia y Tecnología, Av. Carúpano-
Caiguire, Cumaná, Sucre, Venezuela
Tel.: +58-293-4317557
Fax: +58-293-4317557
e-mail: alabarbe@sucre.udo.edu.ve

Agencia Internacional de Energía Atómica de las Naciones Unidas

Internacional Atomic Energy Agency of the United Nations (IAEA)

La IAEA, organización intergubernamental independiente de ciencia y tecnología de la familia de la ONU, actúa como punto focal global para la cooperación nuclear. La IAEA asiste a los Estados Miembros, en el contexto de sus objetivos sociales y económicos, a planificar el uso de ciencia y tecnología nuclear con fines pacíficos. La IAEA desarrolla proyectos de cooperación técnica a nivel nacional, regional e internacional, relacionados con las HAB. El principal foco de actividad es la transferencia tecnológica de ensayos de receptor competitivo para las neurotoxinas, tales como la saxitoxina, que emplean detección radiométrica. El Laboratorio de Medio Ambiente Marino de la agencia en Mónaco ha dado prioridad al uso de técnicas radioactivas para la gestión sostenible de las zonas costeras -la parte de los océanos más cercana al uso y las necesidades humanas. Las actividades incluyen trabajos de laboratorio y de campo sobre temas tales como la contaminación de aguas costeras, las pesquerías, floraciones algales nocivas, y las interacciones tierra/océano. Recientemente la IAEA completó un ejercicio de planificación temática sobre «Uso de Aplicaciones Nucleares e Isotópicas para Tratar Problemas Específicos de Gestión de Zonas Costeras». Copias de este documento marco se distribuirán a quienes lo soliciten.

DIRECCIONES DE CONTACTO

Thomas Tisue
Technical Cooperation Specialist
Department of Technical Cooperation
International Atomic Energy Agency, PO Box 100
Wagramerstrasse 5, A1190 Vienna, Austria
Tel.: +43 1 2600 26042
e-mail: T.Tisue@iaea.org
Web: <http://www.iaea.org>

Florence Boisson
 International Atomic Energy Agency
 Marine Environment Laboratory
 4 Quai Antoine Ier, BP 800, MC 98012
 Monaco Cedex
 Principado de Mónaco
 Tel.: +377 97 977264
 Fax: +377 97 977273
 Web: <http://www.iaea.org/monaco>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO)

Antecedentes y Actividades: La FAO se fundó en 1945 con objeto de mejorar: la nutrición y el nivel de vida, la productividad agrícola y las condiciones de vida de las poblaciones rurales. Hoy día, la FAO es una de mayores agencias especializadas de Naciones Unidas, que lidera la gestión científica para el desarrollo agrícola, forestal, del medio rural y de las pesquerías. FAO tiene 183 estados miembros y una organización miembro, la Unión Europea.

El *Codex Alimentarius* se ha convertido en el punto de referencia global para consumidores, productores y transformadores de los alimentos, agencias nacionales de control alimentario y el comercio internacional de alimentos. El *Codex Alimentarius* brinda una oportunidad única para que todos los países se adhieran a la comunidad internacional en la formulación y armonización de estándares alimentarios y su aplicación global. La resolución 39/248 de las Naciones Unidas recomienda que: «Los gobiernos deberán tener en cuenta la seguridad alimentaria de todos los consumidores, y apoyar, en la medida de lo posible adoptar los estándares establecidos por el *Codex Alimentarius de la FAO* y de la *Organización Mundial de la Salud*»

El Código Alimentario es de gran relevancia para el comercio internacional de alimentos. Para el siempre creciente mercado global, son obvias las ventajas que supone el poseer estándares de calidad alimentaria universales para la protección de los consumidores. Por ello, no es de sorprender que tanto el «Acuerdo para la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (SPS)» como el «Acuerdo sobre Barreras Técnicas al Comercio (TBT)» apoyen la armonización internacional de los estándares

alimentarios. El SPS cita los estándares, directrices y recomendaciones del Código Alimentario como las medidas internacionales preferentes para facilitar el comercio internacional de alimentos. Así pues, los estándares del *Codex* se han convertido en el punto de referencia que sirve para evaluar las directrices y regulaciones nacionales dentro del marco legal de la Ronda de Acuerdos de Uruguay. El Código Alimentario incluye directrices sobre toxinas algales. Dirección: <http://www.codexalimentarius.net/>

Conexiones: Comisión WHO-FAO *Codex Alimentarius*; Comité de Expertos sobre Aditivos Alimenticios (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA)

DIRECCIONES DE CONTACTO

Uwe Barg
 Food and Agriculture Organization (FAO)
 Fishery Resources and Environment Division
 Room NF 517.
 Vialle delle Terme di Caracalla
 00100 Roma, Italia
 Tel: +39 06 52253454
 Fax: +39 06 52253020
 Telex: 610181FAOI
 e-mail: Uwe.Barg@fao.org
 Web: www.fao.org

Oficina Regional para América Latina
 Roberto Samanez Mercado
 Jefe de Operaciones y Proyectos
 Dag Hammarskjöld 3241
 Vitacura, Santiago, Chile
 Tel.: +562 337 2168
 e-mail: Roberto.Samanez@fao.org

Organización Mundial de la Salud (OMS)

World Health Organization (WHO)

La Organización Mundial de la Salud es una agencia de Naciones Unidas cuya misión específica es la protección de la salud pública. La función de la agencia es proteger al consumidor frente a las exposiciones a efectos adversos causados por riesgos alimentarios. El artículo 2 (u) de la Constitución de la OMS da el mandato para desarrollar, establecer y promover estándares internacionales para los alimentos. OMS siempre ha reconocido que el acceso a alimentos adecuados, nutritivos y seguros constituye un derecho de los individuos. Su objetivo es que to-

dos los pueblos mejoren su nivel de vida y para ello, la calidad de la alimentación es un importante requisito.

El Programa Internacional sobre Seguridad de Productos Químicos (International Programme on Chemical Safety IPCS) se estableció para asesorar sobre los riesgos de la exposición a agentes químicos, tanto naturales como sintéticos, para la salud y el medio ambiente.

Objetivos: El IPCS se estableció en 1980 como un programa conjunto de tres organizaciones: la Organización Mundial del Trabajo (OMT), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la OMS, para poner en marcha actividades relacionadas con la seguridad de productos químicos.

La OMS es la Agencia Ejecutiva del IPCS, cuyas funciones principales son; a) establecer las bases científicas para el empleo seguro de productos químicos, y b) reforzar las capacidades y capacitaciones nacionales para el empleo seguro de productos químicos.

El Programa de Sanidad Alimentaria (PSA) de la OMS, establecido en 1978, tiene como objetivo el reducir la carga de enfermedades asociadas a los alimentos. Para alcanzar esta meta, las funciones del PSA son: a) reducir la carga global de enfermedades transmitidas por los alimentos; b) abogar por un enfoque humano de la producción y comercio de los alimentos; c) minimizar el impacto de nuevos riesgos alimentarios; d) suministrar las bases científicas para establecer los estándares de salubridad de los alimentos; e) Dar más importancia a la salubridad de los alimentos como tema sanitaria; f) incrementar las capacidades de los países para mejorar la salubridad de los alimentos.

Actividades: En 1984, el IPCS publicó un trabajo sobre «Criterios de Salud Medioambiental en relación con Biotoxinas Acuáticas (Marinas y de Agua Dulce)» (documento n° 37). Este trabajo incluía las toxinas más importantes, como el grupo de las toxinas paralizantes (PSP), diarreicas (DSP), y las toxinas de la ciguatera (CFP). IPCS-WHO publica las series de trabajos sobre «Criterios de Salud Medioambiental» (Environmental Health Criteria EHC), y de « Directrices para la Salud y la Seguridad (Health and Safety Guides, HSGs).

El Departamento de Protección Medioambiental Humana» de la OMS ha enviado a publicar las «Directrices sobre Calidad de Aguas Potables» y las «Directrices para la utilización segura de Aguas de Recreo», y está trabajando en la preparación de las «Directrices sobre la Calidad de Aguas para Desalinización». Todas estas publicaciones tratan el tema de las algas nocivas y las toxinas algales.

El Programa de Salubridad de los Alimentos ha estado involucrado en enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por biotoxinas. En 1981, se convocó un grupo de trabajo sobre los aspectos de salud pública de las intoxicaciones por productos marinos. En 1984, la OMS publicó «Paralytic Shellfish Poisoning» (publicación en offset n° 79) para ayudar a prevenir los brotes de PSP en los consumidores. En 1989, la OMS desarrolló un asesoramiento sobre aspectos de salud pública de enfermedades causadas por zootias de alimentos marinos, y dió una serie de recomendaciones que incluyen: a) la necesidad de desarrollar métodos de control de toxinas algales en los productos marinos; b) dar pasos para armonizar los niveles de tolerancia de toxinas algales en los productos marinos e investigar sobre las medidas para prevenir la ciguatera. En 1997, un Grupo de Estudio FAO/NACA/WHO sobre temas de salubridad de los alimentos asociados con productos de la acuicultura concluyó que el riesgo que representan para la salud humana las ficotoxinas en peces y crustáceos de cultivo era muy bajo. El PSA ha publicado ejemplos de peces y crustáceos venenosos, e ilustraciones y notas para la identificación de estas especies en internet (<http://www.who.int/fsf/fish/index.html>).

Conexiones: Comité Conjunto FAO-WHO sobre Aditivos de los Alimentos (JECFA) y la Comisión de WHO-FAO para el *Codex Alimentarius*.

DIRECCIONES DE CONTACTO

J. Herrman
WHO Joint Secretary of JECFA
IPCS/World Health Organization
CH-1211 Geneva 27, Suiza
Tel.: +41 22 7913569
Fax.: +41 22 7914848
e-mail: herrmanj@who.int
Web.: <http://www.who.int/pcs>

Jamie Bartram
World Health Organization, Water, Sanitation and Health
Department of Protection of the Human Environment
20 Av. Appia, CH-1211 Geneva 27, Suiza
Fax: +41 22 7914159
E-mail: bartramj@who.int
Website: http://www.who.int/water_sanitation_health/

Hajime Toyofuku
Food Safety Programme
SDE/PHE, World Health Organization
20 Av. Appia, CH-1211 Geneva 27, Suiza
Tel.: +41 22 7914807; 3556
E-mail: toyofukuh@who.ch
Website: <http://www.who.int/fsf>

Organización Panamericana de la Salud (OPS)
WHO Regional Office in the Americas
525 Twenty-third Street, N.W.
Washington D.C. 20037, EEUU
Tel: 1 202 9743396
Fax: 1 202 9743379
Web: <http://www.paho.org>

Organización Marítima Internacional (OMI) *International Maritime Organization (IMO)*

Antecedentes: La Organización Marítima Internacional es la Agencia Especializada de las Naciones Unidas que desarrolla y administra el régimen regulatorio internacional para la seguridad marítima y la prevención de polución por los barcos. La función de la OMI se puede resumir con el slogan «A Barcos más Seguros-Océanos más Limpios» o «Proteger a los Navegantes del Mar-Proteger al Mar de los Navegantes». Además de su papel de Secretaría de Convención, la agencia también suministra asistencia técnica y cooperación a los países en desarrollo para ayudarles en la puesta en marcha de sus convenciones.

Existen evidencias de que los organismos acuáticos se pueden trasladar de un extremo a otro de los mares y océanos a través del agua de lastre de los barcos, provocando importantes problemas medioambientales y de salud. Muchos de los países miembros de la IMO han expresado su preocupación sobre el posible arrastre y difusión a sus áreas costeras de microorganismos fitoplanctónicos tóxicos (principalmente dinoflagelados) mediante este sistema, lo que podría ocasionar intoxicaciones y muertes por con-

sumo de alimentos contaminados, el cierre periódico de granjas marinas, la aparición de mareas rojas, así como pérdidas económicas asociadas a posibles restricciones en las exportaciones.

La OMI ha respondido al problema de las aguas de lastre con las siguientes iniciativas: a) Formación de un Grupo de Trabajo de Agua de Lastre que depende del Comité de Protección Medioambiental Marina (MEPC); b) Adopción de directrices para el control y gestión de aguas de lastre para minimizar la transferencia de organismos acuáticos nocivos y patógenos (Resolución de la Asamblea A.868(20), en lo sucesivo referida como *Directrices OMI*); c) Desarrollo de un nuevo instrumento legal internacional para la gestión de aguas de lastre conocido como «Convención Internacional para el Control y Gestión de Aguas de Lastre y Sedimentos» (en lo sucesivo referida como *Convención sobre las Aguas de Lastre*) que será considerada para su adopción por la Conferencia Diplomática de la OMI a finales del 2003; y d) Unificación de esfuerzos con la Instalación Medioambiental Global (Global Environment Facility, GEF) y el programa PNUMA de las Naciones Unidas, para asistir a los países en desarrollo en la puesta en marcha de las Directrices OMI y prepararse para la «Convención sobre las Aguas de Lastre» a través del Programa Global para Gestión de Aguas de Lastre (GloBallast).

Directrices OMI

Mientras no se adopte la nueva *Convención de las Aguas de Lastre*, los gobiernos y las industrias navales deberían aplicar las *Directrices OMI* como estándares internacionales para la gestión de aguas de lastre. Las *Directrices* están publicadas en la página web de la OMI <http://globallast.imo.org>.

Nueva Convención

La nueva *Convención sobre las Aguas de Lastre* proveerá a la comunidad internacional de un régimen regulatorio uniforme y estandarizado para la gestión global de las aguas de lastre. Se espera que la Convención sea adoptada por una Conferencia Diplomática de la OMI a finales del año 2003. El borrador de la Convención también se puede encontrar en la página web de la OMI.

Programa GloBallast

Antes de la adopción de la nueva *Convención de las Aguas de Lastre*, la OMI ha aunado sus es-

fuerzas con la GEF y el PNUMA para poner en marcha el Programa de Gestión Global de las Aguas de Lastre (GloBallast). Los Objetivos para el Desarrollo de este programa de cooperación técnica son: la asistencia a los países en desarrollo para a) reducir la transferencia de organismos acuáticos nocivos y patógenos por las aguas de lastre; b) poner en marcha las *Directrices OMI* existentes, y c) prepararse para poner en marcha la *Convención de las Aguas de Lastre*. Las actividades también incluyen iniciativas para el fortalecimiento de las instituciones y capacitación.

La página web de la «Asociación Internacional de Armadores Independientes de Buques Cisterna» (INTERTANKO), presenta perfiles de legislaciones, regulaciones y requerimientos nacionales sobre aguas de lastre (www.intertanko.com/tankerfacts/environmental/ballast/ballastreq.htm).

Conexiones: El ICES-IOC-IMO Grupo de Estudio sobre Lastre de Barcos y otros Vectores Navales (SGBOSV); Programa Global sobre Especies Invasivas (GISP); Programa del PNUMA sobre Mares Regionales, y los Proyectos GEF sobre Aguas Internacionales.

DIRECCIONES DE CONTACTO

International Maritime Organization
Director, Marine Environment Division
4 Albert Embankment
London SE1 7SR
Reino Unido
Tel.: +44 020 7735 7611
Fax.: +44 020 7587 3210
Web: <http://www.imo.org>

Consejo Internacional para la Exploración del Mar (CIEM)

International Council for the Exploration of Sea (ICES)

Antecedentes: EL CIEM es una organización científica internacional creada para el estudio y salvaguardia de los ecosistemas marinos y recursos vivos del Atlántico Norte. Fundado en 1902, es la organización intergubernamental de ciencias marinas más antigua del mundo, y constituye un foro líder en la promoción, coordinación y diseminación de la investigación sobre los sistemas físicos, químicos y biológicos en el Atlántico Norte y asesora sobre impac-

tos humanos en el medio, y en particular sobre los efectos de las pesquerías en el nordeste Atlántico. Una de las principales tareas del CIEM, desde la década de los 70, ha sido suministrar información científica y asesoramiento en respuesta a los solicitudes de comisiones internacionales y regionales de regulación, la Comisión Europea y los gobiernos de sus estados miembros en relación con la explotación sostenible de las pesquerías y la protección medioambiental.

Las algas nocivas requieren una atención especial, debido a su posible impacto tanto en el terreno económico como en el social, lo que las distingue de otras floraciones masivas inocuas. El ICES, gracias a su organización de tipo multidisciplinar, juega un importante papel sobre este tema entre los países miembros.

Actividades: El grupo de trabajo ICES/IOC sobre Dinámica de Floraciones Algas Nocivas (WGHABD) centraliza la principal actividad sobre algas nocivas que desarrolla esta organización.

Sin embargo, existen otros grupos sobre temas relacionados, como el Grupo de Trabajo ICES de Ecología Fitoplanctónica (WGPE), el Grupo de Estudio ICES/IOC sobre un Listado de Fitoplancton y otras Protistas, el Grupo de Trabajo de Oceanografía de Mares Costeros (WGSSO), el Comité de Oceanografía (OC), el Comité del Báltico (BC), y el Comité Asesor sobre el Medio Marino (ACME). Varios miembros del ICES son participantes activos en el programa GEOHAB, lo que se refleja en el desarrollo de otras iniciativas en el ICES, tales como el Grupo de Estudio para la puesta en marcha del Programa GEOHAB en el Báltico, y el Grupo de Estudio de Modelizado de Interacciones Físicas/Biológicas, cuyo trabajo incluye el desarrollo de modelos de floraciones de algas nocivas.

DIRECCIONES DE CONTACTO

ICES Secretariat
Harry Dooley
Palaegade 2-4, DK-1261 Copenhagen K
Dinamarca
Tel.: +45 33 154225
Fax.: +45 33 934215
e-mail: ices.info@ices.dk
Web: <http://www.ices.dk>

Jennifer Martin (Chair WGHABD)
 ICES/IOC Working Group on Harmful Algal Bloom
 Dynamics
 Fisheries & Oceans Canada
 Biological Station
 531 Brandy Cove Rd., St. Andrews, NB
 Canada E5B 2L9
 Tel: +1 506 529 5921
 Fax: +1 506 529 5862
 e-mail: martinjl@mar.dfo-mpo.gc.ca

DIRECCIONES DE CONTACTO:

DG Research-EUROHAB
 Elizabeth Lippiatou
 Environment and Sustainable Development
 Programme, Policy Aspects, European
 Commission, Directorate-General for Research
 Rue de la Loi 200, B-1049 Brussels, Bélgica
 Tel.: + 32 2 2966286
 Fax.: +32 2 2963024
 e-mail: Elizabeth.Lippiatou@cec.eu.int

**ORGANIZACIONES
 GUBERNAMENTALES NO
 ESPECIALIZADAS QUE FINANCIAN
 INVESTIGACIONES RELACIONADAS
 CON HAB**

**Comisión de las Comunidades Europeas
 (CCE). Unión Europea**

***Commission of the European Communities
 (CEC). European Union***

Antecedentes: La CEC financia una cantidad ingente de programas, algunos de los cuales pueden estar directamente relacionados con las algas nocivas. Para una información más concreta sobre los mismos se puede consultar la página Web que esta organización tiene abierta en la dirección <http://eurunion.org>. De la misma manera, existen actividades en funcionamiento cuyo objetivo fundamental es incrementar la cooperación entre América del Sur y Europa facilitando la realización de estancias, doctorados y post-doctorados en Europa.

En 1999 se estableció EUROHAB, la "Iniciativa Europea sobre Floraciones Algales Nocivas", formulada para generar y coordinar la investigación requerida para optimizar la gestión de los efectos de estos episodios en aguas marinas y salobres de Europa.

La iniciativa EUROHAB es un «paraguas» que incluye los proyectos medioambientales sobre algas nocivas financiados por el V Programa Marco. La Comisión Europea promueve, a través de EUROHAB, la investigación avanzada y la creación de redes de comunicación sobre temas HAB que se necesitan en Europa en coordinación con actividades nacionales relevantes.

**ORGANIZACIONES NO
 GUBERNAMENTALES**

**Sociedad Internacional para el Estudio de
 Algas Nocivas**

***International Society for the Study of
 Harmful Algae (ISSHA)***

Antecedentes: La ISSHA se fundó en 1997, en respuesta a una solicitud de la COI de la UNESCO para el programa internacional HAB. La sociedad está afiliada a la familia de organizaciones ICSU como parte constituyente de la IUBS (International Union of Biological Sciences = Unión Internacional de Ciencias Biológicas) a través de la IABO (International Association of Biological Oceanography). El objetivo de la sociedad es avanzar en el conocimiento mediante la promoción y búsqueda de todos los aspectos relacionados con el estudio de las algas nocivas, y diseminar ampliamente los resultados de investigación.

Actividades: Las actividades incluyen la promoción del estudio de algas nocivas, incluyendo su aparición, factores oceanográficos relacionados, ecofisiología, taxonomía y sistemática, genética, química de las toxinas, toxicología, gestión y mitigación; colección, evaluación y diseminación de información sobre algas nocivas; promoción de la investigación sobre algas nocivas, formación y extensión, para fomentar iniciativas relacionadas de gestión y mitigación; desarrollo de material divulgativo para hacer tomar conciencia a los ciudadanos sobre los problemas sociales, económicos y ecológicos causados por las HAB; organización y patrocinio de conferencias nacionales, regionales e internacionales, seminarios, congresos y grupos de trabajo; organización de cursos y seminarios; publicación de artículos científicos y divulgativos; apoyo y puesta en marcha de

proyectos de investigación y programas relacionados con las algas nocivas.

DIRECCIONES DE CONTACTO:

Karen Steidinger (President)
Florida Marine Research Institute,
100 8th Ave. S.E., St Petersburg, FL 33712, EEUU
Fax :+1 727 823 0166
e-mail: karen.steidinger@fwc.state.fl.us

Stephen Bates (Secretary)
Fisheries and Oceans Canada
Gulf Fisheries Centre, PO Box 5030, Moncton,
NB E1C 9B6, Canada
Fax: +1 506 851 2079
e-mail: BatesS@mar.dfo-mpo.gc.ca
Web: <http://www.cbr.nrc.ca/issaha/>

**Comité Científico para la Investigación
Oceanográfica**

***Scientific Committee on Ocean Research
(SCOR)***

Antecedentes: Como parte de su objetivo de promover la colaboración internacional sobre ciencias marinas, el SCOR organiza grupos de trabajo reducidos cuyos objetivos deben ser cumplidos en plazos no superiores a los cuatro años. En el campo de las algas tóxicas, el estudio de los factores fisiológicos implicados en la aparición de estos organismos es un área prioritaria de todos los grupos de trabajo que se han organizado.

Actividades: El grupo de trabajo SCOR-IOC 97 sobre Ecología Fisiológica de HAB recomendó la creación de un gran programa de investigación sobre Ecología y Oceanografía Global de las HAB (GEOHAB), que actualmente desarrolla la colaboración científica entre COI y SCOR.

Conexiones: Programa GEOHAB, que tiene representación en el Panel Intergubernamental de la COI sobre las HAB (IPHAB).

DIRECCIONES DE CONTACTO

Dr. Ed Urban
Executive Director, SCOR
Department of Earth and Planetary Sciences
125 Olin Hall, San Martin Drive

The Johns Hopkins University
Baltimore, MD 21218, EE.UU.
Tel: +1 410 516 4070
Fax: +1 410 516 4019
E-mail: scor@jhu.edu
Web: <http://www.jhu.edu/scor>

**Sociedad Internacional de Toxinología (SIT)
*International Society for Toxinology (IST)***

Antecedentes: La IST es una organización científica dedicada al estudio de toxinas procedentes de animales, plantas y microorganismos y sus antídotos. Estos estudios incluyen los aspectos químicos, bioquímicos, farmacológicos, clínicos y terapéuticos de los envenenamientos, y cuenta con más de 600 miembros repartidos entre 57 países.

Objetivos: Uno de los principales objetivos de la IST es la investigación sobre algas tóxicas, incluyendo las floraciones de algas nocivas, la ciguatera y otros envenenamientos e intoxicaciones causadas por ingestión de ficotoxinas, etc. Un aspecto importante es el intercambio de resultados en las reuniones organizadas por la Sociedad, como los congresos sobre farmacología marina.

Actividades: Periódicamente se organizan congresos internacionales y la Sociedad edita su propia revista, *Toxicon* (fundada en 1962).

Conexiones: Presenta actividades comunes con la WHO, ESF, ISF y con otras instituciones de los países miembros.

DIRECCIONES DE CONTACTO

Hervé RoCHAT (IST President)
Faculté de Médecine, Sécateur Nord, Biochimie
Boulevard Pierre Dramard, F-13916
Marseille Cedex 20, France
Tel.: +33 4 9151 2848
Fax: +33 4 9165 7595
E-mail: rochat.h@jean-roch.univ.mrs.fr

Dietrich Mebs (Secretary)
Zentrum der Rechtsmedizin, University of Frankfurt
Kennedyallee 104, D-60596 Frankfurt, Alemania
Tel.: +49 69 6301 7563
Fax: +49 69 6301 5882
E-mail: mebs@em.uni-frankfurt.de

Unión Internacional para la Química Básica y Aplicada

International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC)

COMISIÓN SOBRE QUÍMICA DE LA ALIMENTACIÓN

COMMISSION ON FOOD CHEMISTRY

Antecedentes: La comisión de la IUPAC para la química de los alimentos está formada por distintos grupos de trabajo cuyas actividades se encuentran centradas fundamentalmente en a) micotoxinas, b) biotoxinas acuáticas, c) d) análisis elementales e) toxinas naturales (plantas), f) hidrocarburos halógenos como contaminantes ambientales, g) drogas animales, y h) efectos del procesado de alimentos. El grupo de trabajo sobre Biotoxinas Acuáticas es el encargado de coordinar todas las actividades de la IUPAC relacionadas con contaminaciones, tanto en alimentos como en agua, causadas por biotoxinas acuáticas, incluyendo las ficotoxinas.

Objetivo: El principal objetivo de la Comisión sobre Química de la Alimentación es patrocinar proyectos que fomenten la cooperación internacional.

Actividades: La Comisión patrocina una serie de Congresos sobre micotoxinas y/o ficotoxinas. Cada grupo de trabajo desarrolla proyectos sobre metodología química, estudios relacionados con dicha metodología, vigilancia en la alimentación, etc. cuyos resultados son resumidos y publicados.

Existen otros proyectos previos de la Comisión relacionados con toxinas acuáticas que han dado lugar a publicaciones. Dentro de ellos se incluyen las regulaciones mundiales para ficotoxinas, las ficotoxinas que conciernen a la salud pública, métodos sobre detección de ficotoxinas, al igual que estudios sobre ensayos para ciguatera utilizando método inmunológicos. Las actas de los congresos y los informes periódicos son patrocinados por la IUPAC y publicados en revistas científicas.

El grupo de trabajo sobre Biotoxinas Acuáticas de la Comisión inicia y dirige la investigación sobre biotoxinas acuáticas tanto en el agua como en los alimentos, al igual que sobre sus métodos de análisis; establece los criterios de pureza y estabilidad de las toxinas; recoge y evalúa datos relativos a la incidencia, regulación, niveles y fuentes de contaminación de agua y alimentos por biotoxinas acuáticas; cola-

bora con otras organizaciones internacionales implicadas en el tratamiento de las consecuencias que se derivan de la exposición humana a dichas toxinas, y planifica y dirige congresos sobre toxinas acuáticas.

Conexiones: Trabaja en estrecha relación con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) sobre metodología y validación de resultados. También trabaja coordinadamente con el Codex Alimentarius de la FAO, con el Bureau Comunitario de Materiales de Referencia (BCR) de la Comisión de la Unión Europea y es miembro del Panel Inter-gubernamental sobre HAB.

DIRECCIONES DE CONTACTO

Michael Page
University of Huddersfield
Department of Chemistry
School of Applied Sciences
Huddersfield, HD1 3DH, Reino Unido
Tel.: +44 1484 472169
Fax: +44 1484 472182
e-mail: m.i.page@hud.ac.uk

John Gilbert
Food Chemistry Commission Secretary
Central Science Laboratory Sand Hutton
York, YO41 1LZ, Reino Unido
Tel: +44 1904 462424
Fax: +44 1904 462426
e-mail: j.gilbert@csl.gov.uk

Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

Association of Official Analytical Chemists (AOAC)

COMITÉ DE METODOLOGÍA SOBRE TOXINAS NATURALES

METHODS COMMITTEE ON NATURAL TOXINS

Antecedentes: El programa internacional sobre Métodos Oficiales de la AOAC coordina el desarrollo y validación de métodos analíticos, químicos y microbiológicos, llevados a cabo por científicos que trabajan tanto para el gobierno como la para la industria y las universidades. Los candidatos al *status* de la AOAC están sujetos a colaborar en estudios que impliquen un mínimo de ocho laboratorios y a trabajar de acuerdo con protocolos internacionalmente reconocidos y puestos a punto en común. Las

metodologías propuestas son revisadas en primer lugar por un experto (denominado Evaluador General) y por asesores en estadística y seguridad, y posteriormente son presentadas a un Comité de Expertos sobre Toxinas Naturales. Los métodos aprobados son publicados por el *Journal of AOAC International*.

El Comité es responsable, a su vez, de dirigir y coordinar el desarrollo de los métodos de detección y cuantificación de micotoxinas, toxinas vegetales y toxinas marinas en los alimentos, así como de asegurar su validación. Serán recomendados por la AOAC aquellos métodos que demuestren suficiente precisión, exactitud y especificidad.

Objetivo: Proporcionar métodos de análisis de toxinas naturales que hayan sido probados en el laboratorio debido a sus características de precisión, exactitud, sensibilidad, rango y especificidad.

Actividades: Revisar y recomendar temas de Referencia General, como las Referencias Generales sobre Toxinas del Marisco y las Referencias Asociadas sobre temas como la ciguatera, las toxinas peptídicas de cianobacterias, y las toxinas paralizantes, diarreicas y amnésicas (PSP, DSP y ASP).

El Comité revisa metodologías propuestas, y colabora en estudios sobre protocolos, como el método de Fase Sólida Mediante *Immunobeads* para la Detección de Ciguatera en Peces, o el de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la detección del ácido domoico, etc.

Asimismo, publica informes generales que resumen las actividades y la bibliografía anual de la revista de la AOAC. Patrocina congresos de interés general en la reunión anual AOAC International, como la de Métodos Analíticos para Toxinas del Marisco. Publica trabajos revisados en el *Journal of AOAC International* sobre metodologías, como las comparaciones entre el bioensayo de ratón y los bioensayos celulares para la ciguatera, la cromatografía líquida para la detección de ácido domoico, la reconstitución de los canales de sodio o los radioinmunoensayos como sistema de detección de toxinas marinas, así como las técnicas basadas en la oxidación pre-columna para la detección de saxitoxina.

Conexiones: Existen actividades comunes con la Comisión sobre Química de los Alimentos de la IUPAC, la Organización Internacional de Standards,

el Comité de la Real Sociedad de Metodología de Química Analítica, el Comité Nórdico para Análisis de los Alimentos, el Comité sobre Métodos de Análisis y Muestreos, y muchos más.

DIRECCIONES DE CONTACTO

AOAC Sección de América Latina y el Caribe
Presidente Dr. Alfredo Montes Nino
Xenobióticos SRL
Bolivia 5826, Buenos Aires 1419, Argentina
Tel.: +541 5730010
Fax: +541 5731287

AOAC Methods Coordinator
Scott G. Coates
481 N. Frederick Ave, Suite 500
Gaithersburg, MD 20877-2417, EEUU
Telephone: +1 301 9247077
Fax: +1 301 9247089
e-mail: scoates@aoac.org

AOAC General Referee for Phycotoxins
(Seafood toxins)
Michael A. Quilliam
Institute for Marine Biosciences
National Research Council Canada
1411 Oxford Street
HaliFax, Nova Scotia B3H 3Z1
Canadá
Tel.: +1 902 4269736
Fax.: +1 902 4269413
e-mail.: michael.quilliam@nrc.ca.

ORGANIZACIONES LATINOAMERICANAS INTERGUBERNAMENTALES

Organización de Estados Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Tecnología (OEI)

Antecedentes: OEI es un organismo internacional para la cooperación entre los países iberoamericanos en el campo de la educación, la ciencia, la tecnología y la cultura. A partir de la I Conferencia Iberoamericana de Jefes de Estado y de Gobierno (Guadalajara, 1991), la OEI ha promovido y convocado las Conferencias de Ministros de Educación, como instancia de preparación de esas reuniones cumbres, haciéndose cargo también de aquellos pro-

gramas educativos, científicos o culturales que le son delegados para su ejecución.

Objetivo: facilitar las relaciones entre ciencia, tecnología y sociedad en los países iberoamericanos, analizando las implicaciones del desarrollo científico-técnico desde una perspectiva social y aumentando su valoración y la comprensión de sus efectos por todos los ciudadanos. Asimismo, promueve la vinculación de los planes de educación, ciencia, tecnología y cultura y los planes y procesos socio-económicos que persiguen un desarrollo al servicio del hombre, así como una distribución equitativa de los productos culturales, tecnológicos y científicos.

Actividades: Aunque en la actualidad no se conoce ningún programa directamente relacionado con algas nocivas, la OEI, en su programa de Ciencia, Tecnología y Sociedad establece nexos y programas de trabajo conjuntos con otras instituciones similares, facilitando el desarrollo de programas de investigación entre países iberoamericanos.

DIRECCIONES DE CONTACTO

Oficina Regional en Colombia
Programas y Proyectos Especiales
Calle 67 n° 3-16
Santa Fe de Bogotá, Colombia
Tel.: 346 41 00 - 346 41 14
Fax: 346 41 66
E-mail: proespe@oei.org.co
Web: www.oei.es

Oficina Regional en Argentina, Sede
Avenida Santa Fe 1461 2do piso
1060 Buenos Aires, Argentina
Tel.: 813-0033/34
Fax: 811-9642
Email: oeiba@inea.com.ar
Web: www.oei.es

ORGANIZACIONES NACIONALES LATINOAMERICANAS

En cada país iberoamericano existen diversas Agencias, Secretarías y/o Ministerios de Ciencia y Tecnología cuyo propósito es formular políticas, planes, programas, medidas e instrumentos para el desarrollo de la ciencia, la tecnología y la innovación. Todas estas iniciativas pretenden impulsar y promover la investigación, la aplicación, el financiamiento y la transferencia de conocimientos científico-tecnoló-

gicos como instrumento para el aumento de la calidad de vida y de la productividad social. Asimismo, incentivan la cooperación y la gestión de recursos en el ámbito internacional y coordinan las acciones con los organismos vinculados a la actividad científico-tecnológica.

Dichos organismos financian programas de investigación de toda índole entre los cuales se encuentran diversos proyectos específicos relacionados con microalgas tóxicas. Debido a que no siempre es posible acceder a los programas en curso y a la variabilidad de los mismos en cuanto a su duración, creemos que lo mejor es proporcionar las direcciones de los principales organismos a los que se pueden dirigir las solicitudes de ayuda en un intento de que dicha información no pierda validez en un período de tiempo corto.

ARGENTINA

Secretaría de Estado para la Tecnología, la Ciencia y la Innovación Productiva-SETCIP
Av. Córdoba 831, 2do. Piso
1054 Buenos Aires
Tel : (541) 43112028/3131366/3131477
Fax: (541) 43138364
Web: www.secyt.gov.ar

BRASIL

Esplanada dos Ministérios
Bloco "E", 4º andar, Sala 462
70070 Brasilia, D.F.
Tel: (5561) 2230068/2252793
Fax: (5561) 2256785
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq
Avda. W/3 Norte, SEPN-Q 507, Bloco B
Caixa Postal 6186
Brasilia D.F., CEP 70740, Brasil
Tel: (5561) 348900
Fax: (5561) 2741950
E-mail: sci@cnpq.br
Web: www.cnpq.br

CHILE

Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica-CONICYT
Canadá 304, Providencia, Santiago 21, Chile
Tel: (562) 22744537/2047541
Fax: (562) 2096729
Casilla de Correo 297-V
Web: www.conicyt.cl

PERU

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/
CONCYTEC
Av. Canadá No. 1460, Lima 41, Perú
Tel: (5114) 728081
Fax: (5114) 728081
Apartado 1984, Lima 100
Web: www.concytec.gob.pe

URUGUAY

Dirección Nacional de Ciencia, Tecnología e Inno-
vación / DINACYT
Reconquista 535 p 7.
11100 Montevideo, Uruguay
Tel: (5982) 9161016
Fax: (5982) 9165483
E-mail: postmaster@conicyt.gub.uy
Web: www.conicyt.gub.uy

ÍNDICE TAXONÓMICO

A

A. excavatum. Ver *Alexandrium tamarense*

Adelomelon

ancilla 243

Aequipecten

tehuelchus 199, 201

Alexandrium

tamarense 204

Alexandrium 23, 27, 31, 42, 58, 84, 134, 135, 136, 137, 141, 225, 259

acatenella 135, 137, 138

catenella 27, 58, 59, 135, 137, 138, 139, 212, 239, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 251, 252, 254, 259

conconvum 137

excavatum 137, 138

fraterculus 27, 137, 139, 140, 224, 225, 272, 283

fundyense 135

kutnerae 137, 140

minutum 23, 32, 134

monilatum 142

ostendfeldii 25, 141

peruvianum 137, 141

tamarense 27, 39, 135, 137, 138, 199, 200, 201, 202, 203, 205, 206, 211, 212, 213, 222, 226, 272, 274, 275, 276, 278, 286

taylorii 24

tropicale 137, 141

Alexandrium spp 41, 45

Ameginomya

antiqua 201

Amphidinium 34, 147, 148, 149

carterae 149, 150, 229

klebsii 149, 150

operculatum 148, 149, 150

pelagicum 148

Amphidoma 241

Amphisolenia 128, 135

Amphora 169

coffeaeformis 169, 190

Anabaena

flos-aquae 229

Anaulus

australis 224

Argobuccinum 243

Argopecten

purpuratus 264, 267

Artemia 165

salina 24, 229

Asterionellopsis

glacialis 221, 226, 283

Aulacomya

ater 67, 199, 201, 239, 241, 242, 243, 244, 248, 249

Aureococcus

anophagefferens 160

B

Brevoortia

tyranus 228

C

Cancer

magister 172

Cerataulina

pelagica 169

Ceratium 135

Cochlodinium 147

Concholepas

concholepas 28

Coscinodiscus 280

centralis 169

concinus 169

wailesii 24

Cylindrospermopsis 222

raciborskii 59, 229

CH

Chaetoceros 24, 170, 285
concauicornis 25, 170
convolutus 28, 170
danicus 170

Chatonella 221, 225
cf. antiqua 226

Chattonella 159
antiqua 158
marina 158

Chlamys
vitrea 243

Chloromonas 158

Chondria
armata 68

Chrysochromulina 157, 160, 162, 164, 221
leadbeateri 163
polylepis 22, 25, 32, 47, 162, 163
spinifera 162

D

Dictyochoa 161
fibula 161, 226
octonaria 161
speculum 24, 161

Dinophysis 23, 25, 27, 38, 39, 40, 45, 63, 64, 87, 88, 128, 135, 222, 224, 259, 274, 280
acuminata 27, 33, 64, 130, 134, 203, 205, 206, 225, 226, 272, 280, 281
acuminata var. acuminata 133, 130
acuminata var. lachmannii 131, 133
acuta 27, 33, 40, 45, 48, 64, 88, 129, 130, 133, 229, 280
böhmi 131
borealis 131
caudata 64, 129, 132, 133, 229, 272, 280, 281
fortii 27, 33, 40, 130, 131, 133, 205, 206, 280
homunculus 132, 133
intermedia 131
lachmanni 131
mitra 132, 133
norvegica 33, 87, 88
rotundata 64, 131, 133, 134, 280
sacculus 280

scrobiculata 131, 132
simplex 130
tripos 129, 133
whittingae 131

Dinophysis spp 41

Ditylum
brightwellii 280

Donax
hanleyanus 277, 280

E

Emiliania
huxleyi 162

Engraulis
anchoita 174
mordax 172

Ensis
macha 242

Eurhomalea
exalbida 242

Euterpina
acutifrons 24

Exuviaella 127
mariae-lebouriae 127
minima 127

F

Farfantepenaeus
paulensis 229

Fibrocapsa 158
japonica 158, 159, 221, 226

Fragilariopsis 170, 171

G

Gadus
morhua 152

Gambierdiscus
polyniensis 96
toxicus 24, 34, 96

Gessnerium 136, 137, 141
mochimaensis 142
monilatatum 142

Glenodinium

trochoideum 219

Gomphoneis

herculeana 203

Goniodoma

ostenfeldi 134

Gonyaulax 134, 136, 138, 225, 271, 283

acatenella 134, 138

catenella 134, 139

excavata 27, 137, 138, 141

fratercula 140

grindleyi 25

kutnerae 140

monilata 142

peruvianum 141

tamarensis 27, 134, 137

Gymnodinium 28, 42, 58, 84, 147, 148, 149, 150, 221, 271, 283

achromaticum 148

breve 23, 95, 151, 221

brevisulcatum 151

catenatum 23, 27, 28, 48, 150, 151, 213, 225, 226, 272, 276, 277, 278, 280, 285, 286

galatheanum 152

impudicum 24, 150

microreticulatum 285

micrum 152

mikimotoi 32, 148, 151

nagasakiense 151

nolleri 285

pulchellum 151

sanguineum 147, 280, 283

Gymnodinium spp 32

Gymnodinium 212

Gyrodinium 147, 148, 212

aureolum 148, 151

cf. aureolum 221, 226

corsicum 152

galatheanum 152

impudicum 285

veneficum 152

vitiligo 152

Gyrodinium spp. 28

H

Haliotis

rufescens 263

tuberculata 34

Heterosigma 158, 159, 160, 221

akashiwo 27, 32, 158, 225

Histioneis 128, 135

K

Karenia 32, 151

brevis 23, 47, 95, 151

brevisulcatum 151

mikimotoi 23, 148, 151

Karlodinium 151

micrum 152

Katodinium 147, 148

glaucum 148

L

Leptocylindrus

minimus 28, 32

Leptolyngbya 229

Lingulodinium

polyedrum 90

M

Megabalanus

psittacus 243

Melosira

varians 203

Mesodesma

mactroides 226, 280

Mesodinium

rubrum 25, 26, 212, 226, 280, 283, 285

Microcystis

aeruginosa 221, 222, 227, 229, 230, 269, 272, 282

viridis 229

Mya

arenaria 182

- Mytilus*
chilensis 241, 242, 243, 244, 248, 249, 252, 264, 266
edulis 72, 169, 174, 180, 182, 211, 212, 213, 264, 277, 280
edulis platensis 199, 201

Mytilus spp 30

N

- Nanoneis* 171
hasleae 171

- Navicula*
navis-varingica 33

- Nitzschia* 170
actydropbila 175
delicatissima 170, 175
delicatula 182
fraudulenta 170, 176
navis-varingica 169
navisvaringica 31
pseudodelicatissima 182
pseudoseriata 171
pungens 184
pungens f. *multiseries* 169, 179
pungens var. *atlantica* 184
seriata 170, 189
sicula 170
sigmoidea 170
turgidula 187

- Noctiluca* 22, 26, 42
miliaris 152
scintillans 24, 152, 212, 226, 283

- Nodularia*
baltica 283
baltica spumigena (grupo) 272
baltica-spumigena 283
spumigena 283

O

- Odontella*
aurita 203

- Olisthodiscus* 160
luteus 159

Ornithocercus 128

Ostreopsis 24, 34

P

- Paracentrotus*
lividus 34

- Paralia*
sulcata 203

- Pecten*
maximus 31

- Perna*
perna 64

- Pfiesteria*
piscicida 24, 25

- Phaeocystis* 24, 162, 165
cf globosa 225
scrobiculata 165

- Phalacrocorax*
aff. turgidula 188
penicillatus 172

- Phalacroma* 132
mitra 132
rotundatum 131, 132

- Pitar*
rostrata 272, 274

- Pleoticus*
muelleri 201

- Pododesmus*
rudi 201

- Polykrikos*
kofoidii 147, 280, 283
schwartzii 39, 283

Porphyra 24

- Prorocentrum* 24, 64, 126, 127, 135, 224
cordiforme 127
lima 25, 34, 68, 87, 205, 206
maculosum 88
micans 26, 39, 127, 203, 205, 212, 225, 241
minimum 127, 225, 229, 272, 283
obtusum 225
scutellum 283
triangulatum 127

- Protoceratium*
reticulatum 25, 33, 90

Protogonyaulax 134
excavata 138

Protoperidinium 24, 25, 79, 136
balechii 203
crassipes 25, 79
depressum 25

Protothaca
taca 264

Prymnesium 22, 157, 162, 164, 221
calathiferum 164
nemamethecum 164, 165
parvum 164
parvumf. parvum 164
parvumf. patelliferum 164
patelliferum 164

Pseudo-nitzschia 23, 31, 40, 48, 69, 169, 170, 171, 213, 221, 222, 223, 224, 238, 259, 261, 266, 267
aff. multiseriata 180
australis 27, 48, 69, 169, 172, 174, 175, 178, 179, 190, 205, 206, 226, 264, 266
cf. pseudodelicatissima 213
cf. subfraudulenta 223
cuspidata 176, 184
delicatissima 169, 171, 175, 176, 184
fraudulenta 169, 171, 176, 178, 179, 190, 213
lineola 176, 184, 188
multiseriata 27, 169, 171, 179, 180, 181, 187, 190, 205, 206, 226
multistriata 169
pseudodelicatissima 169, 171, 176, 182, 184, 205, 206, 226, 266
pungens 169, 171, 181, 184, 186, 187, 226, 264, 272, 282
pungensf. multiseriata 179
pungens var. cingulata 187
pungens var. pungens 181, 187
seriata 169, 170, 171, 172, 174, 175, 176, 181, 189, 190
seriataf. obtusa 174, 175, 190
seriata var. fraudulenta 176
subfraudulenta 178, 179
turgidula 169, 171, 187, 188
turgiduloides 188

Pseudo-nitzshia
pungensf. multiseriata 68

Ptychodiscus
brevis 23, 95, 151

Pyramimonas 280
Pyrodinium 84

S

Scripsiella
trochoidea 219, 280, 283
trochoideum 221

Scripsiella
trochoidea 226

Siliqua
patula 69, 172

Skeletonema
costatum 205, 280, 283

Synechocystis
aquatilis 27
aquatilisf. salina 221, 227, 228

T

Thalassiosira
mala 169

Trichodesmium 221, 224
erythraeum 221, 224, 272, 280, 283
hildebrandtii 224
thiebautii 224

Trophon 243

Turbo
pica 34

V

Venus
antiqua 174

W

Woloszynskia
micra 152

Z

Zidona
dufresnei 28, 34

