

## 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

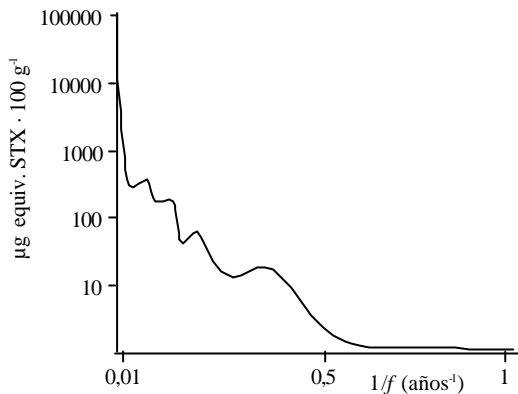


Fig. 2. Posible relación empírica entre la intensidad de los episodios tóxicos ( $I$  en  $\mu\text{g equiv. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) y la inversa de su frecuencia ( $1/f$  en años $^{-1}$ ).

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

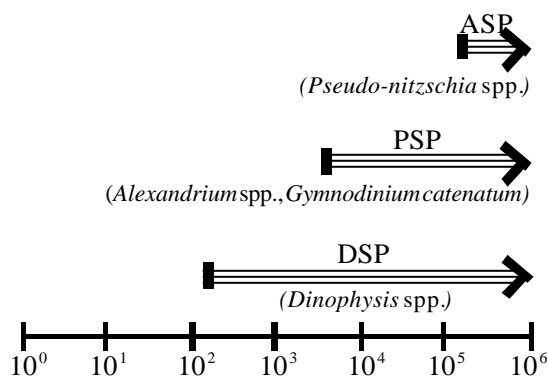


Fig. 3. Rango de concentraciones celulares de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.

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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 ( $18 \times 10^4$  cel · l<sup>-1</sup>) 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?*



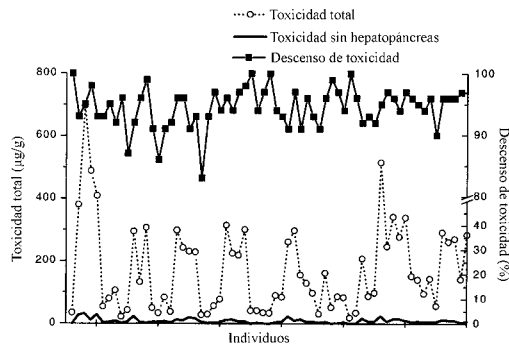


Fig. 4. Variación individual del contenido de toxina amnésica en 65 vieiras de las Rías Gallegas. Porcentaje de descenso de toxicidad en individuos sin hepatopáncreas (Arévalo *et al.*, 1998).

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-

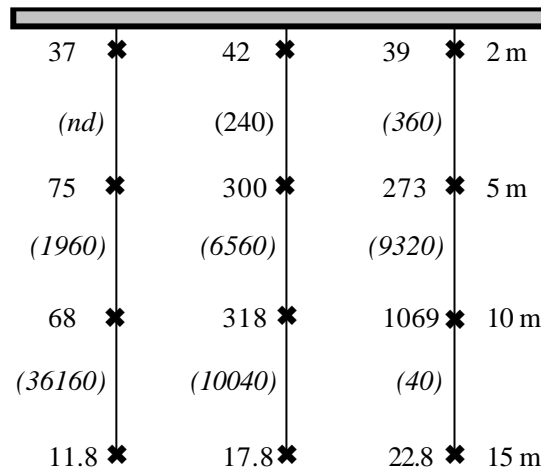


Fig. 5. Distribución vertical heterogénea del contenido de toxinas ( $\mu\text{g}$  equiv. STX  $\cdot 100\text{g}^{-1}$  de carne) en cuatro profundidades (2, 5, 10 y 15 m) de una cuerda de batea de mejillón de las rías gallegas en tres muestreos semanales sucesivos durante un episodio de PSP causado 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

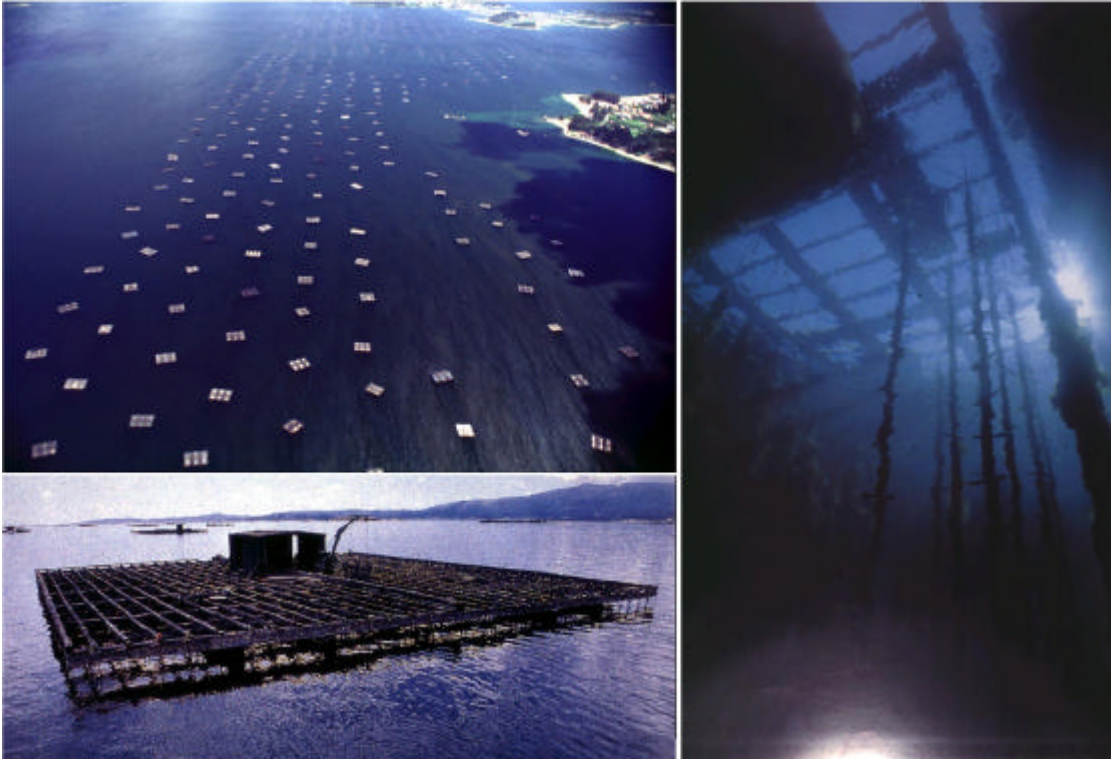


Fig. 6. Cultivo de mejillón en las Rías Gallegas, zona de intensa producción ( $25 \times 10^4$  t anuales), lo que justifica grandes inversiones en programas de seguimiento de fitoplancton tóxico y ficotoxinas. Izda. arriba: Vista aérea de una zona de bateas en la Ría de Arosa Izda. abajo: Batea tradicional 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

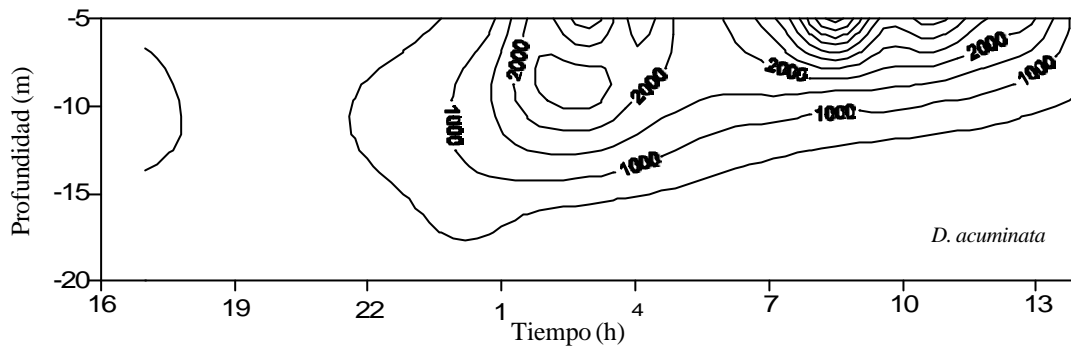


Fig. 7. Heterogeneidad vertical observada en la distribución espacio-temporal de *Dinophysis acuminata* en una estación fija de la Ría de Pontevedra, durante un muestreo intensivo de 24 h en junio de 1994 (Reguera *et al.*, 1996).

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 ocurrido 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

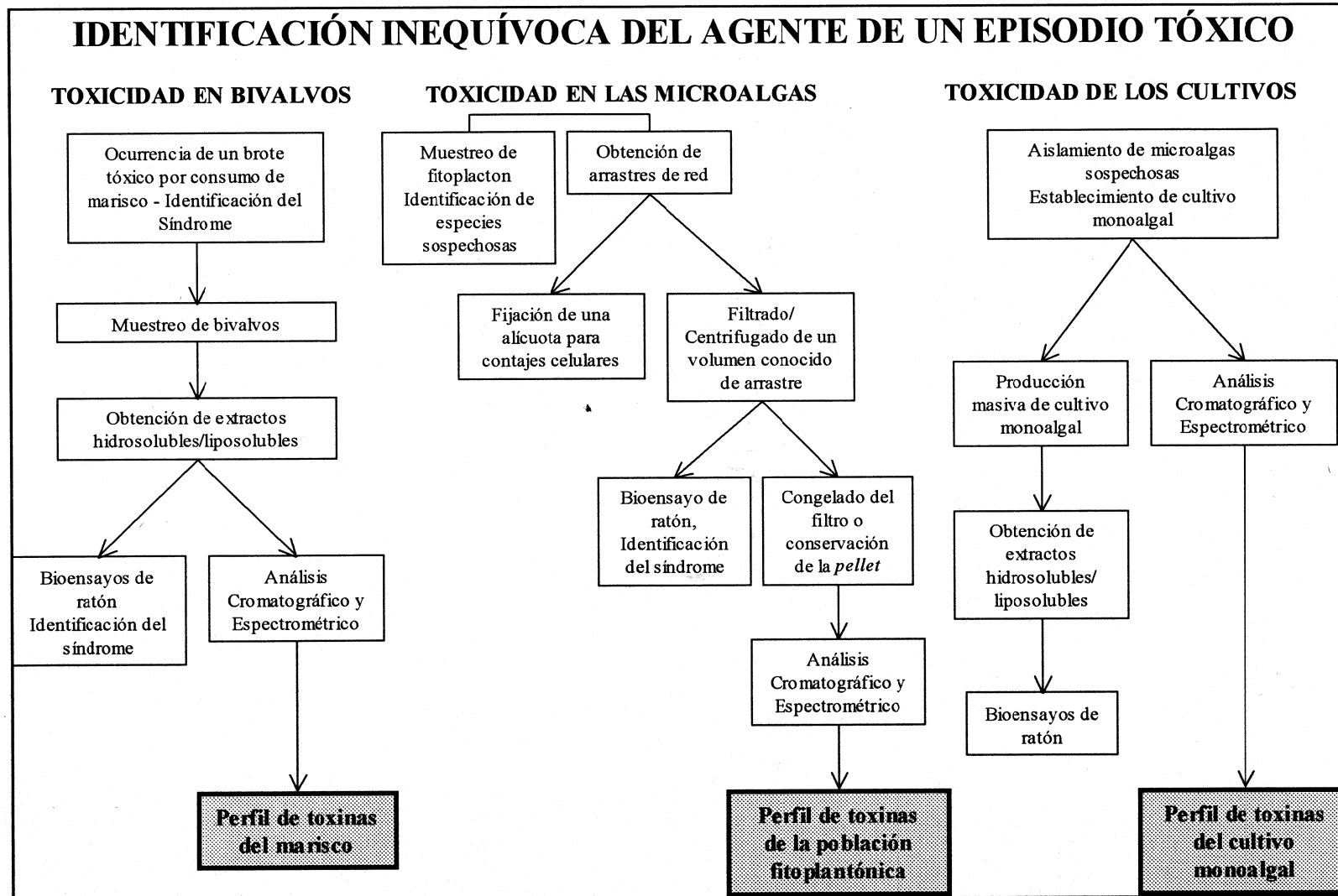
Argentina (*Zidona dufresnei*) y las lapas- o de erizos, como el *Paracentrotus lividus* en Francia, puede constituir el principal recurso a proteger. Estos gasterópodos o equinodermos no son filtradores, sino que «ramonean» la película de microalgas y materia orgánica que cubre macroalgas y sustratos 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ , 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 ( $\mu$ 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$  de apertura de malla, y se mide el volumen filtrado, este método permite realizar un análisis cuantitativo bastante fiable de las células grandes (> 40  $\mu\text{m}$ ). 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  $\mu\text{m}$ , o mejor aún de 10  $\mu\text{m}$ , 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 mucílago. 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<sup>-1</sup> 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-



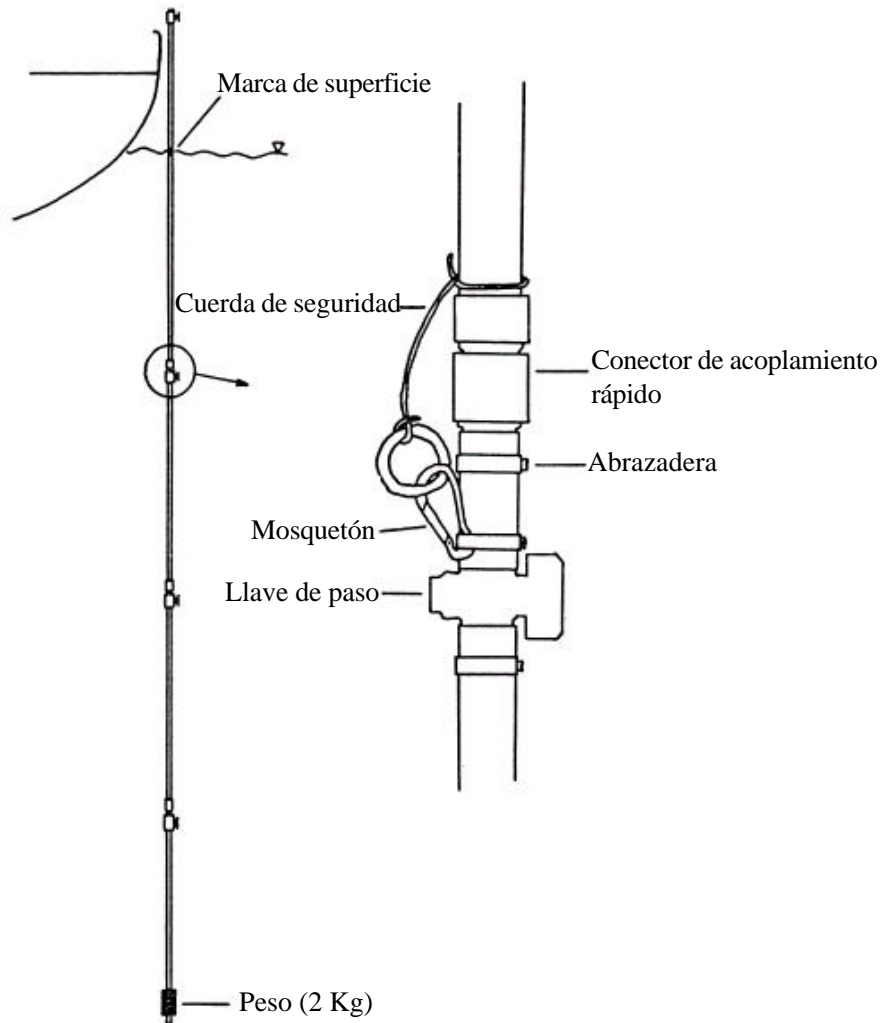


Fig. 10. Manguera de PVC compuesta por tres tramos acoplados (y desmontables), de 5 m cada uno, con llaves de paso que permiten obtener una muestra integrada (0-15 m), o tres muestras integradas (0-5, 5-10, 10-15 m) (Lindahl, 1986).

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 sumerge 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  $\mu\text{m}$  para eliminar detritus y organismos de gran tamaño, y analizar las microalgas en la fracción inferior a 150  $\mu\text{m}$ .
- . 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 determinar 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. Thronsen, 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. 3<sup>rd</sup> 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  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ), 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 incuban 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

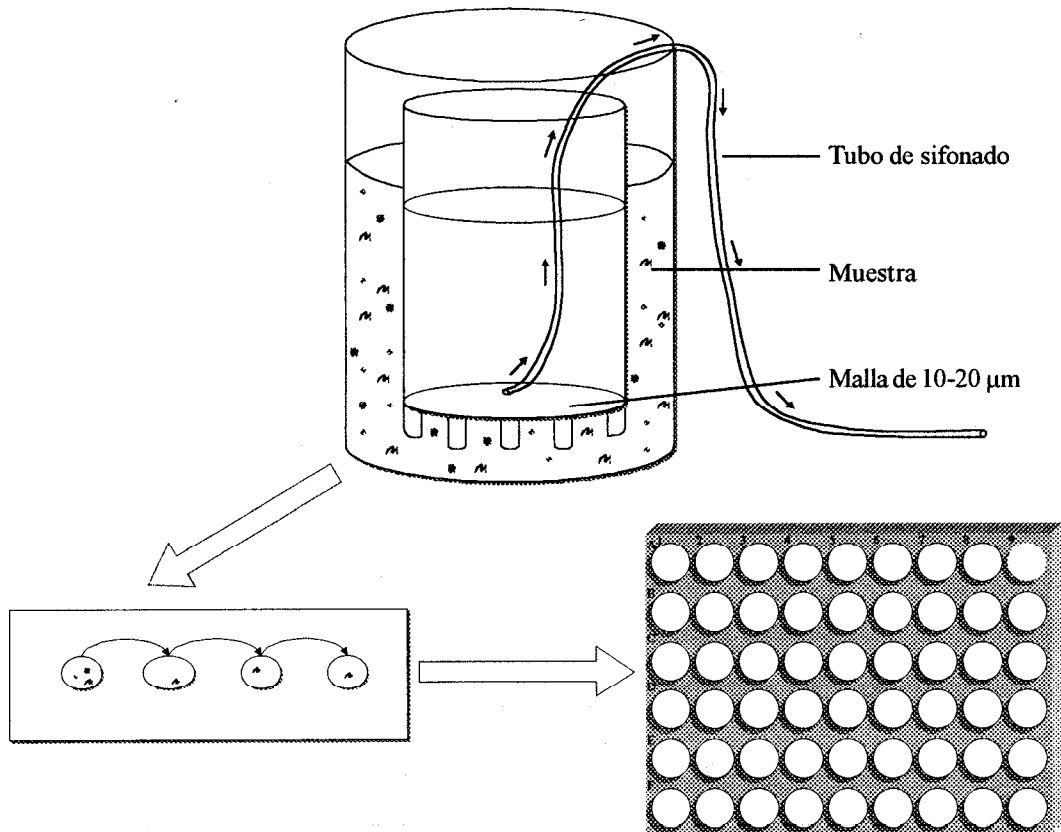


Fig. 1. Ilustraciones de: la filtración inversa; el aislamiento de células de una gota de muestra de agua de mar (concentrada o no) y posteriores transferencias a nuevas gotas de agua de mar filtrada y estéril; cámara de cultivo celular.

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.