

INFORMES TÉCNICOS

INSTITUTO ESPAÑOL
DE OCEANOGRAFÍA

ISSN: 0212-1565

COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS NOCIVAS DEL CENTRO OCEANOGRÁFICO DE VIGO. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ALGUNAS ESPECIES

I. Bravo
I. Ramilo
J. M. Franco
E. Maroño
y S. Fraga



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

Núm. 168

Págs. 32

Madrid, España 1997

INFORMES TÉCNICOS

INSTITUTO ESPAÑOL
DE OCEANOGRAFÍA

ISSN: 0212-1565



COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS NOCIVAS DEL CENTRO OCEANOGRÁFICO DE VIGO. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ALGUNAS ESPECIES

I. Bravo, I. Ramilo,
J. M. Franco, E. Maroño
y S. Fraga

Centro Oceanográfico de Vigo
INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA
Apdo. 1552. 36280 Vigo (Pontevedra), España

Recibido en marzo de 1996. Aceptado en marzo de 1997
Coordinación científica editorial: José Iglesias Estévez



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL TÉCNICA

Centro de Publicaciones
Paseo de la Infanta Isabel, 1. 28014 Madrid, España

Núm. 168

Págs. 32

Madrid, España 1997

COLECCIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS NOCIVAS DEL CENTRO OCEANOGRÁFICO DE VIGO. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ALGUNAS ESPECIES*

I. Bravo, I. Ramilo, J. M. Franco, E. Maroño y S. Fraga

Centro Oceanográfico de Vigo. Instituto Español de Oceanografía. Apartado 1552. 36280 Vigo (Pontevedra), España.

RESUMEN

En el Centro Oceanográfico de Vigo (COV) existe una colección de cultivos de fitoplancton que incluye la mayor parte de las microalgas relacionadas con floraciones tóxicas o nocivas de la costa de la península Ibérica. En este informe se detalla una lista con todas las cepas mantenidas en esta colección, el nombre de la especie, la procedencia de la muestra original desde la que fue aislada y su toxicidad en el caso de que haya sido probada.

Además, se muestran los resultados de los estudios sobre crecimiento de tres especies de dinoflagelados en cultivos de esa colección y que son consideradas las más importantes por su producción de biotoxinas marinas: *Gymnodinium catenatum* Graham, *Alexandrium minutum* Halim y *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. Se mencionan también numerosas publicaciones de estudios realizados con esos cultivos tanto en el COV como por investigadores de otras instituciones.

En el apartado de material y métodos se describe la metodología seguida para el aislamiento y mantenimiento de los cultivos de fitoplancton, así como para el cálculo de la tasa de crecimiento de los mismos.

Palabras clave: Cultivo de fitoplancton, fitoplancton tóxico, *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima*, envenenamientos PSP y DSP.

ABSTRACT

Toxic phytoplankton cultures from Vigo Oceanographic Center

Cultures of different toxic phytoplankton species related with harmful algal blooms are maintained in a culture collection at the Vigo Oceanographic Center. In the present report, we list all the strains from this culture collection. The list indicates the names of the strains and species, the original sample location from which they were isolated and their toxicity in cases in which this has been tested.

This report also presents the results of the studies on growth of three dinoflagellates from the culture collection. These species are: *Gymnodinium catenatum* Graham, *Alexandrium minutum* Halim and *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, and they are remarkably important in toxic phytoplankton research because of their toxin production. Different studies of these cultures described in different publications are also mentioned.

In material and methods we describe the methodology for the isolation and maintenance of microalgae cultures, the method of growth rate calculation is also explained.

Key words: Phytoplankton culture, toxic phytoplankton, *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima*, PSP, DSP.

1. INTRODUCCIÓN

Una pequeña proporción de todas las especies de microorganismos que constituyen el fitoplancton marino puede producir sustancias tóxicas y ser la causa de envenenamientos por consumo de mariscos. En las costas de la península Ibérica se han detectado toxinas relacionadas con dos tipos distintos de estas intoxicaciones: envenenamiento paralizante por consumo de mariscos (EPM, en inglés PSP) y envenenamiento diarreico por consumo de mariscos (EDM, en inglés DSP) (Fraga et al., 1984; Bravo et al., 1990; Reguera et al., 1991; Márquez, 1994; Delgado et al., 1990). Además se ha detectado toxicidad de tipo amnésico (EAM o ASP) en mejillones de la costa de Galicia (Míguez, Fernandez y Fraga, 1996), aunque no se conoce que se haya registrado ninguna intoxicación de este tipo.

Galicia es un importante productor de mejillón a nivel mundial, lo cual ha supuesto que en esta comunidad autónoma se haya desarrollado una amplia red de control e investigación de fitoplancton tóxico y biotoxinas marinas, en la que trabajan coordinadamente distintas instituciones. Fue a partir de octubre y noviembre de 1976, alcanzando la toxicidad de tipo paralizante por consumo de mejillones procedentes de las costas gallegas a consumidores en Francia, Italia, Suiza y Alemania, cuando comenzó a ponerse en funcionamiento dicha red (Reguera et al., 1991). Más tarde, en 1985, se estructuró en el Centro Oceanográfico de Vigo (COV) del Instituto Español de Oceanografía un proyecto denominado Dinoflagelados tóxicos. Entre sus objetivos se incluía el establecimiento de los cultivos de especies responsables de fenómenos de toxicidad asociados a organismos fitoplanctónicos en la costa de Galicia. Hoy en día se mantienen en la colección de cultivos de fitoplancton tóxico de este centro distintas cepas de varias especies de organismos marinos relacionados con floraciones tóxicas o asociados con ellas en algún aspecto. Muchos de estos cultivos han servido de base para la realización de proyectos ya finalizados o que están llevándose a cabo. Además, algunas cepas han sido cedidas a otros grupos de investigación para realizar estudios en algún tema relacionado con biotoxinas marinas.

En este informe se describe la metodología seguida para el establecimiento de los cultivos mantenidos en la colección de fitoplancton tóxico/nocivo del COV. En la tabla I se listan todas las cepas de la colección, el nombre de la especie, su procedencia y su toxicidad en el caso en que haya sido probada por CLAE (cromatografía líquida de alta eficacia). De un total de 71 cepas, 53 proceden de la costa gallega, 12 fueron aisladas también en el COV procedentes de muestras de la costa mediterránea española y 6 han sido amablemente cedidas por otras instituciones extranjeras para realizar estudios comparativos en el COV. También se muestran los resultados obtenidos en diferentes experimentos con las especies de dinoflagelados con las que más se ha trabajado en el COV hasta el momento. Estas especies son: *Gymnodinium catenatum* Graham, *Alexandrium minutum* Halim y *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge.

1.1 *Alexandrium minutum*

Al género *Alexandrium* pertenecen varias especies productoras de toxinas PSP, por lo que ha sido ampliamente estudiado tanto taxonómica como toxicológicamente. Su sistemática ha sido, y sigue siendo, muy discutida. Originalmente las especies de este género estuvieron incluidas en el género *Gonyaulax*, hasta que se aceptó la propuesta de Balech (1985) y se reconoce que *Alexandrium* Halim fue el primer nombre aplicado al grupo de *Gonyaulax tamarensis*. Bajo este nombre fue citado el primer episodio de PSP producido por *Alexandrium* en las costas gallegas en mayo de 1984 (Blanco, Mariño y Campos, 1985) que posteriormente se identificó como *Alexandrium lusitanicum*, sinónimo de *Alexandrium minutum* en la actualidad (Taylor, Fukuyo y Larsen, 1995).

La morfología y la producción de toxinas de los cultivos de esta especie mantenidos en la colección del COV ha sido estudiada por Franco, Fernández y Reguera (1994) y Franco et al. (1995). Estos autores no observaron diferencias significativas entre cepas identificadas en un principio como *A. minutum* y *A. lusitanicum* (P. ej. el cultivo procedente de Portugal), todas ellas denominadas *A. minutum* en la actualidad.

1.2 *Gymnodinium catenatum*

Gymnodinium catenatum fue asociado con el envenenamiento paralizante por consumo de bivalvos en las rías gallegas por primera vez en 1976 (Estrada, Sánchez y Fraga, 1984), siendo su toxicidad probada en episodios posteriores (Fraga et al., 1988; Anderson, Sullivan y Reguera, 1989). Este dinoflagelado también se ha relacionado con intoxicaciones de tipo paralizante en la costa de Málaga (Bravo et al., 1990) y en otros países del mundo: México (Morey-Gaines, 1982; Mee, Espinosa y Díaz, 1986), Portugal (Franca y Almeida, 1989), Tasmania (Hallegraeff y Summer, 1986), Japón (Ikeda et al., 1989) y Marruecos (Tahri, 1995).

Los cultivos establecidos en el COV han sido la base de varios estudios realizados con el objetivo de conocer mejor los procesos implicados en las floraciones de *G. catenatum* en las costas gallegas. Fueron importantes para estudiar la composición de las toxinas (Anderson et al., 1989). Igualmente, han sido utilizados para estudios del ciclo de vida, tasas y condiciones de germinación (Bravo y Anderson, 1994). Otro trabajo realizado en el COV con los cultivos de *Gymnodinium catenatum* fue un estudio taxonómico sobre su diferenciación con *Gyrodinium impudicum* (Fraga y Bravo, 1995), también dinoflagelado formador de cadenas pero que no es tóxico (Fraga et al., 1995a; Fraga et al., 1995b).

1.3 *Prorocentrum lima*

Prorocentrum lima es un dinoflagelado bentónico con amplia distribución geográfica. Ha sido citado abundantemente en aguas tropicales asociado a alguno de los síntomas producidos por la ciguatera, síndrome causado por otro dinoflagelado bentónico, *Gambierdiscus toxicus* (Yasumoto et

al., 1980; Bagnis et al., 1985). Aunque en aguas templadas no existen muchas referencias, ya Lebour (1925) lo cita tanto en muestras de plancton como asociado a sustrato arenoso en las costas de Irlanda y Gran Bretaña.

En todos los cultivos de este dinoflagelado se ha verificado la producción de al menos dos toxinas de naturaleza polieter, ácido okadaico y dinophysitoxina 1, pertenecientes al grupo de las diarreicas (Lee et al., 1989). A pesar de su evidente capacidad para producir toxinas, *P. lima* no se ha asociado claramente a episodios diarreicos debido, probablemente, a que su carácter bentónico hace improbable su ingestión por moluscos filtradores. Sin embargo, el cultivo de este dinoflagelado tiene gran importancia en el estudio de las toxinas diarreicas, ya que las especies del género *Dinophysis*, los organismos claramente asociados con este tipo de toxicidad, no se han conseguido cultivar hasta el momento.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento y establecimiento de los cultivos monoalgales

Para el establecimiento de un cultivo monoalgal se usaron principalmente dos técnicas, a veces combinadas:

Técnica de aislamiento por micropipeta (Hoshaw y Rosowski, 1973; Guillard y Keller, 1984). Esta técnica consiste en aislar los microorganismos por micromanipulación, bajo binocular o microscopio invertido, mediante micropipeta capilar. Se usaron de 25 a 100 aumentos y se realizaron lavados de las células aisladas mediante sucesivas transferencias en medio estéril, hasta que no se apreció contaminación por otros microorganismos distintos al que interesaba. Es una técnica recomendable para especies que resisten bien cierta manipulación y sobre todo para aislamiento de quistes de dinoflagelados.

Técnica de aislamiento por sucesivas diluciones. Esta técnica es aceptable en los casos en que la especie a aislar es dominante en la muestra. Resulta muy sencilla pues consiste en realizar sucesivas diluciones de la muestra en medio limpio, hasta conseguir el cultivo monoalgal. Las sucesivas diluciones de la muestra se realizaron en placas de tejidos de 96 pocillos con 250 μ l de medio en cada uno. Estas placas tienen la gran ventaja de permitir observar el contenido de las mismas al microscopio invertido, por lo que se pudo seguir el estado de los cultivos en los días siguientes a la realización de las diluciones. El uso de esta técnica de aislamiento es ventajoso para especies delicadas, como *Gymnodinium catenatum*, que no toleran una manipulación excesiva.

En los comienzos de la colección se utilizó medio f/2 (Guillard y Rytther, 1962), posteriormente se cambió a medio K (Keller y Guillard, 1985) y actualmente se utiliza medio K sin Tris. Este medio se utiliza sin silicatos excepto para cultivo de diatomeas. Las placas se incubaron en las condiciones que se describen para mantenimiento (apartado 2.2). Para el seguimiento del aumento en número de células y germinación de quistes, se observaron detenidamente las placas al microscopio los días siguientes al aislamiento. Una vez alcanzado un crecimiento regular, sin

contaminación de otras especies y con un número de células suficiente (dependiendo de las especies, un mínimo aproximado de 50-100 células), el siguiente paso fue la transferencia del cultivo a recipientes de mayor volumen, desde los que se realizaron las necesarias transferencias de mantenimiento.

2.2 Mantenimiento de los cultivos

El mantenimiento de las cepas se realiza mediante la transferencia sucesiva de inóculos de los cultivos a medio nuevo, e incubándolos en condiciones adecuadas. En el COV, el mantenimiento de la colección de cultivos se realiza en cámara isotérmica a 19 ± 1 °C para todas las especies, excepto *Alexandrium taylori* y *Pseudonitzschia*, que se mantienen a 22 ± 1 °C y 15 ± 1 °C respectivamente, con luz fluorescente tipo blanco-industrial y tipo luz-día, con intensidades luminosas de aproximadamente $70 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y ciclo 14/10 horas luz/oscuridad. En la actualidad, el medio de cultivo usado en el mantenimiento es el medio K (Keller y Guillard, 1985) sin Tris.

Los cultivos se mantienen en tubos de vidrio con 30 ml de medio, salvo *Gyrodinium impudicum* para la que se utilizan erlenmeyers con 50 ml de medio y *Pseudo-nitzschia* spp. que se mantiene en frascos de cultivos de tejidos con 100 ml de medio. El material se autoclava previamente con agua destilada. El medio de cultivo se hace con agua de mar autoclavada en botellas de teflón de 1 l, las cuales se ponen a enfriar rápidamente al baño maría y añadiendo las soluciones stock en el momento en que se vaya a utilizar el medio (Keller y Guillard, 1985; McLachlan, 1973). La manipulación del material, del medio y de los cultivos se realiza en cámara de flujo laminar manteniendo las condiciones más axénicas en lo posible. La temperatura se estableció teniendo en cuenta los requerimientos de todas las especies que se mantienen en la misma cámara, para lo que fue necesario buscar un cierto consenso entre las temperaturas óptimas de mantenimiento de todas las cepas. Si bien el establecer ese punto no fue muy difícil debido a que casi todas las especies proceden de la misma zona (las rías gallegas), se observaron diferencias importantes en el mantenimiento de las distintas cepas en lo que concierne a la duración de las fases del crecimiento.

Para el mantenimiento de los cultivos de microalgas es importante conocer sus curvas de crecimiento para saber los días que tarda una cepa determinada en alcanzar la última parte de la fase exponencial, que es la más idónea para realizar las transferencias a medio nuevo. Debido a las diferencias observadas en la duración de las distintas fases del crecimiento de las especies de la colección, los cultivos se han agrupado en cepas de crecimiento rápido que es necesario transferir cada 15-20 días y cepas de especies de crecimiento más lento que se transfieren cada 25-30 días.

2.3. Cálculo de la tasa de crecimiento

En el presente informe, como parámetro de crecimiento se utiliza el número de divisiones/día. Para su cálculo se realizaron conteos celulares

cada 2-3 días. En el experimento del efecto de la temperatura en cultivos de *G. catenatum*, se calculó la tasa de crecimiento basándose en medidas de fluorescencia en vivo a lo largo de la fase exponencial de la curva de crecimiento y, para el experimento de efecto de la salinidad, se hizo un seguimiento del crecimiento con conteos celulares y fluorescencia en vivo. En el apartado de resultados de la especie *Gymnodinium catenatum* se discute el uso de estas dos variables para el cálculo de la tasa de crecimiento. También en el caso de *Alexandrium minutum* se discute la necesidad del control del tamaño celular a la hora de comparar tasas de crecimiento. El valor en divisiones/día se calculó usando técnicas de regresión entre el logaritmo del número de células y los días de cultivo durante la fase exponencial de la curva de crecimiento. El valor de la pendiente de la recta es igual a la tasa instantánea de crecimiento ($K_{10} = \log(N_t/N_0)/t$). Usando logaritmo en base 2 se obtiene k en divisiones/día ($k = 3,322 K_{10}$ siendo $\log_2 10 = 3,322$) (Guillard, 1973).

Tabla I. Cepas de microalgas que se mantienen en la colección de cultivos de fitoplancton tóxico/nocivo del COV. (*): Se mencionan exclusivamente las principales toxinas detectadas en los análisis realizados por CLAE para esas cepas o los resultados negativos en los casos en que no se detectaron toxinas. No se mencionan observaciones donde no se han realizado análisis de toxinas.

Nombre	Cepa	Procedencia	Observaciones (*)
<i>Alexandrium affine</i>	PA2V	Vigo	
	PA3V	Vigo	No producen toxinas de tipo paralizante (Lee et al., 1989)
	PA4V	Vigo	
	PA5V	Vigo	
<i>Alexandrium tamarense</i>	PE1V	Vigo	No producen toxinas de tipo paralizante (Franco, datos no publicados)
<i>Alexandrium minutum</i>	AL1V	Vigo	
	AL2V	Vigo	
	AL3V	Vigo	
	AMP4	Mallorca	Toxinas de tipo paralizante: GTX4, GTX1, GTX3 y GTX2 (Franco, Fernández y Reguera, 1994; Franco et al., 1995; Franco, datos no publicados)
	AMP10	Mallorca	
	AMP13	Mallorca	
	18A	Portugal	
	AMAD01	Australia	
	AMAD06	Australia	
	AMAD21	Australia	
AMITA	Adriático		

Tabla I (continuación).

Nombre	Cepa	Procedencia	Observaciones (*)
<i>Alexandrium taylori</i>	AM1V	Costa Brava	No producen toxinas de tipo paralizante (Franco, datos no publicados)
	AM4V	Costa Brava	
	AM7V	Costa Brava	
	AM8V	Costa Brava	
	AM9V	Costa Brava	
<i>Amphydinium cf. carterae</i>	A1V	Aldán	No produce toxinas diarreicas (Lee et al., 1989)
<i>Coolia monotis</i>	CM1V	Vigo	No producen toxinas diarreicas (Lee et al., 1989)
	CM2V	Vigo	
	CM3V	Vigo	
	CM4V	Vigo	
	CM5V	Vigo	
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GC21V	Vigo	Toxinas de tipo paralizante: C1, C2, C3, C4, GTX6, GTX5, dcSTX y STX (Anderson, Sullivan y Reguera, 1989; Franco, datos no publicados)
	GC19V	Vigo	
	GC7B	Vigo	
	GC9V	Vigo	
	GC10V	Vigo	
	GC11V	Vigo	
	GC12V	Vigo	
	GC13V	Vigo	
<i>Gyrodinium impudicum</i>	GY1VA	Valencia	No producen toxinas de tipo paralizante (Fraga et al., 1995b)
	GY2VA	Valencia	
	GY3VA	Valencia	
	GY4VA	Valencia	
	GY5V	Vigo	
	10B	Italia	
<i>Heterosigma carterae</i>	HA1V	Arousa	
	HA2V	Arousa	
	CHATON	A Coruña	

Tabla I (continuación).

Nombre	Cepa	Procedencia	Observaciones (*)
<i>Oltmannsiella virida</i>	OV1V	Vigo	
	PL1V	Vigo	
	PL2V	Vigo	
	PL3V	Vigo	
	PL4V	Vigo	
	PL5V	Vigo	Toxinas diarreicas: ácido okadaico y DTX1 (Lee et al., 1989; Fernández y Bravo, en preparación)
	PL6V	Bueu	
	PL7V	Bueu	
	PL8V	Bueu	
	PL9V	Bueu	
<i>Prorocentrum lima</i>	PL10V	Bueu	
<i>Prorocentrum micans</i>	PM	Vigo	
<i>Prorocentrum minimum</i>	PMIN	Vigo	
<i>Prorocentrum rostratum</i>	PR1V	Vigo	
	PT	Galicia	
	PT2V	Vigo	
	PT3V	Vigo	
	PT5V	Vigo	
<i>Prorocentrum triestinum</i>	PS6V	Pontevedra	No producen ácido domoico (Míguez, datos no publicados)
	G4	Vigo	
	G1	Vigo	Producen ácido domoico (Míguez, datos no publicados)
	G2	Vigo	
	G5	Vigo	
<i>Pseudo-nitzschia cf. australis</i>	F1	Vigo	No produce ácido domoico (Míguez, datos no publicados)
<i>Pseudo-nitzschia cf. subpacífica</i>	S2V	Vigo	No produce toxinas diarreicas (Lee et al., 1989)
	S3V	Vigo	
	EXQ7V	Vigo	
<i>Scrippsiella spp.</i>			

Tabla II. Publicaciones sobre estudios llevados a cabo con cepas de los cultivos de fitoplancton tóxico/nocivo del COV. (†): Cepa desaparecida en la colección de cultivos del COV. (*): Los códigos de las cepas citadas en la publicación no coinciden con los de la colección.

Especie	Cepa	Referencia
<i>A. affine</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>G. impudicum</i>	AA71V(†), GC1V(†), GC11V(†) y GC3V(†)	Anderson, Sullivan y Reguera (1989)
<i>A. affine</i> , <i>A. minutum</i> , <i>A. tamarense</i> , <i>G. catenatum</i> , <i>G. impudicum</i> , <i>P. lima</i> y <i>P. triestinum</i>	PA2V, PA3V, PA4V, AL1V, AL2V, 18V, PE1V, PE2V(†), GC7B, GC9V, GC19V, GC21V, GCVAPL7(†), GCVAPL8(†), GCVAPL9(†), GY5V, PL5V, PL6V, PL7V, PL8V, PT3V y PT5V	Costas y López Rodas (1994)
<i>A. affine</i> y <i>G. catenatum</i>	PA5V y GC1V(†)	Fraga, Gallager y Anderson (1989)
<i>A. affine</i> , <i>A. minutum</i> y <i>A. tamarense</i>	PA5V, 18V, AMAD01, AMAD06, PE1V y PE2V(†)	Scholin et al. (1994)
<i>A. affine</i> , <i>A. minutum</i> , <i>C. monotis</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>P. lima</i>	PA1V, AL?V, CM1V, GC21V, PL2V y PL4V	Selvin et al. (1989)
<i>A. affine</i> , <i>A. minutum</i> , <i>G. catenatum</i> , <i>G. impudicum</i> , <i>P. lima</i> y <i>P. triestinum</i>	PA2V, PA3V, PA4V, AL1V, AL2V, 18V, GC7B, GC9V, GC19V, GC21V, GCVAPL7(†), GCVAPL8(†), GCVAPL9(†), GY5V, PL5V, PL6V, PL7V, PL8V, PT3V y PT5V	Zardoya et al. (1995)
<i>A. minutum</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>G. impudicum</i>	AL1V, AL2V, 18V, GC7B, GC9V, GC19V, GC21V, GCVAPL7(†), GCVAPL8(†), GCVAPL9(†) y GY5V	Costas et al. (1995b)
<i>Alexandrium minutum</i>	AL1V y AL2V	Flynn et al. (1995)
<i>Alexandrium minutum</i>	AL1V, AL2V y AL3V	Franco, Fernández y Reguera (1994)
<i>Alexandrium minutum</i>	AL1V, AL2V, AL3V, AMAD01, AMAD06, AMAD21 y 18A	Franco et al. (1995)
<i>A. minutum</i> , <i>G. catenatum</i> y <i>G. impudicum</i>	AL1V, 18V, GC21V y GY5V	Mendoza et al. (1995)
<i>A. tamarense</i> y <i>P. triestinum</i>	(*)	Costas et al. (1993c)

Tabla II (continuación).

Especie	Cepa	Referencia
<i>Amphidinium</i> sp., <i>C. monotis</i> , <i>Scropsiella</i> sp. y <i>P. lima</i>	A1V, CM1V, S2V, PL1V, PL2V, PL3V, PL4V y PL5V	Lee et al. (1989)
<i>Gymnodinium</i> <i>catenatum</i>	GC1V(+), GC9V, GC21V, GC19V y GC7B	Bravo y Anderson (1994)
<i>G. catenatum</i> y <i>G. impudicum</i>	GC7B, GY1VA, GY2VA, GY3VA, GY4VA, GY5VA, GCVAPL7(+), GCVAPL8(+), GCVAPL9(+)	Fraga et al. (1995a)
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GC21V	Reguera y Oshima (1990)
<i>Gyrodinium impudicum</i>	GC3V(+)	Bravo (1986)
<i>Gyrodinium impudicum</i>	GY1VA, GY2VA, GY3VA, GY4VA, GY5VA, 10B	Fraga et al. (1995b)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Bravo (1991)
<i>P. lima</i> y <i>P. triestinum</i>	PL6V, PL8V, PT3V y PT5V	Costas et al. (1993b)
<i>P. lima</i> y <i>P. triestinum</i>	PL5V, PL7V y PT5V	Costas et al. (1995a)
<i>P. lima</i>	PL2V	Demaret, Sohet y Houvenaghel (1995)
<i>P. lima</i> y <i>P. triestinum</i>	(*)	López-Rodas et al. (1992)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Morlaix y Lassus (1992)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Norte et al. (1991)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Norte, Padilla y Fernández (1994); Norte et al. (1994)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Pillet y Houvenaghel (1995)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Pillet et al. (1995)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Rausch de Traubenberg y Morlaix (1995)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Rausch de Traubenberg et al. (1995a, 1995b)
<i>Prorocentrum lima</i>	PL2V	Sohet et al. (1995)
<i>Prorocentrum triestinum</i> PT		Costas et al. (1993a)

3. RESULTADOS

3.1 *Alexandrium minutum*

En la colección de cultivos del COV se mantienen en total 11 cepas de *Alexandrium minutum* (tabla I). Se ha comprobado que todas ellas son productoras de toxinas PSP (Franco, Fernández y Reguera, 1994; Franco et al., 1995 y Franco, datos no publicados). Además, se mantienen cepas pertenecientes a otras especies del género *Alexandrium* aisladas también de aguas de las Rías Bajas gallegas, *A. tamarense* y *A. affine*, en cuyos cultivos no se detectaron toxinas paralizantes. Igual ocurrió en cultivos de *A. taylori* aislados de muestras de la Costa Brava.

3.1.1 Mantenimiento

En las condiciones mencionadas de mantenimiento de los cultivos de la colección del COV (ver material y métodos), las cepas de *Alexandrium minutum* se transfieren a medio nuevo aproximadamente cada 20 días. En la figura 1 se observan las curvas de crecimiento para tres réplicas de cultivos de la cepa AL1V en las condiciones indicadas y en volúmenes de 150 ml de cultivo.

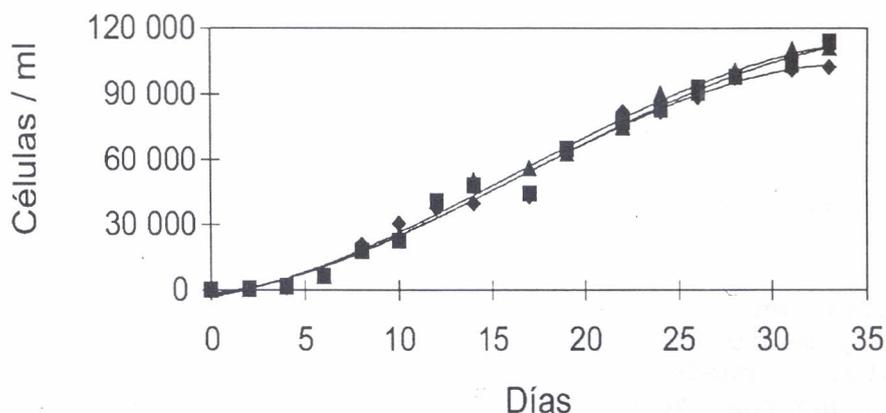


Figura 1. Curvas de crecimiento de tres réplicas de cultivos de *Alexandrium minutum* (cepa AL1V).

Los valores más elevados de la tasa de crecimiento en divisiones/día se observaron del sexto al octavo día de cultivo ($0,76 \pm 0,05$) ($n = 3$). Del octavo al décimo y desde éste al duodécimo día las tasas fueron de $0,22 \pm 0,07$ y $0,31 \pm 0,16$ divisiones/día respectivamente y, en los días sucesivos, las tasas disminuyeron de forma progresiva. En la figura 1 se muestra el crecimiento para tres réplicas. Se observó que el crecimiento varía notablemente entre cepas y según condiciones de cultivo.

En la figura 2 se muestra el crecimiento para las tres cepas aisladas de aguas de la costa gallega. Las curvas de los tres cultivos muestran diferencias en las tasas de crecimiento en la fase exponencial que son notables y que se repitieron en experimentos posteriores. Franco et al. (1995) hacen mención de estos resultados junto con los de toxicidad en

las distintas fases del crecimiento de los diferentes cultivos. Los cultivos representados en dicha figura fueron realizados en las condiciones mencionadas para mantenimiento (ver material y métodos) y en volúmenes de 2 l. Una característica de los cultivos de esta especie que se observa en la figura 2, es la duración de la fase estacionaria al menos durante 10-15 días de forma que, si no se transfieren en la fase exponencial, es posible realizarlo durante la fase estacionaria sin que peligre el mantenimiento de la cepa. Si se comparan las curvas de crecimiento representadas en la figura 1 y la correspondiente de la misma cepa en la figura 2, se observa que las concentraciones alcanzadas en volúmenes de 150 ml de cultivo son diez veces mayores que las observadas en volúmenes de 2 l. Este efecto se observó en otros experimentos realizados con la misma cepa y en cultivos de otras especies de microalgas.

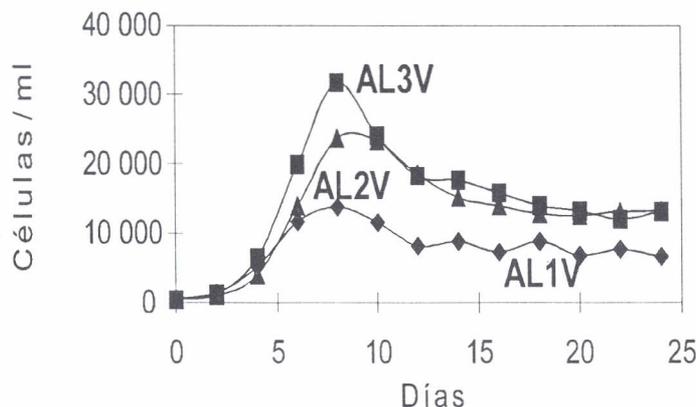


Figura 2. Curvas de crecimiento de tres cepas de *Alexandrium minutum* de la colección del COV.

3.1.2 Efecto del medio de cultivo

Las diferencias en el crecimiento de la cepa AL1V en volúmenes de 2 l, con medio K y medio f/2, y en las mismas condiciones mencionadas para mantenimiento, se pueden observar en la figura 3. En medio f/2 los cultivos tienen una fase de adaptación más prolongada, que puede durar hasta 6 días, alcanzando luego iguales tasas de crecimiento y mayores concentraciones celulares que en medio K. Aunque no se hicieron medidas de los tamaños celulares, se apreciaron células de menor tamaño en los cultivos con medio f/2, que se corresponden con valores más elevados en el número de células. En la figura 3 se representa, también, el efecto de dos distintos tratamientos del agua de mar utilizada para elaborar el medio de cultivo. El tratamiento 1 (T1) consistió en agua de mar autoclavada en botes de teflón de 1 l y en el tratamiento 2 (T2) se utilizó agua de mar filtrada (22 µm de poro). Se observaron mayores rendimientos con este segundo tratamiento. Actualmente, para cultivos de más de 1 l se utiliza la filtración como método de esterilización, por su mayor comodidad, eficacia (volúmenes grandes de agua de mar sufren precipitaciones al ser autoclavados) y tras comprobarse la mencionada mejora del crecimiento. Sin embargo, es necesario tomar precauciones para evitar la contaminación con otros microorganismos, por ello, para el mantenimiento de las cepas de la colección se utiliza agua de mar autoclavada en teflón.

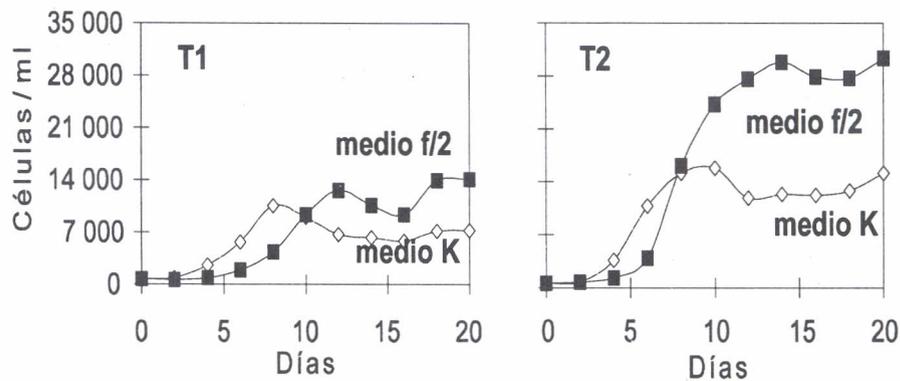


Figura 3. Curvas de crecimiento de cultivos de *Alexandrium minutum* (cepa AL1V) en dos medios diferentes y con agua de mar autoclavada (T1) y agua de mar filtrada

3.1.3 Crecimiento en distintas condiciones luminosas

Se realizó un experimento de crecimiento con la cepa AL1V en cámaras distintas a la misma temperatura pero con distintos tipos de luz. Los cultivos estaban aclimatados a las diferentes condiciones desde hacía varios meses y se realizó el seguimiento del crecimiento por conteos celulares de tres réplicas de cultivos, de 150 ml, para cada tipo de luz. Las condiciones de temperatura y medio de cultivo fueron las mencionadas para mantenimiento (ver material y métodos). En la figura 4 se representa la curva de crecimiento en la cámara 1 (c1) con calidad de luz *luz día* e intensidades luminosas de $60-90 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Las curvas de crecimiento representadas como c2 son las correspondientes a la cámara 2 iluminada con calidad de luz *blanco industrial* e intensidad luminosa de $25-40 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Se realizó, además, un seguimiento del tamaño celular en las distintas fases de crecimiento de uno de los cultivos de cada condición luminosa (a1 y a2, figura 4). El seguimiento del tamaño celular se realizó midiendo el área celular al microscopio óptico mediante análisis de imagen.

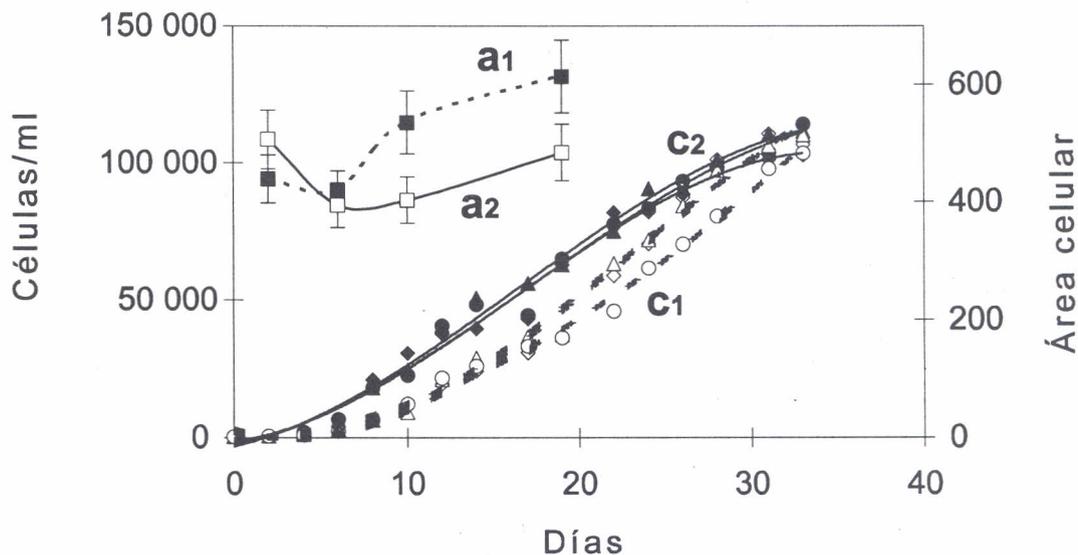


Figura 4. Crecimiento y tamaño celular de *Alexandrium minutum* (cepa AL1V) en distintas condiciones luminosas; a) tamaño celular (μm^2) n = 30; c) crecimiento.

Las curvas de crecimiento son significativamente distintas en la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos en la luminosidad tipo luz día tienen una fase de adaptación mayor con tasas de crecimiento menores que en el tipo de luz blanco industrial, sin embargo, después se recupera, alcanzando densidades celulares equivalentes en ambas calidades luminosas, debido probablemente al efecto de limitación de nutrientes que sufre antes este último cultivo. Los tamaños celulares sufren también cambios que están relacionados con las distintas curvas de crecimiento, expresadas en divisiones/día. En el caso en que el cultivo necesita un mayor periodo de adaptación (c1), aunque las células se dividen más lentamente, crecen más en biomasa, como pone de manifiesto el aumento progresivo de tamaño celular en esa fase (a1). Durante nuestra experiencia con cultivos de *Alexandrium minutum*, hemos observado cambios significativos en los volúmenes celulares dependiendo de la fase de cultivo, condiciones de cultivo y cepa. Por ello, es importante tener en cuenta el volumen celular al hablar de crecimiento en esta especie.

3.1.4 Cultivos en volúmenes de 20 litros

Se realizaron varias experiencias de cultivos de la cepa AL1V en volúmenes de 20 l, medio K y las mismas condiciones mencionadas para mantenimiento (ver material y métodos). El fin de estos cultivos fue la producción de un elevado número de células para la obtención de toxinas, con el objetivo de obtener patrones de las mismas. En la figura 5 se muestran las curvas de crecimiento para dos de los cultivos mencionados. Uno de ellos se mantuvo con agitador magnético para conseguir su homogeneización durante todo el periodo; el otro cultivo solamente se agitó cada dos días para su homogeneización durante la toma de muestras. Se obtuvieron tasas de crecimiento mayores para el cultivo con agitación constante (0,76 frente a 0,51 divisiones/día en la fase exponencial). Además, como se observa en la figura 5, ese cultivo también tiene la fase de adaptación más corta y alcanza concentraciones celulares más elevadas. Este mayor rendimiento se debe, probablemente, a la mayor disponibilidad de los nutrientes gracias a la agitación. De otra forma, en los cultivos en grandes volúmenes se produce una limitación de nutrientes en algunas zonas del cultivo, necesitando las células un gasto de energía extra para obtenerlos. El cultivo masivo de *A. minutum* no ofrece dificultad y es recomendable si se quiere obtener un gran

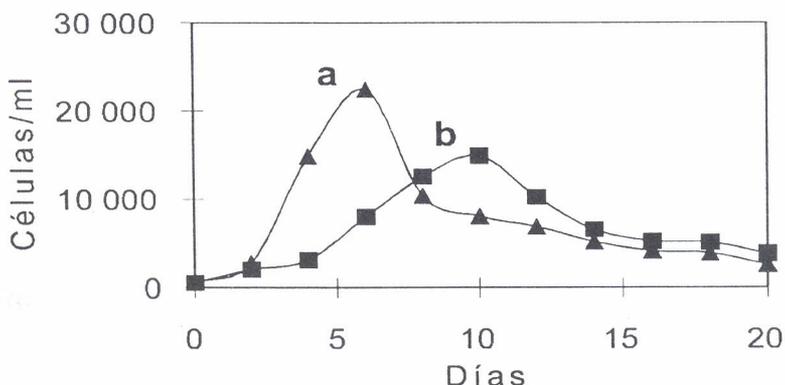


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Alexandrium minutum* (cepa AL1V) en volúmenes de 20 litros. a) Con agitación; b) sin agitación.

número de células en un momento concreto. Para el cultivo (a) representado en la figura 5, se obtuvo una producción de $45 \cdot 10^7$ células en siete días, partiendo de una concentración inicial de 10^4 células.

3.1.5 Cultivos semicontinuo y continuo

Los cultivos continuos y semicontinuos se realizaron en volúmenes de 3 l, en las mismas condiciones que los cultivos anteriores y manteniéndolos con agitación continua. Cuando los cultivos se encontraron en fase exponencial, comenzó a retirarse parte del cultivo y a reponerse la misma cantidad de medio nuevo. En los cultivos semicontinuos, esa operación se realizó manualmente cada dos días, de forma que se retiraba la cantidad adecuada, añadiéndole la misma de medio nuevo, para que el cultivo se mantuviera con concentraciones celulares en torno a $12 \cdot 10^3$ células/ml. De esta forma se obtuvieron rendimientos de $7,8 \cdot 10^6$ células/día en cada cultivo. En los cultivos continuos, la operación de retirada de cultivo y aporte de medio se realizó automáticamente y de forma continua por medio de una bomba peristáltica, obteniéndose rendimientos de $7 \cdot 10^3$ células/min ($10,1 \cdot 10^6$ células/día).

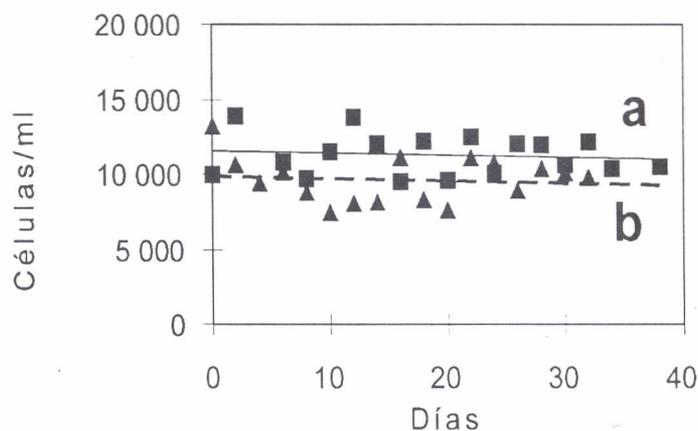


Figura 6. Mantenimiento de cultivos de *Alexandrium minutum* (cepa AL1V) en sistema: a) semicontinuo y b) continuo.

3.2 *Gymnodinium catenatum*

Las cepas de *G. catenatum* que existen en la actualidad en la colección de cultivos de fitoplancton del COV, proceden de muestras de las floraciones de esta especie ocurridas en noviembre de 1985 (GC9V), octubre de 1986 (GC19V, GC21V y GC7B) y septiembre de 1993 (GC10V-GC13V) en las Rías Bajas gallegas. Las cepas procedentes de 1986 se establecieron aislando e incubando quistes producidos en laboratorio a partir de arrastres realizados durante una floración de esa especie (Anderson et al., 1988). Las cepas aisladas en 1985 y 1993 se establecieron a partir de varias cadenas de células vegetativas procedentes de floraciones ocurridas esos años.

3.2.1 Mantenimiento

En la colección del COV las cepas de *G. catenatum* se transfieren a medio nuevo cada 10-15 días. Éste es el tiempo aproximado que necesitan esos cultivos para alcanzar la última fase del crecimiento exponencial a partir de un cultivo con concentración inicial de unas 200 células/ml en volúmenes de 30-150 ml. Se ha observado que el tamaño del inóculo para el comienzo de un nuevo cultivo de *G. catenatum* es importante, de forma que los cultivos fallan en un porcentaje elevado con inóculos por debajo de un umbral. Nosotros utilizamos concentraciones iniciales de 300-400 células/ml para volúmenes de más de un litro y 200 células/ml para volúmenes menores. Los cultivos de *G. catenatum* se caracterizan porque una vez alcanzada la fase estacionaria, el cultivo decae muy rápidamente. Por ello, requiere más cuidado que otras especies de microalgas y conviene transferir los cultivos antes de alcanzar dicha fase. Cuando el cultivo empieza a decaer, aparece en los mismos gran cantidad de mucus rodeando las células, acumulándose en el fondo y es necesario agitarlo bastante para homogeneizarlo.

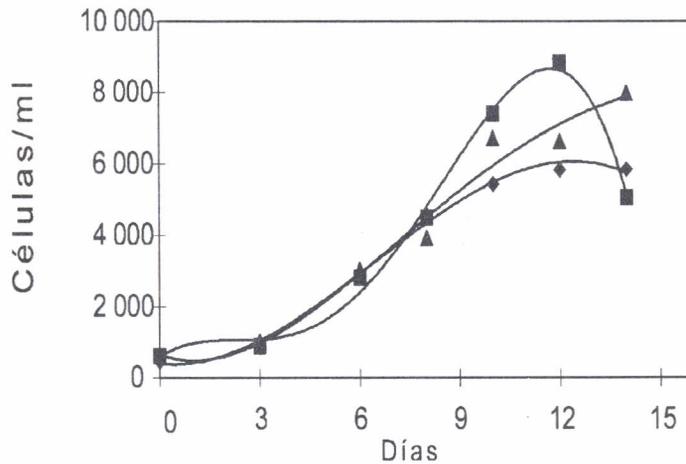


Figura 7. Curvas de crecimiento de tres réplicas de cultivos de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC10V).

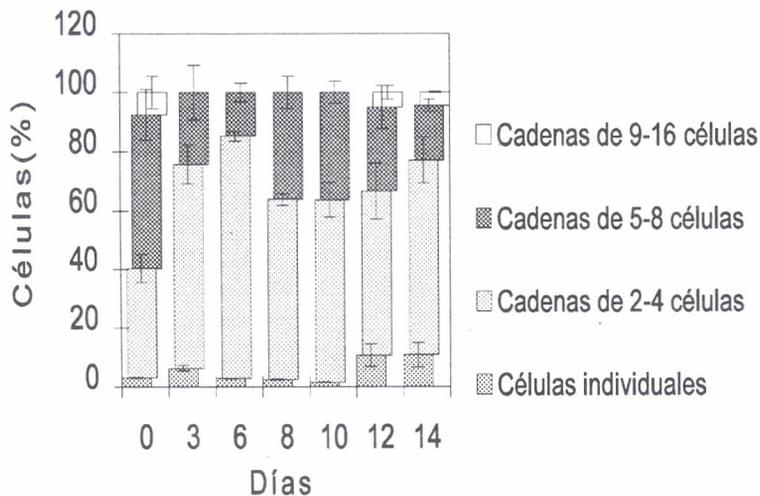


Figura 8. Longitud de las cadenas de los cultivos de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC10V) cuyo crecimiento se muestra en la figura 7, (n = 3).

En las figuras 7 y 8 se representan las curvas de crecimiento y la longitud de la cadena, respectivamente, para tres réplicas de cultivos de la cepa GC10V. Los cultivos se realizaron en volúmenes de 150 ml, medio K y las condiciones citadas para mantenimiento (ver material y métodos). La longitud de cadena se expresa según el número de células de la misma. El número de células por cadena es menor al comienzo de la curva de crecimiento, durante la fase de adaptación. Las cadenas más largas (de 8-16 células por cadena) se observan al final de la fase exponencial y en la fase estacionaria.

3.2.2 Crecimiento a distintas temperaturas

Bravo y Anderson (1994) describen las variaciones de las tasas de crecimiento de *G. catenatum* (figura 9) en un gradiente de temperatura, para una cepa (GC1V) aislada de una floración ocurrida en las Rías Bajas gallegas en 1985. Estos autores realizan un experimento en placa de gradiente térmico conseguido por calentamiento y enfriamiento de sus extremos (Watras, Chisholm y Anderson, 1982). En la placa convenientemente agujereada se colocaron tubos con 30 ml de cultivo en distintas temperaturas y tres réplicas en cada una. Una cuarta réplica en las mismas temperaturas se utilizó para el control diario de éstas. Los cultivos primeramente se acondicionaron a las temperaturas respectivas durante tres generaciones consecutivas. El crecimiento se siguió mediante mediciones de la fluorescencia en vivo para 5-6 réplicas.

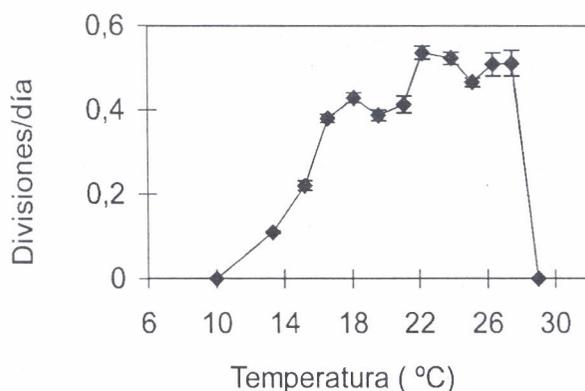


Figura 9. Tasas de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* a distintas temperaturas (Bravo y Anderson, 1994).

La tasa de crecimiento calculada en base a la fluorescencia en vivo fue óptima a 22-28 °C con tasas de aproximadamente 0,5 divisiones/día (figura 9). El crecimiento fue también rápido desde 17-22 °C alcanzando alrededor de 0,4 divisiones/día. Por debajo de 17 °C, la tasa de crecimiento descendió rápidamente con la temperatura y fue imperceptible a 11 °C. No se observó crecimiento a 29 °C. A temperaturas por encima de 25 °C los cultivos crecían rápidamente, al menos en valores de fluorescencia, y se observaban largas cadenas de células en pocos días, alcanzándose la fase estacionaria aproximadamente a los 5-6 días. Esta fase duraba muy poco a esas temperaturas, de forma que a veces el cultivo declinaba en menos de dos días. En temperaturas en torno a 20-22 °C, aunque la fase estacionaria se alcanzaba más lentamente, los cultivos se mantenían en fase exponencial durante más días, de forma que se conseguían

cultivos más estables y cómodos de manejar. Por debajo de 17 °C se observaron crecimientos mucho más lentos y las células en cortas cadenas o individuales.

Se realizó un estudio preliminar sobre la relación entre fluorescencia y número de células, obteniéndose un índice de correlación de 0,93 a 20 ± 1 °C. En el experimento a distintas temperaturas se ha asumido esa correlación entre la fluorescencia y el número de células para todas las temperaturas. Sin embargo, hoy en día se cuestiona el uso de la fluorescencia para el cálculo de la tasa de crecimiento en divisiones/día, debido a que la fluorescencia por célula puede variar en relación al factor cuyo efecto sobre el crecimiento estamos estudiando. En el siguiente experimento se discute más ampliamente este tema en base al seguimiento realizado fluorescencia/número de células a distintas salinidades.

3.2.3 Crecimiento a distintas salinidades

En este experimento se midió el crecimiento de cultivos de la cepa GC9V de *G. catenatum* en medio K a distintas salinidades (27, 29, 31, 33 y 35), realizándose medidas de fluorescencia durante el experimento de 8-12 réplicas para cada salinidad. Con el fin de poder conocer la relación entre fluorescencia y número de células, se realizaron cómputos celulares para dos de las réplicas de cada salinidad.

Tabla IIIa. Tasas de crecimiento (divisiones/día), calculadas atendiendo al número de células, de cultivos de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC9V) a distintas salinidades.

Salinidad	27	29	31	33	35
Div/día	0,34	0,21	0,29	0,35	0,25
(2 réplicas)	0,29	0,37	0,32	0,27	0,17

Tabla IIIb. Tasas de crecimiento (divisiones/día), calculadas atendiendo a la fluorescencia, de cultivos de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC9V) a distintas salinidades.

Salinidad		27	29	31	33	35
Div/día (8-12 réplicas)	Media	0,23	0,23	0,24	0,22	0,29
	Des. Est.	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03

En la tabla III se detallan las tasas de crecimiento en divisiones/día para cada salinidad obtenidas utilizando valores de número de células (tabla IIIa) y fluorescencia (tabla IIIb). Se observa que utilizando fluorescencia, los valores de las tasas de crecimiento son ligeramente menores que cuando se usan concentraciones celulares, excepto para la salinidad 35. Aunque no se realizaron conteos suficientes para poder detectar diferencias significativas, se aprecia que para salinidad 35

la fluorescencia sobrevalora la tasa de crecimiento en divisiones/día con respecto a las otras salinidades. Con los valores obtenidos de fluorescencia y número de células se realizó un estudio sobre la relación entre estas dos variables en las distintas salinidades.

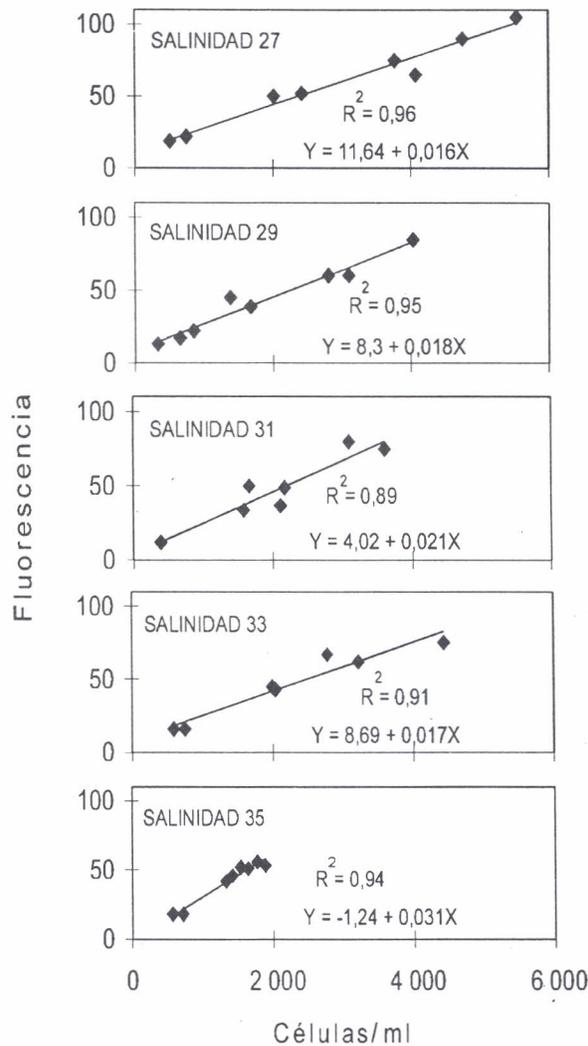


Figura 10. Relación fluorescencia/n.º de células en cultivos de *G. Catenatum* (cepa GC9V) a distintas salinidades.

En la figura 10 se muestra la ecuación de la recta de regresión para cada salinidad; se observa que en todas ellas la correlación es muy alta, dando explicación a los cambios en la fluorescencia por medio de cambios en el número de células durante el crecimiento. Sin embargo, la relación entre ambas variables no fue la misma para todas las salinidades. La recta que más se desvía de las demás es la obtenida para la salinidad 35. Como ya se ha mencionado, los cultivos a esta salinidad se comportan de distinta manera: se obtuvieron tasas de crecimiento menores y los rendimientos máximos fueron mucho menores, como se observa también en la misma recta de regresión. Al calcular la recta de regresión para salinidades 27-33 se obtiene la ecuación $Y = 9,43 + 0,017X$ (pues $R^2 = 0,93$), que serviría para ese rango de salinidad; sin embargo, la ecuación para la salinidad 35 es significativamente distinta. Por ello, se podrían usar los valores de fluorescencia para comparación de

las medias de las tasas de crecimiento en salinidades comprendidas entre 27 y 33, pero no para la salinidad 35, ya que la fluorescencia por célula aumenta en esa salinidad.

3.2.4 Crecimiento en distintas condiciones luminosas

Se realizó un experimento de crecimiento con la cepa GC10V en cámaras distintas, a la misma temperatura pero con diferentes calidades de luz. Los cultivos estaban acondicionados a las características del experimento desde hacía varios meses y se realizó el seguimiento del crecimiento por conteos celulares de tres réplicas de cultivos de 150 ml. En la figura 11 se representan las curvas de crecimiento para ambas condiciones (c1 con calidad de luz *luz día* e intensidades de $60-90 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$; c2 con luz *blanco industrial* y $25-40 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Se observan tasas de crecimiento y rendimientos significativamente mayores para c2. Experimentos que se están realizando actualmente sobre crecimiento de *G. catenatum* a distintas intensidades luminosas con *luz día*, revelan que intensidades luminosas mayores (en un rango entre 8 y $120 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$) mejoran el crecimiento, por lo cual se puede deducir que las diferencias en el crecimiento obtenidas para c1 y c2 se deben a los distintos tipos de luz. Con la luz tipo *blanco industrial* se obtienen mejores valores de crecimiento, aun en intensidades luminosas más bajas, que las utilizadas en el otro tipo de luz. Se realizó, además, un seguimiento de la longitud de las cadenas.

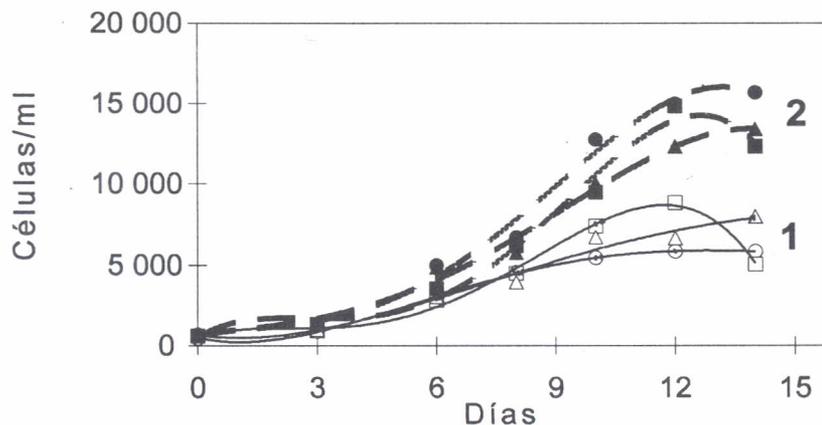


Figura 11. Crecimiento de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC10V) en distintas condiciones luminosas. 1) luz día y 2) blanco industrial.

Al estudiar el número de células por cadena (figura 12), se observan cadenas más largas en los cultivos c2 durante todas las fases del crecimiento. Este resultado, junto con el descrito para la longitud de las cadenas durante las distintas fases de crecimiento (figura 8), dan idea de que las cadenas más largas coinciden con una estabilidad del cultivo y mejor acondicionamiento, lo que podría asumirse en un mejor estado fisiológico de las células. En el experimento realizado para las distintas temperaturas, aunque no se hizo un seguimiento de la longitud de las cadenas, se observó igualmente esta característica de forma que, a medida que baja la temperatura de acondicionamiento, el número de células por cadena disminuye.

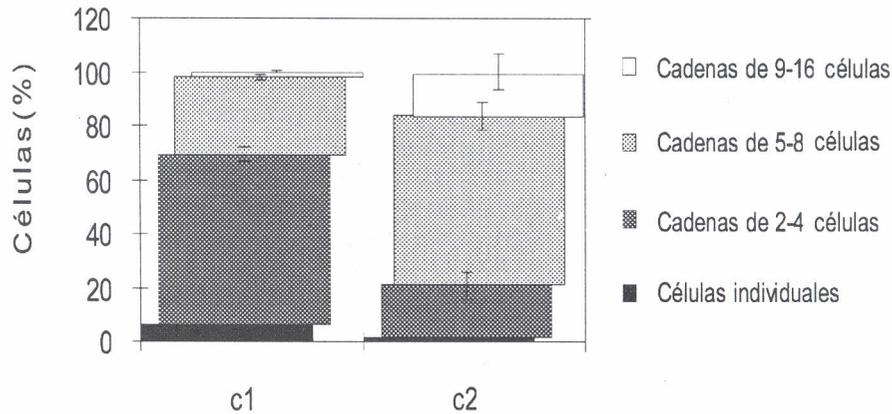


Figura 12. Representación de la longitud de las cadenas en los cultivos de *Gymnodinium catenatum* (cepa GC10V) en distintas condiciones luminosas.

3.2.5 Crecimiento en distintos medios de cultivo

Este experimento se realizó con la cepa GC19V en *erlenmeyers* con 1,5-2 l de cultivo en medio f/2 y medio K modificado (ver material y métodos). Las condiciones de temperatura y luz fueron las mismas mencionadas en mantenimiento de los cultivos. La concentración inicial fue 400 células/ml. Se realizaron conteos celulares cada 2-3 días. En la figura 13 se muestran las curvas de crecimiento. En medio f/2 se obtuvo una tasa de crecimiento de 0,33 y 0,31 divisiones/día para los 8 primeros días de cultivo. La máxima concentración alcanzada en medio f/2 fue de 2 000 células/ml. A partir de este valor los cultivos declinaron; se observó la aparición de abundante mucílago que, junto con las células, formaron grumos difíciles de deshacer. En medio K se obtuvieron tasas de crecimiento ligeramente más elevadas, 0,36 y 0,44 divisiones/día para el mismo periodo que en f/2. Las concentraciones máximas alcanzadas en medio K fueron mayores que en medio f/2 y variaron entre 3 000 y 5 000 células/ml. Los dos cultivos en medio K se recuperaron varios días después de una fase de declive (figura 13), obteniéndose una segunda fase exponencial a partir del día 12 de cultivo.

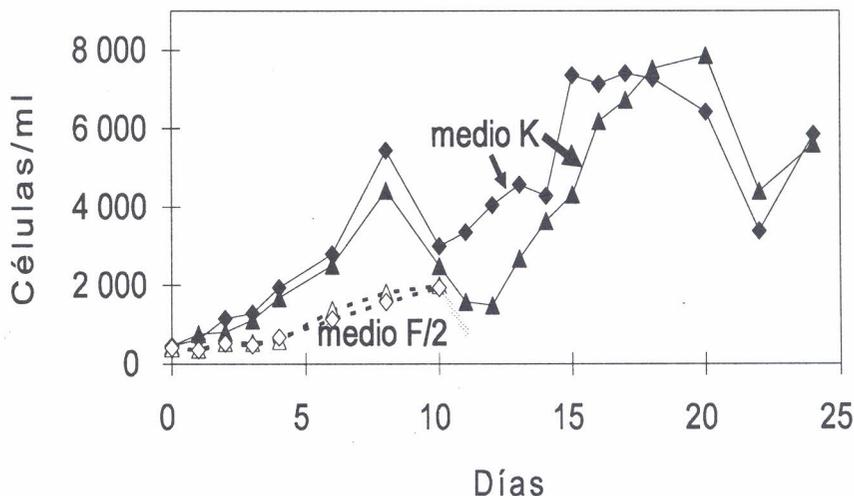


Figura 13. Crecimiento de *G. catenatum* (cepa GC19V) en distintos medios de cultivo.

Este comportamiento de recuperación no es raro en cultivos de *G. catenatum*. Esta especie, en la última fase del crecimiento exponencial, tiende a sedimentarse en el fondo del recipiente formando abundante mucílago. Al agitar el cultivo para homogeneizarlo y tomar la muestra, en muchos casos se produce una recuperación del mismo. Se ha observado que la agitación muy suave del cultivo para producir simplemente una homogeneización, mejora el crecimiento. Sin embargo, la aireación, como se comenta en el apartado siguiente, no produjo el mismo efecto.

3.2.6 Crecimiento con/sin aireación

Este experimento se realizó en balones de vidrio con 5 l de cultivo en medio K y la aireación consistió en un burbujeo lo suficientemente fuerte como para producir la agitación y homogeneización del cultivo. Las condiciones de temperatura y luz fueron las descritas para mantenimiento de los cultivos (ver material y métodos). Al comienzo del experimento se colocaron dos cultivos con aireación y cuatro cultivos sin ella. El crecimiento se siguió por medio de cómputos celulares durante 25 días. El día 20.º se cambiaron las condiciones de aireación de forma que se les desconectó a los cultivos que la tenían y se les conectó a dos de los que carecían de ella. Los cultivos que comenzaron con aireación alcanzaron tasas de crecimiento medias de 0,23 y 0,29 divisiones/día para los 20 primeros días y casi cero en los días posteriores. Estos cultivos cuando se les quitó la aireación, se recuperaron y volvieron a crecer exponencialmente con tasas de 0,26 y 0,30 divisiones/día. Los cultivos sin aireación alcanzaron tasas de división entre 0,31 y 0,38 divisiones/día. Cuando a dos de estos cultivos se les conectó el aire, mantuvieron un comportamiento similar al de los cultivos sin aireación. Según estos resultados, los cultivos crecen mejor sin aireación, al menos en las primeras fases de crecimiento, aunque no parece afectarles notablemente si la aireación es posterior, cuando el cultivo está estabilizado. Como ya hemos mencionado, estos cultivos tienden a formar una especie de mucus que engloba las células colocándose en el fondo del contenedor una vez alcanzada la fase estacionaria; por ello se ha observado conveniente moverlos ligeramente a diario, pero sin provocar agitaciones bruscas sobre todo en la primera fase del cultivo.

3.3 *Prorocentrum lima*

Este dinoflagelado bentónico se ha observado tanto en hábitat de sustrato arenoso (en la laguna costera de la isla norte de las Cíes en la ría de Vigo) como fijado a macroalgas del litoral y de las bateas de mejillón de la costa gallega. Este dinoflagelado ha sido observado en muestras de plancton de la costa de Galicia en muy contadas ocasiones, en concentraciones celulares inferiores a 120 células/l.

En la colección del COV se mantienen 10 cepas de *P. lima*, 2 de ellas aisladas de la laguna de las islas Cíes (ría de Vigo) y 8 procedentes de muestras de algas de batea de las rías de Vigo y Pontevedra. Estas cepas se han utilizado para diversos estudios sobre producción, composición y biosíntesis de las distintas toxinas diarreicas (tabla II).

3.3.1 Mantenimiento

Los cultivos de *P. lima* son cómodos y fáciles de mantener. Por un lado, es un microorganismo que tolera umbrales amplios para factores que afectan a su crecimiento, como temperatura y luz; y por otro, se ha observado que las células presentan una gran longevidad. Los cultivos que se mantienen en la colección se han agrupado junto a aquellas especies de crecimiento lento, realizando las transferencias de mantenimiento aproximadamente cada mes, si bien, los cultivos de esta especie pueden mantenerse vivos por periodos de hasta varios meses. Los cultivos de este dinoflagelado se caracterizan por una abundante producción de mucílago en todas las fases de la curva de crecimiento y por la adherencia de las células entre sí y a las paredes de los recipientes. Debido a esta característica es necesario despegar las células del recipiente para la toma de inóculos o muestras del cultivo. Esto ha supuesto un inconveniente a la hora del seguimiento del crecimiento en nuestros experimentos.

El primer experimento para calcular la tasa de crecimiento fue realizado en placa de cultivos de tejidos con 96 pocillos. Se colocó un inóculo inicial de 7-10 células en cada pocillo, de un total de 24, con 250 μ l de medio K en cada uno. Se siguió el crecimiento cada 2-3 días mediante conteos celulares en todos los pocillos. Este método resultó eficaz durante ese periodo, debido a que las células de este dinoflagelado se adhieren al fondo y es fácil realizar los conteos celulares observando las placas en el microscopio invertido. Sin embargo, en los días siguientes al décimo fue imposible seguir las concentraciones celulares debido a que se forman grandes racimos de células que hacen imposible su conteo mediante ese método.

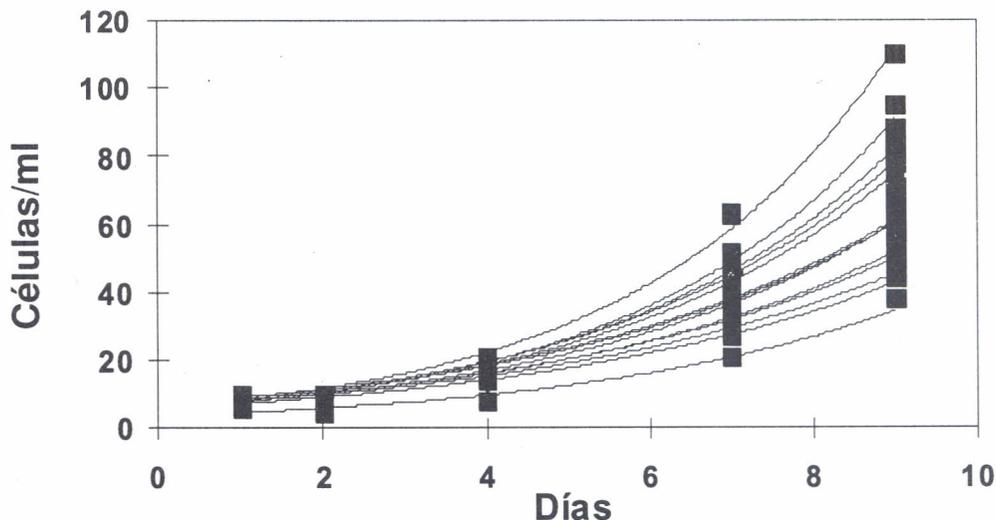


Figura 14. Crecimiento de *Prorocentrum lima* los primeros días de cultivo en placa de tejidos.

En la figura 14 se muestra el crecimiento en los 12 días en que fue posible seguir los cambios en número de células. En la tabla IV se dan los valores medios y desviaciones estándar de las tasas de crecimiento (divisiones/día) observadas en los periodos que se indican, para todos los cultivos representados en la figura 14.

Tabla IV. Tasas de crecimiento (divisiones/día) correspondientes a los datos de la figura 14.

Días de cultivo	Divisiones/día (n = 24)
1-9	0,36 ± 0,046
1-4	0,29 ± 0,081
4-7	0,40 ± 0,088
7-9	0,39 ± 0,068

Los cultivos realizados en erlenmeyer de vidrio presentan el inconveniente de que resulta difícil seguir el crecimiento en los mismos. A la hora de homogeneizar el cultivo para la toma de muestras, nos encon-

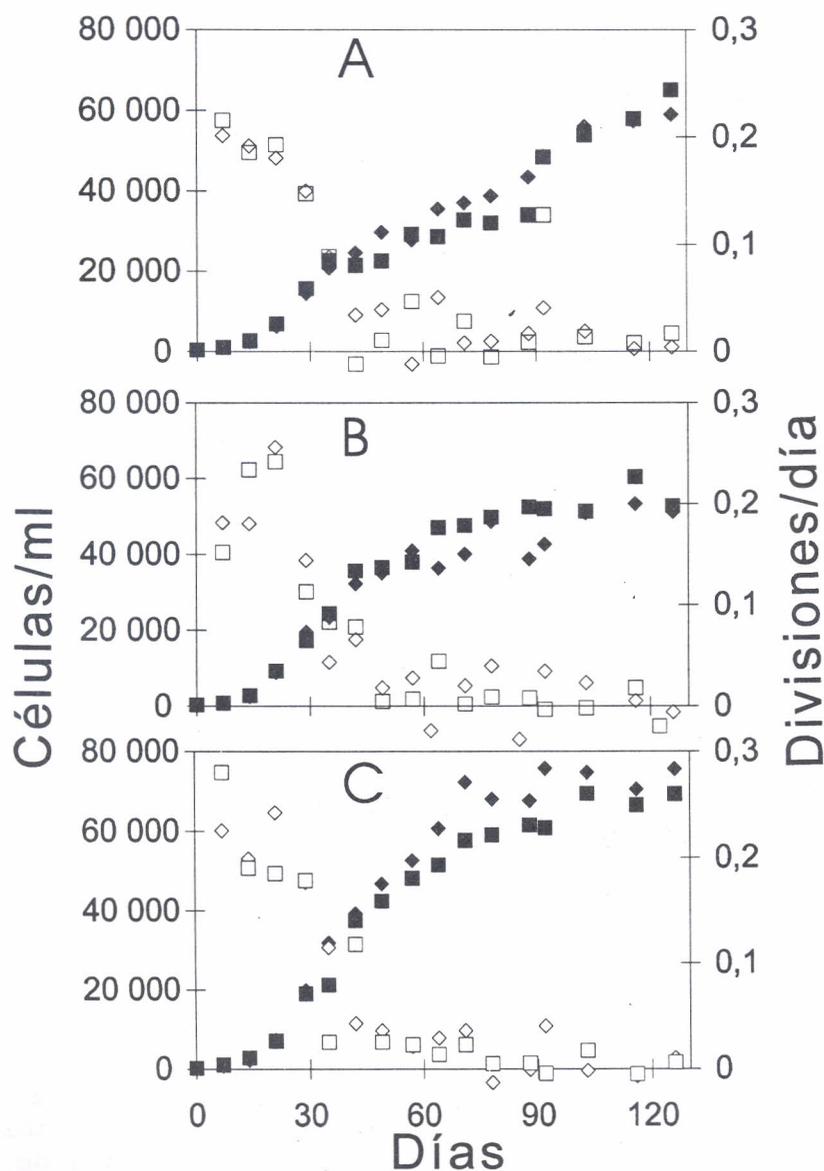


Figura 15. Curvas y tasas de crecimiento (divisiones/día) de tres cepas de *Prorocentrum lima*. (A): PL1V; (B): PL2V; (3): PL3V.

tramos con la dificultad de despegar las células del fondo, siendo necesario usar una varilla pues la simple agitación no da resultado. En experimentos realizados en *erlenmeyers* con 150 ml de cultivo, con conteos celulares cada 3-4 días, se obtuvieron tasas de crecimiento en torno a 0,15 divisiones/día, valores inferiores que los medidos con el método de las placas. Probablemente, esto es debido a que en los cultivos en *erlenmeyer*, al rascar el fondo para la obtención de las muestras, se dañan un número indeterminado de células, provocando una disminución progresiva en la curva de crecimiento. Por otro lado puede haber un efecto del volumen y diferente tipo de recipiente de cultivo.

En la figura 15 se representa el crecimiento de tres cepas de *P. lima* en bolsas de plástico con 2 l de cultivo en las mismas condiciones descritas para los experimentos anteriores y manteniendo los cultivos con ligera aireación. Se realizaron dos réplicas para cada cepa. A lo largo de los cuatro meses que duró el experimento, se controló que los cultivos no sufrieran cambios por evaporación y la salinidad se mantuvo aproximadamente en 35. Se realizaron conteos celulares cada 5-7 días. Aunque, igual que en los experimentos anteriores, se observó el comportamiento bentónico característico de este dinoflagelado, las células no se pegaron tanto en las bolsas como en el vidrio y, además, por la flexibilidad de las mismas, resultó más fácil la homogeneización de los cultivos para llevar a cabo el seguimiento de los cambios en el número de células. Las tasas máximas de crecimiento estuvieron entre 0,25-0,28 divisiones/día, correspondiendo estos valores a periodos de 5-7 días.

3.3.2 Crecimiento luz/oscuridad/luz

Como ya se ha mencionado, los cultivos de *P. lima* muestran una longevidad excepcional, no observada en las demás especies mantenidas en la colección. Se realizó un experimento con las cepas PL2V y PL7V para ver si esta característica se mantenía en condiciones de oscuridad. El experimento se realizó en *erlenmeyers* con 150 ml de medio. Se comenzó con dos réplicas de cada cepa en las mismas condiciones que se han descrito para mantenimiento de los cultivos (ver material y métodos). A los 12 días, una réplica de PL2V y una de PL7V se pusieron en oscuridad durante 63 días; posteriormente, se volvieron a restaurar las condiciones luminosas.

En la figura 16 se observa que los cultivos no se dividieron durante todos los días en que estuvieron en oscuridad y tuvieron la capacidad de volver a situarse en crecimiento exponencial una vez expuestos de nuevo a la luz. Esta característica es particularmente rara en los cultivos de dinoflagelados, ya que normalmente es difícil recuperar el cultivo después de transcurrido tanto tiempo, al igual que mencionábamos la excepcional capacidad de los cultivos de *P. lima* para mantenerse en fase estacionaria durante varios meses. Se observaron diferencias morfológicas entre las células de los cultivos de *P. lima* mantenidos en luz y en oscuridad, que parecen representar estados fisiológicos diferentes. Las células en fase estacionaria de un cultivo iluminado, aunque no se dividan, presentan un crecimiento celular megacítico. Por el contrario, los cultivos mantenidos en oscuridad conservan su forma original, pierden los flagelos y el citoplasma se reduce y adquiere un movimiento browniano característico de células enquistadas.

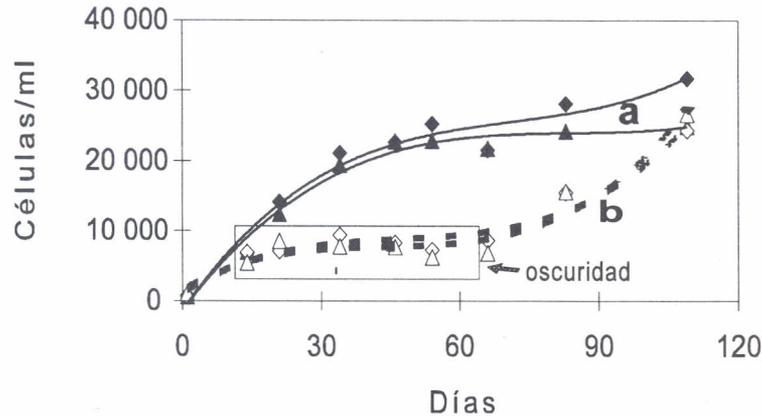


Figura 16. Curvas de crecimiento de *Prorocentrum lima* (PL2V y PL7V). (a): En ciclo normal de luz; (b): con un largo periodo de oscuridad.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Beatriz Reguera, Maribel Reyero, Ana Belén Prieto, Guadalupe Ramilo y Amelia Fernández-Villamarín su contribución al establecimiento y mantenimiento de la colección de cultivos de fitoplancton tóxico del COV. Esta colección ha sido financiada por el Instituto Español de Oceanografía desde su inicio en 1986 hasta la actualidad. En el establecimiento de esta colección, destaca la labor de K. Steidinger, C. M. Yentsch y D. M. Anderson, participantes en el proyecto Dinoflagelados tóxicos (1986-1989) financiado por el Comité Conjunto Hispano-Norteamericano. Agradecemos la cesión de las cepas de procedencia extranjera a M. A. Sampaio, de Portugal, G. M. Hallegraeff y S. Blackburn, de Australia; M. Montresor y G. Honsell, de Italia. Por último, nuestro agradecimiento a Juan Alcober, Vicenç Forteza y Maximino Delgado por su colaboración en la obtención de muestras de agua del mar Mediterráneo.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. M., D. M. Jacobson, I. Bravo y J. H. Wrenn. 1988. The unique microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology* 24: 255-262.
- Anderson, D. M., J. J. Sullivan y B. Reguera. 1989. Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 27 (6): 665-674.
- Bagnis, R., J. Bennet, C. Prieur y A. M. Legrand. 1985. The dynamics of three toxic benthic dinoflagellates and the toxicity of ciguateric surgeon fish in French Polynesia. En: *Toxic Dinoflagellates. Proc. Third Int. Conf. on Toxic Dinoflagellates* (8-12 de junio, 1985. St. Andrews, Canadá). D. M. Anderson et al. (eds.): 177-182. Elsevier. Nueva York.
- Balech, E. 1985. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group. En: *Toxic Dinoflagellates. Proc. Third Int. Conf. on Toxic Dinoflagellates* (8-12 de junio, 1985. St. Andrews, Canadá). D. M. Anderson et al. (eds.): 8-12. Elsevier. Nueva York.

- Blanco, J., J. Mariño y M. J. Campos. 1985. The first toxic bloom of *Gonyaulax tamarensis* detected in Spain. En: *Toxic Dinoflagellates. Proc. Third Int. Conf. on Toxic Dinoflagellates* (8-12 de junio, 1985. St. Andrews, Canadá). D. M. Anderson et al. (eds.): 8-12. Elsevier. Nueva York.
- Bravo, I. 1986. Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Investigación Pesquera* 50 (3): 313-321.
- Bravo, I. 1991. Results of preliminary studies in the field and in culture of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Revue Internationale d'Océanographie Medicale* (101-104): 189-195.
- Bravo, I. y D. M. Anderson. 1994. The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. *Journal of Plankton Research* 16 (5): 513-525.
- Bravo, I., B. Reguera, S. Fraga y A. Martínez. 1990. First report of *Gymnodinium catenatum* Graham on the Spanish Mediterranean coast. En: *Toxic Marine Phytoplankton. Proc. Fourth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (26-30 de junio, 1989. Lund, Suecia). E. Graneli et al. (eds.): 449-452. Elsevier. Nueva York.
- Costas, E., A. Aguilera, S. González-Gil y V. López-Rodas. 1993a. Contact Inhibition: Also a Control for Cell Proliferation in Unicellular Algae? *Biol. Bull.* 184: 1-5.
- Costas, E., E. González-Chavarri, A. Aguilera, S. González-Gil y V. López-Rodas. 1993b. Use of Lectins to Recognize and Differentiate Unicellular Algae. *Botanica Marina* 36: 1-4.
- Costas, E., S. González-Gil, A. Aguilera y V. López-Rodas. 1993c. Effects of mitotic growth factors on growth rates in marine dinoflagellates. *Phycologia* 32 (5): 351-355.
- Costas, E. y V. López-Rodas. 1994. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins. *Journal of Phycology* 30 (6): 987-990.
- Costas, E., M. I. San Andrés, S. González-Gil, A. Aguilera y V. López-Rodas. 1995a. A procedure to estimate okadaic acid in whole dinoflagellate cells using immunological techniques. *Journal of Applied Phycology* 7: 407-411.
- Costas, E., R. Zardoya, J. Bautista, A. Garrido, C. Rojo y V. López-Rodas. 1995b. Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *Gymnodinium catenatum*/*Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum*/*A. lusitanicum* using antibodies, lectins, and gene sequences. *Journal of Applied Phycology* 31: 801-807.
- Delgado, M., M. Estrada, J. Camp, J. V. Fernández, M. Santmartí y C. Lletí. 1990. Development of a toxic *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) bloom in the harbour of Sant Carles de la Rápita (Ebro Delta, Northwestern Mediterranean). *Scientia Marina* 54 (1): 1-7.
- Demaret, A., K. Sohet y G. Houvenaghel. 1995. Effects of toxic dinoflagellates on the feeding and mortality of *Artemia franciscana* larvae. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 427-432. Lavoisier. París.
- Estrada, M., F. J. Sánchez y S. Fraga. 1984. *Gymnodinium catenatum* (Graham) en las rías gallegas (NO de España). *Inv. Pesq.* 48: 31-40.
- Flynn, K., J. Franco, P. Fernández, B. Reguera, M. Zapata y K. J. Flynn. 1995. Nitrogen and phosphorus limitation in cultured *Alexandrium minutum* Halim does not promote toxin production. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 439-444. Lavoisier. París.
- Fraga, S., J. Mariño, I. Bravo, A. Miranda, M. J. Campos, F. J. Sánchez, E. Costas, J. M. Cabanas y J. Blanco. 1984. Red tides and shellfish poisoning in Galicia (NW Spain). En: *Special meeting on the causes, dynamics and effects of exceptional marine blooms and related events. International Council for the Exploration of the Sea. c: 5.*

- Fraga, S., D. M. Anderson, I. Bravo, B. Reguera, K. A. Steidinger y C. M. Yentsch. 1988. Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and toxicity in Ria de Vigo, Spain. *Estuarine, Coastal, and Shelf Science* 27: 349-361.
- Fraga, S., I. Bravo, M. Delgado, J. M. Franco y M. Zapata. 1995a. Differences between two chain forming, athecate, red tide dinoflagellates: *Gymnodinium catenatum*, Graham and *Gyrodinium* sp. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 39-44. Lavoisier. París.
- Fraga, S., I. Bravo, M. Delgado, J. M. Franco y M. Zapata. 1995b. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia* 34 (6): 514-521.
- Fraga, S., S. C. Gallager y D. M. Anderson. 1989. Chain-forming dinoflagellates: an adaptation to red tides. En: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology. Proc. First Int. Sym. on Red Tides* (10-14 de noviembre, 1987. Takamatsu, Japón). T. Okaichi et al. (eds.): 281-284. Elsevier. Nueva York.
- Franca, S. y J. F. Almeida. 1989. Paralytic shellfish poisons in bivalve mollusc on the Portuguese coast caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. En: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology. Proc. First Int. Sym. on Red Tides* (10-14 de noviembre, 1987. Takamatsu, Japón). T. Okaichi et al. (eds.): 93-96. Elsevier. Nueva York.
- Franco, J. M., P. Fernández y B. Reguera. 1994. Toxin profiles of natural populations and cultures of *Alexandrium minutum* Halim from Galician (Spain) coastal waters. *Journal of Applied Phycology* 6: 275-279.
- Franco, J. M., S. Fraga, M. Zapata, I. Bravo, P. Fernández e I. Ramilo. 1995. Comparison between different strains of genus *Alexandrium* of the *minutum* group. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton*. 18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia. P. Lassus et al. (eds.): 53-58. Lavoisier. París.
- Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. En: *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. J. R. Stein (ed.): 289-312. Cambridge University Press. Londres y Nueva York.
- Guillard, R. R. L. y D. Keller. 1984. Culturing dinoflagellates. En: *Dinoflagellates*. D. L. Spector (ed.): 391-435. Academic Press, Inc. Orlando.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- Hallegraeff, G. M. y C. E. Summer. 1986. Toxic plankton blooms affect shellfish forms. *Australian Fisheries* 45: 15-18.
- Hoshaw, R. W. y J. R. Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. En: *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. J. R. Stein (ed.): 53-69. Cambridge University Press. Londres y Nueva York.
- Ikeda, T., S. Matsuno, S. Sato, T. Ogata, M. Kodama, Y. Fukuyo y H. Takayama. 1989. First report on Paralytic Shellfish Poisoning caused by *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Japan. En: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology. Proc. First Int. Sym. on Red Tides* (10-14 de noviembre, 1987. Takamatsu, Japón). T. Okaichi et al. (eds.): 411-414. Elsevier. Nueva York.
- Keller, M. D. y Guillard R. R. L. 1985. Factors significant to marine dinoflagellate culture. En: *Toxic Dinoflagellates. Proc. Third Int. Conf. on Toxic Dinoflagellates* (8-12 de junio, 1985. St. Andrews, Canadá). D. M. Anderson et al. (eds.): 113-116. Elsevier. Nueva York.
- Lebour, M. V. 1925. *The dinoflagellates of northern seas: The Marine Biological Association of the United Kingdom*. Plymouth: 250 pp.

- Lee, J. S., T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard y T. Yasumoto. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology* 1: 147-152.
- López-Rodas, V., S. González-Gil, A. Aguilera y E. Costas. 1992. Mecanismos de control biológico de la proliferación de dinoflagelados marinos: I factores de crecimiento y mitógenos. *Scientia Marina* 56 (4): 293- 299.
- Márquez, I. 1994. Presencia de PSP en el corruco (*Acanthocardia tuberculata*) en el litoral de la provincia marítima de Málaga y distritos marítimos de La Línea y Algeciras. En: *Actas de la III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton tóxico y biotoxinas* (20-22 de abril, 1993. Vilaxoán, España). J. Mariño y J. C. Maneiro (eds.): 27-33. Xunta de Galicia.
- McLachlan, J. 1973. Growth media-marine. En: *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. J. R. Stein (ed.): 25-51. Cambridge University Press. Londres y Nueva York.
- Mee, L. D., M. Espinosa y G. Díaz. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine Environmental Research* 19: 77-92.
- Mendoza, H., V. López-Rodas, S. González-Gil, A. Aguilera y E. Costas. 1995. The use of polyclonal antisera and blocking of antibodies in the identification of marine dinoflagellates: species-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 186: 103- 115.
- Míguez, A., M. L. Fernández y S. Fraga. 1996. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). En: *Harmful and Toxic Algal Blooms. Proc. Seventh Int. Conf. on Toxic Phytoplankton*. (12-16 de julio, 1995. Sendai, Japón). T. Yasumoto et al. (eds.): 143-146. IOC of Unesco. París.
- Morey-Gaines, G. 1982. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armored forms. *Phycologia* 21 (2): 154-163.
- Morlaix, M. y P. Lassus. 1992. Influence de l'azote et du phosphore sur la croissance et la toxicité de *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Cryptogam. Algol.* 13 (3): 187-195.
- Norte, M., R. González, J. J. Fernández y M. Rico. 1991. Okadaic acid: A proton and carbon NMR study. *Tetrahedron* 47 (35): 7437-7446.
- Norte, M., A. Padilla y J. J. Fernández. 1994. Studies on the Biosynthesis of the Polyether Marine Toxin Dinophysistoxin-1 (DTX-1). *Tetrahedron Letters* 35 (9): 1441-1444.
- Norte, M., A. Padilla, J. J. Fernández y M. L. Souto. 1994. Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima*. *Tetrahedron* 50 (30): 9175-9180.
- Pillet, S y G. Houvenaghel. 1995. Influence of experimental toxification by DSP producing microalgae *Prorocentrum lima*, on clearance rate in blue mussels *Mytilus edulis*. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 481-486. Lavoisier. París.
- Pillet, S., A. Pereira, J. C. Braekman y G. Houvenaghel. 1995. Patterns in long term accumulation of okadaic acid and DTX1 in blue mussels, *Mytilus edulis* experimentally fed with the DSP-containing alga *Prorocentrum lima*. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton* (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 487-492. Lavoisier. París.
- Rausch de Traubenberg, C., M. L. Geraud, M. O. Soyer-Gobillard y D. Emdadi. 1995a. The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. I. An ultrastructural study. *Europ. J. Protistol.* 31 (3): 318- 326.
- Rausch de Traubenberg, C. y M. Morlaix. 1995. Evidence of okadaic acid release into extracellular medium in cultures of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. En: *Harmful*

- Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 493-498. Lavoisier. París.
- Rausch de Traubenberg, C., M. O. Soyer-Gobillard, M. L. Geraud, y M. Albert. 1995b. The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. II. Immunolocalization of okadaic acid in axenic and non axenic cultures. *Europ. J. Protistol.* 31 (4): 383-388.
- Reguera, B., M. J. Campos, S. Fraga, J. Mariño e I. Bravo. 1991. The monitoring of harmful algal blooms in Galicia (NW Spain). En: *Actes du Colloque sur les Biotoxines Marines. Proc. Sym. on Marine Biotoxins* (30-31 de enero, 1991. París, Francia). J. M. Fremy (ed.): 217-223. Editions du Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires. París.
- Reguera, B. e Y. Oshima. 1990. Response of *Gymnodinium catenatum* to increasing levels of nitrate: growth patterns and toxicity. En: *Toxic Marine Phytoplankton. Proc. Fourth Int. Conf. On Toxic Marine Phytoplankton* (26-30 de junio, 1989. Lund, Suecia). E. Granéli et al. (eds.): 316-319. Elsevier. Nueva York.
- Scholin, C. A., M. Herzog, M. Sogin y D. M. Anderson. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *Journal of Phycology* 30: 999-1011.
- Selvin, R., B. Reguera, I. Bravo y C. M. Yentsch. 1989. Use of Fluorescein Diacetate (FDA) as a Single-Cell Probe of Metabolic Activity in Dinoflagellate Cultures. *Biological Oceanography* 6: 505-511.
- Sohet, K., A. Pereira, J. C. Braekman y G. Houvenaghel. 1995. Growth and toxicity of *Prorocentrum lima* (Erhenberg) Dodge in different culture media: effects of humic acids and organic phosphorous. En: *Harmful Marine Algal Blooms. Proc. Sixth Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton*, (18-22 de octubre, 1993. Nantes, Francia). P. Lassus et al. (eds.): 669-674. Lavoisier. París.
- Tahri, L. 1995. First report of *Gymnodinium catenatum* from Atlantic Marocco. *Harmful Algae New* 12/13: 7.
- Taylor, F. J. R., Y. Fukuyo y J. Larsen. 1995. Taxonomy of Harmful Dinoflagellates. En: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. G. M. Hallegraeff et al. (eds.): 283-317. Unesco. París.
- Watras, C. J., S. W. Chisholm y D. M. Anderson. 1982. Regulation of growth in a stuarine clone of *Gonyaulax tamarensis*: salinity-dependent temperature responses. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 62: 25-37.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, Y. Murakami, I. Nakajima, R. Bagnis e Y. Fukuyo. 1980 Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46 (3): 327-331.
- Zardoya, R., E. Costas, V. López-Rodas, A. Garrido-Pertierra y J. M. Bautista. 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41: 637-645.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

SECRETARÍA GENERAL TÉCNICA

Centro de Publicaciones
Paseo de la Infanta Isabel, 1 • 28014 Madrid, España

ISSN: 0212-1565