



IX Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas

Cartagena, 7 – 10 mayo 2007

RESÚMENES

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

Elisa Berdalet y Marta Estrada

Institut de Ciències del Mar, CSIC, Pg. Marítim, 37-49, E-08003, Barcelona

Las especies fitoplanctónicas causantes de PANs tienen un tamaño cercano o menor a la escala de Kolmogorov. A esta pequeña escala diversos aspectos biológicos están condicionados tanto por la viscosidad como por el campo de velocidad del medio acuoso. Al mismo tiempo, tamaño, forma y motilidad celular, junto con las características del ciclo de vida, modulan la respuesta biológica a las propiedades físico-químicas del agua.

La experimentación en el laboratorio, aunque no puede emular cualitativa y cuantitativamente la turbulencia natural, está ayudando a revelar los mecanismos de adaptación celulares. La turbulencia de pequeña escala parece interferir con la transferencia de moléculas hacia y desde el interior celular, con la sedimentación o con el encuentro entre organismos. Los dinoflagelados aparecen especialmente sensibles, aunque la respuesta es específica e influenciada por las condiciones experimentales. Las alteraciones observadas apuntan a una interferencia con la división celular y el ciclo de vida, aunque los mecanismos subyacentes de interacción con la turbulencia son desconocidos. Entre los resultados recientes, aparece la interacción de la turbulencia con la concentración celular de toxinas y con la dinámica de cistes.

Los resultados experimentales deben situarse con prudencia en el contexto de la dinámica de las PANs. En la naturaleza, las respuestas ecofisiológicas individuales se entrelazan con otros factores biológicos y ambientales y con la circulación a distintas escalas espacio-temporales, lo cual da lugar conjuntamente, a la dinámica de la comunidad microplanctónica, y con ella a la de la PAN. El principal reto actual es el seguimiento simultáneo de la variabilidad de las dinámicas biológica y física, con la resolución espacio-temporal apropiada. Los avances en la tecnología microelectrónica y acústica pueden ser de gran utilidad.

Fitoplancton tóxico y/o nocivo en las Rías Gallegas en los años 2003 a 2006

Yolanda Pazos, Angeles Morono y M^a Dolores Doval

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

El dinoflagelado responsable de la mayor parte de los cierres en los polígonos de producción de mejillón de las Rías Gallegas, *Dinophysis acuminata*, presentó estos años dos floraciones, una en primavera y otra en otoño excepto en el año 2006 en el que sólo proliferó en otoño. *Dinophysis acuta* proliferó cada año, en octubre, en situaciones de hundimiento.

Gymnodinium catenatum desarrolló un intenso episodio tóxico, después de diez años de ausencia en las rías, en el año 2005. En 2006 se produjo una réplica con menores concentraciones celulares. *Alexandrium minutum* presentó proliferaciones en verano, en localizaciones geográficas muy aisladas, relacionadas con estratificación halina y con resuspensión de quistes locales.

Las proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp., asociadas con acumulación de ácido domoico en mejillón se detectaron en momentos muy puntuales, máximo de una o dos semanas en los meses de abril o mayo (2004 y 2005) y septiembre (2004 y 2006).

Se detectaron mareas rojas de *Lingulodinium polyedra* en la Ría de Ares-Betanzos en 2003 y de *Noctiluca scintillans* en Muros y Arousa en 2006.

Evolución del fitoplancton tóxico en Andalucía en el periodo 2003-2006

D. Jaén ¹, L. Mamán ¹, R. Fernández ¹ e I. Márquez ²

¹ Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. Ctra. Punta Umbría-Cartaya,
km 12. El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva.

² Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Pesca, Junta de Andalucía.
C/Tabladilla, s/n 41071 Sevilla

En el presente estudio se describen las principales floraciones tóxicas de los últimos cuatro años y los parámetros oceanográficos que las acompañan. Las especies que con mayor frecuencia desencadenan episodios tóxicos en el litoral andaluz siguen siendo los dinoflagelados *Dinophysis acuminata* y *Gymnodinium catenatum*, así como algunas diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*.

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

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

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

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

Monitorização de PSP na costa portuguesa através de espécies indicadoras

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

Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR),
Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal

As biotoxinas PSP começaram a ser monitorizadas em Portugal em 1986, recorrendo ao bioensaio em ratinhos. A partir de 1996 introduziu-se o estudo por HPLC com derivatização pré-coluna (método de Lawrence). Após a disponibilidade de HPLC no programa de monitorização, não surgiram mais proliferações de microalgas produtoras de PSP na costa portuguesa. Somente foi possível estudar algumas espécies que apresentavam contaminação PSP recorrente, como a lambujinha (*Scrobicularia plana*).

A legislação comunitária vigente (Regulamento CE/854/2004) estipula que "sempre que se conheçam as taxas de acumulação de toxinas para um determinado grupo de espécies em crescimento na mesma zona, a espécie com a taxa mais elevada deve ser utilizada enquanto espécie indicadora, o que permitirá a exploração de todas as espécies incluídas no grupo, se os teores de toxinas na espécie indicadora estiverem abaixo dos valores-limite regulamentares." O programa de monitorização português definiu em 2002 o uso de espécies-indicadoras (mexilhão e berbigão em zonas estuarinas e lagunares, e conchilha e amêijoia-branca nas

zonas costeiras do litoral) baseando-se na contaminação mais importante que vinha a ser estudada até então – a contaminação com DSP.

No outono de 2005 e no verão de 2006 surgiu novamente contaminação de bivalves com toxinas PSP, permitindo verificar a adequação das espécies indicadoras em uso para a contaminação com a biotoxina PSP. Os resultados mostraram que estuários e lagoas (Ria de Aveiro, Estuário do Mondego e Lagoa de Óbidos) a espécie que apresentava os níveis mais elevados foi o mexilhão, seguido pelo berbigão. A amêijoia-boia e amêijoia-macha (*Ruditapes decussatus* e *Venerupis senegalensis*, respectivamente) apresentaram níveis semelhantes ou inferiores ao berbigão. Os níveis de PSP na lambujinha (*S. Plana*) igualaram ou ultrapassaram os níveis máximos registados no mexilhão, pois habitualmente esta espécie retém as toxinas PSP por muito tempo. Na zona litoral só foi possível estudar a amêijoia-branca cujos níveis de PSP excederam o limite regulamentar. Estudos recentes da bioquímica desta espécie permitiram concluir que possui uma rápida actividade carbamoilásica. Esta actividade enzimática invalida o uso desta espécie como espécie-indicadora por si só, pois é de esperar que mantenha toxicidade elevada devido à rápida conversão das toxinas N-sulfocarbamoiladas de *G. catenatum* em análogos decarbamoilados potenciando a toxicidade destes animais. Assim, os pares de espécies-indicadoras definidas para a contaminação com DSP também se adequam à vigilância da toxina PSP, tendo que ter-se em atenção que *S. plana* e *S. solida* podem apresentar toxicidade particularmente elevada.

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

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

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

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

³ Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aquicultura, Generalitat de Catalunya

En el período que va desde enero del 2003 hasta finales de marzo del 2007 se han producido un total de 27 cierres de zonas de producción de bivalvos. De estos 26 han sido por toxicidad diarreica (DSP) y sólo 1 por toxicidad paralizante (PSP), no ha habido ninguna detección de toxicidad amnésica (ASP) en bivalvos. La mayor parte de los cierres, 19, se han producido en las bahías del delta del Ebro. Las posibles especies de microalgas implicadas han sido *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis caudata*, *Protoceratium reticulatum* y *Alexandrium minutum*. En relación a los casos de ictiotoxicidad, únicamente se registró un caso en el año 2003 debido a una proliferación de *Karlodinium* spp que ocurrió a finales de la primavera. Las elevadas temperaturas registradas durante los veranos de los años 2003 y 2006 causaron una elevada mortalidad de los bivalvos cultivados por lo que fue necesaria la importación de semilla de mejillón de otros países por parte de los productores.

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

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

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

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

Durante el fin de semana del 8 al 9 de Julio de 2006 se detectó un caso epidémico de afección respiratoria de entre 40 y 50 personas atendidas en el Hospital General de Lorca cuya característica común era bañarse en las playas de Calarreona, La Carolina y La Higuera de Águilas y La Palmera y Los terreros de Almería con los siguientes síntomas epidemiológicos: infección de faringe, espasmos bronquiales, carraspera, disfonía, eccema en la piel y eritema. Los análisis químicos del agua realizados por la consejería de sanidad dieron resultado negativo, no encontrándose ninguna sustancia química causante de este evento. En las aguas de dichas playas se encontraron cinco días después dos especies de microalgas potencialmente tóxicas – *Gymnodinium* sp. y *Chattonella* sp. con densidades de 18.840 y 2.080 células por litro respectivamente – productoras de brevetoxinas, una neurotoxina que ocasiona los mismos síntomas descritos anteriormente cuando se ingiere con el consumo de organismos que la acumulan. A la vista de estos resultados se inició un plan de vigilancia en las playas de la zona encontrándose un descenso en la densidad de estas células con la aparición de células del género *Ostreopsis* el 16 de agosto que presentó un máximo de 1.460 células por litro el 13 de septiembre. *Ostreopsis* fue encontrada también en dos playas vecinas de la provincia de Almería el 14 de agosto en la que se presentó un caso de afección respiratoria en más de cincuenta personas con síntomas similares. En este trabajo se presentan los resultados del plan de vigilancia realizado con la evolución de las especies tóxicas encontradas. Se discute los valores de densidad.

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

P. Barroso García ¹, P. Rueda de la Puerta ¹, T. Parrón Carreño ¹, P. Marín Martínez ², J. Guillén Enriquez ¹

¹ Área de Gestión Sanitaria Norte de Almería, c./ Silvestre Martínez de Haro s/n. Huércal Overa, Almería

² Delegación Provincial de Salud. Almería

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

Métodos: Estudio descriptivo. Se diseñó un cuestionario, con variables de persona, lugar, tiempo y exposición ambiental. La hipótesis planteada fue que el responsable del brote era algún tipo de exposición ambiental, llevándose a cabo un estudio de casos-controles para verificar dicha hipótesis. Para el análisis de la información se dividió la barriada en tres zonas. Al realizar la encuesta se solicitó a los afectados que valoraran subjetivamente, en una escala de menor a mayor gravedad (1 a 3), el cuadro clínico. Los datos se analizaron con SPSS y Programa Epiinfo. Se calcularon odds ratio (OR) y sus intervalos de confianza al 95% para

relacionar la gravedad del cuadro por zonas, y como medida de asociación por tipo de exposición. Se utilizó test de Chi-cuadrado y corrección de Yates. Se calcularon tasas de ataque. Se realizaron investigaciones ambientales: datos meteorológicos, fitosanitarios, movimientos de tierras de obras próximas, contaminación atmosférica, tierra de reposición de la playa. Se tomaron muestras de agua del mar.

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

Resultados: Se realizaron 83 entrevistas, 57 casos y 26 controles. Se estimó una tasa de ataque del 69% (84% en la zona 1). El 59,6% de los afectados encuestados fueron mujeres y el 40,4% hombres. Sus edades oscilaron entre 4 y 91, con una media de 43, mediana de 45 y desviación estándar de 21,3. Los síntomas más frecuentes fueron estornudos en un 87,7%; un 80% de los de la Zona 1 presentaron fiebre. Un 50,9% de los afectados consideraron haber tenido un cuadro grado 1 (76,9% de la Zona 1). Los afectados de la Zona 1 presentaron mayor riesgo de padecer cuadro grado 1 que los de la Zona 3 (OR 46,7; 4,5-1171). El cuadro tuvo una duración media de 3,9 y una mediana de 3. El día con mayor número de casos fue el 4 de agosto. Las personas que indicaron haber realizado más actividad fuera de la vivienda tuvieron mayor riesgo de enfermar que las que indicaron más actividad dentro (OR 12,25; IC 1,13-310,54). No se han encontrado diferencias significativas en cuanto a estancia en la playa y baño en la playa. Las tasas de ataque para los que vivían en primera línea de playa fue de 0,74; para los que realizaban actividad habitual fuera de la casa 0,75; para los que se bañaron 0,72 y para los que habían estado en la playa 0,70. En los análisis de agua de mar del día 28 de agosto se detectaron niveles tóxicos de los dinoflagelados *Ostreopsis*.

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

Creación de una red temática de Proliferaciones Algales Nocivas a nivel nacional

Esther Garcés¹, Santiago Fraga², Gotzon Basterretxea³ y Jordi Camp⁴

¹ IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Sant Carles de la Ràpita

² Instituto Oceanográfico Vigo, Cabo Estai-Canido, 36200Vigo

³ IMEDEA (UIB-CSIC), Miquel Marqués 21, 07190 Esporles, Baleares

⁴ Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar-CMIMA, CSIC, Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, E08003 Barcelona

La incidencia de las proliferaciones de algas nocivas (PANs) es cada día mayor en la economía de los países que utilizan el mar. Sus efectos van desde la pérdida de la calidad aparente de aguas de recreo hasta mortalidades de organismos marinos, incluidos los peces en instalaciones de acuicultura, o las intoxicaciones de los consumidores de marisco por PSP o DSP que suceden incluso a concentraciones muy bajas de organismos biotóxicos. Aunque la presencia de PANs en determinadas zonas pueda deberse a condiciones naturales, la expansión de este fenómeno parece estar ligada a la creciente presión sobre el medio costero. El seguimiento y control de este fenómeno presenta aspectos de evidente interés científico pero es igualmente importante establecer vínculos inmediatos de transferencia de información y conocimiento entre la comunidad científica y los responsables de la gestión costera (técnicos ambientales, responsables del control sanitario) y usuarios del litoral en general.

La comunidad científica española dedicada a la investigación de los PANs es importante tanto en su número como en su relevancia científica internacional. Sin embargo su disgregación en grupos con interacciones relativamente limitadas hace que su potencial científico no quede

bien reflejado en su representatividad en las reuniones internacionales sobre el tema, ni en su competitividad frente a otras líneas de investigación a nivel nacional. El esfuerzo de los investigadores por cohesionarse en torno a un polo nacional dio lugar a la Reunión Ibérica de Fitoplancton Tóxico que puede considerarse un antecedente la red que aquí se propone. Sin embargo, aunque la toxicidad de algunas especies constituye un aspecto significado del estudio tradicionales de las PANs, el problema abarca aspectos más amplios y diversos, especialmente medioambientales, que requieren de la colaboración de especialistas en distintas disciplinas, incluyendo economistas y gestores. Por ello, se considera interesante emprender acciones complementarias que proporcionen una mayor inmediatez y dinamismo en el intercambio de experiencias e información científica.

La presente propuesta se enmarca en la línea de las agrupaciones nacionales existentes en otros países (EEUU, Canadá, Japón) cuyo grado de organización permite gestión mucho más eficiente de los recursos dirigidos a los estudios en algas tóxicas. De igual modo existen otras redes nacionales sobre diversas temáticas en ciencias marinas que se aglutinarán con la creación de la Red de Ciencias Marinas.

Se propone crear red temática sobre PANs, relacionada con la red de Ciencias Marinas, con los siguientes objetivos:

- ✓ Organizar y cohesionar a la comunidad científica que trabaja en PANs en torno a un polo que mejore su visibilidad y peso científico a nivel nacional e internacional.
- ✓ Potenciar la interacción entre los científicos de la red y científicos externos, en especial relacionados con la oceanografía, las ciencias ambientales, la sociología, favoreciendo la interdisciplinariedad necesaria para abordar problemas complejos.
- ✓ Identificar temas prioritarios para la investigación en este tema.
- ✓ Organizar foros de opinión, debate y difusión de temas específicos y novedosos sobre PANs o en relación con ellas.
- ✓ Abrir un canal de intercambio de conocimientos y de transferencia entre ciencia y sociedad en lo relacionado con PANs.
- ✓ Dar soporte a las iniciativas de formación y divulgación sobre el tema.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Emma Orive, Aitor Laza y Sergio Seoane

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

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

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

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

*Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR),
Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal*

As biotoxinas DSP começaram a ser monitorizadas em Portugal em 1987, recorrendo ao bioensaio em ratinhos. A partir de 1994 introduziu-se o estudo de algumas amostras por HPLC após derivatização com um reagente fluorescente (ADAM), e a partir de 2000 através de injeção directa em espectrometria de massa (LC-MS). Em 2002 foi publicada legislação comunitária que estabeleceu pela primeira vez um limite quantitativo para a DSP de 16 µg/100g (Decisão CE/225/2002).

O programa de monitorização foi redefinido em 2002, de modo a testar preferencialmente mexilhão e berbigão em zonas estuarinas e lagunares, e conquilha e amêijoia-branca nas zonas costeiras do litoral. Foram escolhidas duas espécies indicadoras para cada ecossistema, pois o mexilhão e a conquilha retêm as toxinas DSP por períodos mais prolongados que as restantes espécies comerciais. Aquando da depuração de toxinas DSP, estas duas espécies por si só não servem para assinalar a depuração das restantes espécies, o que causaria encerramentos desnecessários das pescarias de diversas espécies de bivalves se não forem também testadas.

A partir de 2003 todas as amostras do programa de monitorização foram pesquisadas por LC-MS de acordo com as espécies indicadoras descritas acima e quando necessário foram também testadas outras espécies comerciais. A contaminação com toxinas DSP foi regular em toda a costa, principalmente entre a Primavera e o Outono. Os bivalves dos estuários e lagoas da costa noroeste foram os mais afectados. Nos estuários e lagoas da costa sudoeste e sul a contaminação com DSP foi fraca, e raramente ocorreu a interdição da apanha de bivalves. Na zona litoral da costa NW a amêijoia-branca excedeu por vezes o limite regulamentar durante períodos curtos. Na costa SW e Sul, somente a conquilha excedeu habitualmente o limite regulamentar por períodos prolongados, as restantes espécies comerciais foram pouco afectadas pelo DSP.

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

J. Correa, A. Vidal, M. Goicoechea, C. Salgado, F. Arévalo

*Instituto Tecnolóxico de Control do Medio Mariño,
Peirao de Vilaxoan s/n, Vilagarcía de Arosa, 36611. Pontevedra*

El programa de vigilancia y control de biotoxinas que se lleva a cabo en Galicia en el INTECMAR, incluye, entre otros aspectos, el análisis periódico y exhaustivo de las diferentes especies de moluscos destinadas al consumo humano. Para este fin la red de control comprende 52 puntos fijos primarios de control (bateas con cultivo de moluscos bivalvos), distribuidos en las 7 rías principales de Galicia, 40 puntos de control para moluscos infaunales y 17 para epifaunales.

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

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

En este sentido tanto la toxicidad DSP como la toxicidad ASP han estado presentes y provocado cierres en las todas zonas de producción a lo largo de estos cuatro años, siendo la toxicidad DSP la más frecuente y recurrente.

Sin embargo es importante señalar que a finales del año 2005 aparece un episodio de toxicidad PSP provocado por proliferaciones de *Gymnodinium catenatum*. Dicho episodio provocó cierres prolongados en las distintas zonas de producción que se alargaron hasta mediados de abril del año siguiente. Los valores de toxicidad más altos que se llegaron a alcanzar durante dicho episodio son de 4080 µg STX eq /100g vianda en el año 2005, y 1150 µg STX eq /100g vianda en el 2006, ambos valores detectados en el mismo polígono de la ría de Pontevedra.

Este tipo de toxicidad PSP no es frecuente en el litoral gallego no habiéndose registrado ninguna tan intensa desde el año 1995.

The Distribution of Potentially toxic species of the Diatom *Pseudo-nitzschia* and relationships with domoic acid accumulation in Moroccan shellfish

Btissam Ennaffah ¹, Abdelghani Chafik ²

¹ Laboratoire des efflorescences Nuisibles, Institut National de Recherche Halieutique,
2, rue de Tiznit, Casablanca, Maroc

² Département de la Qualité et Salubrité du Milieu Marin, Institut National de Recherche
Halieutique, 2, rue de Tiznit, Casablanca, Maroc

On the Moroccan Atlantic coast, *Pseudo-nitzschia* spp. is a frequent component of the micro-phytoplankton (detected in 80%-90% of the samples).

The temporal and spatial variability in the abundance of this marine genus was investigated in Atlantic Moroccan coast: in J.O.Ghanem-Dar Ihamra area as a open sea (32°51', 396N-08°53,455W; 32°47'; 944N-08°57',321 W), and Sidi Moussa as a lagoon (32°59',868N-08°43',726 W; 32°58', 530 N-0845,545 W).

The highest cell density was found in April, May, June and July 2006 in J.O.Ghanem-dar Ihamra area. In Sidi Moussa lagoon, the highest abundance were observed in spring and summer 2006, with maxima of 105 c l⁻¹

The highest cell numbers concentration of *Pseudo-nitzschia* spp were occurred in spring at temperature value of 17-19°C and in summer with a temperature values oscillate between 20-26°C (found at Sidi Moussa lagoon).

In light microscopy, the *Pseudo-nitzschia* genus was present on the short and large form. In this area, many species are present during the years that are dominant by the large form.

In electron microscopy, we identify 3 species of *Pseudo-nitzschia*: *P. australis*, *P. fraudulanta* (*Seriata* group), and *P. pseudo-delicatissima* (*pseudo-delicatissima* group). These species are known as potentially toxic and their proliferation cause the contamination of the mussels by ASP.

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

M.J. Botelho ¹, T. Vidal ², S. Palma ¹, S.S. Gomes ¹, S.M. Rodrigues ¹, P. Vale ¹,
M.G. Vilarinho ¹, M.T. Moita ¹

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas / IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisboa

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Pescas / IPIMAR, CRIP Centro, Canal das Pirâmides 3800-242 Aveiro

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

A zona de Aveiro, onde se detectaram nos bivalves concentrações mais elevadas de toxinas e com maior persistência em tempo, foi a região escolhida para se apresentarem os resultados da relação entre as toxinas paralisantes (PSP) e a ocorrência de *Gymnodinium catenatum*, entre Outubro de 2005 e Maio de 2006.

Em Novembro de 2005, *G. catenatum* atingiu a concentração máxima (43×10^3 células.L⁻¹) na zona costeira de Aveiro, mantendo-se na zona norte de Portugal até Janeiro de 2006. Verificaram-se diferentes dinâmicas na toxificação de bivalves, em que a concentração máxima de PSP foi detectada em mexilhão apresentando 1014 ug equivalentes STX/100 g tecido. Este valor, foi detectado 5 dias após a máxima concentração de *G. catenatum* e na amêijoia-branca (589 ug equivalentes STX/100 g tecido) detectou-se 10 dias depois. A toxicidade manteve-se no mexilhão e berbigão até final de Janeiro de 2006.

Programa de control de biotoxinas en la costa andaluza en el período 2003-2006: Observaciones sobre el comportamiento de distintas especies ante episodios tóxicos tipo PSP

M. A. Ocaña ¹, M. Gordillo ¹, L. Mamán ¹, L. Fernández ¹ e I. Márquez ²

¹ Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros.

Ctra. Punta Umbría-Cartaya, Km 12 El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva.

² Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Pesca, Junta de Andalucía.
C/Tabladilla, s/n 41071 Sevilla

En el litoral andaluz se han declarado 45 zonas de producción de moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos, en las cuales el Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros desarrolla un programa de control y seguimiento de las condiciones sanitarias con un carácter dinámico, que evoluciona a lo largo del tiempo integrando los cambios que se van sucediendo en los bancos naturales y en la actividad acuícola.

Una de las peculiaridades de las zonas de producción del litoral andaluz es la alta diversidad de especies que existen y su diferente respuesta a la contaminación por biotoxinas marinas, lo que añade una notable complejidad al sistema de control.

En este estudio se presenta un resumen de los episodios detectados durante los cuatro últimos años relacionados con los tres grupos de toxinas marinas legislados en la actualidad en la Unión Europea: toxinas paralizantes (PSP), grupo de toxinas liposolubles (DSP) y toxinas amnésicas (ASP).

Destacar durante el período que nos ocupa, los episodios tóxicos de PSP por su amplitud y duración. Los datos obtenidos han permitido conocer las pautas de comportamiento de especies tan diferentes como: concha fina (*Callista chione*), chirla (*Chamelea gallina*), almeja chocha (*Venerupis rhomboides*), corruco (*Acanthocardia tuberculata*), vieira (*Pecten maximus*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), constituyendo una herramienta de gran ayuda para el programa de control.

Capas finas de *Pseudo-nitzschia* spp y distribución de *Dinophysis acuminata* durante un ciclo de afloramiento/hundimiento en la Ría de Pontevedra (Galicia)

Lourdes Velo-Suárez, Sonsoles Gonzalez-Gil, Isabel Ramilo, Patrick Gentien, Michele Lunven,
Liam Fernand, Robin Raine y Beatriz Reguera

*Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Cabo Estai, Canido,
Apto. 1552, 36200 Vigo*

Entre el 30 de mayo y el 14 de junio de 2005 se desarrolló la campaña HABIT-Vigo 2005 en la Ría de Pontevedra (Rías Baixas, Galicia). El principal objetivo era explorar, mediante instrumentos oceanográficos de alta resolución vertical, y muestreos biológicos intensivos, la posible presencia de capas finas de microalgas nocivas. Los registros de ADCP (acoustic doppler current profiler) fondeado en el canal de navegación de la ría, permitieron detectar un ciclo de afloramiento/ relajación/ afloramiento/ hundimiento. Durante la fase de afloramiento, se formó una capa fina (TL) (>30 µg de clorofila por L⁻¹) de *Pseudo-nitzschia* spp asociada a la isopicna de 27σ_t, sobre el agua aflorada (12.5°C). Esta TL, que apareció siempre asociada a la interfase entre aguas superficiales y afloradas, fue desplazada hacia abajo y erosionada en la fase de hundimiento. *Dinophysis acuminata* no apareció asociado con esta TL, pero concentraciones de esta especie de hasta 8 • 10³ cel • L⁻¹ se detectaron en aguas superficiales (0-4m) asociadas a gradientes de la termoclina diurna (15-18 °C) y no se detectó migración vertical.

Estos resultados muestran que en los estudios de interacciones físico-biológicas de especies de interés es imprudente considerar comportamientos generalizados -tales como que *D. acuminata* realiza migración vertical, que el máximo celular se localiza en la profundidad de máximo gradiente térmico, o que *Dinophysis* se dispersa durante los pulsos de afloramiento intensos- basados en muestreos aislados y carentes de la adecuada resolución vertical.

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

Margarita Puigserver y Gabriel Moyá

*Dept. Biología (Ecología), Univ. de les Illes Balears,
Ctra. Valldemossa km 7.5, 07122 Palma (Mallorca)*

Hasta el momento los estudios del fitoplancton en las Baleares se habían restringido a áreas reducidas, principalmente bahías y puertos. Este trabajo presenta por primera vez un estudio generalizado de las comunidades fitoplanctónicas de todo el litoral balear, el mismo forma parte de la evaluación del estado ecológico de las masas de aguas costeras, en el contexto de la implantación de la Directiva Marco del Agua en las Baleares. Las muestras se han recogido estacionalmente en 64 puntos, distribuidos entre 32 masas de agua delimitadas según criterios de la DMA. Se presentan los resultados correspondientes a los muestreos de verano de 2005 y primavera de 2006.

Se han identificado 212 taxones a nivel de especie o género, entre los cuales 19 son considerados potencialmente tóxicos. Las concentraciones totales han oscilado entre 139-2561 cél/ml en verano y 127-4075 cél/ml en primavera. Las especies tóxicas más abundantes han sido las diatomeas *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, con máximos de 65 y 58 cél/ml, y los dinoflagelados *Alexandrium* spp., con máximos de 17 y 5 cél/ml en los respectivos muestreos. Otras especies tóxicas abundantes han sido *Gymnodinium breve*, *Prorocentrum balticum*, *Prorocentrum cordatum* y *Pseudo-nitzschia* spp.

Las máximas concentraciones de *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* se han determinado en las bahías de Palma y Alcudia, y en zonas próximas al suroeste de Mallorca. En cuanto a *Alexandrium*, sus máximas abundancias se han observado en zonas portuarias del este y norte de Mallorca y al oeste de Formentera. En la mayoría de casos, altas concentraciones de especies tóxicas no coinciden con máximas abundancias totales de fitoplancton, ya que la comunidad está dominada por ultraflagelados.

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

Hassina Illoul ^{1,2}, Mercedes Masó ¹, Albert Reñé ¹ y Silvia Anglés ¹

¹ Institut de Ciències del Mar, CSIC, Pg. Marítim, 37-49, E-08003, Barcelona

² ISMAL, (Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral)
BP 19, Campus Universitaire Bois de Cars Dely brahim, 16320 Alger, Algérie

Desde los años 80, diversas playas del archipiélago Balear sufren discoloraciones asociadas a las proliferaciones de *Alexandrium taylori*. El fenómeno es recurrente y conocido por la población y administración locales. La percepción de que el fenómeno se está expandiendo en los últimos veranos está provocando una mayor preocupación de la administración ya que los problemas socio-económicos derivados están adquiriendo mayor relevancia. Con el objetivo de determinar el número de playas afectadas por proliferaciones algales nocivas y las especies causantes se realizó un muestreo extensivo (60-80 playas) en aguas recreativas de Baleares durante los veranos de 2004-2006 (Conselleria del Govern Balear). Los resultados muestran que además de *A. taylori* diversas especies de Gymnodiniales son capaces de producir y mantener elevadas biomásas y provocar discoloraciones. Entre ellas se ha identificado *Gymnodinium chlorophorum* un dinoflagelado productor de proliferaciones de altas biomásas y discoloraciones desde el año 82 en las costas francesas del Atlántico. En la cuenca Calatano-Balear es la primera vez que se detecta esta especie. La concentración máxima (12.106 células l⁻¹) fue registrada en Eivissa, el verano de su primera detección (2004).

Durante los veranos 2005 y 2006, el fenómeno parece recurrente, ampliándose a varias playas. La especie puede provocar proliferaciones monoespecíficas y mantenerse durante más de 1 mes con concentraciones superiores a 105 células l⁻¹.

Resonancia en puertos y su efecto sobre las proliferaciones de *Alexandrium minutum*. El caso de Arenys de Mar

Gotzon Basterretxea ¹, Antoni Jordi ¹, Esther Garcés ^{2,3}, Silvia Anglés ²,
Benjamín Casas ¹ Kees van Lenning ²

¹ IMEDEA (UIB-CSIC), Miquel Marqués 21, 07190 Esporles, Baleares, Spain

² Institut de Ciències del Mar (CMIMA-CSIC),

Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003 Barcelona, Spain

³ IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Sant Carles de la Ràpita, Spain

Uno de los casos más particulares de proliferación nociva de microalgas es la asociada a las zonas portuarias. Los puertos son zonas que se caracterizan por su escasa profundidad, la presencia de sedimentos finos y, a menudo anóxicos, sus bajos niveles de turbulencia y por la reducida tasa de renovación de sus aguas. Estos sistemas, artificialmente modificados, pueden propiciar la proliferación (i.e. > 10⁴ cells/l) de determinadas especies de flagelados que, como *Alexandrium minutum*, aparecen con frecuencia en los puertos Mediterráneos. En el presente trabajo relacionamos las proliferaciones invernales de esta especie en el puerto de Arenys de Mar con las oscilaciones resonantes del puerto. Proponemos que la resonancia

natural en sistemas semi-cerrados puede favorecer la resuspensión de los quistes que se acumulan en el sedimento y su subsiguiente proliferación. El estudio está basado en el seguimiento realizado durante el invierno 2005-2006 como parte del proyecto europeo SEED, en el que se monitorizaron en tiempo real las condiciones del puerto. El comportamiento del sistema se diagnostica mediante el uso de un modelo unidimensional en el que se simulan los eventos de resuspensión en base a las oscilaciones del puerto.

Una propuesta para clarificar taxonómicamente el complejo de especies *Alexandrium tamarense/catenella/fundyense*

Santiago Fraga ¹, Nagore Sampedro ², Rosa I. Figueroa ^{1,2}, Isabel Bravo ¹, José M. Franco ³, Antonella Penna ⁴, Isabel Ramilo ¹ y Amelia Fernández-Villamarín ¹

¹ Instituto Español de Oceanografía, Vigo; ² Institut de Ciències del Mar, CSIC, Barcelona;

³ Instituto de Investigaciones Mariñas, CSI, Vigo; ⁴ University of Urbino, PESARO, Italia

El complejo de especies *Alexandrium tamarense/catenella/fundyense* abarca cuatro clades genéticos en los cuales la semejanza entre cepas geográficamente próximas, aunque de distintas especies, es mayor que entre las cepas geográficamente distantes de la misma especie. Estos clades son el del Norteamericano (NA), los de Europa Occidental (WE), el Asiático Templado (TA) y el Mediterráneo (ME). Los caracteres morfológicos usados actualmente para distinguir las especies dentro de este complejo, son la presencia o la ausencia de un poro ventral en placa 1', la capacidad de formar cadenas, y la relación entre el transdiámetro y la longitud de las células. Pero hay ejemplos suficientes para pensar que estos caracteres no son siempre válidos. Por ejemplo, en *Alexandrium minutum* la presencia del poro ventral no es un carácter constante y en otras especies la capacidad de formar cadenas, más largas o más cortas, depende de la cepa, así como la relación entre el transdiámetro y la longitud de células depende de si éstas están o no en cadena. Estos caracteres por sí solos, ya no son válidos para distinguir entre especies de este complejo. En nuestra opinión, los cuatro clades pueden corresponder a cuatro especies semicrípticas, y son necesarios nuevos criterios morfológicos para definirlos. Nuestra propuesta es que el clade Norteamericano correspondería a *Alexandrium catenella*, que puede formar cadenas o no, tener poro ventral o no y es siempre tóxico. El clade de Europa Occidental (WE) correspondería a *Alexandrium tamarense*, que suele tener poro ventral y no formar cadenas y es ligeramente tóxico o no tóxico. Los otros dos clades corresponderían a dos nuevas especies, una tóxica que correspondería con el clade Asiático templado (TA) al que pertenece el conocido como *Alexandrium catenella* en el Mediterráneo y otro no tóxico, el Mediterráneo (ME) que podría ser conspecifico con *Alexandrium kutnerae* y que en el Mediterráneo es conocido como *A. tamarense*. Como resultado, además de algunos caracteres morfológicos, para apoyar esta hipótesis, se presentan datos sobre diferentes tasas de crecimiento en función de la temperatura para distintas especies, y sobre experimentos de cruces entre diversas cepas.

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

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

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

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

³ CRA, Centre de Referència en Aquicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya, Spain

Dentro de las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* se encuentran algunas especies asociadas a la producción de ácido domoico, toxina responsable del envenenamiento amnésico por mariscos (ASP). La identificación de este género puede realizarse por medio de la microscopía óptica, la discriminación entre las especies a menudo requiere la observación de caracteres morfológicos por medio de la microscopía electrónica. Debido a esto se ha iniciado un proyecto para el desarrollo de métodos de identificación alternativos. En este trabajo se pretende desarrollar sondas moleculares para hibridación fluorescente in situ (FISH) y PCR en tiempo real como métodos de detección de las especies de *Pseudo-nitzschia*. Igualmente, abordamos una nueva estrategia, basada en principios termodinámicos, para escoger las sondas más óptimas para la detección de microalgas tóxicas mediante hibridación in situ.

Ingeniería de Bioprocesos con dinoflagelados. Experiencias preliminares.

Francisco García*, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón, Hassan El Belarbi y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

La Ingeniería de Bioprocesos Marinos juega un papel esencial en el desarrollo y mejora de medios y condiciones de cultivo, y en el diseño y optimización de fotobiorreactores "a medida" para la producción de metabolitos de interés comercial a partir del cultivo de microalgas. La aplicación de la experiencia acumulada en este campo podría ayudar a paliar el escollo que supone el cultivo masivo de microalgas frágiles de la clase dinoflagelata (dinoflagelados) productoras de biotoxinas de interés alimentario y farmacológico.

La aireación y mezcla son dos factores imprescindibles en la mayoría de fotobiorreactores destinados al cultivo de microalgas en suspensión. La aireación, porque proporciona CO₂ al medio de cultivo. La mezcla, bien sea mecánica y/o neumática, porque aumenta la disponibilidad a las células de los nutrientes aportados al medio tanto en forma gaseosa como disueltos, previniendo la limitación del crecimiento celular. A través de la mezcla se disminuyen las diferentes resistencias al transporte de materia.

El aumento de la intensidad de mezcla se consigue con una gran variedad de estrategias dependiendo del tipo de biorreactor utilizado; por ejemplo, aumentando la velocidad de los agitadores, modificando el tipo de agitador, aumentando la velocidad de circulación del cultivo, utilizando tabiques deflectores y mezcladores estáticos, actuando sobre la forma de distribuir la aireación, etc. Todas estas estrategias generan una gran diversidad de campos de fuerzas de corte y fenómenos asociados a la interacción célula-burbuja en cualquier tipo de biorreactor agitado y/o aireado. El umbral de sensibilidad de los microorganismos cultivados a estos fenómenos agresivos es muy variado, es decir, interespecífico e incluso intraespecífico (dependiente de la cepa).

El problema de la agitación y mezcla toma gran relevancia cuando se trata de células frágiles porque se tiene que llegar a soluciones de compromiso entre la disminución de la velocidad de crecimiento por inhibición debida a fuerzas de corte y aumento de la velocidad de crecimiento por la mejora de las propiedades de transporte en el fotobiorreactor. La situación es más compleja cuando las células frágiles a cultivar son fotoautotróficas y requieren iluminación para su crecimiento. En este escenario, la mezcla y, por ende, la fluidodinámica adquieren una extraordinaria relevancia porque son las responsables de transportar células desde zonas menos iluminadas en el centro del fotobiorreactor hasta zonas próximas a la superficie sobradamente iluminadas.

En consecuencia, el cultivo masivo de células frágiles fotoautotróficas puede presentar una triple restricción asociada a la agitación: daño celular por fuerzas de corte, restricción de nutrientes por escasa mezcla e iluminación interna deficiente, también por insuficiencias en la mezcla. Pensamos que el cultivo masivo de dinoflagelados tóxicos fotoautotróficos se encuentra en esta última y compleja situación

Sin embargo, a diferencia de otras microalgas, los dinoflagelados no han sido estudiados en profundidad como microorganismos de interés comercial, sino como microorganismos de interés ecológico y medioambiental. Por tanto, la carencia de información sobre el cultivo masivo de dinoflagelados con cierto éxito es evidente. En el trabajo que presentamos demostramos cómo con estrategias propias de la Ingeniería de Bioprocesos se puedan dar saltos cualitativos importantes en el área relacionada con la producción sostenible de biotoxinas.

El dinoflagelado modelo utilizado ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), especie productora de yessotoxinas. El cultivo se llevó a cabo en biorreactores convencionales tipo tanque agitado de 2 L de capacidad provistos de medida y control de pH, O₂, T^a, etc. Agitación y aireación se acomodaron para evitar fuerzas de corte letales. Los cultivos se desarrollaron en modo discontinuo, fedbatch, semicontinuo y continuo. El modo fedbatch proporcionó valores máximos de la concentración de células y de yessotoxinas en la suspensión, casi un orden de magnitud por encima de los publicados hasta ahora con esta especie. Los resultados preliminares en modo continuo nos permitieron demostrar que es posible cultivar dinoflagelados de forma estable en el tiempo, aunque no exenta de problemas. Se alcanzaron varios estados quiasiestacionarios a diferentes velocidades de dilución, aunque presentaron problemas de estabilidad.

Daño celular por fuerzas de corte en cultivos de dinoflagelados tóxicos

Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón, Hassan El Belarbi,
Francisco García* y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

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

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

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

Estudios previos revelaron que el nivel de daño parecía depender del estrés promedio, de la duración del periodo agitado y del momento del día en el que se introducía dicha agitación. Sin embargo, dichos estudios se diseñaron con fines medioambientales y no ingenieriles. Para salvar esta distancia, en este trabajo se ha elaborado un protocolo de cultivo que nos permite valorar las posibilidades de una cepa para ser cultivada masivamente. A través de la alteración de factores tales como estrés de corte, tiempos de ciclo de exposición a la turbulencia y fracción de tiempo de exposición se pueden estudiar los mecanismos de inhibición del crecimiento por fuerzas de corte y detectar umbrales de estrés en dinoflagelados.

El comportamiento de la población celular fue seguido a través de medidas diarias de concentración celular, diámetro celular promedio, viabilidad y actividad esterasa y auto-fluorescencia. En mitad de la fase exponencial se analizó el ciclo celular. El contenido en toxinas y en lipoperóxidos se cuantificó al final de los ensayos. La especie cultivada fue *P. reticulatum* GG1AM, amablemente cedida por el Instituto Oceanográfico de Vigo. Los cultivos se realizaron en frascos erlenmeyer dispuestos sobre un agitador orbital, usando medio de cultivo L1, ciclos luz-oscuridad 12:12.

Los experimentos realizados nos permitieron establecer conclusiones interesantes sobre la resistencia de las células a fuerzas de corte asociadas a la turbulencia. El umbral de daño para esta especie estaría alrededor de 0.1 s^{-1} . Este valor es varios órdenes de magnitud inferior a los valores mínimos de estrés de corte existentes en fotobiorreactores convencionales.

Effects of Bacillamide and related compounds on algal growth

C. Churro ¹, V. Figueira ², S. Paulino ¹, E. Alverca ¹, P. Pereira ¹, A. Lobo ²,
Susana Franca ¹

¹ Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisboa, Portugal

² Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Bacillamide, a natural algicide produced by the marine bacteria *Bacillus* sp., and several other derivatives were synthesized in the laboratory and tested against different algal strains belonging to Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Prysinophyceae, Eustigmatophyceae, Prasinophyceae and Chlorophyceae. The selective antialgal activity of each synthetic bacillamide was screened by exposing the different algal cultures at different cell densities to different concentrations of the bacillamide (0 to 160 ug.ml^{-1}) over a 216 hours period. The tests were carried out on 96-well microplates and daily optical measurements (450nm) were used to determine growth inhibitory concentrations (IC50 and IC90). Preliminary results showed that the chlorophytes *Ankistrodesmus falcatus* and *Scenedesmus obliquus* were much less sensitive to bacillamide than the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon gracile*, *Anabaena circinalis* and *Anabaenopsis circularis*. However other cyanobacteria, namely the oscillatoriales *Leptolyngbya* sp. and *Plankthotrix rubescens*, showed higher tolerances to bacillamide, similar to the ones exhibited by the different non-toxic algae *Chlamydomonas* sp., *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Diacronema* sp. and *Nannochloropsis* sp. Among the other derivatives tested, fluor-bacillamide and chlorine-bacillamide showed similar results, while Metoxi-bacillamide seemed much less effective than bacillamide and Iodine-bacillamide strongly affected the growth of all the algae tested with no apparent selectivity. Although no conclusions should be rushed from these preliminary results, data suggest that the use of bacillamide derivatives in natural environments to control/remediate HAB occurrences, should take into account the type and the amount of HAB species present in the water in order to avoid noxious effects of bacillamides on harmless phytoplankton.

Financial Support: FCT-POCI/AMB/60351/2004.

Adaptación, azar y contingencia histórica en la evolución de *Prorocentrum triestinum* bajo condiciones simuladas de Cambio Global.

¹Antonio Flores Moya, Eduardo Costas ² y Victoria López-Rodas ².

¹ Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Vegetal (Botánica)

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

Los estudios sobre cambio global predicen que en las próximas décadas se producirá un aumento de la temperatura de la superficie de los océanos, y una eutrofización progresiva de las zonas costeras. Asumiendo estas premisas, se han investigado los efectos a largo plazo de la presión de selección sobre la eficacia biológica y el tamaño de la célula del dinoflagelado productor de mareas rojas tóxicas *Prorocentrum triestinum* Schiller, bajo condiciones simuladas de aumento de temperatura y de disponibilidad de nutrientes inorgánicos. Dos cepas de *P. triestinum*, previamente aclimatadas a condiciones estándar (medio f/2, 20 °C), se transfirieron a nuevas condiciones de cultivo (medio f, 25 °C), hasta que los valores eficacia biológica y tamaño celular fueron invariantes en función del tiempo (720 d, alrededor de 400 generaciones). El valor medio de eficacia biológica de ambas cepas incrementó como consecuencia de eventos de evolución adaptativa, pero los cambios en el tamaño celular fueron debidos tanto a la adaptación a condiciones simuladas de Cambio Global, como a efectos conjuntos del azar y la contingencia histórica. A la luz de los cambios ambientales predichos, se sugiere que los eventos de marea roja producidos por *P. triestinum* podrían incrementar en las próximas décadas.

Proliferación masiva de cianobacterias en el embalse de Ullibarri-Gamboa

Laura Muro Molina ¹, Salomé Ortiz de Landaluce ¹, Nuria Cifuentes Ezquerro ¹,
Araceli Vara Bernet ¹, Eduardo Costas Costas ²

¹ Aguas Municipales de Vitoria S.A. (AMVISA), ETAP de Araka,
N-240 Km 6,3 01012 Vitoria-Gastei

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

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

Caracterización morfológica, molecular y estudio de la compatibilidad sexual en *Pseudo-nitzschia delicatissima*

S. Quijano ¹, E. Garcés ², N. Lundhom ³, J. Camp ¹

¹ *Departament de Biologia Marina i Oceanografia, Institut de Ciències del Mar, CMIMA, Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, E08003 Barcelona, Spain*

² *IRTA-Centre d'Aqüicultura, Crta. Poble Nou, Km 5.5, 43540-Sant Carles de la Ràpita, Spain*

³ *Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Strandpromenaden 5, DK-3000 Helsingør Denmark*

El concepto de especie es una unidad fundamental y su delimitación adecuada es esencial para el entendimiento correcto de la biodiversidad, ecología, biogeografía y evolución además de los mecanismos de especiación. Actualmente la biodiversidad del fitoplancton se basa principalmente en características morfológicas, sin embargo se está desarrollando taxonomía molecular que permite discriminar entre especies crípticas y pseudo-crípticas, que presentan diferencias fisiológicas, de hábitats y de ciclos de vida con implicaciones ecológicas. Las diatomeas constituyen un grupo de algas importante ecológicamente formando parte de las comunidades planctónicas y bentónicas de todo el mundo. Dentro de ellas el género *Pseudo-nitzschia* ha despertado interés en los últimos años por estar asociado a la producción de ácido domoico. Dentro del programa de vigilancia de fitoplancton tóxico de la ACA (Agencia Catalana del Agua) se han identificado las especies de *Pseudo-nitzschia* presentes en las costas de Cataluña. Para una mejor caracterización taxonómica se han aislado 20 cepas de *P. delicatissima* en el periodo 2006-2007. Las cepas se observaron al microscopio electrónico, se analizó el gen 5.8S rDNA y las regiones ITS, se estimaron las tasas de crecimiento y se estudió la compatibilidad sexual. De las 20 especies aisladas que identificamos morfológicamente como *P. delicatissima* solo 4 son compatibles formando auxosporas viables. De estas se obtuvo la primera y segunda generación y se caracterizó morfológica, molecular y fisiológicamente para determinar posibles variaciones. Se han detectado diferencias fisiológicas en la F1 y morfológicas en la F2.

Detección, cuantificación y seguimiento de proliferaciones de fitoplancton mediante LISST

(Laser in situ Scattering Transmissometry)

Sílvia Anglès ¹, Antoni Jordi ², Esther Garcés ^{1,3}, Mercedes Masó ¹, Gotzon Basterretxea ²

¹ *Institut de Ciències del Mar (CMIMA-CSIC),*

Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003 Barcelona, Spain

² *IMEDEA (UIB-CSIC), Miquel Marqués 21, 07190 Esporles, Balears, Spain*

³ *IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Sant Carles de la Ràpita, Spain*

El estudio de la dinámica de poblaciones de especies que causan proliferaciones algales nocivas requiere de datos de una resolución espacio-temporal alta. Desafortunadamente, las técnicas convencionales de monitoreo, basadas en la recolección de muestras y posterior análisis en el microscopio, resultan por lo general insuficientes. El desarrollo de nuevas tecnologías hace cada vez más accesible la obtención de medidas de alta resolución en tiempo real. Una de estas tecnologías, basada en el uso de las propiedades ópticas del medio marino, es el Laser in situ Scattering Transmissometry (LISST). Este instrumento mide la concentración y distribución de tamaños de las partículas en 32 clases distribuidas logarítmicamente dentro del rango de 2 a 500 micras. Aunque fue diseñado originalmente para el estudio de sedimentos, existen trabajos anteriores que demuestran su capacidad para estimar la abundancia del fitoplancton.

En el presente trabajo, probamos la eficacia del LISST para detectar y cuantificar células de *Alexandrium*, tanto en cultivos de laboratorio como en el campo, mediante el

seguimiento de una proliferación de *A. taylori* en la playa de la Fosca, en Palamós (Costa Brava). Las medidas realizadas con este instrumento se han comparado con muestras simultáneas analizadas en el microscopio. Los resultados indican que los datos de distribución de tamaños de partículas obtenidos por el LISST son equiparables a los recuentos obtenidos en el microscopio. En consecuencia, sugerimos que el LISST es un instrumento eficaz en la detección y cuantificación de especies de fitoplancton en proliferaciones mono-específicas, y que permite obtener datos de alta resolución espacio-temporal para el estudio de la dinámica de población de estas especies.

Quistes de dinoflagelados potencialmente tóxicos durante una extracción de sedimento en la ría de Muros (Galicia, NO España) y discusión de su posible impacto en las Proliferaciones Algales Nocivas de la zona

Isabel Bravo ¹, Rosa I. Figueroa ¹, Eduardo López ¹

¹ Instituto Español de Oceanografía, Aptado 1552, 36200 Vigo

¹ Centro Tecnológico del Mar, Eduardo Cabello s/n, 36208 Vigo

Ya que los quistes de los dinoflagelados muchas veces tienen un papel clave en la aparición y la recurrencia de una proliferación de microalgas nocivas, se hace necesario el conocimiento del sistema plancton/bentos a la hora de diseñar los programas de gestión y control del fitoplancton tóxico, de forma que ese sistema integre el potencial de la posible presencia y acumulación de los quistes de especies potencialmente tóxicas en el sedimento u otros sustratos. Uno de los primeros pasos en ese sentido ha sido la inclusión del estudio de los quistes de dinoflagelados potencialmente tóxicos entre los parámetros a estudiar durante la monitorización ambiental llevada a cabo durante la extracción de sedimento realizada en la acción piloto del proyecto GESTINMER. El objetivo principal del proyecto GESTINMER es desarrollar un sistema de gestión integral de los residuos producidos por el cultivo de mejillón en Galicia, con la finalidad de reducir su impacto ambiental y recuperar la heterogeneidad natural del ecosistema. Con el fin de evaluar el impacto que puede suponer la resuspensión de quistes de dinoflagelados tóxicos al manipular el sedimento durante la acción piloto, se realizó una caracterización previa del sedimento antes de su extracción y se estudió la resuspensión de los quistes durante la misma. En este estudio se detectaron quistes de 3 especies potencialmente tóxicas: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium tamarense* y *Lingulodinium polyedrum*. Basándonos en los resultados de este estudio y en el conocimiento que se tiene de la estrategia de vida de estas tres especies, así como el de las dinámicas de sus floraciones en las rías Gallegas, se discute el impacto que puede suponer la resuspensión de quistes de estos dinoflagelados en lo relativo a la posibilidad de que la germinación de los quistes detectados puedan producir una proliferación tóxica.

Análisis de microcistinas. Últimos avances analíticos.

Cintia Flores, Josep Rivera y Josep Caixach

Laboratori d'Espectrometria de Masses, Dept. d'Ecotecnologies, IIQAB-CSIC,

C/Jordi Girona 18, 08034 Barcelona

En las últimas décadas, las cianobacterias han vuelto a atraer la atención debido a su presencia cada vez más frecuente en aguas superficiales. Las microcistinas son una familia de más de setenta péptidos hepatotóxicos producidos por diferentes géneros de cianobacterias (*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix-Oscillatoria* y *Nostoc*). En nuestro laboratorio se ha realizado el análisis cualitativo y cuantitativo de las diferentes variantes de microcistina presentes en blooms de cianobacterias observadas desde 1998 en aguas continentales de

diferentes puntos de la geografía española. A medida que se han ido produciendo avances analíticos, se han puesto a punto diferentes metodologías para la determinación de microcistinas (SPE off-line/on-line acoplado a HPLC/UV, LC/ESI-MS y LC/ESI-MS/MS). En este trabajo se presenta una comparativa de los resultados obtenidos con cuatro instrumentos diferentes triple cuadrupolo. Actualmente, se está trabajando en la automatización del método de extracción en fase sólida (SPE) on-line acoplado a LC/ESI-MS/MS con el sistema Environmental Quantitation (EQUAN). Con esta metodología se ha conseguido reducir el volumen de agua a extraer hasta 1 mL, disminuyendo consecuentemente el tiempo de análisis y obteniendo unos límites de detección inferiores a 14 ng/L para todos los analitos estudiados (nodularina, MC-LR, RR e YR).

Estudio de la sensibilidad de las células de neuroblastoma Neuro-2a a estándares de toxinas marinas

Elisabeth Cañete, Amandine Caillaud y Jorge Diogène

IRTA, Sant Carles de la Ràpita, Ctra Poble Nou s/n, 4340 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona

Los métodos de detección de toxinas marinas basados en el estudio del efecto tóxico en cultivos celulares aportan información relevante respecto a la actividad tóxica de las toxinas y eventualmente contribuyen a describir su mecanismo de acción. Al igual que todas las metodologías de detección de toxinas, los ensayos de citotoxicidad necesitan de validaciones para convertirse en métodos de uso convencional. En éste trabajo abordamos la respuesta de células Neuro-2a (ATCC, CCL131) frente a diferentes estándares de toxinas marinas utilizando un método dependiente de ouabaina y veratridina (O/V). Este modelo celular, rico en canales de sodio, es un modelo habitualmente empleado para estudios de toxinas que actúan sobre estos canales. Con el fin de estudiar su aplicabilidad a otras toxinas, hemos realizado un estudio multi-toxínico. En las condiciones utilizadas en presencia de O/V se obtuvieron EC50s de 8,6 nM para la saxitoxina (bloqueadora de canales de sodio), 8,2 nM para la brevetoxina-3 y 36,9 nM para la brevetoxina-2 (activadoras de canales de sodio). Entre las toxinas que no actúan sobre canales de sodio, se produjo mortalidad en las células Neuro-2a sin tratamiento previo con O/V de forma dosis-dependiente, obteniéndose las siguientes EC50s: palitoxina 0,1nM, pectenotoxina-2 28,3 nM, ácido okadaico 21,9 nM y dinophysistoxina-1 20,6 nM. El ácido domoico no produjo mortalidad en las células Neuro-2a con o sin O/V. El modelo Neuro-2a se configura como una estrategia potente para el estudio de un amplio espectro de toxinas marinas.

Evidencia de yesotoxina en mejillones de la bahía de Alfacs

J. Diogène^{1,2}, B. Paz³, M. Fernández^{1,2}, E. Mallat^{1,2}, E. Cañete^{1,2}, A. Caillaud^{1,2}, L. Elandaloussi^{1,2}, P. de la Iglesia^{1,2}, A. G. Cabado⁴, J. Lago⁴, J. Vieites⁴, J. Franco³.

¹ IRTA Sant Carles de la Rapita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita;

² XRAq, Xarxa de Referencia en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya; ³ Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC), E.Cabello, 6, 36 200 Vigo;

⁴ Area de Microbiología y Toxinas ANFACO-CECOPESCA, Ctra. Col Univ, 16, 36310 Vigo.

Durante el invierno de 2007 se ha registrado un importante episodio de presencia de yesotoxina (YTX) en mejillones de la bahía de Alfacs, Tarragona. Durante este episodio, se detectó YTX en todas las muestras de mejillón repartidas por los diferentes puntos del polígono de producción coincidiendo con una proliferación de *Protoceratium reticulatum* que alcanzó un máximo de 960 células.L⁻¹. La máxima concentración de YTX en mejillón determinada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas fue de 520 ug.kg⁻¹. Estas toxinas están actualmente reguladas en la Unión Europea y el límite máximo autorizado para el

consumo es de 1000 ug.kg⁻¹ de mejillón. Ante la evidencia de presencia de YTX en la zona, y con el fin de mejorar la evaluación de toxinas lipofílicas en bivalvos, se ha procedido a implementar el bioensayo ratón específico para discriminar YTXs de otras toxinas lipofílicas (ácido ocadaico, OA; dinofisistoxinas, DTXs; pectenotoxinas, PTXs y azaspirácidos, AZAs) mediante extracción líquido-líquido con diclorometano (OA, DTXs, PTXs y AZAs) y metanol:agua (60:40) (yesotoxinas). Si bien anteriormente se habían identificado en esta zona YTXs en mejillón y proliferaciones de *Protoceratium reticulatum* incluso a más altas densidades que las registradas, este episodio constituye la primera evidencia en Catalunya de presencia de YTX con implicaciones claras en el programa de vigilancia de toxinas diarreicas en bivalvos.

Pre-validación de un método de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas para el análisis simultáneo de toxinas lipofílicas

Adriano Villar-González, María L. Rodríguez-Velasco y Luis M. Botana
*Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas (LCRBM),
Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN),
Estación Marítima s/n, 36200 Vigo.*

Las biotoxinas marinas de carácter lipofílico y de origen fitoplanctónico pueden acumularse en diferentes tipos de moluscos bivalvos, presentando un importante riesgo para la salud pública. La legislación de la UE, en el Reglamento (CE) n° 2074/2005, establece los métodos de ensayos reconocidos para la detección de toxinas lipofílicas, señalando como método de referencia los análisis biológicos e indicando posibles métodos alternativos al método de referencia, entre los que se encuentra la Cromatografía de líquidos acoplada a la Espectrometría de masas (LC-MS). Este Reglamento también indica la necesidad de sustituir lo antes posible los métodos biológicos por métodos de detección alternativos que hayan sido validados conforme a un protocolo acordado a nivel internacional. De acuerdo con esto, el Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas está actualmente coordinando, a nivel europeo, diversos estudios enfocados a la validación de un método de LC-MS para la determinación de toxinas lipofílicas. En el presente trabajo se describen los diferentes estudios realizados en la etapa de pre-validación del método, cuyo objetivo se centra en la optimización y estandarización de un protocolo para el análisis simultáneo de ácido ocadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTXs), pectenotoxinas (PTXs), azaspirácidos (AZAs), yesotoxinas (YTXs) y espirólidos. A partir de los resultados obtenidos en esta etapa se elaboró un Procedimiento Operativo de Trabajo, candidato a ser validado a través de un estudio colaborativo. Actualmente este Procedimiento está en fase de evaluación y perfeccionamiento.

Producción de espirólidos por tres cepas de *Alexandrium peruvianum* aisladas del puerto de Palamós (Gerona)

José Franco¹, Amelia Fernández², Pilar Riobó¹, Beatriz Paz¹, Gemita Pizarro³,
Rosa Figueroa² e Isabel Bravo²

¹ Fitoplancton Tóxico. Instituto Investigaciones Marinas (CSIC). Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo; España; ² Fitoplancton Tóxico. Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), Cabo Estay, Apdo 1552, 36200 Vigo; España; ³ Instituto de Fomento Pesquero. Punta Arenas (Chile)

Los espirólidos son iminas macrocíclicas farmacológicamente activas que se aislaron y caracterizaron por primera vez en extractos lipofílicos de vieira y vísceras del mejillón recolectados en Nueva Escocia (Canadá). Posteriormente se determinó que el origen biogénico es *Alexandrium ostenfeldi*. Recientemente se detectaron en moluscos de Noruega .

Aunque actualmente el modo de acción de estas toxinas es desconocido, son considerados como toxinas de acción rápida con una clara sintomatología neurotóxica al ser administradas por vía intraperitoneal a ratones.

En este trabajo se presentan la producción de espirólidos en cultivo por tres cepas de *Alexandrium peruvianum* aisladas en aguas del puerto de Palamós (Gerona). En los ensayos preliminares se detectaron, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM), fundamentalmente el desmetil spiroolido C y el spiroolido B; y muy pequeñas cantidades de desmetil spiroolido D y de los spiroolidos C y D.

Toxicidad de la dinoflagelada *Gambierdiscus* sp. aislada de las Islas Canarias

A. Caillaud^{1,2}, E. Cañete^{1,2}, S. Fraga³, E. Mallat^{1,2}, J. Diogène^{1,2}

¹ IRTA Sant Carles de la Rapita, Ctra. Poble Nou, Km 5.5, 43540 Sant Carles de la Ràpita.

² XRAq, Xarxa de Referència en Aqüicultura, CIRIT-Generalitat de Catalunya.

³ Instituto Español de Oceanografía, Apdo. 1552, E-36200 Vigo.

Por primera vez en 2004, ha sido descrito un caso de ciguatera en el litoral este del Océano Atlántico debido al consumo de un pescado (*Seriola Rivoliana*) capturado en las aguas temperadas de las Islas Canarias (Perez-Arellano *et al*, 2004). Aproximadamente al mismo tiempo, una dinoflagelada del género *Gambierdiscus* (Vgo791) fue aislada de las aguas de las Islas Canarias (S. Fraga and al, Xle International Conference on Harmful Algae, Cape Town 2004). El objetivo del trabajo que presentamos es la caracterización de la toxicidad de esta cepa. Se ha evaluado la toxicidad de un extracto bruto del *Gambierdiscus* sp de Canarias en cultivo mediante la utilización de cultivos celulares de neuroblastomas Neuro-2a. Los resultados obtenidos dan una toxicidad muy elevada del extracto bruto (IC50= 3.84 células/mL RPMI). La utilización de un activador específico del canal de sodio (Veratridina) y de un inhibidor de la bomba de sodio potasio (Ouabaina) aplicados conjuntamente con el extracto permite aumentar la sensibilidad de la respuesta tóxica de las células Neuro-2a ante la presencia de toxinas neurotóxicas que actúan sobre canales de sodio. Un estándar de brevetoxina PbTx-3 ha sido utilizado como control positivo de presencia de neurotoxinas activadoras del canal de sodio. La diferencia de respuesta tóxica obtenida con el extracto de *Gambierdiscus* sp. procedente de las Islas Canarias sólo y con presencia de Ouabaina/Veratridina (IC50= 2,04 células/mL RPMI) no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$) pero la respuesta no descarta la posible presencia de neurotoxinas de tipo activadoras del canal de sodio.

Ácido Belizeánico, un nuevo derivado del ácido Okadaico

Antonio Hernandez Daranas, Patricia G. Cruz, José J. Fernández Castro y Manuel Norte

Unicrsidad de La Laguna. I.U.B.O.-A.G.,
Astrofísico Fco. Sánchez 2, La Laguna, 38256, Tenerife

En el marco de nuestro programa de búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de origen marino, hemos estudiado el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, a partir del cual se encontró el ácido belizeánico. Este es un nuevo derivado del ácido okadaico, del que puede considerarse un precursor de interés. Utilizando fundamentalmente técnicas de resonancia magnética nuclear se determinó su estructura y mediante la utilización de diferentes técnicas de modelización molecular se ha estudiado su conformación en disolución. Es interesante el hecho de que este metabolito también presenta una potente actividad inhibidora de la proteína fosfatasa 2A pese a las diferencias estructurales que presenta con el ácido okadaico.

Un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A, el ácido 19-epi-okadaico

Patricia G. Cruz, Antonio H. Daranas, José J. Fernández y Manuel Norte
*Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna,
Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife*

Con el objetivo de buscar nuevas toxinas dentro del grupo de las causantes del síndrome diarreico (DSP), hemos estudiado el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum*, del cual se aisló un nuevo metabolito, el ácido 19-epi-okadaico. Su estructura fue determinada mediante métodos espectroscópicos y su conformación en disolución muestra importantes cambios con respecto al cabeza de serie, el ácido okadaico. Además, esta nueva toxina mostró actividades de orden nanomolar como inhibidor de proteínas fosfatasa, siendo más selectivo frente a PP1 que a PP2A.

Auto-asociación del ácido okadaico, como vía de entrada a las células

Antonio Hernández Daranas ¹, Patricia G. Cruz ¹, Alberto Hernández Creus ²,
Manuel Norte ¹, y José J. Fernández ¹

¹ *Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206*

² *Departamento de Química-Física, Universidad de La Laguna,
38071, La Laguna, Tenerife.*

El ácido okadaico (OA), una toxina de naturaleza polieter producida por dinoflagelados, fue el primer inhibidor natural de proteínas fosfatasa que actúan sobre los residuos de serina y treonina, y que juegan un papel fundamental en la regulación de muchos procesos esenciales en las células. Usando técnicas de "scanning tunneling microscopy (STM)" se puede observar claramente la auto-asociación que sufre dicha toxina, y que parece crucial para su transporte a través de las membranas celulares.

Asociación correlacional entre el consumo de moluscos y el cáncer colorrectal en España: Los niveles legales de toxinas DSP no son seguros para la salud

Juan Martínez ¹, Victoria López-Rodas ², Emilia Maneiro ², Macarena Navarro ²
y Eduardo Costas ²

¹ *Departamento de Medicina Preventiva, Hospital Carlos III, Madrid 28029*

² *Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040*

Los síntomas de la enfermedad diarreica inducida por el consumo de marisco, Diarrhetic Shellfish Poisoning o síndrome DSP, son bien conocidos. Para frenar dichos síntomas, la legislación europea limita la concentración de toxinas DSP hasta 0,16 µg equivalentes Ácido Okadaico (AO)/gr de cuerpo entero o de cualquier parte comestible. Diversos estudios experimentales in vitro e in vivo demuestran que AO es un promotor tumoral. En este trabajo, nosotros utilizamos tres estudios complementarios para valorar el efecto del AO a la dosis permitida: ensayo in vitro (influencia de AO sobre células fetales humanas), ensayo in vitro en ratones (influencia de la ingesta constante de AO) y un estudio epidemiológico correlacional

entre los hábitos alimentarios y la incidencia de cáncer en la población española. Nuestros resultados muestran que el AO incrementa el riesgo de aparición del cáncer de colon tanto en el modelo experimental como en el epidemiológico, y posiblemente actúe como agente citotóxico durante el desarrollo embrionario. Por lo tanto, estos resultados deberían alertar sobre el riesgo que supone para la salud los niveles permitidos de toxinas DSP en los alimentos.

Nuevas herramientas que ofrece el proyecto MarCoast para complementar los sistemas de monitorización de mareas rojas (HABs)

Marina Martínez y Araceli Pi Figueroa

STARLAB, Camino del Observatorio Fabra s/n, 08035 Barcelona

MarCoast- Marine & Coastal Environmental Information Services- es un proyecto que pertenece al programa GMES (Global Monitoring for Environment & Security) de la Agencia Espacial Europea (ESA). El servicio desarrollado por Starlab en MarCoast consiste en la monitorización y vigilancia de las aguas españolas a partir de datos de satélite y previsiones a partir de modelos oceanográficos de Mercator-Ocean. Se proporcionan diferentes índices marinos y permite al usuario realizar una mejor caracterización y prevención de la llegada de microalgas potencialmente tóxicas (HABs, Harmful Algae Blooms). El servicio sirve mapas de los frentes de temperatura así como de las corrientes horizontales y verticales en la zona de vigilancia.

Se proveen básicamente dos índices/componentes: El índice de temperatura y corriente; y el índice de "upwelling". También se ofrecen cortes transversales a una longitud fija, que muestran las diferentes temperaturas y los índices de upwelling dependiendo de la profundidad y de la latitud.

El objetivo del índice de temperatura y corrientes es caracterizar las corrientes cercanas a la costa. Este índice muestra aquellas áreas del océano donde la temperatura es mayor a un determinado valor específico. Este valor específico se fija con el usuario para poder identificar las zonas de riesgo por afectación de bacterias dañinas (el umbral son los 17°C).

El índice de "upwelling" se basa en el cálculo de la componente vertical, W , a partir de las componentes horizontales de los mapas de corrientes (U, V) a diferentes profundidades.

Los proyectos DINOPHYSIS GALICIA y HABIT: Objetivos y primeros resultados

Beatriz Reguera ¹, Lourdes Velo-Suárez ¹, Sonsoles Gonzalez-Gil ¹, Laura Escalera ¹, Yolanda Pazos ², Angeles Moroño ², Maria Dolores Doval ², Gemita Pizarro ¹ y J.M. Franco ³

¹ *Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Cabo Estai, Canido, Aptdo. 1552, 36200 Vigo.*

² *Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia, Peirao de Vilaxoán, s/n, 36611 Vilagarcía de Arousa, Pontevedra.,*

³ *Instituto de Investigacións Mariñas, CSI, Vigo*

El proyecto DINOPHYSIS GALICIA (Interacciones físico-biológicas en poblaciones de Dinophysis en Galicia), financiado por el programa MAR del Plan nacional, tiene como objetivo el estudio de las interacciones físico-biológicas que determinan la iniciación, desarrollo, mantenimiento y declive de las poblaciones de Dinophysis en las Rías Baixas. El proyecto

HABIT (Harmful Algal Blooms in Thin Layers), del 6º Programa Marco de la UE, es un proyecto multidisciplinar que tiene como objetivo el estudio de la dinámica de poblaciones de microalgas nocivas, con especial atención al género *Dinophysis*, agregadas en capas finas. En esta presentación se resumirán los objetivos y primeros resultados alcanzados en el desarrollo de estos proyectos.

Actividades del Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas

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

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

El Reglamento (CE) no 776/2006, designa al Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria en Vigo como Laboratorio Comunitario de Referencia para el control de las biotoxinas marinas (LCRBM), lo que le conlleva unas tareas de coordinación y liderazgo en el análisis de biotoxinas marinas en el marco de la Unión Europea. Por otro lado, el LCRBM es también el Laboratorio Nacional de Referencia (LNRBM) en España. Las funciones asignadas como LCR y como LNR están establecidas en el Reglamento (CE) Nº 882/2004 e incluyen labores de coordinación de actividades de los laboratorios europeos o nacionales, según el caso, en la aplicación de los métodos oficiales de análisis de biotoxinas marinas. Entre ellas, la organización de ensayos comparativos y su adecuado seguimiento de acuerdo con los protocolos internacionalmente reconocidos; así como la provisión de información, formación y asistencia científico-técnica a los laboratorios nacionales de control oficial, a los laboratorios de la red europea, a las autoridades competentes y a los Países Terceros. En el presente trabajo, se describen las diferentes actividades llevadas a cabo por el LCRBM, en especial, en cuanto a la organización de ensayos comparativos para la determinación de toxinas PSP y lipofílicas, dirigidos a la red europea y nacional, así como todas aquellas actividades encaminadas a la armonización de los métodos que se vienen aplicando y al desarrollo y validación de nuevos métodos analíticos alternativos al bioensayo en ratón, por tratarse de una urgente necesidad en este campo de la seguridad alimentaria.

Acción estratégica de la CA de Galicia para la mitigación de los efectos de los episodios tóxicos

Juan Blanco

Centro de Investigaciones Mariñas, apdo 13. 36620 Vilanova de Arousa

Dada la importancia de los episodios tóxicos en la CA de Galicia, la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura y la Dirección Xeral de Investigación de Desenvolvemento de la Consellería de Innovación e Industria, han decidido iniciar una acción estratégica en la que se aborda, por una parte, la coordinación de los equipos de investigación existentes y, por otra, una serie de investigaciones que se considera que pueden contribuir directamente y a corto plazo a mitigar los efectos de los episodios tóxicos, o bien, que siendo de mucho interés para este fin, están muy poco desarrollados y necesitan un impulso. En esta comunicación se exponen las bases para el desarrollo de la acción, las estructuras que se pretende crear y las posibles interacciones con otras estructuras a nivel estatal y/o internacional.

POSTERS

Monitorização de iessotoxinas em mexilhão na baía de Lisboa

Susana Sousa Gomes, Sofia Palma, Maria João Botelho, Teresa Moita y Paulo Vale

*Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR),
Av. Brasília, s/n, 1449-006, Lisboa, Portugal*

A pesquisa de iessotoxinas (YTXs) através de um kit de imunoensaio comercial foi iniciada em Portugal em 2005. Nesse estudo foi detectada a contaminação de diversas espécies de bivalves na Ria Formosa e na Ria de Aveiro e respectivas zonas litorais. Nas zonas estuarinas o mexilhão apresentou a contaminação mais elevada, enquanto na zona litoral a amêijoia-branca foi a espécie mais contaminada.

No presente trabalho foi efectuada a pesquisa de YTXs em mexilhão colhido na baía de Lisboa durante o ano de 2005. A contaminação mais elevada foi registada em Junho e, novamente em Agosto, coincidindo com baixas concentrações (~102) de *Lingulodinium polyedrum*. *L. polyedrum* não voltou a ser detectada nos restantes meses, no entanto a contaminação com YTXs foi persistente até ao final do ano. *Protoceratium* spp. e *Gonyaulax spinifera*, implicados na contaminação observada na Ria de Aveiro, não foram detectadas na baía de Lisboa ao longo deste ano.

Para tentar explicar a causa da persistência foi efectuado um estudo piloto de destoxificação de YTXs. Em Setembro de 2006 foi colhido mexilhão contaminado e colocado a depurar em tanque com alimentação artificial durante um período de dez dias. A concentração de YTXs determinada no hepatopâncreas aumentou ligeiramente ao longo do período em estudo, associada a uma perda de massa do órgão. Enquanto em estudos anteriores de destoxificação de dinofisistoxinas e saxitoxinas, a concentração residual ao final de sete dias variou entre 20-38%, e foi inferior a 1% para as pectenotoxinas, para as YTXs não foi observada diminuição da concentração ao final de uma semana. O facto de as elevadas concentrações de YTXs estarem associadas a baixas concentrações de células na água pode estar relacionado com a lenta eliminação destas toxinas.

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

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

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

Desde el establecimiento del Parque Nacional de Doñana en 1969 se han descrito hasta dieciocho mortandades masivas de aves acuáticas en sus marismas. Aunque el origen de la mayoría de estas muertes es todavía desconocido, en el 2001 se consiguió, por vez primera, relacionar la presencia de cianobacterias tóxicas en las aguas de Doñana con la muerte masiva de flamencos.

Desde entonces se han detectado otras dos mortandades en el Parque, una en Julio de 2004 y otra en Junio de 2005. En la primera, ocurrida en la laguna de los Ánsares, murieron cientos de peces (carpas y lisas) y más de 5500 aves de 47 especies distintas. En la segunda, ocurrida en el Caño de Guadiamar, murieron más de 20 toneladas de peces en apenas tres días. En ambas mortandades se pudo apreciar una coloración azul-verdosa del agua característica de la presencia de cianobacterias. Este trabajo pretende determinar si la proliferación de cianobacterias tóxicas pudo ser la causa de estas dos últimas mortandades,

para lo que se llevaron a cabo estudios físico-químicos y tóxicos del agua, la detección de toxinas en cadáveres y bioensayos en ratón.

Puesto que más del 80% de las especies de aves acuáticas de toda Europa se encuentran representadas en el Parque Nacional de Doñana, resulta de gran importancia determinar la causa de estas muertes masivas.

Aparición de mutantes resistentes a cobre en la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa*: implicaciones en el uso de cobre como alguicida

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

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

La proliferación masiva de cianobacterias tóxicas en embalses de abastecimiento supone un riesgo para la salud pública. Para el control de estos blooms se realizan tratamientos con alguicidas como el sulfato de cobre. Actualmente se desconoce el efecto de los tratamientos masivos con alguicidas sobre la dinámica de las poblaciones de cianobacterias a largo plazo. Este trabajo es una revisión sobre la adaptación de las cianobacterias a dosis letales de sulfato de cobre, usando como microorganismo experimental *Microcystis aeruginosa*. Mediante un análisis de fluctuación, demostramos que las células resistentes a sulfato de cobre aparecen gracias a una mutación espontánea que ocurre al azar antes de la exposición al cobre. La frecuencia de aparición de la mutación que permite el paso de células sensibles a células resistentes es de $1,76 \times 10^{-6}$ mutantes por división celular. Las células resistentes tienen una tasa de crecimiento menor que las células sensibles en ausencia de cobre, sin embargo son las únicas capaces de crecer en concentraciones mayores a $5,8 \mu\text{M}$ de sulfato de cobre.

Cytological changes induced by cyanobacterial microcystin-LR in mammalian Vero cells

M. Andrade, E. Alverca, E. Dias, P. Pereira

National Health Institute Dr. Ricardo Jorge (INSA), Lisbon, Portugal

Microcystins are potent hepatotoxins produced by cyanobacteria. They are responsible for acute poisoning and for long-term health effects, but the cellular mechanisms underlying these toxicity processes are still poorly understood. In this study, we evaluated the cytotoxic effects of microcystin LR (MCYST-LR) in a mammalian cell line. Vero cells were exposed to different MCYST-LR concentrations (0.01 $200\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) for 24, 48 and 72 hours. For each incubation condition both biochemical (MTT, LDH and NRU) and morphological analyses were performed.

This information was combined with an ultrastructural analysis of cells exposed to $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ MCYST-LR for 24h. Biochemical and morphological data revealed a good agreement and demonstrated a dose-dependent relation. Cell viability decayed markedly after 24h of exposure to toxin concentrations greater than $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. With exposure times of 48 and 72h the effects were slightly increased.

Furthermore, cells began to lose their polyhedral shape, became rounded and a growing proportion of cells detached from the substrate. The ultrastructural analysis of treated Vero cells revealed well preserved membranes and nuclear structure. The cytoplasm showed numerous lysosomes containing amorphous and/or multilamellar structures and some disorganized and/or disrupted mitochondria.

Occasionally, putative micronuclei could be seen. These results suggest that both lysosomes and mitochondria are important microcystin targets at the cellular level, and further investigation studies are being performed in order to confirm this assumption.

Análisis morfológico, molecular y contenido de toxinas de *Dinophysis cf ovum*, registrado en las Rías Baixas en mayo de 2005

Nicolás Raho ¹, Gemita Pizarro ², Laura Escalera ²,
Beatriz Reguera ² e Irma Marín ¹

¹ Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid

² Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Cabo Estai, Canido,
Apto. 1552, 36200 Vigo.

Dinophysis acuminata Claparède et Lachmann es el principal productor de toxinas DSP, causantes de prolongados cierres de extracción de bivalvos, en la costa suratlántica europea (Francia, Irlanda, España y Portugal). No obstante, bajo esta denominación taxonómica se incluyen una serie de morfoespecies cuya característica común es poseer sus grandes placas hipotecales con un contorno que varía entre ovoide, elipsoidal y sub-esférico.

A finales de mayo de 2006 se registró una repentina floración de un *Dinophysis* sp. de contorno ovalado muy regular, tecas muy delicadas, y talla pequeña (L: 31-42 µm; W: 22.5-32µm), fácilmente distinguible del *D. acuminata* típico de las Rías Baixas gallegas. Este *Dinophysis cf ovum*, con morfología próxima a *D. ovum* Schüt y a *D. sphaerica* Stein, es muy similar a los *D. cf acuminata* descritos en Bahía de Thermaikos (Grecia) y en las costas de Huelva. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC/MS) de arrastres ricos en esta especie revelaron un contenido moderado (< 10 pg • cel⁻¹) de ácido okadaico (AO).

El análisis comparado de diferentes regiones del operón del rRNA obtenido a partir de células de *D. cf ovum*, aisladas in vivo por micromanipulación, presentan diferencias con respecto a las obtenidas para *D. acuminata* típica de la región.

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

Lucía Palacios e Irma Marín

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

En los ecosistemas acuáticos se observan de manera frecuente interacciones entre bacterias y dinoflagelados. Se ha postulado que esta relación alga-bacteria es de tipo simbiote, dado que ambos organismos co-existen y en muchos casos la asociación se mantiene durante largos periodos de tiempo, por lo que se sugiere que las bacterias asociadas a dinoflagelados podrían tener un importante papel como reguladores de la proliferación o la toxicidad de las microalgas, por producir compuestos necesarios para el crecimiento del dinoflagelado como nutrientes o que regulen su proliferación por las producción de compuestos alguicidas. La identificación y localización de grupos bacterianos específicos asociados a dinoflagelados es esencial para el conocimiento de este tipo de interacciones y el entendimiento de la dinámica de las floraciones algales nocivas (FAN). En este trabajo hemos estudiado la asociación entre bacterias y diferentes clones de *A. minutum*, productores de Envenenamiento Paralizante por Marisco (Paralytic Shellfish Poisoning o PSP) por medio de una modificación de la técnica TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification Fluorescente In Situ Hybridization) consistente en la permeabilización de la teca mediante tratamiento enzimático y la eliminación de la autofluorescencia común en este tipo de microalgas y en combinación con técnicas de microscopía confocal.

¿Es la frecuencia de intensidad de proliferaciones algales nocivas un buen indicador ecológico de calidad de aguas marinas costeras?

Albert Reñé, Magda Vila, Laura Arin, Nagore Sampedro, Eva Flo y Jordi Camp
Institut de Ciències del Mar (CSIC), Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003 Barcelona

La frecuencia e intensidad de proliferaciones fitoplanctónicas es uno de los indicadores biológicos sugeridos por la Directiva Marco del Agua (DMA) para la determinación de la calidad de las aguas marinas costeras. Dentro del Programa de Seguimiento del Fitoplancton Potencialmente Tóxico y/o nocivo de la Costa Catalana (ACA-ICM) se muestrearon un total de 17 playas desde Junio de 2004 hasta diciembre de 2006. Las estaciones se hallan en masas de agua de 3 tipologías definidas en función de su contenido de agua dulce (muchísima influencia, influencia moderada y sin influencia de agua continental) y están sometidas a distinto grado de presiones antropogénicas. Se determina la distribución temporal y geográfica de los organismos fitoplanctónicos potencialmente tóxicos o nocivos, así como la frecuencia e intensidad de proliferaciones algales nocivas (PAN).

El género potencialmente tóxico más ampliamente distribuido tanto temporal como espacialmente es *Pseudo-nitzschia*. Los dinoflagelados *Ostreopsis* spp. y *Coolia monotis*, que presentan un claro patrón estacional, se observan con mucha frecuencia y en concentraciones importantes. Encontramos de forma recurrente cada verano, proliferaciones con altas concentraciones de *Alexandrium taylori* y un gymnodinioide acompañante en la Costa Brava. Se detectan otros organismos potencialmente tóxicos como *Prorocentrum rathymum*, *P. minimum*, *Alexandrium minutum*, *Dinophysis sacculus*, etc., de manera habitual pero en bajas concentraciones. Se desarrolla un índice de PAN en función de su frecuencia e intensidad y se relaciona con los valores promedio de clorofila a (Chl a) observados durante los mismos muestreos. A pesar de que se observa una correlación positiva y significativa entre ambos ($r^2=0.60$; $p=0.0003$), ésta se encuentra fuertemente marcada por el aporte de aguas continentales. Mientras que en aguas de influencia fluvial existe una buena relación entre concentración de Chl a y el índice de PAN, esto no se cumple para las aguas sin influencia continental.

Algunos dinoflagelados bentónicos canarios, tóxicos y no tóxicos

Santiago Fraga ¹, Pilar Riobó ², Beatriz Paz ² y José M. Franco ²

¹ *Instituto Español de Oceanografía, Apdo. 1552, 36200 Vigo*

² *Instituto de Investigaciones Mariñas, CSI, Vigo*

Aprovechando la VIII Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas celebrada en La Laguna en noviembre de 2003, se muestrearon dinoflagelados bentónicos la zona intermareal de Punta Hidalgo. Como resultado de ese muestreo y otros posteriores en otras islas, se han obtenido cultivos de varias especies interesantes de dinoflagelados entre las que se encuentran algunas tóxicas. Por vez primera se ha detectado la presencia de *Gambierdiscus* sp. en esta zona del Atlántico que tal vez casualmente también coincidió con el primer caso conocido de ciguatera causado por peces pescados en Canarias. Se han aislado varias especies de *Prorocentrum* bentónicos tóxicos tales como *P. lima*, *P. arenarium*, *P. belizeanum*, y otras dos más, no tóxicas, de las cuales una, seguramente es una especie nueva que también se ha observado en Grecia y Portugal y posiblemente en Cataluña. Otro género común en estas aguas es *Ostreopsis*, del que se han obtenido varias cepas tóxicas y cuyo estudio taxonómico está en curso. También se han aislado *Coolia monotis* y otra especie nueva de *Coolia*, ambas no tóxicas.

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

Yolanda Pazos¹, Luz Mamán² y Maximino Delgado³

¹ Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia, Peirao de Vilaxoán, s/n. 36611 Vilagarcía de Arousa. Pontevedra; ² Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros. Ctra. Punta Umbría-Cartaya, km 12. El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva; ³ Institut de Ciències del Mar, CSIC, Pg. Marítim, 37-49, E-08003, Barcelona

Con objeto de evaluar la incertidumbre asociada a los recuentos celulares de fitoplancton tóxico en microscopio invertido, utilizando las cámaras de sedimentación de Uthermöhl, se realizó un ejercicio de intercalibración interlaboratorio en el que participaron 58 investigadores, de 28 laboratorios de 13 países.

Se recogieron 30 litros de agua de mar de la Ría de Pontevedra, concentrada mediante manga de plancton de 10 micras, que contenía una proliferación de *Dinophysis acuminata* junto con presencia de otras especies de *Dinophysis*.

Se enviaron dos réplicas de submuestra por investigador junto con un protocolo en el que se especificaba la agitación, tiempo y volumen de sedimentación, magnificación y área a recotar. Se evalúan los resultados en términos de precisión de los recuentos y de la identificación de las especies presentes.

Primera detección de *Alexandrium andersoni* (Dinoflagelado) en la costa catalana

Nagore Sampedro¹, Margarita Fernández², Esther Garcés¹, Kees van Lenning¹, Nicolas Touzet, Santiago Fraga³, Jorge Diogène² y Jordi Camp¹

¹ Institut de Ciències del Mar, Pg Marítim de la Barceloneta 37-49 08003 Barcelona

² IRTA, Carretera del Poblenou s/n, 43540 Sant Carles de la Ràpita, Spain

³ Instituto Oceanográfico Vigo, Cabo Estai-Canido, 36200Vigo

Alexandrium andersoni fue descrito por Balech en 1990 a partir de material recolectado en Cape Cod (NO Atlántico). El mismo año Anderson et al reportaron la cepa como no tóxica. En el Mediterráneo esta especie fue encontrada por primera vez en el Golfo de Nápoles en 1998 y fue descrita como tóxica (productora de PSP) (Montresor 1998, Ciminiello 2000).

Durante los meses de Enero, Febrero y Marzo de 2007 *A. andersoni* ha sido detectado en la bahía de Alfacs (Delta del Ebro) con concentraciones máximas del orden de 103 células/L. La especie estaba acompañada por otras especies del mismo género, la más abundante de las cuales era *Alexandrium minutum*. A partir de los recuentos de microscopía óptica con una tinción de placas (calcofluor) se ha cuantificado las diferentes poblaciones de *Alexandrium*. *A. andersoni* era la especie dominante en la mayoría de las muestras analizadas con unas proporciones respecto al total de células del género *Alexandrium* cuantificadas de entre 29 % a 87%.

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

Francisco García*, Juan J. Gallardo, Asterio Sánchez, María C. Cerón,
Hassan El Belarbi y Emilio Molina

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

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

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

La mayoría de los modelos P-I carecen de aplicabilidad general porque tienen una base principalmente empírica, no considerando los mecanismos básicos que subyacen en la fotosíntesis. Las constantes cinéticas de tales modelos apenas tienen significado biológico. Frecuentemente, estos modelos no tienen en cuenta fenómenos fotoadaptativos que podrían modificar notablemente las respuestas P-I proporcionando valores diferentes de los parámetros cinéticos. La mayoría de las respuestas que pueden simular estos modelos son de estado estacionario, obviando por tanto la influencia del tiempo cuando las condiciones medioambientales cambian con éste (ej. cultivos discontinuos, ciclos luz-oscuridad, irradiancia variable, limitación por nutrientes, etc.).

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

El modelo explica respuestas fotosíntesis-irradiancia observadas bajo diferentes condiciones de cultivo: iluminación intermitente (ciclos luz-oscuridad), iluminación continua, iluminación diurna solar, limitación del crecimiento simultánea de nitratos, fosfatos, CO₂ e irradiancia, fotoaclimatación, condiciones iniciales del inóculo, entre otras. La especie de dinoflagelado utilizada ha sido *Protoceratium reticulatum* (GG1AM), productora de yessotoxinas.

En este trabajo se describen las ecuaciones básicas del modelo y se ilustran los datos experimentales de la variación temporal de la concentración de células y biovolumen correspondiente. Se puede apreciar que el modelo simula los datos experimentales satisfactoriamente.

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

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

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería; 04120 Almería

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

En un trabajo reciente (1) se ha demostrado cómo la concentración celular y la velocidad de crecimiento de *P. reticulatum* aumentó al enriquecer el medio de cultivo base (L1) en nitratos y fosfatos. Teniendo en cuenta estos datos previos, la productividad celular podría verse influenciada por la disponibilidad en el medio de dichos macronutrientes. De hecho, estudios anteriores de asimilación a corto plazo de estos nutrientes con *Gymnodinium catenatum* han mostrado que el consumo de los mismos depende de la concentración disponible y la velocidad de crecimiento es proporcional a la cuota celular de nitrógeno y fósforo. Parece, pues, imprescindible, para el desarrollo de un proceso de producción a mediana-gran escala, determinar las necesidades celulares de N y P para poder realizar la optimización de las condiciones de cultivo de dinoflagelados.

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

Los resultados obtenidos en la primera serie de experimentos mostraron, como cabía esperar, un consumo de fosfato tanto mayor cuanto mayor era la concentración en el medio y un descenso en dicho consumo con la edad del cultivo. No se observó influencia en la viabilidad celular hasta concentraciones superiores a 6 veces la concentración de la formulación del medio L1, valor a partir del cual ocurrió una disminución casi lineal con la concentración mostrando cierta toxicidad por dicho nutriente. Hasta dicha concentración de fosfato la concentración celular y la velocidad de crecimiento aumentaron con el contenido en fosfato del medio mostrándose, por tanto, dicha concentración como óptima para el crecimiento celular. La velocidad específica de crecimiento calculada a partir del volumen celular fue, en todos los casos, superior a la calculada a partir de la concentración celular ya que el volumen celular creció de forma continuada con la edad del cultivo. De este modo se demuestra que la generación de biomasa es bastante superior a la generación de células y que los datos de crecimiento parece más adecuado expresarlos como biovolumen generado en lugar de células generadas.

Para la segunda serie de experimentos se utilizó la concentración de fosfato óptima de 6 veces la correspondiente al medio L1. No se apreció diferencia en la velocidad específica de crecimiento ni en la viabilidad celular con la concentración de nitrato utilizada. Sólo a partir de las concentraciones 4 veces superiores a las correspondientes al medio L1 se apreció la aparición de fase estacionaria a partir del sexto día, mientras que para las concentraciones de

original y dos veces superior no aparece esta fase estacionaria. Este comportamiento indicaría que a partir del sexto día hay algún otro nutriente que está limitando el crecimiento como el CO₂ o algún micronutriente. Se observó un consumo de fosfato independiente de la concentración de nitrato utilizada pero que disminuyó de una forma continuada con el tiempo, como ocurriera en el ensayo anterior.

El consumo de nitrato no sigue una tendencia generalizada ni con la concentración ni con el tiempo existiendo cierta liberación de nitrato al medio lo que hace que haya días de velocidad de consumo y rendimiento celular negativo.

Estudio fisiológico de *Dinophysis* spp. en poblaciones naturales durante un periodo de upwelling/downwelling en la Ría de Pontevedra (Galicia)

Sonsoles González-Gil, Lourdes Velo-Suárez, Isabel Ramilo y Beatriz Reguera
Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo

Durante un ciclo de upwelling/downwelling de dos semanas en junio de 2005 por la Ría de Pontevedra (Galicia), se realizaron observaciones biológicas de poblaciones fitoplanctónicas. El principal objetivo fue el de identificar las principales características morfológicas de *Dinophysis* spp. que pudieran dar lugar a un estudio del estatus fisiológico de los individuos de este género en poblaciones naturales. Así, se analizaron los porcentajes de individuos vacuolados y con reservas de polisacáridos en distintas estaciones y en perfiles verticales y se hicieron medidas morfométricas. Se encontraron evidencias de mixotrofia en *D. acuminata* y la presencia de un parásito durante un ciclo de 24 horas. Así mismo, los mayores porcentajes de células con depósitos de almidón fueron encontrados en la estación más externa de la Ría en un periodo intenso de upwelling.

Purificación de cultivos mediante separación de células con citometría de flujo

Javier Gilabert e Isabel Rodríguez Carvajal

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

Dos especies de dinoflageladas (*Anphidinium carterae* y un dinoflagelao desnudo de pequeño tamaño que hemos asignado al género *Karenia*) fueron aislados del puerto de Cartagena mediante técnicas clásicas de separación en placa y dilución. Los cultivos se purificaron posteriormente mediante "sorter" con citometría de flujo y se mantuvieron viables. En esta comunicación se describe el protocolo seguido, las dificultades encontradas en el proceso y las soluciones encontradas.

Fitoplancton potencialmente tóxico en los puertos deportivos del Mar Menor

Javier Gilabert y Leonor Andúa

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

Desde Julio de 2003 a junio de 2004 se realizó un seguimiento mensual del fitoplancton en 8 puertos deportivos del Mar Menor: Lo Pagán, Los Alcázares, Los Urrutias, Los Nietos, Islas Menores, Mar de Cristal, La Isleta y Dos Mares. En este trabajo se muestra la evolución total de la densidad de células, el porcentaje en su composición de los grandes grupos como diatomeas, dinoflageladas y otras células, y algunas la evolución de algunas de las especies potencialmente tóxicas encontradas. De entre las prorocestrales se describe la densidad de *Prorocentrum micans* y *Prorocentrum minimum*. También se encontró una especie de *Karenia* no identificada a nivel de especie y *Gymnodinium sanguineum*. De los resultados de este estudio se desprende que, aunque no se han registrado como tales los efectos nocivos directamente derivados de las proliferaciones de microalgas tóxicas, su presencia en ciertas épocas y la densidad de algunas de ellas hacen aconsejable, al menos, tomar algún tipo de precauciones al respecto. Se discuten algunas hipótesis por las que no se han producido estas proliferaciones y se sugiere la implementación de un sistema de vigilancia para poder hacer frente al conocimiento de las causas que las pudieran producir. En segundo lugar se aprecia que en zonas más restringidas como pueda ser en Los Nietos, parecen darse más proliferaciones que en otros lugares indicando que algún tipo de medidas debería adoptarse con respecto a esta zona ya que si este tipo de proliferaciones se repite con frecuencia pudiera actuar como un centro de exportación a otras zonas de la laguna. En tercer lugar se aconseja un estudio más detallado de las especies aquí encontradas que permita aislarlas y cultivarlas en laboratorio con el fin de poder determinar con exactitud su posible toxicidad y las condiciones ambientales que favorecen su proliferación.

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

Nieves Bouza y Marina Aboal

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

Dentro del marco de un estudio de caracterización de las comunidades fitoplanctónicas del tramo del litoral murciano comprendido entre Calnegre y Mazarrón, se hizo un seguimiento más detallado de las especies algales potencialmente nocivas y tóxicas. Se realizaron muestreos a tres profundidades con periodicidad mensual en una estación y estacional en tres estaciones situadas a 2,5 Km de costa. Se identificaron un total de 27 especies tóxicas o nocivas entre dinoflagelados (Dinophyceae), diatomeas (Bacillariophyceae), haptoficeas (Haptophyceae) y silicoflagelados (Dictyochophyceae). Las densidades celulares de los diferentes grupos taxonómicos nunca fueron muy elevadas y alcanzaron sus valores máximos en primavera y verano. Las especies del género *Pseudonitzschia* alcanzaron un desarrollo importante (200 cel/mL) en verano. Se discute la importancia de los aportes de nutrientes, en particular de los procedentes de las ramblas, en la dinámica anual de las especies.

Análisis de la ventana de crecimiento óptimo para *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* en las Rías Baixas Gallegas durante el 2006

Laura Escalera, Yolanda Pazos, Ángeles Morono,
M. Dolores Doval y Beatriz Reguera

Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Subida a Radiofaro 50/52

Dinophysis acuminata y *Dinophysis acuta* son los principales productores de toxinas lipofílicas (okadaiatos, pectenotoxas) en Galicia y Portugal. Existe una buena comunicación y comparación de datos entre diferentes grupos gallegos (IEO, INTECMAR) y portugueses (IPIMAR) que estudian y monitorizan estas especies, pero se utilizan distintas estrategias de muestreo, por lo que hay que interpretar con cautela las comparaciones entre densidades celulares.

Con objeto de conocer los rangos y dispersión de las densidades celulares estimadas de muestras integradas (0-5, 5-10, 10-15, 15-20m) frente a aquéllos obtenidos con muestras de botella, se llevaron a cabo muestreos semanales de elevada resolución vertical en la capa de 0 a 10m, en la estación P2 de a Ría de Pontevedra coincidiendo con los muestreos rutinarios del INTECMAR. Este muestreo también servía a un objetivo del proyecto "Dinophysis Galicia": Establecer relaciones cuantitativas entre densidades celulares de *Dinophysis* y las ventanas de oportunidad para el crecimiento y advección de *D. acuminata*.

Los muestreos de botella revelaron récords históricos (aparentes) en las concentraciones de *D. acuminata* (39320 cel·l⁻¹) y *D. acuta* (78260 cel·l⁻¹) para la zona, y una importante diferencia en los valores obtenidos con ambos métodos en los momentos de máximos de concentración y/o agregación celular. En este trabajo se describen las características físico-químicas de las ventanas ambientales asociadas a los incrementos celulares de las distintas especies de *Dinophysis* en el segundo semestre de 2006.

Producción y perfil de yessotoxinas de cepas de *Protoceratium reticulatum* procedentes de Galicia

Beatriz Paz², Pilar Riobó², Laura Escalera¹ y José M. Franco²

¹ Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), Cabo Estay, Apdo 1552, 36200 Vigo

² Instituto de Investigaciones Mariñas, CSIC, Vigo

Protoceratium reticulatum es un conocido productor de yessotoxina (YTX) y análogos en varios lugares del mundo, pero hasta la fecha no se había detectado en aguas Gallegas. A finales del 2006 se aislaron en Bueu (Galicia) tres cepas de *P. reticulatum*, que se cultivaron en el laboratorio en condiciones homogéneas con el fin determinar la producción y el perfil de YTXs. La cuantificación de YTX se hizo por LC-FLD y la determinación del perfil de YTXs por LC-MS/MS. Se determinó que las tres cepas producen cantidades importantes de YTX junto con análogos conocidos, demostrándose así por primera vez la producción de YTXs por cepas de *P. reticulatum* aisladas en Galicia. Además se confirma la gran variabilidad en la cantidad y perfil de YTXs encontrados en cepas de otras localizaciones (Eiki et al., 2005; Miles et al., 2005; Paz et al., 2007).

Referencias

- Eiki, K., Satake, M., Koike, K., Ogata, T., Mitsuya, T., Oshima, Y., 2005. Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. *Fisheries Science* 71, 633-638.
- Miles, C.O., Samdal, I.A., Aesen, J.A.G., Jensen, D.J., Quilliam, M.A., Petersen, D., Briggs, L.R., Wilkins, A.L., Rise, F., Cooney, J.M., MacKenzie, L., 2005. Evidence for numerous analogs of Yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075-1091.
- Paz, B., Riobó, P., Ramilo, I., Franco, J.M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon*. En prensa.

Identificación y caracterización por LC-MS de derivados del ácido okadaico en cultivos de *Prorocentrum belizeanum*

Beatriz Paz ², Antonio H. Daranas ¹, Patricia G. Cruz ¹, José M. Franco ², José G. Napolitano ¹, Manuel Norte ¹ y José J. Fernández ¹

¹ Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, España

² Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36080 Vigo, España

En el presente estudio, las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum* (Ácido okadaico, DTX-5c y 7-hidroximetil-2-metilen-octa-4,7-dienil okadaato) fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS/MS), lo que permitió determinar los tiempos de retención (tR) respectivos, y en el caso específico de la DTX-5c, establecer su patrón de fragmentación, información de gran importancia en la caracterización de los derivados hidrosolubles del ácido okadaico.

Como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de cultivos de *P. belizeanum* fueron analizadas. Las tres toxinas nombradas anteriormente fueron detectadas como compuestos mayoritarios en los extractos celulares, mientras que en el medio de cultivo se detectaron sólo trazas de ácido okadaico.

Estudio de ostreocinas en cultivos de *Ostreopsis ovata*

Humberto J. Domínguez ¹, José J. Fernández ¹, M. Norte ¹, José M. Franco ², P. Riobó ³, Fernando Gutiérrez ¹, Maria L. Souto ¹

¹ Instituto Universitario de Bioorganica "Antonio González" Departamento de Química Organica. Universidad de La Laguna. La Laguna 38206, Canary Islands. Spain

² Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36080 Vigo, Spain

³ Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo, Apdo. 1552, 36200 Vigo

Las ostreosinas son un grupo de compuestos de naturaleza poliéter, su primer representante fue la palytoxina (C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₄) cuyos efectos fueron descritos por primera vez en 1964. Es una de las más potentes y complejas toxinas marinas conocidas y la segunda molécula de mayor peso molecular aislada de fuentes marinas que no contenga unidades repetidas de aminoácidos y monosacáridos. Fue aislada inicialmente del zoanthidio *Palythoa* tóxica, pero realmente es producida por dinoflagelados del género *Ostreopsis*. Posee potentes y variadas actividades, entre las que destacan: la despolarización de membrana, la estimulación de la liberación de ácido araquidónico, la estimulación de la liberación de neurotransmisores, la inhibición de la Na⁺/K⁺ ATPasa, la inducción de la contracción de músculo liso así como la actividad promotora de tumores. Estas actividades hacen de la palitoxina una extraordinaria herramienta biomédica. Debido a la proliferación de especies del género *Ostreopsis* en las costas Canarias, y a la peligrosidad de las mismas, se ha iniciado un estudio de éstas, comenzando por preparar cultivos a gran escala de *Ostreopsis ovata*, optimización de los métodos de aislamiento y detección mediante ensayo hemolítico y CL acoplada con espectrometría de masas (LC-MS).

Disminución del contenido en ácido domoico en vieiras (*Pecten maximus*) mediante un proceso fácilmente aplicable en la industria transformadora

Jorge Lago, Iago Valverde, Juan M. Vieites, Ana G. Cabado* (*Autora de contacto)
*Area de Microbiología y Toxinas, ANFACO-CECOPESCA. Campus Univ. Vigo,
36310 Vigo (Pontevedra) España*

La incidencia económica de las mareas rojas con toxicidad ASP (amnesic shellfish poisoning) es especialmente trágica en el sector de la vieira (*Pecten maximus*) debido a su baja tasa de detoxificación natural.

El ácido domoico se acumula mayoritariamente en el hepatopáncreas de este molusco. Por ello, la normativa comunitaria actual permite la ablación del hepatopáncreas para disminuir la toxicidad, si bien exige garantías de que este procedimiento consiga disminuir la concentración de toxina en la parte comestible hasta niveles tolerables. Por otra parte, existe normativa específica para la disminución de la toxicidad PSP (paralytic shellfish poisoning) en el corruco o langostillo (*Acanthocardia tuberculatum*).

En este trabajo hemos estudiado el efecto de la combinación de ambos procedimientos sobre la toxicidad ASP en vieiras. Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de ambos métodos es más efectiva que la ablación por sí sola y que puede suponer una alternativa para disminuir el efecto económico negativo de la toxicidad ASP sobre el sector de la vieira.

Caracterización de la respuesta citotóxica de la pectenotoxina-2 (PTX-2) en dos modelos celulares humanos: células de neuroblastoma y células Caco-2

Iago Valverde, Jorge Lago, Juan M. Vieites, Ana G. Cabado* (*Autora de contacto)
*Area de Microbiología y Toxinas, ANFACO-CECOPESCA. Campus Univ Vigo,
36310. Vigo (Pontevedra). Spain*

La presencia de pectenotoxinas (PTX) en los moluscos fue descubierta debido a su elevada toxicidad aguda en el bioensayo en ratón mediante inyección intraperitoneal de extractos lipofílicos. Los estudios en animales indican que son mucho menos potentes vía oral y que no inducen diarrea.

En este trabajo, hemos caracterizado la respuesta citotóxica de la PTX-2 in vitro en dos líneas celulares, las células de Caco-2 y las células de neuroblastoma, incluyendo marcadores de citotoxicidad y de apoptosis.

Hemos evaluado los potentes cambios estructurales que provoca la PTX-2 sobre ambos modelos celulares, el desprendimiento del sustrato, el redondeamiento celular y los cambios en el citoesqueleto, así como la integridad de la membrana plasmática que no se ve afectada por la PTX-2 en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Por otro lado, hemos abordado el estudio de distintos marcadores de apoptosis: potencial de membrana de mitocondria, fragmentación del DNA y activación de caspasas. Entre ellos el que más se ve afectado por el tratamiento celular con la PTX-2 es el potencial de membrana de mitocondria, mientras que otros marcadores o no se ven afectados o el efecto es poco relevante.

Distribución celular del ácido okadaico en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*

Araceli Escudeiro, Elena Martín y Juan Blanco
Centro de Investigacións Mariñas (CIMA) - Xunta de Galicia

La mayor parte de las estrategias para mitigar las consecuencias de los procesos tóxicos pasan, además de por controlar su presencia, por conseguir que los bivalvos acumulen la menor cantidad de toxinas posibles o que las eliminen más rápidamente. Para ello resulta necesario conocer los mecanismos implicados en estos procesos y los factores que las regulan. Aunque se han realizado avances significativos en estos temas aún existe una notable carencia de conocimiento de las bases de la acumulación y depuración.

Por este motivo y con el fin de abrir nuevas vías para el desarrollo de estos mecanismos, se realizó el presente estudio en el que se pretende averiguar la distribución, a nivel celular, del ácido okadaico en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*.

Se realizó un fraccionamiento mediante el cual se disoció la glándula (con solución CMFS) y se realizaron dos centrifugaciones diferenciales (100 y 180 xg) para poder separar los tipos celulares grandes o células digestivas, de los pequeños o células proliferativas. A cada uno de estos dos tipos celulares se les extrajo el okadaico con metanol al 80%, y se cuantificó mediante HPLC-MS con trampa iónica, la cantidad de toxina presente cada una de ellos.

Los resultados muestran una acumulación preferencial del okadaico por los tipos celulares de mayor tamaño. Esto puede abrir camino para determinar la distribución a nivel subcelular de la toxina y averiguar si presenta o no algún tipo de ligamiento a moléculas que nos permitan conocer más sobre sus mecanismos de actuación.

Estudio de la distribución intracelular y ligamiento de la toxina ASP en la glándula digestiva de *Pecten maximus*

Aida Mauriz y Juan Blanco

Centro de Investigacións Mariñas-Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia

La búsqueda de una vía de aceleración de la depuración de la toxina ASP en *Pecten maximus* requiere conocer los mecanismos de retención-eliminación. El objetivo de este estudio es establecer la distribución del ácido domoico a nivel subcelular y comprobar si existe ligamiento en la glándula digestiva de la vieira, órgano que concentra la mayor parte de esta toxina. Se realizaron dos experimentos de fraccionamiento de los componentes celulares de la glándula digestiva, con distintos medios de homogeneización, para asegurar que el potencial ligamiento de toxina a sus receptores no se rompa. En el primero, el buffer de homogeneización contenía un cocktail de inhibidores de proteasas y en el segundo una mezcla de protectores de grupos tiol. En ambos casos se rompieron las células en Utraturrax y se separaron dos fracciones por centrifugación (45000 g una hora). La primera previsiblemente contenía las membranas y los orgánulos, y la segunda el citosol (y probablemente algunos microsomas). El sobrenadante se ultrafiltró por un ultrafiltro de masa molecular nominal de 10000Da. En ambos experimentos el análisis de las distintas fracciones mostró que la mayor parte del ácido domoico se encuentra en la fracción soluble del citoplasma y no ligado a ninguna sustancia con masa molecular nominal superior a 10000Da. El análisis cromatográfico de esta fracción mediante una columna SEC (size exclusion chromatography) realizado para comprobar si existe ligamiento a algún compuesto de masa molecular menor de 10000Da, mostró que el ácido domoico se encuentra, prácticamente en su totalidad, libre en el citosol.

Estudio sobre la evolución de toxinas PSP en cultivos intensivos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*)

M. Gordillo ¹, M. A. Ocaña ¹, L. Mamán ¹, L. Fernández ¹ e I. Márquez ²

¹ Laboratorio de Control de Calidad de los Recursos Pesqueros.

Ctra. Punta Umbría-Cartaya, km 12. El Rompido. Cartaya. 21459 Huelva

² Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Pesca, Junta de Andalucía.
C/Tabladilla, s/n 41071 Sevilla

El cultivo intensivo del mejillón es tradicional en ciertas regiones de nuestro país, sin embargo en Andalucía, la instalación de este tipo de sistemas es relativamente reciente. Las características de este cultivo suspendido en una estructura flotante, ha requerido una especial atención en el diseño de la metodología para la toma de muestras de dicha especie. Desde finales de 2006 a principios de 2007 tiene lugar un episodio de toxinas paralizantes de larga duración que afecta a la totalidad de los cultivos de mejillón, situados en el mediterráneo. Con objeto de estudiar la distribución vertical de toxicidad PSP se realiza una experiencia con 21 muestras de mejillón procedentes de 3 zonas de producción diferentes. De cada muestra se realizaron cuatro análisis, tres de ellos corresponden a los distintos tramos en los que se divide la cuerda del cultivo (superior, medio y fondo) y para el cuarto se realiza un integrado de la cuerda. El análisis estadístico de los resultados obtenidos no revelan diferencias significativas ni entre los distintos tramos, ni entre estos y la muestra integrada, a la vez que manifiestan una gran correlación entre ellos. Debido a la similitud entre las especies, la identificación en microscopía óptica es sumamente dificultosa y es aconsejable el uso de técnicas alternativas. Con la finalidad de agilizar futuros recuentos se utilizó la técnica FISH (Fluorescent in situ hybridization), con sondas rRNA diseñadas por N. Touzet y R. Raine en el 2007, para la identificación de *Alexandrium minutum* y *A. andersoni*. Se obtuvo una señal positiva con la reacción de hibridación de la sonda (MinA) con células vegetativas de *A. minutum* de cepas de la costa catalana, aunque se dio alguna ambigüedad con la señal obtenida de la sonda (AndA'+C) para *A. andersoni*. Para caracterizar mejor la especie se han aislado cepas de *A. andersoni* provenientes de muestras de campo para posteriores análisis de toxinas, pigmentos y morfología.

Validación Europea de un método fluorimétrico para la detección de toxinas diarreas en molusco

H. Smienk ¹, L. Mata ¹, E. Dominguez ¹, L. Botana ², M.L. Rodriguez-Velasco ²

¹ ZEU-Inmunotec. María de Luna 11, Nave 19 50018 Zaragoza

² Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas, AESAN.
Estación Marítima s/n 36200 Vigo

Toxiline-DSP es un test basado en la inhibición de la actividad enzimática de la fosfatasa pp2A por toxinas diarreas. En condiciones normales, la fosfatasa es capaz de hidrolizar un sustrato específico obteniéndose un producto que puede ser detectado por fluorescencia. En presencia de las toxinas diarreas se produce una inhibición de la actividad enzimática proporcional a la cantidad de toxina diarrea presente en la muestra. Esta propiedad ha sido propuesta por diferentes autores para el análisis de las toxinas diarreas y en concreto ha sido utilizada para el desarrollo del Test Toxiline-DSP.

En estos momentos se está llevando a cabo una validación del test bajo la supervisión de ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) y el LCRBM (Laboratorio Comunitario de Referencia de Biotoxinas Marinas) con el fin de que pueda ser utilizado como método alternativo al bioensayo en ratón de acuerdo a la Reglamenteo Comunitario 2074/2005.

Para alcanzar este objetivo se están llevando a cabo una serie de fases para la prevalidación del método, que se resumen a continuación:

Fase I – Validación interna y mejora de los protocolos de trabajo.

En esta fase se ha redefinido el protocolo inicial en función de resultados previos. Se ha determinado la reproducibilidad intralaboratorio, además de otros parámetros de precisión y exactitud así como la robustez frente a potenciales interferencias y la comparación con otros métodos, etc. Además, se ha decidido el procedimiento estadístico a utilizar para la evaluación de los resultados.

Fase II – Transferibilidad a otro laboratorio

Los protocolos definidos por el primer laboratorio deben ser transferidos a un segundo laboratorio. Para ello se analiza un pequeño número de muestras que permitan determinar la reproducibilidad y la necesidad de mejorar los protocolos de trabajo.

Fase III – Evaluación de la funcionalidad del método entre varios laboratorios

Se repite la fase II utilizando el protocolo de trabajo optimizado con un número apropiado de muestras codificadas y en varios laboratorios (7-10 laboratorios). Antes de esta fase los laboratorios participantes realizan varios ensayos de familiarización con la técnica.

Para asegurarse de que el estudio se realiza de acuerdo a los principios de ECVAM se ha creado un Comité para la validación del método, compuesto por representantes de ECVAM, de los laboratorios participantes, de expertos externos, etc. Este comité es responsable de la organización del estudio, lo que incluye la planificación del estudio, la selección de los laboratorios participantes, la adecuación de los protocolos, la selección y codificación de las muestras, la recogida y análisis de los resultados y de las conclusiones e informe final del estudio.

En función de los resultados obtenidos se pueden dar las siguientes situaciones:

- Retorno a la fase I
- Resultados suficientes para demostrar la validez de método. No se necesita más validación
- Retocar el protocolo y proceder a la validación final
- Rechazar el método

Las 2 primeras fases de la prevalidación han sido llevadas a cabo en los últimos meses y a lo largo de 2007 se desarrollará la tercera fase de la prevalidación y si fuese necesario la validación final del método.

Se presenta la estructura y los resultados preliminares de la validación europea de un método de inhibición de la fosfatasa mediante detección fluorométrica para la detección de las toxinas DSP

Estudio preliminar del efecto de la cerulenina y aminoácidos en cultivos de *Prorocentrum lima*

Tamara Vilches ¹, Antonio Hernández Daranas ¹, José J. Fernández ¹, Manuel Norte ¹, Beatriz Paz ^{2,3} y José M. Franco ^{2,3}

¹ Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife

² Instituto Investigaciones Marinas (CSIC). Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo;

³ Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo (IEO). Cabo Estay, 36200 Vigo; España

El ácido okadaico y sus relacionados han sido los principales componentes del grupo de las toxinas del síndrome diarreico conocido como DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning), sus principales productores son los dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*.

Por sobre el interés químico y el impacto en la salud pública, el ácido okadaico y sus derivados tienen un gran interés farmacológico ya que regula algunos procesos celulares importantes e inhibe selectivamente las enzimas fosfatasa PP1 y PP2A.

Como parte de la confirmación del posible origen biogénico de la toxina polietérea ácido okadaico, hemos agregado cerulenina (inhibidor de la policétido sintasa) y aminoácidos a cultivos artificiales de *Prorocentrum lima* y los resultados de dicho experimento en cuanto al crecimiento y producción de toxinas serán comentados.