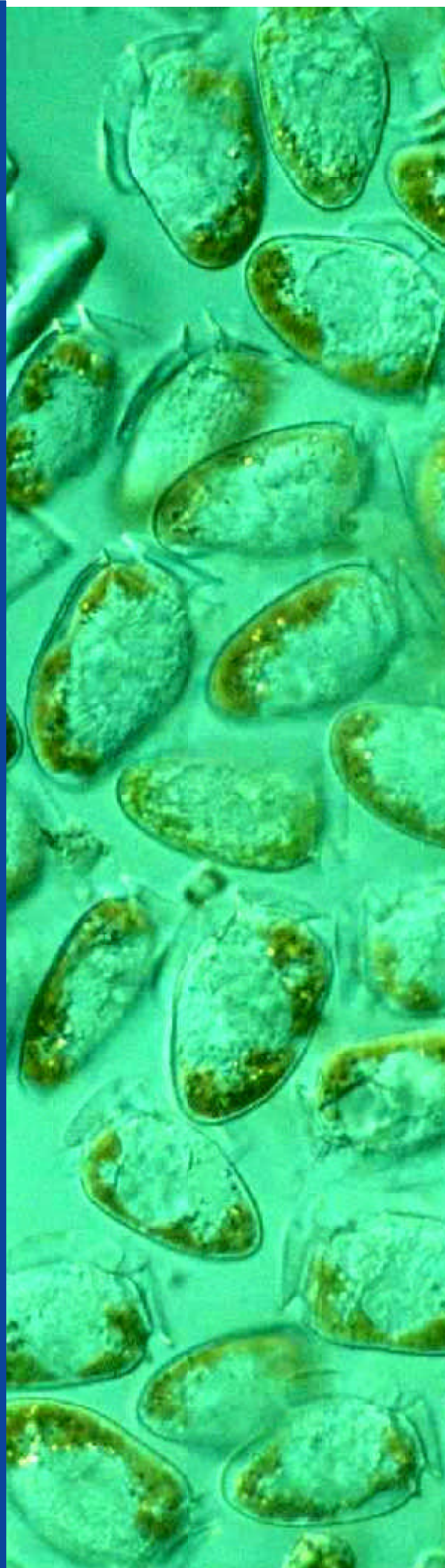


**BIOLOGÍA, AUTOECOLOGÍA
Y TOXINOLOGÍA DE LAS
PRINCIPALES ESPECIES
DEL GÉNERO *DINOPHYSIS*
ASOCIADAS A EPISODIOS
DE INTOXICACIÓN
DIARREOGÉNICA POR
BIVALVOS (DSP)**

**Beatriz Reguera Ramírez
2003**

Instituto Español de Oceanografía, C. O. de Vigo
Departamento de Ecología, Universidad de Barcelona



Universidad de Barcelona

Facultad de Biología - Departamento de Ecología

Biología, autoecología y toxinología de las principales especies del género *Dinophysis* asociadas a episodios de Intoxicación Diarreogénica por Bivalvos (DSP)

Beatriz Reguera Ramírez

Tesis Doctoral
Universidad de Barcelona
Facultad de Biología - Departamento de Ecología

Biología, autoecología y toxicología de las principales especies del género *Dinophysis* asociadas a episodios de Intoxicación Diarreogénica por Bivalvos (DSP)

Memoria presentada por Beatriz Reguera Ramírez para optar al título de doctora en Biología en el Departamento de Ecología - Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, bajo la dirección de la Dra Marta Estrada y del Dr. Francisco Gómez Figueiras

Beatriz Reguera Ramírez
Barcelona, Abril de 2003

VºBº
Pfra. Marta Estrada Miyares
Directora de la tesis
ICM-CSIC

BºVº
Dr. Francisco Gómez Figueiras
Director de la tesis
IIM-CSIC

Visto bueno
El tutor de la tesis
Facultad de Biología - UB

A MI PADRE

A TIM

A KRISTINA, TOMÁS Y PABLO

AGRADECIMIENTOS

Una tesis casi a los 50 es como un hijo tardío, que se saborea y disfruta más que los tenidos cuando se era joven. Además, tratándose de las *Dinophysis*, dinoflageladas que te enganchan y obsesionan, ha sido un placer, si bien de vez en cuando he de luchar por ser pragmática y poner el acelerador para acabar de una vez (y no aguantar más a los que me preguntaban: “¿Qué?, ¿Para cuando está esa tesis?”).

Mi primer recuerdo es para Santiago (Chaguín), mi padre, nacido en Caimanera (Guantánamo), lugar hoy tristemente célebre porque en él se ubica el limbo de la justicia estadounidense. Hasta donde me alcanza la memoria, recuerdo siempre a mi padre, encantado como un niño, contemplando los pájaros y las plantas, y repitiendo machaconamente: “¡Todo bicho viviente es una maravilla!”. Fui para él el hijo que no tuvo (éramos cuatro hermanas) y compañera de correrías en las crías de pájaros y siembras de vegetales, primero en el jardín tropical de Miramar, y luego en las tierras de Cantabria, en lo que para él constituyó un duro exilio. Aún entonces lo recuerdo anotando incansable en sus cuadernos de rayas y lápiz, tomando como voluntario datos para el servicio meteorológico y otros menesteres. En fin, que mi padre, que nunca fue a la Universidad, me dio el mejor ejemplo de curiosidad altruista por la naturaleza. Mi madre (muerta de cáncer hace muchos años), guapa e intrínsecamente urbana, respetaba nuestras actividades guardando las distancias. Cuando le dije a mi padre que quería estudiar veterinaria, me dijo disgustado: “¡Me gustaría imaginarme a mi hija con una bata blanca haciendo experimentos con microbios y no de pueblo en pueblo metiendo la mano por el ano a las vacas!” Al final por proximidad, conveniencia y posibilidades, acabé haciendo biológicas en el País Vasco, y fui después a parar al Centro Costero de Santander del I EO por similares motivos. Mi padre me adoraba, me tenía en un altar, y mi mayor tristeza en estos momentos es que por sólo unos meses él ya no podrá ser testigo del fin de esta tesis.

De las tediosas clase del curso de selectivo en Santander, se salva en mi recuerdo D. Francisco Ramos, profesor de biología, que me dijo: “¡Suspende la biología si quieres, pero aprende inglés y sobre todo, hay que publicar, publicar y publicar!” De la carrera en Leioa (País Vasco), recuerdo con especial gusto las clases de bioquímica de Eduardo Cadenas y sobre todo las didácticas clases de morfología y fisiología animal de Ana Rayo. Tras la licenciatura, un túnel de varios años de oscuridad y autodidactismo. En una oportuna carta el Prof. Margalef, que siempre contestaba a todo el mundo, me comentó que había laboratorios muy estimulantes en Europa, tales como el laboratorio de Oban en Escocia o la «Marine Biological Association of the U.K.» en Plymouth, en los que podría ampliar mis conocimientos sobre fitoplancton. María Jesús Campos y Joaquín Mariño, del laboratorio de La Coruña del I EO, fueron

los compañeros y amigos que me enseñaron a observar y clasificar el fitoplancton. En aquellos días este laboratorio, con su interesante programa de cooperación Hispano-USA en las Rías Bajas, era el ejemplo a seguir. Varias visitas y una pequeña campaña con estos colegas fueron para mí el estímulo imprescindible. Tras una estancia en Plymouth de cuatro semanas, conseguí una "scholarship" de 3 meses del British Council con la que fui a parar al laboratorio de Lowestoft en East Anglia. Viaje bien trascendente, pues durante esta estancia conocí al que es hoy mi marido, científico altruista donde los haya, quien indudablemente ha tenido una enorme influencia sobre mí, y se me ampliaron los horizontes. Después vino otra beca del British Council de un año de duración, en la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de East Anglia, para estudiar una colección de muestras de fitoplancton recogidas en campañas en la Southern Bight del Mar del Norte. Los datos obtenidos se suponía que iban a constituir el material de mi futura tesis. Más adelante fui a Barcelona y conocí a Marta Estrada, que aceptó dirigirme la tesis. ¡Pero de esto hace ya 20 años!

¡En fin, que la vida da muchas vueltas! Al regresar del Reino Unido pedí traslado a Galicia, al C.O. de Vigo del I.E.O. Al principio me costó olvidarme de las diatomeas y concentrarme en unas dinoflageladas que tenían tal o cual toxina y que a veces formaban "mareas rojas". Pero poco a poco me fui sumergiendo en el nuevo tema, tuve tres hijos seguidos y además, una preciosa huerta que cultivar. El asunto del fitoplancton de la Southern Bight, tratado sin prisa y sin entusiasmo, me resultaba cada vez más distante. De vez en cuando veía a Marta, que me decía con su lógica aplastante: " *Tú verás, hija: o la tesis o el huerto.*" ; o ya pasados los años y con tono de resignación: " *Cada cosa tiene su edad*". A mitad de andadura pedimos a Paco Figueiras que codirigiera mi tesis, a ver si por aquello de la proximidad física podía ejercer una mayor presión sobre mí que Marta desde Barcelona. ¡Cuántas veces intentó Marta convencerme para que cambiara de tema e hiciera la tesis sobre el trabajo que hacía en la actualidad con las dinoflageladas tóxicas! Tomar esa decisión me llevó unos cuantos años más, pero una vez tomada, ya todo fue casi sobre ruedas. Gracias, Marta y Paco, por vuestros sabios consejos y meticulosas revisiones tras las cuales esta tesis es mucho más digerible. Y gracias sobre todo por vuestra paciencia, aunque creo que al final ya me dabais por perdida.

Lo importante es que a partir de mi llegada a Vigo dejé de trabajar sola con mi tema. Luego vino el programa de cooperación que Santi Fraga había planeado con Clarice Yentsch, Karen Steidinger y Don Anderson; la cooperación con otros colegas gallegos y sobre todo, la asistencia a estimulantes congresos internacionales entre los que recuerdo en especial el "DINO III" en el Royal Holloway College. Allí conocí a la enorme Marie Kat, que comentaba con frustración sobre sus *Dinophysis*: " *nadan y nadan tan contentas, pero no se dividen*", y me impresionó profundamente la ponencia de Dean Jacobson, sobre la nutrición heterótrofa de los *Protoperdinium*,

con su *pallium* a modo de tela de araña, hallazgo que constituyó un hito en este campo y en cierto modo revolucionó el patrón tradicional de la sucesión planctónica. De las visitas de intercambio durante la cooperación Hispano-USA, recuerdo en especial el encanto del laboratorio de Bigelow en tiempos de los Yentstch, a finales de la década de los 80, donde tuve la suerte de conocer a Bob Guillard que me contó con placer una buena lista de truquillos para cultivar con éxito las microalgas.

¡Bueno! Vayamos al grano con los agradecimientos concretos. Ya se sabe que el trabajo de una tesis es casi siempre el resultado de la cooperación e interacción con otras muchas personas que nos ayudan, nos inspiran o nos provocan. Los datos de campo de seguimiento de dinoflageladas potencialmente tóxicos (1986-1991) fueron obtenidos en el transcurso del programa de "monitoring" del Centro Oceanográfico de Vigo (I EO) en las rías de Pontevedra y Vigo, en el que compartí fatigas y discusiones con mis compañeros Santiago Fraga e Isabel Bravo. Los primeros análisis de toxinas en mejillón por CLAE (Capítulo 7) los realizaron Claire Marcaillou-Le Baut y Pierre Masselin, del I FREMER de Nantes, como resultado de una cooperación amistosa entre el I EO y el I FREMER. Todos los análisis posteriores de toxinas en arrastres fitoplanctónicos y en células aisladas por micromanipulación los realizó mi colega y buena amiga de Sanidad Exterior (Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas) Marisa Fernández. Entre 1999 y 2002, Sonsoles González-Gil fue mi compañera de fatigas en los trabajos de análisis de imagen, ciclos de vida y aislamientos del medio natural.

La planificación de los muestreos *in situ* de *Dinophysis* en el lugar y momento apropiados a partir de 1992 hubiera sido muy difícil sin el apoyo logístico de los informes semanales de fitoplancton y condiciones oceanográficas del "Centro de Control do Medio Mariño" de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos (Xunta de Galicia) y los avisos espontáneos por teléfono de Yolanda Pazos y Ángeles Moroño. La tripulación del B/O "José María Navaz" del I EO, y en especial Valentín, su patrón, nunca me fallaron cuando los necesité para los muestreos y mini-campañas planificadas o para la toma de muestras de oportunidad en el camino de vuelta de su ruta semanal por las Rías Bajas. Amelia Fernández-Villamarín, nuestra «curator» de la colección de cultivos, me ayudó con esmero en la preparación de medios de cultivo, distribución en placas de cultivo celular y otros menesteres que requerían orden y tranquilidad. Elsa Maroño, Elena Ávila y Patricia Lourés fueron becarias FP2 que aportaron su granito de arena en los aislamientos, preparación de extractos o mediciones durante el tiempo que estuvieron entre nosotros. Rosalía Romani se debió hartar de hacerme fotocopias, y Laura Escalera, la estudiante en prácticas más reciente, se tomó muy en serio lo de examinar con lupa cualquier punto y coma fuera de lugar en las referencias y en algunos capítulos de esta tesis.

Gracias a Juan Blanco, Maxi Delgado y Esther Garcés por estimulantes y agradables discusiones de trabajo llenas de inspiración, y a Irma Marín, por abrirme la mente al mundo de la biología molecular. Y por último, mi más profundo agradecimiento a Isabel Ramilo, por las horas y horas de meticulosa y ordenada dedicación a la introducción de datos y obtención de gráficas y a Cristina Sexto, por el escaneado de imágenes y montaje de este libro sin perder nunca su refrescante sonrisa.

ÍNDICE

Agradecimientos

Capítulo 1 - Floraciones algales nocivas, episodios de fitoplancton tóxico e intoxicaciones diarreogénicas por bivalvo (DSP): antecedentes y consideraciones generales	1
Capítulo 2 - Variabilidad morfológica de las principales especies de <i>Dinophysis</i> en Galicia	39
Capítulo 3 - Formación de células pequeñas y células intermedias en el ciclo vital de especies de <i>Dinophysis</i> (Dinophyceae, Dinophysiales)	85
Capítulo 4 - Tendencias en las poblaciones de <i>Dinophysis</i> spp en aguas gallegas.	121
Capítulo 5 - Autoecología y algunos estadios del ciclo vital de <i>Dinophysis acuta</i> Ehrenberg	141
Capítulo 6 - Patrones del ciclo celular y estimación de tasas de división <i>in situ</i> de dinoflagelados del género <i>Dinophysis</i> mediante un índice postmitótico	167
Capítulo 7 - Distribución de ácido okadaico en las cuerdas de bateas de mejillón en la Ría de Pontevedra: relación con la concentración celular de <i>Dinophysis</i> y su contenido de toxinas	201
Capítulo 8 - Toxinología y contenido tóxico de <i>Dinophysis acuminata</i> , <i>D. acuta</i> y <i>D. caudata</i> de las Rías Bajas gallegas.....	229
Conclusiones	251
Bibliografía	255
Anexo I	275
Resumen	283
Acrónimos	295

CAPÍTULO 1

FLORACIONES ALGALES NOCIVAS, EPISODIOS DE FITOPLANCTON TÓXICO E INTOXICACIONES DIARREOGÉNICAS POR BIVALVO (DSP): ANTECEDENTES Y CONSIDERACIONES GENERALES.

Parcialmente publicado en:

Reguera, B., 2000a. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. In: Sar, E., Ferrario, M. & Reguera, B. (Eds.), *Floraciones Algas Nocivas en el Cono Sur Americano*. Inst. Esp. Oceanogr., Vigo, España, pp. 19-55.

GENERALIDADES

Las floraciones algales, en sentido estricto, o «mareas rojas» son discoloraciones del agua, visibles a simple vista, debidas a elevadas concentraciones (del orden de 10^6 cel · l⁻¹ en el caso de microalgas) de microorganismos planctónicos pigmentados (microalgas, ciliados, bacterias). En sentido amplio, el término «Floraciones Algales Nocivas» (en inglés «Harmful Algal Blooms» o su acrónimo HAB), acuñado por la COI (Comisión Oceanográfica Intergubernamental) de la UNESCO, designa las proliferaciones de un heterogéneo grupo de microorganismos que son percibidas como dañinas por el hombre por sus efectos adversos en la salud humana, en las explotaciones de acuicultura y turísticas y en las poblaciones naturales de organismos marinos. Si bien el término se inspiró en las manchas de dinoflageladas planctónicas, hoy día se aplica a cualquier población microalgal, ya sea planctónica o bentónica, incluso aunque las concentraciones celulares no sean muy elevadas, siempre y cuando su aparición conlleve un efecto nocivo. «Floraciones de Algas Nocivas» (FAN en Sudamérica), pues, no es un término científico, sino un término operativo que es hoy día ampliamente aceptado por la comunidad de científicos y por los gestores sanitarios y medioambientales. El mismo término se empleó para denominar el programa internacional de la COI, aprobado por el Panel Intergubernamental sobre Floraciones de Algas Nocivas (IPHAB) en junio de 1992 (Anónimo, 1992). A lo largo de este volumen emplearemos también los términos «evento» o «episodio» de microalgas para referirnos a cualquier presencia de microalgas en el medio natural que conlleve un impacto negativo para el hombre. Con la expresión «episodio (o evento) tóxico» denominaremos tanto los casos en que se registraron intoxicaciones de personas u organismos, como aquéllos en los que simplemente se registraron toxinas en los moluscos en concentraciones superiores a las consideradas como aptas para el consumo humano (nivel de regulación).

En las dos últimas décadas hemos sido testigos de un incremento *aparente*, en intensidad, duración y distribución geográfica, de las FAN. Debemos decir que el incremento es aparente, pues para probar con rigor científico que el incremento es real, se requieren series históricas de datos de fitoplancton y de condiciones ambientales de las que se dispone en muy pocas partes del mundo. Con frecuencia se asocia la «primera aparición» de una especie tóxica en una región del mundo con la aparición de un evento excepcionalmente virulento. Se ignora, en estos casos, la posibilidad de que la misma especie existiera con anterioridad en niveles moderados no asociados a eventos tóxicos, o en concentraciones que hubieran conferido a los mariscos niveles moderados o bajos de toxinas que habrían pasado desapercibidos al no existir programas de vigilancia. Los datos de regiones que disponen de una serie histórica de observaciones (10-50 años), como es el caso en la costa oeste de Canadá (Martin & Richard, 1995), confirman que puede haber una relación de uno o varios órdenes de magnitud entre el número de eventos en los que se detecta la presencia

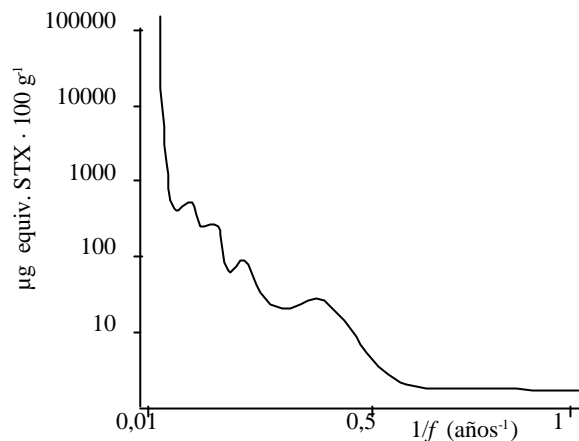


Fig. 1.1. Posible relación empírica entre la intensidad de los episodios tóxicos (I en $\mu\text{g equiv. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) y la inversa de su frecuencia ($1/f$ en años^{-1}).

de especies tóxicas en cantidades muy bajas (niveles de toxinas detectables tan sólo mediante análisis muy sensibles de cromatografía líquida) y aquéllos en los que las concentraciones son suficientes para conferir niveles de toxinas detectables por bioensayos de ratón ($\geq 38 \mu\text{g equiv. STX} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de carne en el caso de toxina paralizante); y a su vez entre el número de estos últimos y el de episodios excepcionales acompañados de víctimas humanas. La relación entre virulencia de los episodios y su frecuencia podría representarse gráficamente como una curva polimodal (Fig. 1.1) similar a las empleadas para representar la frecuencia y magnitud de terremotos. A pesar de ello, en la década de los 90 abundaron las revisiones científicas, entre las que cabe destacar las de Anderson (1989) y Smayda (1990), en las que se daba por descontado que nos encontrábamos ante una intensificación de características *quasi* epidémicas de la ocurrencia de floraciones de algas nocivas. Estas revisiones se produjeron en la misma época en la que se pusieron en marcha gran parte de los programas actuales de seguimiento de fitoplancton tóxico/nocivo en Europa, y en la que entraron en vigor estrictas directivas de la Unión Europea sobre el control de la presencia de ficotoxinas en los moluscos.

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

cultivos de peces y en otras, con la llegada a la zona de un fitoplanctólogo o con la puesta en marcha de un programa de vigilancia del medio costero. No hay que olvidar que los episodios más virulentos de intoxicación paralizante, con mayor número de víctimas humanas, se han registrado en las prístinas aguas de las costas noroeste y nordeste de Norteamérica (Hall 1982; Prakash *et al.*, 1971), y en el Canal de Beagle en la Patagonia chilena (Benavides *et al.*, 1995). A medida que se amplíen las series temporales de datos, se podrá comprobar que en numerosos casos se trata de contracciones y expansiones en la distribución de las especies que forman parte de las fluctuaciones interanuales naturales del sistema (Wyatt, 1995). Pero nadie cuestiona que existe una creciente explotación del medio costero por el hombre a través de las prácticas de acuicultura y del sector turístico; aportes de tipo agropecuario, urbano e industrial; dragados y otras obras de ingeniería portuaria; transportes de aguas de lastre de los barcos en recorridos cada vez más rápidos de un extremo al otro del planeta, etc., y que el incremento de estas prácticas puede afectar a la composición del fitoplancton, favorecer el desarrollo masivo de especies oportunistas capaces de acarrear problemas diversos asociados a exceso de biomasa (eutrofización, distrofia, etc.), y en algunos casos propiciar el incremento en intensidad y/o duración de las proliferaciones de algunas especies de microalgas tóxicas.

OBJETIVOS DE LA TESIS Y CONTENIDO DE SUS CAPÍTULOS.

El objetivo principal de esta tesis es contribuir a la caracterización morfológica y toxinológica de las principales especies del género *Dinophysis* responsables de intoxicación diarreogénica por bivalvos (DSP) en las costas de Galicia, y al conocimiento de las condiciones ambientales que favorecen el incremento numérico de sus poblaciones, ya sea debido a crecimiento activo *in situ*, o a acumulación por causas físicas en las rías. Los trabajos emprendidos se planearon para poder contestar total o parcialmente a las siguientes preguntas:

- ¿Cuáles son las causas de la gran variabilidad morfológica observada en algunas especies de *Dinophysis*?
- ¿Existen procesos sexuales en *Dinophysis* spp?
- ¿Cuál es la estacionalidad y las características ambientales específicas asociadas a la iniciación, desarrollo y declive de las proliferaciones de las principales especies de *Dinophysis*?
- ¿A qué se deben los aumentos numéricos de la población: a un activo crecimiento *in situ* o a acumulaciones resultantes de interacciones físico-biológicas forzadas por factores meteorológicos?
- Una vez expuestos los mejillones a las poblaciones de *Dinophysis* spp: ¿Se refleja la heterogénea distribución vertical de las dinoflageladas en el contenido de toxinas de los bivalvos a distintas profundidades de las cuerdas de batea? ¿Cuánto tiempo tardan los bivalvos en detoxificarse?

- ¿Cuáles son las especies de *Dinophysis* productoras de toxinas polietéreas y la contribución de cada una de ellas a los episodios DST en las Rías Bajas?
- ¿Cuál es el perfil de toxinas de estas especies y el rango de variabilidad del contenido de toxina por célula?

En este **Capítulo 1** («*Floraciones algales nocivas, episodios de fitoplancton tóxico e intoxicaciones diarreogénicas por bivalvo (DSP): Antecedentes y consideraciones generales*») se presentan los objetivos de la tesis, así como generalidades, antecedentes, definiciones y el estado del arte del tema de estudio para facilitar la comprensión de los capítulos siguientes. En el Anexo I se describen algunas técnicas de muestreo y de tratamiento de las muestras que no están detalladas en los capítulos.

En el **Capítulo 2** («*Taxonomía y variabilidad morfológica de las principales especies de *Dinophysis* en las costas de Galicia*») se describe la morfología de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. rotundata*, *D. caudata* y *D. tripos* de las Rías Bajas. Se dedica una especial atención a la variabilidad morfológica intraespecífica. Las descripciones se hicieron tras la revisión de las originales en unos casos, o de intensas revisiones con muestras propias en otros. Se añade información sobre los morfotipos observados en Galicia en el curso de muestreos múltiples a lo largo del programa de seguimiento de especies potencialmente tóxicas (hasta 1991), del proyecto "Radiales" del IEO, o de muestreos intensivos para estudios del ciclo celular y tasas de división *in situ*.

El **Capítulo 3** («*Formación de células pequeñas y células intermedias durante el ciclo vital de *Dinophysis spp**») describe la formación de «células pequeñas» de *Dinophysis*, inicialmente descritas como especies diferentes, a partir de células vegetativas que dan lugar a parejas dimórficas en un proceso «depauperante» (¿ó gametogenesis?), que tiene lugar en paralelo con la división vegetativa normal, pero que, salvo en casos excepcionales, se suele dar en un pequeño porcentaje (1-5%) de la población total. La principal hipótesis que guía este capítulo es que la formación de «células pequeñas» y el posterior crecimiento de estas células pequeñas hasta recuperar el tamaño habitual, pero pasando por formas intermedias, explicarían una buena parte de la variabilidad morfológica observada en las especies del género. Este proceso se añade a otras evidencias de la existencia de un ciclo de división sexual dentro del complejo ciclo vital (aún sin describir por completo) de las especies de *Dinophysis*.

El **Capítulo 4** («*Distribución estacional y variabilidad interanual de *D. cf* acuminata y *D. acuta**») es un estudio de la distribución espacio-temporal de las dos especies más abundantes de *Dinophysis* de la costa gallega en relación con factores meteorológicos y oceanográficos.

El **Capítulo 5** («*Autoecología de *Dinophysis acuta* y distintos estadios de su ciclo vital durante las proliferaciones excepcionales de esta especie en 1989*») describe las condiciones oceanográficas «excepcionales», durante un año extremadamente cálido y seco, que permitieron la persistencia de densas poblaciones de esta especie durante un largo período de tiempo (agosto-noviembre) bajo dos escenarios distintos: verano, con marcada estratificación térmica, y otoño, con hundimiento (downwelling) y perfiles *quasi* verticales de salinidad y temperatura.

El **Capítulo 6** («*División en fase y estimación de tasas de división in situ de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos**») presenta los resultados de cuatro muestreos intensivos o mini-campañas para determinación de tasas de crecimiento *in situ* de *Dinophysis* spp. realizadas en las rías de Vigo y Pontevedra entre 1994 y 1998, en distintas condiciones oceanográficas y estaciones del año. Las hipótesis de partida eran: a) en condiciones similares, cada especie presenta un patrón constante de división celular; b) los incrementos numéricos pueden deberse a crecimiento activo *in situ* o a procesos de acumulación.

Estos muestreos intensivos (incluso cada 30 min durante algunos intervalos del día y ciclos) de especies de *Dinophysis* «no cultivables» permitieron obtener observaciones originales de gran valor sobre la duración de distintas etapas del ciclo celular de estas especies, difíciles de obtener en incubaciones de poblaciones naturales, que acusan claramente el estrés de la manipulación.

En el **Capítulo 7** («*Distribución de ácido okadaico en las cuerdas de bateas de mejillones en la Ría de Pontevedra. Relación con la abundancia y contenido de toxinas de las poblaciones de *Dinophysis**») se hace un seguimiento del contenido en ácido okadaico en mejillones situados a distintas profundidades de las cuerdas de batea durante las proliferaciones de *D. acuminata* y *D. acuta* en el segundo semestre de 1990. Las concentraciones máximas de toxina alcanzadas y el tiempo de detoxificación se relacionan con las concentraciones de células de *Dinophysis* y con otras variables oceanográficas (T, S, clor. a). Además, se hace una estimación del contenido de toxina por célula de *Dinophysis* y por especie mediante regresión múltiple del contenido global de toxinas en los filtros que contenían arrastres multiespecíficos.

El **Capítulo 8** presenta el perfil cromatográfico de toxinas y la variación de contenido de toxinas en 3 especies de *Dinophysis*, aisladas célula a célula por micromanipulación capilar, en las que se investigó la presencia de AO y derivados.

Al final se presentan el resumen y las conclusiones de los distintos capítulos de esta tesis.

Los trabajos aquí presentados se desarrollaron con fondos de los siguientes proyectos (de los que fue Investigadora Principal la defensora de esta tesis):

- «Estudio de la toxicidad que producen las dinoflageladas, y los bivalvos contaminados por éstas» Subproyecto 1 del proyecto coordinado FIS 89/0015-4.
- «Control ambiental del crecimiento y producción de toxinas de dinoflagelados planctónicos agentes de episodios PSP y DSP». Proyecto MAR95-1791 (CI CYT).
- «Classification of marine phytoplankton (Dinoflagellates) using neural networks» Proyecto MAS2-CT92-0015 (UE-MAST 2).
- «Dinoflagellate categorization by artificial neural networks» (DiCANN). Proyecto MAS3-CT98-0188 (UE-MAST 3).
- «Biología de dinoflagelados del género *Dinophysis* agentes de intoxicaciones diarreogénicas: Variabilidad morfológica y genética, crecimiento y toxicidad» (DINOPHYSIS 2000). Proyecto MAR99-0224 (CI CYT).

DEFINICIÓN DE MAREAS ROJAS INOCUAS/NOCIVAS/TÓXICAS Y DE OTRAS CLASES DE EPISODIOS DE MICROALGAS TÓXICAS

Las **mareas rojas** son discoloraciones (alocromías *sensu* Balech) del agua del mar causadas por elevadas concentraciones de microorganismos planctónicos pigmentados. Cuando confieren al agua una tonalidad rojiza, se emplea el término de origen griego *hemotalasia*. Estas manchas son inofensivas en la mayor parte de los casos si se dan en zonas con una buena tasa de renovación de agua, o en zonas no dedicadas a la producción marisquera o a la piscicultura, pero son consideradas como muy nocivas en zonas turísticas y pueden crear alarma social innecesaria si las autoridades sanitarias y los consumidores no están bien informados. Tal fue el caso con la espectacular mancha de *Noctiluca scintillans* en mayo de 1988, formada en las costas de San Sebastián (País Vasco, costa Cantábrica española) (Fig. 1.2) tras intensas lluvias, que colapsó la venta de pescado y otros productos marinos en la ciudad durante una semana. No obstante, una floración de idéntica composición podría resultar nociva si apareciera en una zona de escasa circulación, o dedicada a cultivos de peces en jaulas.

Las **mareas rojas tóxicas** son discoloraciones de microalgas productoras de potentes venenos o toxinas endocelulares. Se trata de **mareas rojas ictiotóxicas** si liberan al medio exotoxinas con propiedades hemolíticas o neurotóxicas, que causan mortandades de peces y otros organismos marinos, como ocurre con las floraciones de *Prymnesium* (Hallegraeff & Hara, 1995) *Chrysochromulina polylepis* (Dahl *et al.*, 1989) y *Karenia mikimotoi* (Gentien & Arzul, 1990).



Fig. 1.2. Marea roja de *Noctiluca scintillans* desarrollada en las costas de San Sebastián (Golfo de Vizcaya, España) en mayo de 1988 tras un período de intensas lluvias (Foto cedida por J. Urrutia, Servicio de Investigación Oceanográfica del País Vasco).

Algunas microalgas producen toxinas tan potentes, que pueden resultar dañinas aunque no alcancen concentraciones celulares elevadas que discoloren el agua. Bastan unos pocos cientos (o miles, según la especie) de células por litro para que los mariscos adquieran niveles de toxinas que sobrepasan los límites legales establecidos como nivel de regulación. Definiremos como **episodios de microalgas tóxicas** aquellos eventos en los que la presencia de microalgas en concentraciones moderadas (no causantes de discoloraciones) confieren niveles de toxinas a los moluscos tales que pueden constituir un peligro para la salud, y obligan a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización. Los mariscos tóxicos pueden

transmitir estas sustancias a niveles superiores de la cadena trófica, actuando como vectores que dan lugar a los tristemente célebres síndromes de «intoxicación por marisco», que afectan a los vertebrados y al hombre. En la Fig. 1.3 se presenta un esquema de los niveles de concentración celular de microalgas tóxicas planctónicas a partir de los cuales se comienzan a detectar toxinas en los mariscos sin que este suceso se vea necesariamente acompañado de discoloraciones.

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

Un buen ejemplo de episodio de microalga tóxica, que puede provocar el síndrome con bajas concentraciones celulares ($10^2 - 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) lo constituyen los episo-

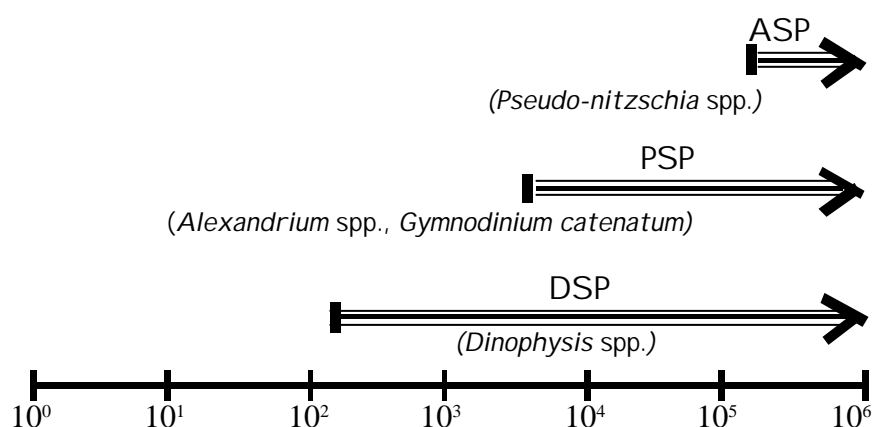


Fig. 1.3. Rango de concentraciones celulares ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de microalgas planctónicas tóxicas dentro de los cuales se manifiesta la presencia de toxinas en los bivalvos.

dios de DSP asociados a la aparición de concentraciones moderadas de dinoflageladas del género *Dinophysis* (Reguera *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1998). Las toxinas microalgales también pueden ser acumuladas por el microzooplancton (Maneiro *et al.*, 2000) y en niveles subletales en las vísceras de peces planctívoros. La posterior transferencia de niveles subletales de toxinas, a través de pequeños organismos pelágicos, a niveles superiores de la red trófica puede causar mortandades de mamíferos marinos, como fue el caso de las muertes de leones marinos tras ingerir alimento portador de toxinas amnésicas (Scholin *et al.*, 2000).

Algunos episodios se podrían ajustar a más de una de las definiciones anteriores. Así, las intensas floraciones de *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve* = *Ptychodiscus brevis*) en el Golfo de México son mortíferas para los peces; simultáneamente, las brevetoxinas contenidas en las células son acumuladas por los mariscos, causando NSP; además, las células y/o los productos excretados por éstas, son dispersados en el aerosol formado por el batir de las olas en la línea de playa, causando irritación en las vías respiratorias de las personas que lo inhalan. Las floraciones de *Alexandrium minutum* son agentes de episodios de PSP. Pero no sólo las microalgas, sino también el medio donde se desarrollan puede resultar tóxico. Se ha demostrado que el filtrado de los cultivos de *A. minutum* inhibe el crecimiento de otros flagelados (Blanco & Campos, 1988) y es tóxico para el copépodo *Euterpina acutifrons* (Bagoien *et al.*, 1996) y para *Artemia salina* (Lush & Hallegraeff, 1996), así como para las fases larvarias y juveniles de algunos peces (Lush *et al.*, 1998). Estos últimos autores encontraron que la actividad de los «bloqueadores del canal de sodio» (SCB) era más del doble en el filtrado del cultivo que en el interior de las propias células de *A. minutum*. Durante una floración de esta especie en Alejandría (Egipto), la ciudad que le dió el nombre, se registraron mortandades de peces del medio natural y de los del acuario de la ciudad, que utilizaba agua de mar filtrada del medio circundante (Halim & Labib, 1996).

En ocasiones, pueden ocurrir **intoxicaciones de origen desconocido**, es decir, presencia de toxinas en los moluscos que no se pueden asociar con la presencia de especies tóxicas conocidas en el plancton. Algunas de estas incógnitas han podido ser resueltas *a posteriori* con la mejora de las técnicas analíticas de separación e identificación de nuevos compuestos, como el caso de la intoxicación por azaspirácidos (AZP, recientemente regulado en una directiva de la UE) en los bivalvos irlandeses, que se ha relacionado con grandes dinoflageladas heterotróficas del género *Protoperidinium* (Yasumoto *et al.*, 2002). En otras ocasiones podemos oír hablar de **intoxicaciones de origen bentónico**, si se sospecha que la fuente de toxicidad es un organismo que vive en el fondo marino o adherido a sustratos sólidos, como es el caso de los dinoflageladas bentónicas del género *Prorocentrum*, productores de toxinas diarreogénicas, o los del género *Ostreopsis*, productores de toxi-

nas neurotóxicas o hemolíticas (como la palytoxina), o los quistes de dinoflageladas planctónicas. La Ciguatera, síndrome tóxico que se da tan sólo en regiones tropicales con arrecifes coralinos, es un caso especial de intoxicación de origen bentónico que se transmite por los peces que han ingerido materia vegetal sobre la que crecen dinoflageladas bentónicas tales como *Gambierdiscus toxicus*. Otro caso especial es el de *Pfiesteria piscicida* (Burkholder *et al.*, 1992a, 1992b), dinoflagelada de la que se ha descrito un complejo (¡y polémico!) ciclo vital polimórfico, que causa muertes masivas de peces y afecta a los humanos que inhalan el aerosol formado alrededor de sus tanques de cultivo.

Definimos, por último, las **mareas rojas nocivas**, es decir, mareas rojas de microalgas no tóxicas pero que pueden causar daños a los organismos marinos o perjuicios socioeconómicos. En general, cualquier especie fitoplanctónica que alcance densidades formadoras de manchas constituye un peligro potencial para los peces cultivados en jaulas flotantes o para los organismos bentónicos si:

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

Un buen ejemplo de marea roja nociva son las espectaculares manchas de *Noctiluca scintillans* (Fig. 1.2), que pueden crear alarma social y afectar al sector turístico aunque no haya ningún daño real asociado. Sin embargo, manchas de la inocua *Noctiluca* han causado mortandades de peces cultivados en Japón al desarrollarse en zonas poco dinámicas, consumir el oxígeno (es una dinoflagelada heterotrófica) y liberar altos niveles de amonio al decaer la floración (Okaichi & Nishio, 1976). Las floraciones de *Coscinodiscus wailesii* agotan los nutrientes del medio, causan una disminución de la transparencia y constituyen una amenaza para los cultivos de la macroalga *Porphyra* sp. («nori») en Japón (Nagai & Imai, 1998), y en la fase de declive y sedimentación se han asociado a necrosis de corales en regiones tropicales.

El «mare sporco» italiano, una ingente producción de fitoplancton con gran secreción de compuestos mucilaginosos (Herndl, 1992), causó pérdidas millonarias en el sector turístico de las costas de Emilia Romagna (noroeste del Mar Adriático) en 1989, y produjo atascos en las agallas de los peces y daños a la flora y fauna silvestre. El color pardo-verdoso de las manchas, totalmente inocuas, del pequeño dinoflagelado *Alexandrium taylorii* en algunas playas de Cataluña (España), en el Mediterráneo occidental (Garcés *et al.*, 1998), es interpretado (erróneamente) por los turistas como una señal de contaminación y de aportes de aguas residuales; el abandono de las playas con manchas por los visitantes estivales causa así importantes pérdidas de ingresos a los pequeños hoteles de la zona. Las floraciones de *Chaetoceros concavicornis* han provocado mortandades de salmones en jaulas en la costa noroeste de Estados Unidos por la fricción mecánica de las setas espinosas de esta diatomea, que irritan las agallas, provocan segregación de mucus y acarrear hipoxia en la sangre de los peces (Bell, 1961; Rensel, 1993).

La experiencia de los últimos 15 años nos enseña que no se debe considerar nunca cerrada la lista de especies potencialmente tóxicas/nocivas de una región. El episodio de *Chrysochromulina polylepis* («algas asesinas») en Escandinavia (Dahl *et al.*, 1989; Underdahl *et al.*, 1989), los brotes de intoxicación amnésica (ASP) en Canadá (Bates *et al.*, 1989), y las espectaculares mortandades de peces por proliferaciones de *Pfiesteria piscicida* en Chesapeake Bay (EEUU) (Burkholder *et al.*, 1992a, 1992b) constituyen buenos ejemplos de especies cuya peligrosidad no se puso de manifiesto hasta hace poco más de una década a pesar de tener lugar en regiones del mundo con una larga historia previa de estudios fitoplanctónicos. A finales de la década de los 90, y en paralelo con grandes avances tecnológicos para la separación y cuantificación de toxinas, hemos sido sorprendidos con la identificación de la dinoflagelada *Gonyaulax grindleyi* (= *Protoceratium reticulatum*) como productor de yesotoxinas (Satake *et al.*, 1997b; MacKenzie *et al.*, 1998) y de *Alexandrium ostendfeldii* como productor de los espirólidos (Cembella *et al.*, 1998). Los azaspirácidos, otro grupo de toxinas polietéreas recientemente descritas y detectadas en moluscos irlandeses, se localizaron finalmente en el interior de grandes dinoflageladas heterotróficas del género *Protoperdinium*, como *P. crassipes* y *P. depressum* (Yasumoto *et al.*, 2002). Se desconoce si son producidos por estas dinoflageladas o si por el contrario se trata de una acumulación de toxinas procedentes de una presa no identificada. La aplicación de nuevas técnicas analíticas ha mostrado que los azaspirácidos están ampliamente distribuidos en el norte de Europa (James *et al.*, 2002).

La presencia de ácido okadaico en los mejillones de Nueva Escocia (Canadá) no se ha podido correlacionar con las poblaciones de *Dinophysis* spp., y Lawrence *et al.* (1998, 2000) han presentado evidencias que sugieren que el causante de esta toxi-

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

FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN EUROPA

Europa no constituye una excepción, y sufre cada año el impacto negativo de diversos episodios de algas nocivas, que en el transcurso del taller europeo EUROHAB (Granéli *et al.*, 1999) se agruparon en:

1. Algas productoras de toxinas que se transfieren a través de la cadena trófica
2. Especies mortíferas de peces
3. Especies no tóxicas productoras de elevadas biomásas
4. Floraciones de cianobacterias

Microalgas productoras de toxinas que se transfieren a través de la cadena trófica

En ese grupo se incluyen las microalgas que, sin necesidad de alcanzar concentraciones que discoloren el agua, confieren niveles de toxinas de tipo paralizante (PSP), diarreogénico (DSP) y amnésico (ASP) a los bivalvos y los convierten en no aptos para el consumo humano, ocasionando prolongados cierres en las explotaciones de cultivos y bancos naturales de moluscos. Si bien los episodios PSP, asociados a la presencia de *Alexandrium* spp y *Gymnodinium catenatum* constituyen el riesgo más grave para la salud humana, son los episodios de DSP causados por *Dinophysis* spp y los de ASP causados por *Pseudo-nitzschia* spp los que por su carácter crónico, amplia distribución espacial y larga duración constituyen globalmente el principal quebradero de cabeza para los maricultores europeos. A estos síndromes tradicionales hay que añadir el más reciente, la intoxicación de bivalvos por azaspirácidos (AZP), asociado con dinoflageladas del género *Proto-peridinium*, que afecta a los bivalvos de Irlanda, Escocia y Noruega. En la Tabla 1.1 se presenta un resumen de los principales tipos de síndromes tóxicos transmitidos por bivalvos registrados en Europa, las especies microalgales que los ocasionan, y las regiones donde proliferan. La Fig. 1.4 muestra un mapa de la distribución de episodios DSP en aguas del Atlántico europeo y su frecuencia anual en la década 1991-2000.

Tabla 1.1. Microalgas causantes de episodios de intoxicación por bivalvo más comunes en Europa y localidades donde se registraron [Referencias incluídas en el texto a continuación o tomadas de revisiones en Granéli *et al.* (1998), Garcés *et al.* (2002) y de la base de datos IOC-ICES-HAEDAT en la dirección www.unesco.org/hab].

ENVENENAMIENTO AMNÉSICO POR BIVALVO (ASP) (Acido Domoico y sus isómeros)	
Especies Tóxicas	Lugares donde se asocian con Episodios Tóxicos
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	Costa Atlántica Ibérica
<i>P. multiseriis</i>	Mar del Norte
<i>P. multistriata</i>	Golfo de Nápoles
<i>P. seriata</i>	Skagerrak
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Costa Atlántica y Mediterránea europea
ENVENENAMIENTO PARALIZANTE POR BIVALVO (PSP) (STX, GTXs y análogos)	
Especies Tóxicas	Lugares donde se asocian con Episodios Tóxicos
<i>Alexandrium catenella</i>	NO Mediterráneo
<i>A. minutum</i>	Mar Mediterráneo, Portugal, Galicia y Bretaña
<i>A. ostendfeldii</i>	Región septentrional del Mar del Norte
<i>A. tamarense</i>	Nordeste del Reino Unido, Mar Celta, Mar de Irlanda
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Costa Atlántica de la Península Ibérica (Sur de Finisterre), Mar de Alborán
ENVENENAMIENTO DIARREICO POR BIVALVO (DSP) (AO y DTXs) Pectenotoxinas (PTXs)	
Especies Tóxicas	Lugares donde se asocian con Episodios Tóxicos
<i>Dinophysis acuminata</i>	Toda la costa europea
<i>D. acuta</i>	Costa Atlántica Ibérica, Irlanda, Suecia y Noruega
<i>D. caudata</i>	Península Ibérica
<i>D. fortii</i>	Mar Adriático
<i>D. rotundata</i>	Toda la costa europea
<i>D. sacculus</i>	Mediterráneo, Costa Atlántica Ibérica y francesa
<i>D. tripos</i>	Costa Atlántica Ibérica
<i>Prorocentrum lima</i>	No determinado
YESOTOXINAS (YTX)	
Especies Tóxicas	Lugares donde se asocian con Episodios Tóxicos
<i>Lingulodinium polyedra</i>	Mar Adriático
<i>Protoceratium reticulatum</i>	Mar Noruego, Mar Adriático
AZASPIRÁCIDOS (AZP)	
Especies Tóxicas	Lugares donde se asocian con Episodios Tóxicos
<i>Protoperidinium crassipes</i>	Irlanda, Escocia, Mar Noruego
<i>Protoperidinium depressum</i>	

Sinónimos de géneros y especies: *Alexandrium* (*Gonyaulax*, *Protogonyaulax*); *Dinophysis rotundata* (*Phalacroma rotundatum*); *Lingulodinium polyedra* (*Gonyaulax polyedra*); *Protoceratium reticulatum* (*Gonyaulax grindleyi*); *Protoperidinium* (*Peridinium*); *Pseudo-nitzschia* (*Nitzschia*).

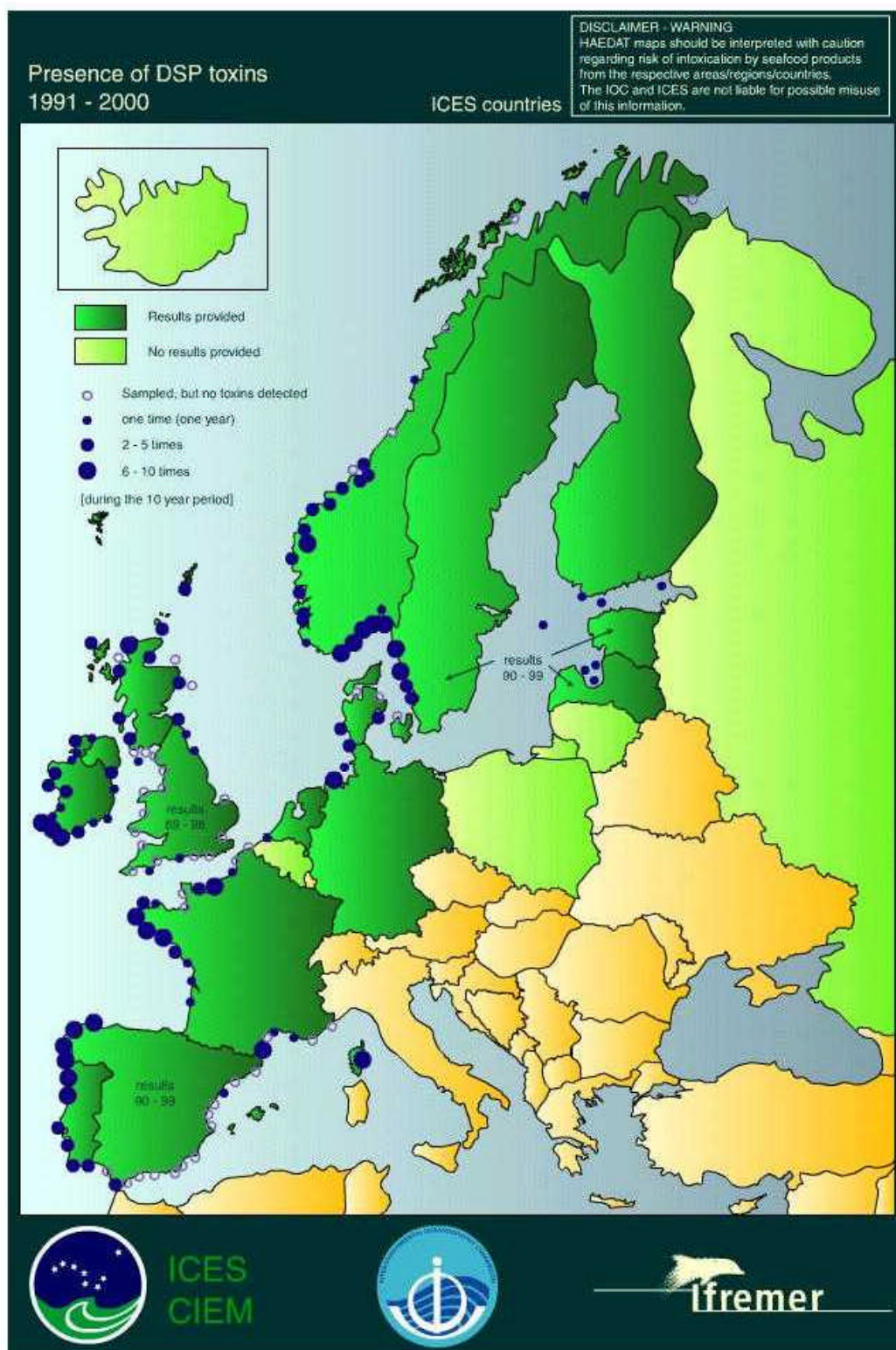


Fig. 1.4. Mapa decadal (1991-2000) de distribución de episodios DSP en países europeos ribereños del Atlántico norte, que integran, junto con EEUU y Canadá el «Consejo Internacional para la Exploración del Mar» (ICES). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia anual de los episodios. Nótese que en algunas zonas (país coloreado en verde claro, o línea de costa con ausencia de círculos abiertos), la ausencia de registros de episodios DSP puede ser debida a la inexistencia de muestreos (Tomado de www.unesco.org/hab).

Microalgas mortíferas de peces

En Europa se trata fundamentalmente de especies ictiotóxicas, que segregan toxinas extracelulares hemolíticas o neurotóxicas que ocasionan la muerte de fauna silvestre y/o causan graves daños en las granjas salmoneras de Escocia y países escandinavos. Los principales daños han sido asociados con *Karenia mikimotoi* en el Canal de la Mancha, Bretaña y Mar del Norte (Partensky *et al.*, 1991); *Chattonella* spp, *Chrysochromulina polylepis* y *Prymnesium parvum* en Escocia y Escandinavia (Edvardsen & Paasche, 1998) y *Gyrodinium corsicum* en el Mediterráneo occidental (incluyendo la Región del Delta del Ebro) (Delgado *et al.*, 2000a).

Especies no tóxicas productoras de elevadas biomásas

Las densas floraciones de estas especies producen mucílago, tales como el *mare sporco* del Adriático (Herndl, 1992); intensas coloraciones del agua costera en bahías y calas de circulación restringida que afectan negativamente al turismo en el Mediterráneo, tales como las floraciones de *Alexandrium taylorii* en Cataluña, costa mediterránea francesa y sur de Italia (Garcés *et al.*, 2000) y los espectaculares acumulaciones de mucílago y espuma en las playas causadas por *Phaeocystis* spp en el Canal de la Mancha y en la Ensenada Sur del Mar del Norte (Lancelot *et al.* 1987; Lancelot, 1995), donde este fenómeno se conoce popularmente como "fishermen's spit" (escupitajo de pescador).

Floraciones de cianobacterias

Asociadas principalmente a floraciones de *Aphanizomenon flos-aquae*, *Nodularia spumigena*, y *Microcystis aeruginosa*, son de especial relevancia en el Mar Báltico, donde causan intensas coloraciones del agua superficial. Además del exceso de biomasa, estas especies producen toxinas neurotóxicas (saxitoxinas) y hepatotóxicas (microcistinas, nodularina, etc.). Las «natas» de cianobacterias que se forman en las orillas de los embalses y recodos de los ríos, han causado con frecuencia la muerte de animales domésticos que acudían a beber agua. También constituyen un riesgo para la salud pública si se liberan toxinas a los depósitos de agua potable. En la Península Ibérica las floraciones nocivas de cianobacterias son frecuentes en el tramo final, sobre todo en territorio portugués, de los grandes ríos peninsulares (Pereira *et al.*, 2000).

LOS EPISODIOS DE ENVENENAMIENTO DIARREOGÉNICO POR BIVALVO (DSP) Y SU RELACIÓN CON LAS POBLACIONES DE *DINOPHYSIS* SPP.

Varias especies del género *Dinophysis* han sido señaladas como las principales responsables de la presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos en Japón, Europa, Chile y Nueva Zelanda. Dada la persistencia de estas especies a lo largo del año, pueden constituir la principal amenaza para la explotación de los recursos

marisqueos (cultivados o en bancos naturales) en las regiones costeras expuestas a proliferaciones de *Dinophysis*. No obstante, al tratarse de especies no cultivables (hasta la fecha) y que normalmente se presentan en concentraciones moderadas ($< 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), en numerosas ocasiones ha resultado complejo establecer una relación numérica entre la presencia y concentración de *Dinophysis* spp y la detección de toxinas diarreogénicas en los moluscos.

Antecedentes históricos

El primer caso de episodio de afección gastrointestinal -acompañado de vómitos y diarrea- causado por agentes tóxicos desconocidos tras consumo de mejillón y dado a conocer internacionalmente, se dió en los Países Bajos en 1961 (Korringa & Roskam, 1961). No obstante, fueron Guzmán & Campodonico (1975), en la región de los fiordos chilenos, los primeros en citar la relación establecida por Hermosilla entre una densa floración de *Dinophysis* sp en 1970 y la intoxicación diarreogénica en la población local que había consumido los bivalvos. Paralelamente, la holandesa Marie Kat revisó los episodios diarreogénicos acaecidos en su país tras consumo de mejillones en 1960, 1970 y 1976 (Kat, 1979). Kat descartó la posibilidad de que los bivalvos hubieran estado expuestos a aguas fecales o de que los afectados sufrieran de alergia al marisco. El examen del contenido estomacal de los mejillones mostró dominancia de dinoflageladas planctónicas del género *Prorocentrum* (sobre todo *P. micans*) y en mucha menor proporción *Dinophysis acuminata*, lo que llevó a Kat a asumir que las especies de *Prorocentrum* eran las responsables de las intoxicaciones, pero no fue capaz de reproducir el efecto tóxico de los mejillones de campo en las ratas de laboratorio cuando les suministró a éstas oralmente (bioensayo de rata) mejillones alimentados con cultivos puros de *P. micans* y *P. minimum*, las dos principales especies bajo sospecha.

Kat concluyó que quizás las dinoflageladas naturales poseían bacterias adheridas que les conferían un carácter tóxico ausente en las dinoflageladas cultivadas. A pesar de estas interpretaciones precoces para su época (ya que hoy día sabemos que hay asociaciones bacteria-dinoflagelado, y hay diversas cepas bacterianas con potencial diarreogénico), Kat cometió el error de asumir que el dinoflagelado responsable de las intoxicaciones tenía que ser la especie dominante en las poblaciones de campo y en el tracto digestivo de los bivalvos. Quizás este error se hubiera evitado si los expertos chilenos y la investigadora holandesa se hubieran comunicado sus respectivos hallazgos... Pero en la década de los 70 las noticias sobre nuevos eventos tóxicos y la coordinación internacional sobre el tema funcionaban con escalas de tiempo muy distintas de las actuales. Mucho antes de estos sucesos, Pinto & Silva (1956) habían relacionado las intoxicaciones por consumo de bivalvos acaecidas en la Laguna de Óbidos (Portugal) con densas floraciones de *Prorocentrum micans*; no obstante, las descripciones de los cuadros clínicos dadas por estos autores (hormi-

gueo de labios, entumecimiento de miembros, paraplejia..) se corresponden claramente con los síntomas de envenenamiento paralizante por bivalvo (PSP), que podrían haber sido causados por dinoflageladas productoras de toxinas PSP, como *Alexandrium lusitanicum* (*A. minutum*) no detectados en el momento de muestreo.

La descripción del síndrome de intoxicación diarreogénica por consumo de bivalvos (Diarrhetic Shellfish Poisoning = DSP) hubo de esperar hasta finales de la década de los 70 (Yasumoto *et al.*, 1978). El mismo grupo japonés descriptor del síndrome señaló al dinoflagelado *Dinophysis fortii* como el causante de estos episodios (Yasumoto *et al.*, 1980). Hasta entonces, los episodios de DSP habían sido confundidos frecuentemente con gastroenteritis de origen bacteriano. Fue un accidente afortunado que el Prof. Yasumoto sufriera él mismo los efectos de los episodios de DSP acaecidos en el distrito de Tohoku en los años 1976 y 1977. Su curiosidad, tras asegurarse de que el bivalvo que había ingerido era fresco y debidamente cocinado (descartándose, pues, el origen bacteriano de la intoxicación; Yasumoto, comun. pers.), le condujo a la investigación de las causas y posterior descripción del ácido okadaico (AO) y sus derivados, un nuevo grupo de toxinas polietéreas y lipofílicas, diarreogénicas y termoestables (Yasumoto *et al.*, 1978).

Tras los escritos de Yasumoto *et al.* (1978, 1980), muchos expertos dedicados al seguimiento de poblaciones fitoplanctónicas hicieron un análisis retrospectivo de sus datos. En muchos casos pudieron confirmar que los episodios de intoxicación diarreogénica por consumo de bivalvos estaban asociados a períodos en los que se alcanzaban concentraciones máximas de dinoflageladas como *Prorocentrum micans* y/o *Prorocentrum minimum* (acompañantes habituales de *Dinophysis acuminata*), así como poblaciones más moderadas (1 ó 2 órdenes de magnitud inferiores) de especies del género *Dinophysis*, las cuales pasaron a ocupar un lugar protagonista en las listas de especies potencialmente tóxicas. En Galicia, los primeros casos de episodios diarreogénicos de origen presumiblemente fitoplanctónico (causados por ingestión de mejillón depurado) en los años 1978 y 1979 se achacaron a densas floraciones de *Prorocentrum* spp (Mariño *et al.*, 1985). Tras un intenso episodio en 1981, y conocidos ya los resultados de los investigadores japoneses, se relacionaron los episodios de DSP con la presencia de poblaciones de *Dinophysis* spp, especialmente *D. cf acuminata* y *D. acuta* (Campos *et al.*, 1982; Fraga *et al.*, 1984).

Hoy día sabemos que las especies del género *Dinophysis* no suelen ser miembros abundantes de la comunidad microplanctónica. Raras veces alcanzan niveles suficientes para colorear el agua ("mareas rojas"), siendo frecuente que se asocien a episodios tóxicos con concentraciones que oscilan entre $2 \cdot 10^2 - 10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ y que pueden representar porcentajes muy bajos (1-10%) de la población microplanctónica global. Tan sólo en casos excepcionales (Guzmán & Campodonico, 1975; MacDonald, 1994; Subba-Rao *et al.* 1993; Dahl *et al.*, 1996; Santhanam & Srinivasan, 1996; Burgess

et al., 2002) se han podido observar "aguas rojas" de *Dinophysis* spp, coincidiendo a veces con la etapa final de las proliferaciones, y posiblemente debidas a acumulaciones por interacciones físico-biológicas.

Tras la divulgación de los hallazgos japoneses, el seguimiento de especies del género *Dinophysis* y de los episodios tóxicos asociados a su aparición se convirtió en uno de los objetivos prioritarios de los programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico. Se cayó en la tentación de considerar tóxicas a todas las especies de *Dinophysis*, y aún más, de establecer un «umbral» de concentración de *Dinophysis* spp. por debajo del cual no había riesgo de detección de toxinas diarreogénicas en los bivalvos, y por tanto no era necesario desarrollar los controles rutinarios de bioensayo de ratón.

Existen actualmente numerosas citas que relacionan la presencia de *Dinophysis* spp con episodios de detección de toxinas diarreogénicas en todos los países europeos con territorios costeros que han explorado esta posibilidad. Los trabajos de los últimos 10 años muestran que puede haber una gran variabilidad intraespecífica en el contenido de toxina por célula de la misma especie en distintas regiones del mundo, o incluso en la misma región durante distintos episodios, o distintas etapas del mismo episodio. Hay ejemplos bien documentados de densas floraciones de *Dinophysis norvegica* carentes de AO y derivados en Nueva Escocia, Canadá (Lawrence *et al.*, 1998), y de floraciones de *D. cf acuminata* en la región de los fiordos chilenos no asociados a la detección de toxinas diarreogénicas en los bivalvos (Clément *et al.*, 1994). Tampoco se han detectado AO y derivados en poblaciones de *D. norvegica* en la costa noreste de Estados Unidos (Morton *et al.*, 2000).

Episodios DST, especies de Dinophysis en el litoral español, toxinas diarreogénicas y otras toxinas lipofílicas tradicionalmente incluidas en el grupo DSP.

En las regiones, como es el caso de Galicia, que ya desarrollan programas de control sanitario para detección de ficotoxinas en los bivalvos, es poco frecuente que haya consumidores afectados por estas toxinas tras la ingestión de molusco no controlado. Por ello, es más exacto utilizar en lo sucesivo a lo largo de este trabajo la expresión «episodio DST» (Diarrhetic Shellfish Toxins) para indicar detección de toxinas diarreogénicas en los bivalvos por encima del nivel de regulación, sin que se hayan registrado necesariamente intoxicaciones humanas. Reservaremos el término DSP (Envenenamiento o Intoxicación Diarreogénica por Bivalvos) para los casos en que realmente haya tenido lugar una intoxicación de consumidores tras ingerir bivalvos con elevados niveles de toxinas diarreogénicas. También utilizaremos el acrónimo DST cuando nos refiramos simplemente a las toxinas diarreogénicas (sin entrar en sus efectos).

En la costa Atlántica noroeste de España, la detección de toxinas diarreogénicas en los mejillones de batea de la Rías Bajas Gallegas, asociado a la presencia de *Dinophysis* spp, es un fenómeno crónico. En 1981 tuvo lugar en la costa mediterránea española un agudo brote de gastroenteritis que afectó a 5000 consumidores. Se identificó el origen del problema por ingesta de mejillones procedentes de las Rías Bajas. A partir de entonces, las autoridades sanitarias gallegas incluyeron los bioensayos para detección de toxinas diarreogénicas (DST) en sus controles rutinarios de detección de ficotoxinas (Campos *et al.*, 1982). Los datos disponibles entre 1977 y 1991 revelaron que la detección de toxina diarreogénica tenía lugar normalmente en los meses de agosto y septiembre. No obstante, entre 1991 y 1993 se registraron proliferaciones muy prolongadas de *D. acuminata* y/o *D. acuta*, así como presencia de enterotoxinas en los bivalvos prácticamente a lo largo de todo el año. Este período especialmente virulento, unido a la transposición de la Directiva Europea 492/91 (Anonymous, 1991) sobre control de calidad de las aguas dedicadas a cultivos de bivalvos, y a la aplicación de controles cada vez más estrictos para la detección de ficotoxinas en los productos marinos hicieron que los brotes de DSP se convirtieran en el principal factor de riesgo para la explotación de los mejillones de batea y otros bivalvos de las Rías Bajas.

Las especies más abundantes del género *Dinophysis* en las rías gallegas son *Dinophysis sacculus* y *D. acuminata* en las Rías Altas, y *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* en las Rías Bajas. Otras especies frecuentes que aparecen en concentraciones mucho más moderadas son *D. rotundata*, *D. caudata* y *D. tripos*. Cada una de estas especies prolifera en condiciones ambientales bien diferenciadas, y puede presentar uno o varios máximos anuales. Durante un año desafortunado, una misma región se puede ver afectada por sucesivos pulsos de distintas *Dinophysis* spp. de tal manera que cuando los bivalvos no han terminado aún de eliminar la toxina adquirida durante un pulso reciente, incorporan nuevas dosis de toxinas diarreogénicas, producidas por otra especie de *Dinophysis*, que se solapan con los residuos de las precedentes (Reguera *et al.*, 1993a; Blanco *et al.*, 1995, 1998). La estación de Bueu, en la Ría de Pontevedra, exhibió el récord en el año 1994, permaneciendo cerrada la extracción de mejillón, principalmente por presencia de toxinas diarreogénicas, 314 días del año (Arévalo *et al.*, 1995). Considerando que Galicia es el primer exportador mundial de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), con una producción anual que puede alcanzar las 250 000 t, y que a esta producción se asocia una gran cadena de industrias derivadas (extracción, cocederos, congeladores, conserveros...), es fácil comprender el impacto socioeconómico de los períodos de prohibición de comercialización de bivalvos asociados a proliferaciones de especies de *Dinophysis*.

En la costa sudatlántica (Andalucía oeste), la detección de enterotoxinas asociadas a la presencia de *Dinophysis acuminata* y las prolongadas prohibiciones de

extracción de coquinas (*Donax trunculus*) constituyen un problema recurrente desde que se inició el programa de seguimiento de fitoplancton y ficotoxinas establecido por la Junta de Andalucía a finales de la década de los 90 (Mamán *et al.*, 2000). En la costa Mediterránea, son conocidas las proliferaciones de *Dinophysis sacculus* en la costa catalana del Delta del Ebro desde que se estableció el programa de seguimiento financiado por la Generalitat de Cataluña a finales de la década de los 80. Tratándose, por lo que parece, de una especie débilmente tóxica, no siempre las proliferaciones de *D. sacculus* aparecen asociadas con detección de toxinas diarreogénicas en los bivalvos. Otra especie de *Dinophysis* frecuente en la zona es *Dinophysis caudata*. (Delgado *et al.*, 2000a, 2000b).

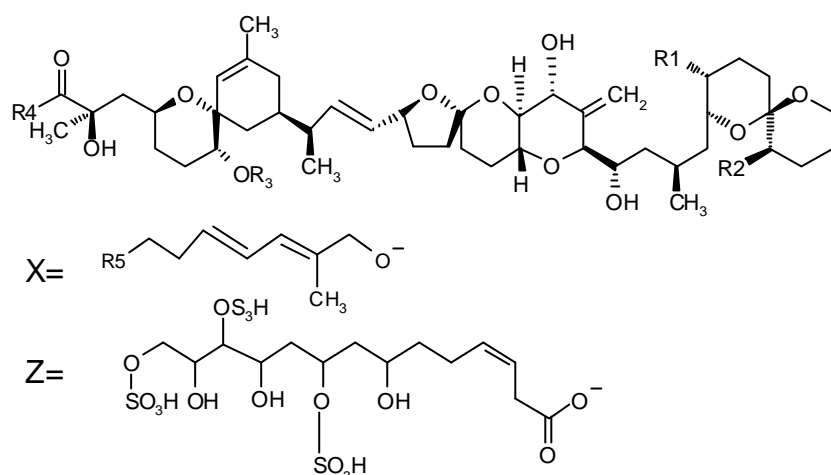
La información procedente de otras amplias zonas del litoral español, como la costa Cantábrica y la región valenciana, es muy escasa. Dada la amplia distribución de las especies del género *Dinophysis* en las costas Atlántica y Mediterránea de Europa, no cabe duda de que el género estará bien representado en estas regiones. No obstante, la falta de programas de seguimiento robustos en estas zonas, que se pretende justificar con la escasez de áreas de explotación de bivalvos, impide disponer de una información fidedigna. Vale la pena mencionar que, durante los muestreos de fitoplancton llevados a cabo en la Bahía de Santander entre 1978 y 1980, cuando aún no se había identificado al género *Dinophysis* como el causante de episodios de DSP en distintas partes del mundo, *Dinophysis caudata* fue con frecuencia la especie dominante en los arrastres de red de septiembre y octubre en dos de las tres estaciones muestreadas quincenalmente (Reguera, 1987).

En resumen, podemos afirmar que en toda la costa española existen proliferaciones de especies de *Dinophysis* en concentraciones tales que constituyen riesgos para la salud humana y que pueden afectar a la explotación de cultivos y bancos naturales de bivalvos en las regiones donde son debidamente monitorizadas (ver Tabla 1.1).

CLASIFICACIÓN Y NATURALEZA QUÍMICA DE LAS «TOXINAS DIARREOGÉNICAS». PRESENCIA EN ESPECIES DEL GÉNERO *DINOPHYSIS*

Bajo el nombre de toxinas diarreogénicas o del grupo DSP se han agrupado tradicionalmente tres familias o grupos de compuestos polietéreos liposolubles y de elevado peso molecular que difieren en estructura química y en actividad biológica (Yasumoto *et al.*, 1985; Yanagi *et al.*, 1989; Yasumoto & Murata, 1990):

1. Ácido okadaico (AO) y sus derivados
2. Pectenotoxinas (PTX)
3. Yesotoxinas (YTX)



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
1	CH ₃	H	H	OH	—	OA
2	CH ₃	CH ₃	H	OH	—	DTX1
3	H	CH ₃	H	OH	—	DTX2
4	(H ó CH ₃)		Acil	OH	—	DTX3
5	CH ₃	H	H	X	OH	OA diol-éster
6	CH ₃	H	H	X	Z	DTX4

Fig. 1.5. Estructura química del ácido okadaico y sus principales derivados.

Tan sólo el AO y derivados han mostrado un claro efecto diarreogénico en los estudios toxicológicos. Desde hacía más de una década se insistía sobre la necesidad de reclasificar el complejo grupo de toxinas comúnmente denominadas «toxinas DSP». En fechas recientes los tres grupos han sido claramente separados en los documentos de las directivas europeas que regulan los niveles de estas toxinas admisibles en los productos destinados a consumo y los métodos analíticos o ensayos aceptados para su determinación (Anonymous, 2002).

Acido okadaico (AO) y derivados

Este grupo comprende: el ácido okadaico (AO); sus análogos, las dinofisistoxinas DTX1 y DTX2, que son isómeros estructurales del AO; los correspondientes compuestos acilados de las tres toxinas anteriores - Acil-AO, Acil-DTX1 (DTX3) y Acil-DTX2 - y los ésteres precursores del AO y DTXs (Fig. 1.5). El AO fue la primera toxina diarreogénica identificada en extractos de vieiras japonesas (Yasumoto *et al.*, 1978). Dos años después se identificó al dinoflagelado *Dinophysis fortii* como el organismo productor de esta toxina (Yasumoto *et al.*, 1980). El AO y las DTX1 (Murata *et al.*, 1982), DTX2 (Hu *et al.*, 1992a) y DTX3 (Yasumoto *et al.*, 1985) son compuestos polietéreos liposolubles que muestran un potente efecto de inhibición de las fosfatasa (Bialojan & Takai, 1988), propiedad ligada a la inflamación del

tracto intestinal, diarreas, y efecto promotor de tumores (Hamano *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1990).

Hasta la fecha se ha demostrado la presencia de AO, y/o DTX1 y/o DTX2 en células de todas las especies de microalgas planctónicas del género *Dinophysis* que han sido debidamente analizadas (aunque algunas especies han mostrado cepas tóxicas en una región que aparentemente eran no tóxicas en otras) y en microalgas bentónicas del género *Prorocentrum*. En estudios con microalgas bentónicas cultivables, tales como *Prorocentrum lima* y *P. concavum*, se ha demostrado que el compuesto dominante almacenado por las células es el éster DTX4, un complejo relacionado con el AO, soluble en agua, en el que el grupo OH primario del diol-éster está esterificado con un grupo trisulfato (Yasumoto *et al.*, 1990; Norte *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1992b). Quilliam *et al.* (1996) sugirieron que la DTX4 y los enzimas capaces de hidrolizarla se encuentran en compartimentos celulares distintos. Cuando se obtienen los extractos de toxinas por los procedimientos habituales, los distintos orgánulos celulares se rompen, su contenido se mezcla, y la DTX4, cuya potencia tóxica no ha sido aún evaluada, se hidroliza enzimáticamente convirtiéndose en el diol éster, que a su vez se hidroliza convirtiéndose en AO. Así pues, existe un nuevo grupo de compuestos precursores del AO (DTX4 y los diol-ésteres del AO) que quizás estén presentes en algunas especies de *Dinophysis*, pero que no pueden ser detectados con los métodos de extracción habituales. Morono *et al.* (2000), aplicando el método de extracción de Quilliam *et al.* (1996), encontraron DTX4 en arrastres fitoplanctónicos de las Rías Bajas gallegas que contenían poblaciones densas de *Dinophysis acuminata*.

En los bivalvos, las toxinas dominantes suelen ser el AO y la DTX1 y/o DTX2, pero también se han observado 7-O acil-derivados de estas tres toxinas. Los acil-derivados son compuestos de baja polaridad en los cuales el grupo acil graso se enlaza al grupo 7-OH de la correspondiente toxina. No se han detectado acil-derivados en extractos de dinoflageladas, y se sospecha que la presencia de estos compuestos en bivalvos es debida a transformaciones enzimáticas en sus glándulas digestivas (Fernández *et al.*, 1998), tal como demostraron Suzuki *et al.* (1999) en vieiras japonesas alimentadas con *D. fortii* (carente de acil-derivados). El acil-derivado DTX3 se ha encontrado en mejillones de Irlanda (Marr *et al.*, 1992), Galicia (Fernández *et al.*, 1996), y Portugal (Vale & Sampayo, 1999), país éste último donde se dio un episodio reciente de intoxicación por consumo de coquinas, en las que los acil-derivados constituían la toxina predominante.

Pectenotoxinas

Las pectenotoxinas (PTXs) comprenden dos grupos de sustancias distinguibles estructuralmente: un grupo posee una estructura de éster cíclico denominado «macrólido» (Fig. 1.6 A); el otro grupo tiene hidrolizado el enlace tipo éster de la

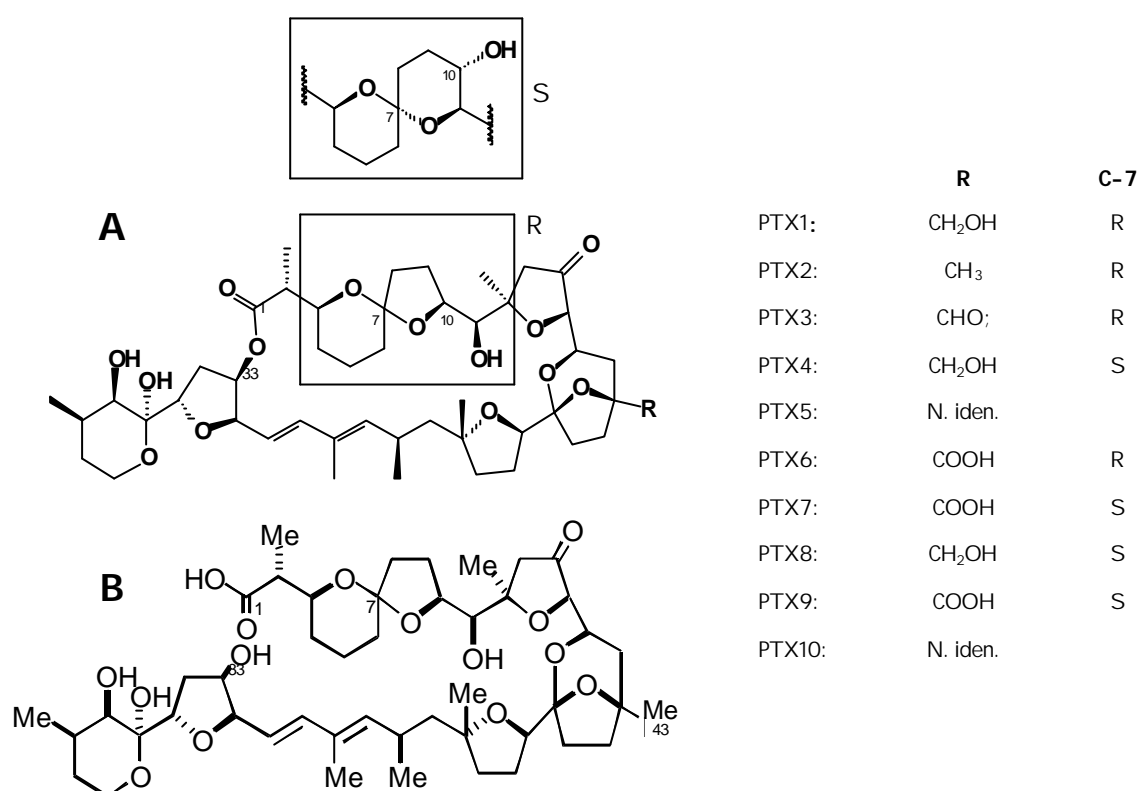


Fig. 1.6. Estructura de: A. pectenotoxinas (PTXs) y B. seco-ácido de las pectenotoxinas (PTXSA). Según la configuración espacial de los enlaces unidos al C7, se distinguen distintos tipos de isómeros ópticos de las pectenotoxinas o enantiómeros, denominados *R* y *S*.

estructura cíclica, situado entre el C1 y el C33, que se convierte así en ácido carboxílico y alcohol, y se denomina «seco-ácido» (Fig. 1.6 B). Hasta la fecha se ha dilucidado la estructura química de 6 pectenotoxinas (PT1, PTX2, PTX3, PTX4, PTX6, PTX7), que se distinguen por la naturaleza del radical *R*, de un sólo carbono, unido al C18, y de dos seco-ácidos de pectenotoxinas (PTX2SA, 7-*epi*-PTX2SA), isómeros entre sí, y ambos con un grupo metilo (-CH₃) en el C18. Según la configuración espacial de los enlaces unidos al C7, se distinguen distintos tipos de isómeros ópticos, *R* y *S*, conocidos como enantiómeros. Las pectenotoxinas tienen un fuerte efecto hepatotóxico, siendo su efecto diarreogénico muy suave o incluso indetectable en los animales de ensayo (Terao *et al.*, 1986; Ishige *et al.*, 1988; Draisci *et al.*, 2000).

Se ha demostrado la presencia de PTX2 en *Dinophysis fortii*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. acuminata* (Lee *et al.*, 1989; Draisci *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2002b; Yasumoto, 2002) pero la lista de especies que lo contienen irá en aumento a medida que se apliquen las nuevas técnicas analíticas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (CL-EM) a los extractos de células aisladas por micromanipulación. Originalmente descritas a partir de análisis de pectínidos japoneses (Yasumoto *et al.*, 1989), de los que les viene el nombre, las PTX1, PTX3, PTX6, y los derivados de la PTX2 (PTX2SA, 7-*epi*-PTX2SA)

descritos en años recientes (Daiguji *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999) se han encontrado tan sólo en los moluscos y se cree que son el resultado de conversiones enzimáticas de la PTX2 por los bivalvos (Suzuki *et al.*, 2001). La presencia de derivados de la PTX2 en arrastres planctónicos (Burgess *et al.*, 2002) pudiera deberse a conversiones enzimáticas tras la rotura de células, congelación no inmediata de la muestra, etc.

Yesotoxinas

Por último las yesotoxinas, incluyen un grupo de toxinas polietéreas disulfatadas de estructura similar a las brevetoxinas causantes del NSP. Las primeras formas descritas fueron la yesotoxina (YTX), encontrada en *Patinopecten yessoensis* (Murata *et al.*, 1987) y sus derivados la homo-yesotoxina (homoYTX) y la 45-hydroxy-homoyessotoxin (45-OH-homoYTX) en bivalvos del Adriático (Satake *et al.*, 1997a; Tubaro *et al.*, 1998), pero el número de nuevos derivados descritos va en aumento. Las yesotoxinas son cardiotoxicas, no tienen efecto diarreogénico y su potencia intraperitoneal en ratones es superior a la del AO y derivados, produciendo síntomas similares a los de las neurotoxinas (Draisci *et al.*, 2000).

Sorprendentemente, el agente tóxico productor de este compuesto en Nueva Zelanda (Satake *et al.*, 1997b; MacKenzie *et al.*, 1998), y posteriormente en Japón (Satake *et al.*, 1999), Mar Adriático (Boni *et al.*, 2000) y Noruega (Miles *et al.*, 2002), fue identificado como *Protoceratium reticulatum*, dinoflagelado de amplia distribución geográfica previamente conocido como *Gonyaulax gryndleyi*, y cuya toxicidad era insospechada hasta entonces. En el Adriático, la presencia de yesotoxinas en los mejillones también se ha asociado con la aparición de floraciones de *Lingulodinium polyedrum* (Tubaro *et al.*, 1998). Estudios recientes mediante CL-EM han demostrado la producción de yesotoxinas en cultivos de *L. polyedrum* aislado de las Rías Altas gallegas y de la costa Atlántica de Andalucía (Riobó *et al.*, 2002).

Las yesotoxinas se han detectado en vieiras japonesas, en mejillones noruegos -coapareciendo con DTX1 y DTX3 (Lee *et al.*, 1988)- y neozelandeses, y en mejillones del Adriático (Tubaro *et al.*, 1998).

Toxinas encontradas en *Dinophysis* spp. y mejillones en Galicia

En los primeros estudios realizados con *Dinophysis* spp (Lee *et al.*, 1989) y bivalvos de la costa gallega (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1989) se concluyó que el AO era la única toxina diarreogénica que se podía detectar en los mejillones gallegos y en las células de *Dinophysis* spp causantes de su intoxicación. Estudios posteriores de picos cromatográficos no identificados en extractos de mejillones irlandeses condujeron a la identificación de una nueva toxina, la DTX2 (Hu *et al.*, 1992a), que también pudo ser identificada en mejillones gallegos (Gago *et al.*, 1996) y portugueses (Vale &

Sampayo, 1996; Vale *et al.*, 1998) intoxicados por poblaciones naturales de *Dinophysis* spp, y en arrastres fitoplanctónicos (Blanco *et al.*, 1995) (ver cap. 7). Fernández *et al.* (1996), variando el método de extracción empleado rutinariamente en los controles sanitarios, detectaron acil-derivados del AO (DTX3) en mejillones gallegos. El contenido de AO y DTX2 en varias especies de *Dinophysis* gallegos se demostró en células aisladas por micromanipulación (Fernández *et al.*, 2001) (ver cap. 8). Moroño *et al.* (2000) encontraron DTX4 en arrastres fitoplanctónicos de las Rías Bajas gallegas ricos en *Dinophysis acuminata*. Recientemente se ha demostrado la presencia de pectenotoxinas, en ocasiones como toxinas dominantes, en los arrastres planctónicos ricos en *D. acuta* y *D. caudata* y en los mejillones expuestos a estas poblaciones en las Rías Bajas gallegas (Fernández *et al.*, 2002a, 2000b).

IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS AGENTES DE EPISODIOS TÓXICOS.

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

En la Fig. 1.7 se presenta un esquema de los pasos de rigor que se deben seguir para identificar de forma inequívoca las especies causantes de brotes tóxicos en una localidad.

A. Análisis de toxinas de los mariscos

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

Se prepararán extractos de las vísceras o de todo el tejido blando del molusco: extractos hidrosolubles si se sospecha que el síndrome es causado por toxinas PSP o ASP, y extractos liposolubles si se sospecha que son toxinas del grupo diarreogénico

DSP u otras toxinas polietéreas. Si no se tuviera idea del tipo de toxinas que se espera encontrar, se dividirá la muestra en dos submuestras y se prepararán extractos de los dos tipos. A continuación se realizarán los bioensayos de ratón, siguiendo los métodos estándar.

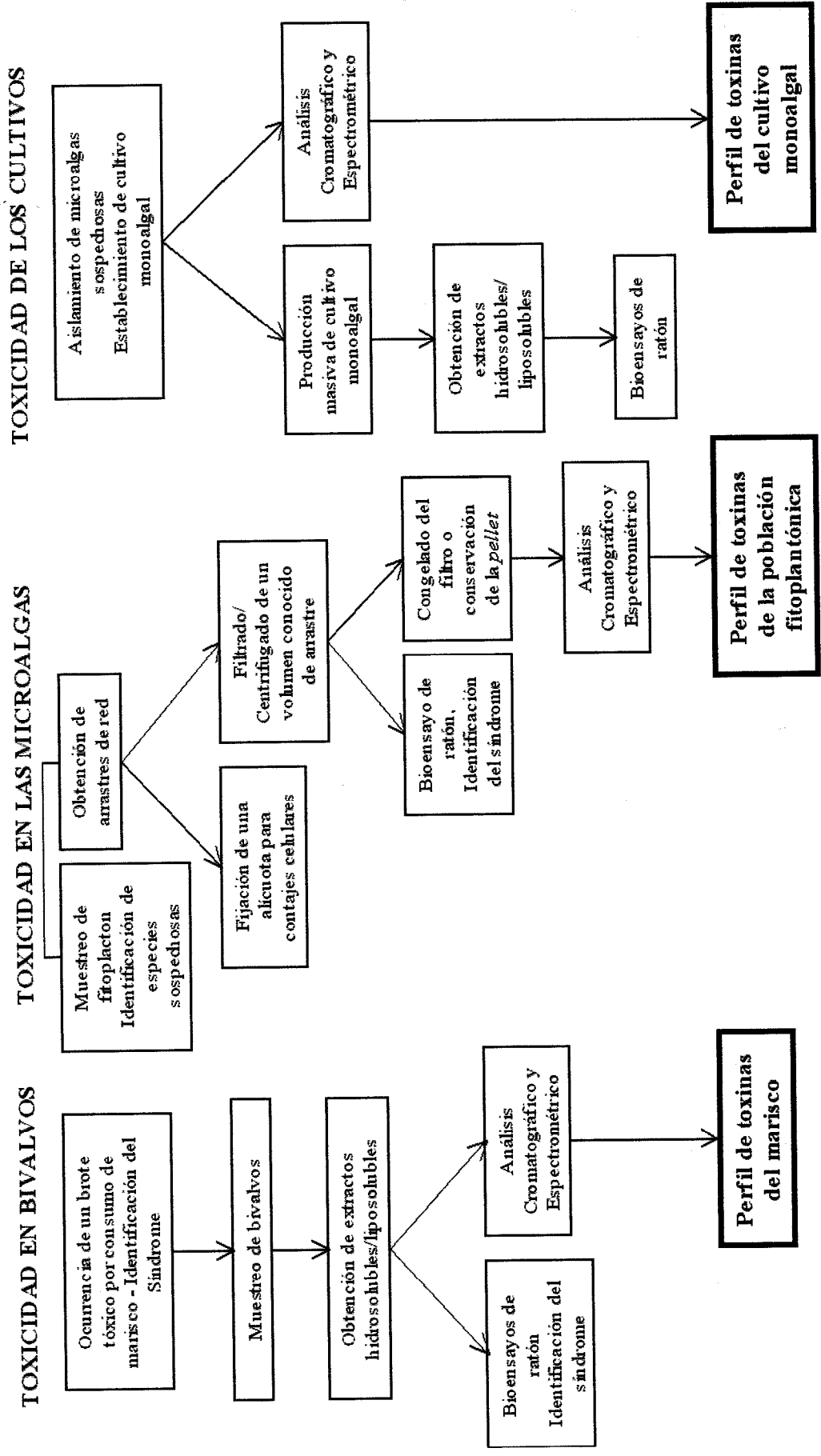
Los bioensayos de ratón proporcionan información sobre el efecto biológico de las toxinas pero no sobre su naturaleza química. Por el contrario los análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) permiten obtener el perfil de toxinas causantes del síndrome, siempre y cuando se trate de toxinas conocidas y de las que se dispone de patrones puros. Los modernos análisis por espectrometría de masas (EM) acoplada al cromatógrafo líquido (CL-EM) permiten confirmar inequívocamente la naturaleza química de los compuestos y ahorran las tediosas labores de derivatización. El análisis por EM será imprescindible cuando aparezcan cromatogramas con picos desconocidos que pudieran corresponder a toxinas «nuevas», de las que no se dispone de patrones puros y que presentan un comportamiento cromatográfico no comparable a los previamente descritos. Incluso si se obtuvieran picos cromatográficos de igual comportamiento que los patrones puros, es conveniente, por prudencia, aplicar análisis mediante CL-EM a las muestras cuando se registran toxinas conocidas en especies que no hubieran sido registradas previamente como productoras de las mismas.

B. Análisis de toxicidad del fitoplancton

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

Para la recogida de muestras de fitoplancton para análisis de toxinas, es recomendable emplear una red de plancton de mayores dimensiones que las empleadas para obtener muestras con fines de identificación de especies, y con un colector de PVC cilíndrico, cerrado, pero con fondo desmontable o con un grifo o llave para facilitar la recolección de material. De esta forma el material filtrado se mantiene suspendido en agua de mar, y se minimizan las roturas de células (ver cap. 7). Si el material recolectado se va a analizar por CLAE, basta con filtrar/centrifugar 10-50 ml de este arrastre (según su densidad), pero si se va a probar mediante bioensayo

Fig. 1. 7. Esquema de los pasos que se deben seguir para identificar de forma inequívoca las especies causantes de brotes tóxicos en una localidad
IDENTIFICACIÓN INEQUÍVOCA DEL AGENTE DE UN EPISODIO TÓXICO



de ratón, será necesaria una mayor biomasa de fitoplancton. Es posible fraccionar el arrastre, es decir, seleccionar, mediante mallas o filtros, distintos rangos de talla, con lo cual se podría determinar en qué fracción o rango de tallas del fitoplancton se encuentra el organismo tóxico.

Se preparan extractos liposolubles y/o hidrosolubles de los filtros, o de los *pellets* obtenidos de los arrastres concentrados y se procede a la determinación de toxinas (bioensayos, análisis cromatográfico) contenidas en los extractos tal como se procedió con los análisis de moluscos. Se confirma o descarta el origen planctónico de la toxicidad. En el último caso, existe la posibilidad de que la toxicidad hubiera sido causada por un organismo que ya no estaba presente en la columna de agua en el momento del muestreo, o incluso podría tratarse de una toxicidad de origen bentónico.

Los arrastres densos constituyen un material muy lábil. Si el filtrado o centrifugado no se realizan inmediatamente, hay que evitar que el arrastre esté demasiado concentrado, y mantenerlo refrigerado, ya que numerosas células pueden romperse y liberar su contenido al medio. El material centrifugado o el filtro deben congelarse inmediatamente (idealmente con nitrógeno líquido), pues tan pronto como las células mueren (o rompen) se desatan procesos enzimáticos que harán variar el perfil de toxinas.

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

Se aíslan las células planctónicas sospechosas mediante micromanipulación capilar, y se intenta establecer cultivos monoalgales en placas de cultivo celular. Conseguidos los aislamientos, se escala el tamaño del cultivo hasta alcanzar mayores volúmenes; se concentra un volumen de cultivo según la técnica a emplear (bioensayos o análisis cromatográficos) y se preparan extractos para los bioensayos o análisis cromatográficos como en el caso de la vianda de molusco y de los arrastres planctónicos, para determinar el perfil de toxinas de la especie microalgal cultivada.

D. Comparación de los resultados de determinación de toxinas

Una vez completado los distintos pasos de los apartados A y B, se puede establecer qué tipo de toxinas tienen los bivalvos, y si éstas son similares a las determinadas en el fitoplancton presente en el momento de muestreo. Se recomienda utilizar como bivalvo al mejillón pues, al menos durante los primeros días, suele presentar un perfil de toxinas prácticamente igual al de las células tóxicas ingeridas. Además, se trata de un organismo de amplia distribución, bajo precio y elevada tasa de filtración e intoxicación. Los bivalvos transforman enzimáticamente las toxinas ingeridas, y en algunas especies ocurre con más rapidez, y los cambios son más intensos (Oshima *et al.*, 1990). El estudio de estas transformaciones debería hacerse posteriormente

alimentando a los bivalvos comerciales de la zona con cultivos monoalgales de la especie tóxica o con arrastres planctónicos de perfil tóxico conocido. Ello permitirá estudiar la variación del perfil de toxinas causada por la acción enzimática en los tejidos del molusco.

Finalizados los pasos del apartado C, y si el cultivo monoalgal da un perfil tóxico comparable al de los bivalvos y al del arrastre planctónico, sólo entonces se podrá decir con rigor científico que la especie en estudio y bajo sospecha es la responsable de la presencia de esas toxinas en los bivalvos. De lo contrario, conviene ser prudentes y limitarse a «asociar» la aparición de determinadas especies fitoplanctónicas con la aparición de determinadas toxinas en los bivalvos de la misma localidad.

No hay que olvidar que:

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

Alternativas en el caso de especies del género *Dinophysis*.

El análisis de toxinas en extractos de arrastres de red de la población fitoplanctónica total se ha empleado a menudo, sobre todo si se sospechaba que la microalga productora de las toxinas era una especie no cultivable, como es el caso de las *Dinophysis* spp. El procedimiento habitual en estos casos consiste en dividir el contenido total de toxinas, determinadas en el extracto del filtro o *pellet*, entre el número de células de la especie supuestamente tóxica presente en el arrastre. El número de células se calcula multiplicando el volumen total de arrastre filtrado/centrifugado, y la concentración de la especie obtenida en el conteo de una alícuota del arrastre. No obstante, esta práctica conlleva una carga de error difícil de evaluar (que se discute en el capítulo 8) entre otras cosas porque se asume *a priori* cuáles son las especies tóxicas contenidas en el arrastre y se supone que el resto de las especies que coinciden con las tóxicas no contienen toxina.

En los últimos años, la aplicación de análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (CL-EM) de individuos aislados uno a uno por micromanipulación en muestras cada vez más pequeñas (una o varias decenas de células) está ofreciendo resultados muy prometedores, como los obtenidos a partir de aislamientos de *D. acuta*, y *D. caudata* de las rías gallegas (Fernández *et al.* 2002a, 2002b).

TRANSFERENCIA Y TRANSFORMACIÓN DE TOXINAS DE LAS DINOPHYSIS SPP. A TRAVÉS DE LAS REDES TRÓFICAS.

Las especies del género *Dinophysis* son planctónicas, y las cepas cuya toxicidad ha sido confirmada contenían, en la mayor parte de los casos, principalmente AO y DTX1 ó DTX2, si bien recientemente se ha informado sobre la presencia de pectenotoxinas, a veces como compuestos dominantes del complejo tóxico, en *D. fortii* y *D. acuta* de aguas europeas y de otras partes del mundo (Daiguji *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002a; Yasumoto, 2002). Con las mejoras progresivas de las técnicas analíticas, y la mayor disponibilidad de patrones, se están identificando nuevas toxinas, como el seco-ácido de la pectenotoxina 2 (PTX2SA) y formas conjugadas del AO, en bivalvos y en especies de *Dinophysis* que hasta la fecha se creía que tan sólo portaban AO.

Las células tóxicas de *Dinophysis* son ingeridas por los mejillones y otros bivalvos filtradores. Las toxinas se ligan a "aceptores" en los tejidos de los bivalvos, sobre todo a la glándula digestiva o hepatopáncreas, como parte del proceso de asimilación del alimento ingerido. Es un error común creer que las toxinas de los bivalvos se eliminan en las plantas depuradoras, donde se limitan a estabular al molusco, entre 48 y 72 h, en tanques por los que circula agua de mar estéril. Este tratamiento tan sólo permite que el organismo filtrador limpie de bacterias y suciedades su tracto digestivo.

La toxicidad adquirida por el bivalvo va a depender de la cantidad y contenido tóxico de las células de *Dinophysis*, su proporción en relación con la cantidad total de alimento disponible, de diversos factores ambientales, y de la propia fisiología del bivalvo (Blanco *et al.*, 1995). Todos estos factores van a influir también en el proceso de detoxificación. Se han encontrado importantes diferencias específicas en la cinética de intoxicación-detoxificación de ficotoxinas, lo cual condujo a Bricelj & Shumway (1998) a agrupar a los bivalvos en dos grupos: a) bivalvos de detoxificación rápida (entre las que incluiríamos a los mejillones, como *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*), que tardan entre 1 semana y varios meses en detoxificarse, según intensidad del episodio y época del año, y b) bivalvos de detoxificación lenta, como *Acanthocardia tuberculatum* ("langostillo" en Andalucía) que pueden retener entre meses y años la toxicidad adquirida en un episodio (Berenguer *et al.*, 1993).



Fig. 1.8. Tintínido (*Favella* sp.) con células de *Dinophysis acuminata* (fondo) y *D. acuta* (parte superior) en el interior de su lorica.

Una vez asimiladas por los bivalvos, las toxinas pueden sufrir transformaciones enzimáticas que dan lugar a la formación de 7-O acil derivados del AO, DTX1 y DTX2, genéricamente denominados DTX3. La conversión de DTX1 (procedente de *D. fortii*) a DTX3 en la vieira japonesa (*Patinopecten yessoensis*) ha sido demostrada por Suzuki *et al.* (1999). En todos los otros casos de detección de acil-derivados en los bivalvos (Marr *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1996; Vale & Sampayo, 1999), se sospecha que estos compuestos se han producido por la actividad enzimática de los bivalvos, pero no hay que descartar la posibilidad de transformaciones bacterianas desarrolladas por la flora digestiva de los bivalvos, ya que Kotaki *et al.* (1989) aislaron bacterias de *Mytilus edulis* capaces de transformar GTX2 y GTX3 en saxitoxina. Estas transformaciones son de gran interés, no sólo fisiológico, sino también socioeconómico, ya que la toxicidad del derivado resultante puede ser muy distinta de la del compuesto original, y la metabolización del derivado resultante, por parte del bivalvo, puede requerir procesos con cinética de incorporación y eliminación diferentes que modifiquen el tiempo de detoxificación (Fernández *et al.*, 1998). Así pues, la principal vía de transmisión de DST de las especies de *Dinophysis* a través de la red trófica pelágica parece ser la de los bivalvos filtradores.

Son escasísimos los estudios de transmisión de DST a través del zooplancton. Carlsson *et al.* (1995) confirmaron que *Dinophysis acuminata* era consumido por varias especies de copépodos, algunas de las cuales resultaban negativamente afectadas. En estudios de transferencia de toxinas en las Rías Bajas, pudimos observar una asociación de especies de *Dinophysis* con ciliados tintínidos, algunos de los cuales presentaban células de *Dinophysis* en el interior de la lorica (Maneiro *et al.* 1998). Posteriormente se pudo confirmar, en experimentos de laboratorio, el pastado de *D. acuminata* y *D. rotundata* por tintínidos del género *Favella*, así como la acumulación de DST en la fracción del microzooplancton de 100-200 μm asociada a estos ciliados (Maneiro *et al.* 2000) (Fig. 1.8). Estos hallazgos sugieren, que en determinadas cir-

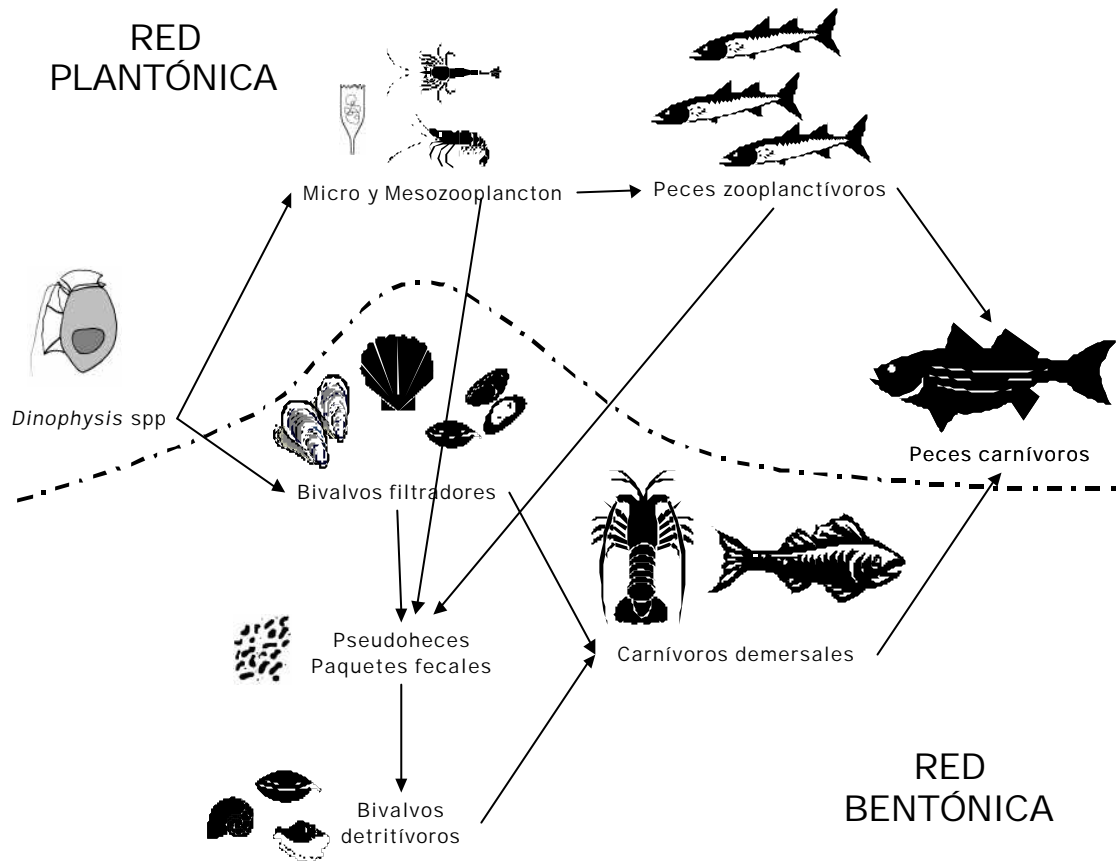


Fig. 1.9. Diagrama simplificado de posibles vías de transferencia de toxinas de *Dinophysis* a distintos eslabones de la red trófica.

cunstances, la presencia de especies de *Dinophysis* y sus toxinas pueden afectar a componentes del "bucle microbiano". La transferencia de DST a crustáceos (posiblemente por ingestión de bivalvo tóxico) ha sido mostrada recientemente por Vale & Sampayo (2002). En la Fig. 1.9 se presenta un diagrama de las posibles transferencias de toxinas DSP a través de las cadenas tróficas.

Otra posible vía de transmisión muy poco explorada sería a través de las heces y pseudoheces de los bivalvos, y de los paquetes fecales del zooplankton. Maneiro *et al.* (2000) observaron células de *Dinophysis* aparentemente no digerido, en los paquetes fecales de copépodos. Es conocido que los mejillones pueden eliminar en sus heces toxinas, células vivas de especies tecdadas (por ej. *Alexandrium* spp.) o incluso quistes de dinoflageladas que germinan posteriormente sin problema. La eliminación de células no digeridas de *Dinophysis* a través de heces y paquetes fecales haría el alimento tóxico accesible a organismos coprófagos (ciliados, copépodos harpacticoides..) que viven en el fondo. Esta conexión de la cadena trófica pelágica con la cadena béntica-detritica aumentaría los riesgos de presencia de DST en una amplia gama de organismos marinos. De nuevo hay que mencionar aquí que los datos disponibles sobre estos procesos con DST son prácticamente inexistentes a excep-

ción de los trabajos preliminares de Maneiro *et al.* (2002). Por el contrario, hay numerosas citas de episodios de PSP en los que se observa la presencia de neurotoxinas en equinodermos, crustáceos, y otros organismos marinos carnívoros que se alimentaron de bivalvos filtradores tóxicos (Shumway, 1995).

En el caso de especies de *Prorocentrum*, se ha demostrado la producción de toxinas diarreogénicas en *P. lima* y *P. concavum*, ambas dinoflageladas bentónicas que viven adheridos, mediante compuestos extracelulares mucilaginosos, a partículas sólidas del suelo marino, macroalgas, y otros substratos. Se ha especulado sobre la implicación de *P. lima* en episodios DST de origen desconocido, máxime cuando las toxinas diarreogénicas se registran en bivalvos de regiones donde los análisis de extractos de poblaciones naturales con especies de *Dinophysis* indican ausencia total de DST (Lawrence *et al.*, 1998). La conexión entre toxinas de *P. lima* y mejillones de batea requeriría que las células de la dinoflagelada, firmemente adheridas a las macroalgas que crecen en las cuerdas de mejillón, se soltaran (por efecto de elevada turbulencia o por el propio comportamiento del organismo) y fueran así accesibles para los filtradores. Esta posibilidad ha sido investigada y confirmada en mejillones de Nova Scotia, en la costa este canadiense (Lawrence *et al.*, 2000).

PRINCIPALES IMPEDIMENTOS PARA LA CONSECUCCIÓN DE OBJETIVOS EN LOS ESTUDIOS DE ESPECIES DE *DINOPHYSIS*

Cuando se emprenden estudios de distintos aspectos autoecológicos, fisiológicos y toxicológicos de especies del género *Dinophysis*, los principales impedimentos con que se encuentran los investigadores, y de los cuales derivan las dificultades subsiguientes, se pueden resumir en dos: la carencia de cultivos de especies de *Dinophysis*, y las bajas densidades celulares habituales en el medio natural. Los cultivos monoalgales son una valiosa herramienta, casi imprescindible, en los estudios de taxonomía morfológica, quimiotaxonomía (perfil de toxinas, de pigmentos, composición bioquímica...), genética (secuenciación de DNA, estudios filogenéticos), ciclo vital y fisiología de dinoflageladas y otras microalgas. Son también la mejor materia prima para la obtención de patrones de toxinas puras, o para el desarrollo de experimentos de cinética de incorporación y transformación de las toxinas por los moluscos bivalvos. La carencia de cultivos estables de *Dinophysis* es el principal impedimento que explica el lento avance de las investigaciones sobre este género.

¿Por qué no ha sido posible el cultivo de especies fotosintéticas de Dinophysis? ¿Qué alternativas han ensayado los científicos para poder estudiar este género?

Schnepf & Elbrächter (1988) observaron que las especies fotosintéticas de *Dinophysis* poseían cloroplastos con estructura y pigmentos similares a los de las criptofíceas, presentando un característico color naranja cuando eran observados

al microscopio de epifluorescencia. Jacobson & Andersen (1994) presentaron evidencias del carácter mixótrofo de *Dinophysis acuminata* y *D. norvegica*, especies fotosintéticas del género, y Koike *et al.* (2000) de fagotrofía en *D. fortii*, pero el mecanismo de toma de alimento por "mizocitosis" sólo ha sido descrito para la especie heterotrófica *D. rotundata* (Hansen, 1993), que succiona el interior de una presa, tal como el tintínido *Tiarina fusus*, tras perforarle la lorica con un pedúnculo alimenticio contráctil. Nadie ha conseguido cultivar ninguna especie pigmentada de *Dinophysis* con los medios de cultivo habituales empleados para microalgas auxotróficas, por lo que se dedujo que podrían tener un comportamiento mixotrófico.. Los intentos de cultivo han llevado a distintos expertos a utilizar medios de enriquecimiento diversos con adición de carbono orgánico disuelto, extracto de suelo, bacterias, cianofíceas, o incluso la criptofícea *Plagioselmis* sp., que posee pigmentos fotosintéticos análogos a los presentes en *Dinophysis* spp (Sampayo & Moita, 1993; Delgado *et al.*, 1996; Maestrini *et al.*, 1995; revisión de Maestrini, 1998). Hasta la fecha, los resultados mejores fueron los conseguidos por Ishimaru *et al.* en 1985 (en Maestrini, 1998), que obtuvieron 22 células de *D. acuminata* a partir de una sola célula incubada con cultivo de *Plagioselmis* sp a razón de $0.2 \text{ div.} \cdot \text{d}^{-1}$, y los de Sampayo & Moita (1993), que con medio de enriquecimiento Mikel con adición de ácido glicólico obtuvieron tasas de $0.6 \text{ div.} \cdot \text{d}^{-1}$ tanto de *D. acuminata* como de *D. acuta*. No obstante, ninguno de estos autores consiguió un cultivo estable y los individuos de *Dinophysis* acababan perdiendo coloración y/o tamaño, y por último morían. Ninguno de estos autores empleó tintínidos como fuente heterótrofa de alimento (como es habitual con *D. rotundata*), lo que quizás se explique por lo delicado y fastidioso que resulta a veces el mantenimiento de tintínidos en cultivo. Existe la sospecha generalizada de que las especies fotosintéticas de *Dinophysis* pudieran requerir el "secuestro", al menos en alguna etapa de su ciclo vital, de los cloroplastos u otras sustancias contenidas en otras microalgas planctónicas o en los organismos predadores de éstas (ej.: ciliados). El empleo de "cleptocloroplastos" procedentes de criptofíceas ya ha sido descrito para otras especies de dinoflageladas mixotróficas y heterotróficas (ver revisión de Schnepf & Elbrächter 1999). Recientemente Hackett *et al.* (2003) han presentado evidencias, mediante secuenciación de porciones del DNA de los plástidos, sobre el origen de los cloroplastos de *Dinophysis* a partir de una criptofita endosimbiótica. Estos autores también encontraron DNA de florideofíceas (algas rojas) en *Dinophysis* y sugirieron que, de no tratarse de un contaminante, este hallazgo probaría que las *Dinophysis* spp. incluyen algún tipo de florideofícea entre sus potenciales presas.

La carencia de cultivos ha impedido una descripción completa del ciclo vital de las especies del género. La información disponible, a modo de piezas de un rompecabezas incompleto, se ha obtenido de observaciones de muestras de campo en momentos de proliferaciones de especies de *Dinophysis*. y de incubaciones en laborato-

rio de poblaciones o de células aisladas por micromanipulación. La variabilidad morfológica de las especies de *Dinophysis* es otro de los grandes quebraderos de cabeza en los estudios de este género. Las distintas especies presentan una gran plasticidad, respondiendo rápidamente con variaciones morfológicas a las condiciones ambientales cambiantes. Si además consideramos que la identificación taxonómica de las especies de *Dinophysis* se basa sobre todo en el contorno de la cubierta celular, y que la variabilidad intraespecífica puede ser igual o mayor que la variabilidad interespecífica, es fácil imaginar los problemas que se presentan en los análisis cuantitativos de muestras de campo donde coexisten distintas especies de *Dinophysis*, difíciles de separar, pero que pueden tener toxicidades bien distintas.

Los estudios de descripción inequívoca del perfil de toxinas de especies de *Dinophysis* se han realizado aislando cientos de individuos del medio natural mediante engorrosas micromanipulaciones capilares, y esta misma técnica se ha aplicado para observaciones *in vivo* de individuos mantenidos en laboratorio. En casos excepcionales, la presencia de elevadas densidades de *Dinophysis acuta* en Irlanda, y su recolección mediante una gran red planctónica de arrastre oblicuo, permitió emplear células del medio natural como materia prima para el aislamiento de dinofisistoxinas (James *et al.*, 1999).

Otro problema es la ya mencionada escasez habitual de las especies del género, y en numerosas ocasiones, su heterogénea distribución vertical, lo cual requiere un diseño de muestreo apropiado a estas características. En los estudios de seguimiento anual de la abundancia de *Dinophysis* spp en las Rías Bajas gallegas, que formaban parte del programa de monitoreo de especies potencialmente tóxicas, se realizaron muestreos integrados de la columna de agua (o de distintos tramos de la columna de agua) mediante manguera de jardinería, con tramos de 5 m acoplados según el diseño de Lindahl (1986), hasta una profundidad de 15-20 m (ver Anexo I). Estas observaciones se complementaron con las de muestreos convencionales con botellas oceanográficas a distintas profundidades, y muestreos con botellas en los que se concentraba posteriormente la muestra de 250-4000 ml de agua antes de su análisis microscópico por el método de Utermöhl. Además, los muestreos rutinarios mediante arrastres verticales de red han permitido detectar la presencia de las distintas especies de *Dinophysis* cuando se encontraban en niveles inferiores a los límites de detección mediante análisis cuantitativos convencionales ($20 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$).

Una de las preguntas fundamentales cuando se desarrolla una floración nociva en una localidad es determinar si el incremento poblacional se ha debido a división activa de las células o a procesos de acumulación por causas físicas. Para contestar a esta pregunta, una de las aproximaciones posibles es la medición de tasas específicas de crecimiento *in situ*. En el caso de especies de *Dinophysis* su escasez, o su pequeña proporción en relación con la población global, o ambas cosas a la vez, com-

plican sobremanera esta actividad, y la determinación de tasas sólo es asequible cuando hay importantes incrementos numéricos de las poblaciones naturales, o cuando las condiciones ambientales favorecen el predominio de dinoflageladas frente a las densas poblaciones habituales de diatomeas. Otra aproximación consiste en identificar, a nivel de mesoescala, las masas de agua en las que se registran y/o proliferan las especies de interés; y a nivel microescalar, las condiciones meteorológicas y estructuras hidrográficas singulares que expliquen la mayor incidencia de una especie concreta en determinadas rías o zonas de las rías, y los regímenes de vientos que favorecen los movimientos locales de las "manchas" de *Dinophysis* spp.

CAPÍTULO 2

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE *DINOPHYSIS* EN GALICIA.

Información parcialmente publicada en:

Bravo, I., Reguera, B. & Fraga, S. (1995a). Description of different morphotypes of *Dinophysis acuminata* complex in the Galician Rias Bajas in 1991. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P. and Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.) *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Paris, pp. 21-26.

Reguera, B., Bravo, I., MacCall, H. & Reyero, M.I. (1996). Phased cell division and other biological observations on *Dinophysis* spp populations during in situ cell cycle studies. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. and Fukuyo, Y. (Eds.) *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO Publishers, pp. 257-260.

Reguera, B., González-Gil, S. & Delgado, M. (2002). Formation of *Dinophysis dens* and *D. diegensis* from laboratory incubations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, 21-25 October 2002, p. 240.

¿QUÉ SON LAS MICROALGAS?

Según la clasificación tradicional de Linné del S. XVIII, y la posterior de Eichler en el S. XIX, las algas son plantas (organismos fotosintéticos) criptógamas, es decir, carentes de órganos reproductores visibles (flores y semillas), que producen esporas. Hoy día sabemos que la clasificación tradicional en reino animal o vegetal no es «natural», es decir, carece de fundamento filogenético u otro significado biológico. Existen organismos unicelulares microscópicos que son móviles, fotosintéticos y capaces de ingerir partículas, difíciles de adscribir al reino animal o vegetal. Además, dentro de la definición de algas microscópicas o microalgas unicelulares, algunas de ellas, como las cianobacterias, son procariotas –es decir, células carentes de aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico, con el ADN y tilacoides en el citoplasma, sin membranas que los envuelvan- y otras son eucariotas –células dotadas de núcleo y cloroplastos delimitados por membranas. Por ello, se definió un tercer reino, Protista, en el que se incluyeron los organismos unicelulares eucariotas.

Margulis y colaboradores hipotetizaron que en tiempos pasados de la evolución, algunas células eucariotas simples capturaron e ingirieron células procariotas fotosintéticas, tales como las cianobacterias, y en vez de digerirlas las «domesticaron», convirtiéndolas en orgánulos celulares. Así pues, la célula eucariota fotosintética primitiva habría adquirido sus plástidos primarios mediante una endosimbiosis primaria. A su vez esta eucariota con plástidos primarios, ingerida y «domesticada» por otra eucariota heterótrofa habría dado lugar a una célula eucariota dotada de un plástido secundario. El carácter primario, secundario o incluso terciario de los plástidos, rodeados de una, dos o tres membranas respectivamente, se determina fácilmente en los estudios de cortes citológicos con ayuda de microscopía electrónica. Los avances en biología molecular y específicamente la posibilidad de secuenciación del ADN, han permitido mostrar porciones de genoma diferentes en los cloroplastos, mitocondrias y núcleo de microalgas.

Actualmente se acepta la existencia de 5 reinos (Monera, Protoctista, Fungi, Animalia y Plantae), que tampoco pueden considerarse «naturales» puesto que no tienen el mismo origen filogenético. El reino Protoctista (protos + ktistos = el primero en ser establecido) –formado por exclusión, por organismos que no son ni animales ni plantas- está constituido por un conjunto muy diverso de microorganismos eucariotas (los antiguos Protista) y sus descendientes inmediatos: todas las algas nucleadas, mohos acuáticos flagelados, mohos mucilaginosos y protozoos (revisado en Van den Hoek *et al.*, 1995; Bhattacharya, 1997; Delwiche & Palmer, 1997; Saunders *et al.*, 1997). Este reino comprende tres subreinos: Mastigobionta, Myxobionta y Phycobionta (en el que se incluyen las microalgas).

Las algas se clasifican mediante un sistema jerárquico (Taxinomía) de:

División (o phylum) → Clase → Orden → Familia → Género → Especie

Esta clasificación se ha basado fundamentalmente en criterios morfológicos (presencia o ausencia de flagelos, estructura de los flagelos, patrón de división nuclear y celular, estructura de los cloroplastos) y bioquímicos (tipo de pigmentos fotosintéticos, sustancias de reserva, composición de la pared celular, etc.).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS DINOFLAGELADAS Y SU CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

En el siguiente capítulo seguiremos la clasificación de Dodge (1982), que difiere de las de Loeblich (1982), Sournia (1986) y Taylor (1987a):

División DI NOPHYTA

Clase DI NOPHYCEAE

Órdenes Gymnodinales, Gloeodinales, Thoracosphaerales, Phytodinales, Dinotrichales, Dinamoebidales, Noctilucales, Blastodinales, Syndinales, Peridinales, Dinophysiales, Prorocentrales.

Las dinoflageladas son microalgas eucariotas unicelulares (excepto algunas formas cocoides y filamentosas), marinas en su mayoría (más del 90%), que al menos en un estadio de su ciclo vital poseen una célula móvil dotada de dos flagelos desiguales. Se han descrito más de 2000 especies vivientes y 2000 especies fósiles (Taylor, 1987b). Aproximadamente el 50% de las especies vivientes son fotosintéticas, y el resto incluye especies heterótrofas estrictas y especies mixótrofas con comportamiento alimenticio muy diverso. Debido a estas características, y a su movilidad y posesión de pared celular, han sido reclamadas tanto por los zoólogos como por los botánicos (revisado en Steidinger & Cox, 1980; Taylor, 1987a; Van den Hoek *et al.*, 1995). Las formas fotosintéticas poseen clorofila *a* y *c₂* y a veces otros pigmentos de posible origen endosimbiótico. Otras características de interés biológico son:

- Poseen un núcleo, *dinocarion*, con los cromosomas permanentemente condensados, con escasas proteínas básicas y sin nucleosomas.
- Las células están surcadas por dos hendiduras -una longitudinal o *sulcus* y otra transversal o *cingulum*- y dos flagelos desiguales -uno longitudinal, insertado en el *sulcus*, que determina la propulsión, y otro transversal, insertado en el *cingulum*, que determina la dirección de la natación- con una estructura característica de las especies de esta división.

- La célula móvil, o *mastigoto*, posee una capa periférica de vesículas aplanadas, las vesículas tecales, que pueden estar vacías o casi vacías en las formas desnudas o *atecadas*, o contener placas de celulosa de espesor variable en las formas armadas o *tecadadas*. En las células «armadas o tecadas» las placas tecales forman una armadura bipartida, con una parte superior o epicono y otra inferior o hipocono, separadas por el *cingulum*.
- Los quistes permanentes, de origen sexual, poseen componentes adicionales, similares a la esporopolenina, que confieren resistencia adicional a la pared; cuando germinan, la célula móvil sale a través de un orificio denominado *arqueopilo*.
- Poseen esteroides característicos de este *phylum*, como el dinosterol y el amphisterol. En las formas fotosintéticas es frecuente la presencia del carotenoide accesorio peridina, formando complejos con las clorofilas, y otros pigmentos, como xantofilas y β -carotenos.
- Ciclo vital haplonte (células con una dotación cromosómica, n) en el que tan sólo el núcleo del cigoto, que normalmente se transforma en quiste de resistencia, es diploide (2n) (excepto contadas excepciones).
- Pueden presentar manchas oculares de distintos tipos. La principal sustancia de reserva es el almidón - que se forma en el citoplasma, fuera de los cloroplastos, originando gránulos - pero también pueden almacenar lípidos.
- Poseen complejos sistemas de tubos, a modo de vacuolas modificadas, las *púsculas*, comunicadas con el exterior cerca de la base de los flagelos; en la superficie celular pueden poseer *tricoquistes*, que se descargan al exterior bajo distintos estímulos.

Según la posición de los flagelos, las dinoflageladas tecadas pueden ser *dinocontas*, tal como las especies de los géneros *Alexandrium* y *Dinophysis*, si los dos flagelos emergen de un poro, el *poro flagelar*, situado en el margen ventral de la célula, o *desmocontas*, tal como las especies del género *Prorocentrum* spp, si ambos flagelos surgen del extremo anterior o polo apical. En las dinocontas, el lado opuesto al de emisión de los flagelos se denomina margen dorsal. El extremo que va dirigido hacia delante cuando la célula nada se denomina polo apical, y el extremo opuesto, polo antapical. Se denomina area periflagelar al conjunto de diminutas placas que bordean al poro flagelar. Si cortamos imaginariamente a la célula, en visión dorsal, con un plano que va del polo apical a la región antapical pasando por el *sulcus*, distinguiremos el lado o margen izquierdo y el lado o margen derecho. La posición y desplazamiento del *cingulum*, y la forma de las placas tecales o tabulación son otras características de gran importancia en la clasificación taxonómica de las dinoflageladas. En la Fig. 2.1 se presenta el esquema de una dinoflagelada dinoconta típica.

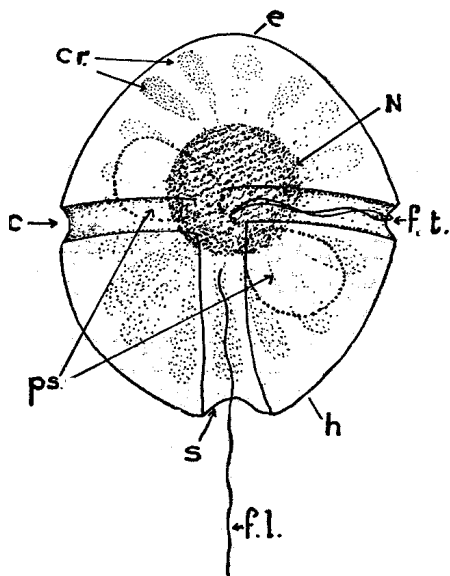


Fig. 2.1. Esquema simplificado de una dinoflagelada dinoconta desnuda tipo: e, epicono; h, hipocono; c, cíngulum en el que se inserta ft, flagelo transversal; s, sulcus

Además de las características ya mencionadas (tabulación, posición y desplazamiento cingular), para la clasificación morfológica precisa se utilizan cuantos caracteres celulares relevantes sean posibles: tamaño y posición del núcleo, morfología y número de los cloroplastos, ornamentación de las placas, etc. La descripción adecuada de estas características puede requerir el uso de colorantes celulares específicos, como los fluorocromos, que resaltan determinados orgánulos o los compuestos que éstos almacenan y los hacen fluorescentes, permitiendo su fácil observación al microscopio de epifluorescencia; en otros casos se requieren sofisticadas preparaciones y montajes para posterior observación al microscopio electrónico (de transmisión o de barrido). La observación de las células *in vivo* y su comportamiento natatorio característico puede ser

esencial en el caso de dinoflageladas desnudas que se deforman con los fijadores convencionales. Definiremos como morfoespecies a las especies definidas sobre la base de características morfológicas (Taylor, 1993). La quimiotaxonomía se aplica con frecuencia como información complementaria de la morfológica para trazar pigmentos, toxinas u otras moléculas que pudieran considerarse «marcadores» de un género o especie. En la última década, los grandes avances en el diseño de sondas moleculares, liderados por el mundo médico, han permitido disponer de valiosas herramientas para los estudios del fitoplancton. Así, anticuerpos que reaccionan contra antígenos determinados o lectinas que se unen a glicoproteínas o glicopéptidos específicos de la cubierta celular, y sondas de ácidos nucleicos que reconocen secuencias específicas del ADN o el ARN celular se pueden aplicar hoy día para la detección de especies microalgales, tanto en cultivos como en muestras de campo (Scholin, 1998) y determinar si las morfoespecies son también genoespecies (idéntica secuencia de los ácidos nucleicos).

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA INTRAESPECÍFICA

Dentro de una misma morfoespecie se pueden presentar variaciones morfológicas o morfotipos determinadas por respuestas fisiológicas/estrategias adaptativas ante las condiciones ambientales propias de una región. Las variaciones de los distintos factores abióticos (temperatura, salinidad, turbulencia/estabilidad, fotoperíodo,

macro y micronutrientes) en una misma localidad pueden actuar como los detonantes de procesos biológicos (germinación, crecimiento en biomasa, división celular, reproducción sexual, enquistamiento...) que modifican profundamente la morfología celular. Hay tres procesos fisiológicos –el ciclo vital, el ciclo celular y la nutrición mixótrofa/heterótrofa– que pueden afectar sobremanera al tamaño y forma de la célula.

El Ciclo Vital

Todas las dinoflageladas estudiadas hasta la fecha, a excepción de la especie *Noctiluca scintillans*, son protoctistas haplontes. Las células vegetativas (planctónicas o bentónicas) son haploides (con una dotación cromosómica sencilla, n). Bajo determinados estímulos –entre los cuales los más citados son la limitación de nutrientes, el estrés por excesiva turbulencia y las densidades elevadas– se producen gametos de signo contrario que al fusionarse dan lugar a un cigoto diploide ($2n$) o *planozigoto*. Este planozigoto, flagelado y móvil, se puede transformar (al cabo de un tiempo indeterminado y que probablemente varía mucho de unas especies a otras) en un *hipnozigoto* o quiste de resistencia dotado de fuerte pared, cargado de sustancias de reserva y con frecuencia con una mancha rojiza (revisado en Pfiester & Anderson, 1987). En la Fig. 2.2 se presenta un esquema simplificado del ciclo vital típico de las dinoflageladas.

En algunas especies de dinoflageladas –como es el caso de *Prorocentrum micans* (Bhaud *et al.*, 1988)– los gametos de signo contrario son idénticos (isógamos) y además su aspecto es muy similar al de las células vegetativas, de las que se diferencian si acaso en el tamaño; en otras especies se observan complejos ciclos dimórficos o polimórficos, los gametos de signo contrario son distintos en tamaño y/o forma (anisogamia) y los distintos estadios del ciclo vital pueden ser tan disimilares que en algunos casos han sido clasificados como especies distintas. Por ello, la descripción de una especie debería incluir siempre la de los distintos estadios de su ciclo vital. No obstante esta información sólo se puede obtener de forma inequívoca si se dispone de cultivos monoalgales establecidos a partir de aislamientos celulares de la especie en cuestión. Asimismo, resulta difícil identificar el quiste de una especie si no se consiguen enquistamientos y germinaciones en condiciones controladas de laboratorio.

El Ciclo Celular

La morfología de la célula también puede sufrir importantes variaciones a lo largo del ciclo celular, que se manifiestan sobre todo en la fase previa a la división citoplasmática en las voluminosas células *megacíticas* y en las células hijas resultantes de la división vegetativa o *mitosis*.

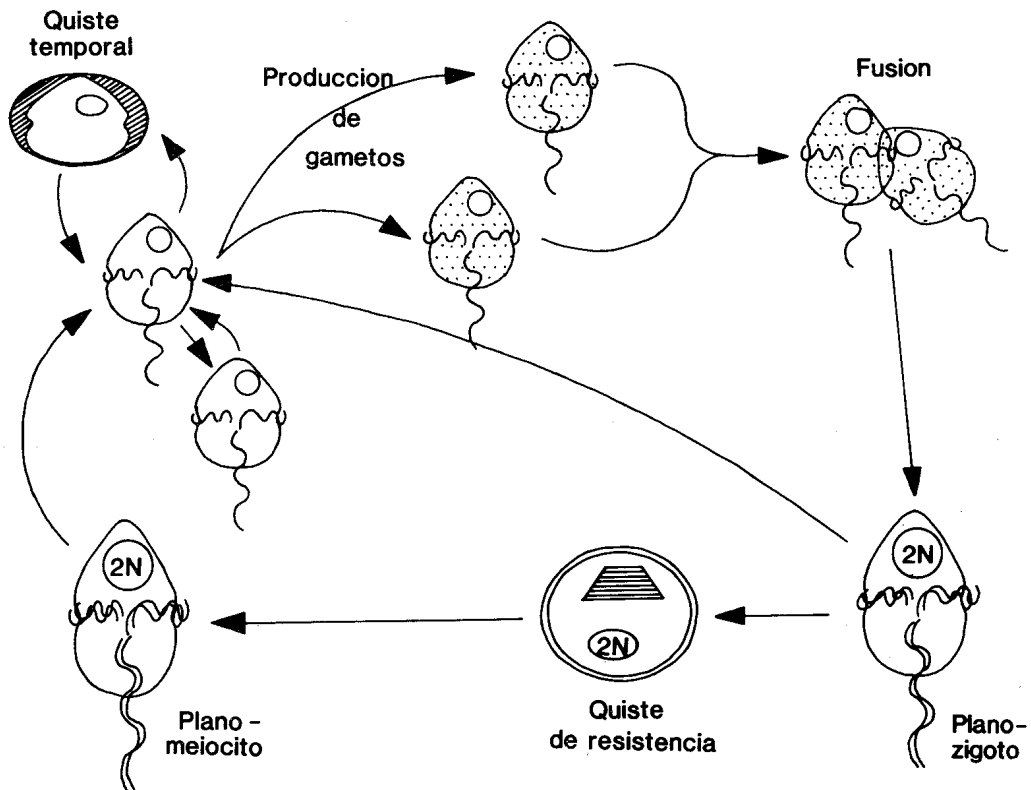


Fig. 2.2 Esquema simplificado del ciclo de vida tipo de una dinoflagelada haplonte. Los estadios diplontes (planozigoto, quiste de resistencia y planomeiocito) están marcados con 2N (Tomado de Blanco, 1988).

La mitosis o fisión celular es el proceso mediante el cual un individuo duplica su material cromosómico y su citoplasma y da lugar a dos células hijas. Hablaremos de *desmosquisis* si se trata de una división en la que la teca materna se comparte entre las dos células hijas. Por el contrario se denomina *eleuterosquisis* al tipo de división (común en los peridiniales) en que la célula madre se desprende de la vieja teca y las células hijas forman una teca completamente nueva, mostrando ambas un aspecto uniforme inmediatamente después de la división (Taylor, 1987c).

Debido a la oblicuidad del plano de división celular en las dinoflageladas que se dividen por *desmosquisis*, las células hijas pueden mostrar diferencias significativas en sus proporciones inmediatamente después de la división según la porción heredada de la célula materna, y la porción nueva generada durante el proceso de división. Así, en el caso de *Ceratium* spp, la cubierta materna se parte por el *cingulum*, una de las células hijas hereda la epiteca, y la otra hereda la hipoteca con sus dos grandes cuernos antapicales; la mitad complementaria se regenera después de la citocinesis. También puede haber diferencias entre la ornamentación de las placas de la mitad madura heredada de la célula madre, y la mitad recién generada.

La tasa de división de una población puede influir también en la distribución de tallas. Las células hijas resultantes de la división vegetativa pueden presentar un tamaño inferior al de la célula madre de la que proceden y aumentar su biomasa hasta convertirse en las voluminosas células megacíticas que preceden a la mitosis. Por otro lado, si disminuye la tasa de división celular pero continúan al mismo ritmo otros procesos biosintéticos, tales como la síntesis de toxinas, este desequilibrio podría dar lugar a poblaciones con un mayor contenido de toxina por célula (Flynn, 1998).

La nutrición mixótrofa/heterótrofa

Hay especies de dinoflageladas que son heterótrofas estrictas, y especies que son mixótrofas. Las microalgas mixótrofas poseen cloroplastos con pigmentos fotosintéticos que les permiten utilizar fuentes inorgánicas de carbono (autotrofía), pero también pueden utilizar fuentes orgánicas disueltas o presas vivas como las especies heterótrofas. Para la captura de presas vivas se valen de distintos mecanismos de fagocitosis. Se han descrito al menos tres mecanismos distintos de fagotrofía en dinoflageladas tecadas:

- Engullimiento de la presa rodeándola con un pseudopodio o a través de alguna fisura celular («engulfment») (Bockstahler & Coats, 1993).
- Captura mediante palio («pallium-feeding»), en la que la célula predatora emite una red o *pallium* a modo de tela de araña, donde la presa queda atrapada y es digerida extracelularmente (Jacobson & Anderson, 1996).
- *Mizocitosis*: Mecanismo que consiste en la perforación de la presa y posterior succión de su contenido mediante un pedúnculo de alimentación (Schnepf & Deichgräber, 1984).

Tras la fagocitación de su presa, las dinoflageladas mixótrofas o heterótrofas pueden aumentar considerablemente su volumen, deformarse, y presentar su citoplasma repleto de vacuolas.

APLICACIÓN DE SONDAS MOLECULARES EN TAXONOMÍA: TAXONOMÍA MORFOLÓGICA VERSUS TAXONOMÍA GENÉTICA

Los estudios filogenéticos basados en la comparación de secuencias del ADN han revolucionado el tradicional concepto de «especie». Las técnicas más recientes están suministrando continuas evidencias sobre la variabilidad genética entre distintas cepas de una misma «morfoespecie» así como sobre la proximidad genética de especies con morfologías muy diversas.

En las comunidades de fitoplancton marino existen especies de microalgas que producen potentes compuestos bioactivos tóxicos o ficotoxinas. Estas toxinas son

retenidas por los moluscos filtradores y transferidas a niveles superiores de la cadena trófica por lo que constituyen un riesgo para la salud humana y una fuente de pérdidas para el sector maricultor (ver capítulo 1). Las autoridades sanitarias y pesqueras controlan el impacto negativo de las proliferaciones de microalgas tóxicas estableciendo costosos programas de seguimiento de fitoplancton y ficotoxinas en los moluscos. Una de las actividades prioritarias de estos programas es la identificación y cuantificación precisa de especies de microalgas potencialmente tóxicas. La detección de especies «diana» debe ser posible cuando aún se encuentran en concentraciones bajas ($< 40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), para así poder dar una «alerta temprana» y optimizar los planes de contingencia.

Los análisis cualitativos y cuantitativos rutinarios de microalgas potencialmente tóxicas en los programas de seguimiento se basan fundamentalmente en aspectos morfológicos de las células, visibles al microscopio óptico, en muestras fijadas con formol neutro o con lugol ácido. La identificación precisa de diversas especies del género *Alexandrium*, agentes de episodios de intoxicación paralizante (PSP), requiere observaciones minuciosas de la estructura de placas tecales en muestras previamente tratadas con hipoclorito sódico, o mejor aún, muestras teñidas con calcoflúor y posteriormente observadas al microscopio de epifluorescencia. Los recientes problemas de intoxicación amnésica (ASP) exigen identificaciones más precisas de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, que deben ser tratadas con ácido para poder observar la ornamentación de las valvas, o deben ser preparadas para su examen al microscopio electrónico. El aislamiento y establecimiento de cultivos monoalgales de las especies problema permite realizar los trabajos de identificación taxonómica con más comodidad al disponerse de abundantes células del mismo organismo para las tinciones y otros tratamientos, o incluso para preparar anticuerpos u otras sondas moleculares para la detección de estas especies.

En el caso de microalgas del género *Dinophysis*, principales agentes de intoxicaciones de tipo diarreogénico (DSP), las tareas de identificación se ven dificultadas por: a) las concentraciones normalmente bajas ($< 100 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de las especies del género; b) la imposibilidad, hasta la fecha, de establecer cultivos monoalgales; c) los criterios habituales de identificación, basados tan sólo en la silueta de las células; d) la gran variabilidad morfológica intraespecífica que presentan algunas especies de *Dinophysis*.

La aplicación de sondas celulares (anticuerpos monoclonales, lectinas) y moleculares (oligonucleótidos) para la identificación de especies de microalgas tóxicas fácilmente confundibles con otras especies poco tóxicas o no tóxicas, presentes además en bajas densidades celulares, constituye una alternativa prometedora a los tediosos análisis y recuentos rutinarios (Anderson, 1995). Los anticuerpos monoclonales y/o policlonales están siendo empleados cada vez más en la identifica-

ción y aislamiento de dinoflageladas de los géneros *Alexandrium* y *Karenia*, o de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Scholin, 1998; Scholin & Anderson, 1998; Scholin *et al.*, 1999). No obstante, se necesitarán aún años de progreso para poder aplicarlos rutinariamente en los programas de seguimiento, ya que los anticuerpos preparados contra una serie de cepas mantenidas en el laboratorio podrían no reaccionar con la misma eficiencia ante un abanico de cepas de la misma especie procedentes de distintas zonas geográficas.

La aplicación de sondas moleculares que identifican secuencias determinadas del RNA ribosómico (18S, 5.8S y 28S) y las regiones intergénicas (ITS1 e ITS2) de las especies diana constituye uno de los métodos más específicos y sensibles disponibles hoy día. Para ello se parte de sofisticadas técnicas de PCR («Polymerase Chain Reaction»), que permiten amplificar regiones específicas del ADN de células de microalgas. Tras secuenciar el producto amplificado, se analizan los datos comparándose las secuencias con las disponibles en las bases de datos genómicas. Una vez establecida la secuencia de fragmentos específicos de ADN, se pueden diseñar distintos tipos de sondas de oligonucleótidos que permitirán detectar las especies de interés, ya sea en organismos aislados, en cultivos, o incluso directamente en complejas muestras de arrastres de red de plancton o sedimentos (revisado en Edvardsen, 2002; Guillou & Biegala, 2002).

Los métodos más prometedores para la identificación precisa en muestras de campo son los no-destructivos, es decir, los que no requieren la rotura de la célula, o la preparación de homogenizados celulares, para identificar el organismo diana (Adachi *et al.*, 1996; Scholin & Anderson, 1998; Anderson *et al.*, 1999). Las mejoras recientes de las técnicas de aislamiento de ADN y posterior aplicación mediante PCR han permitido caracterizar especies de las que no existían cultivos disponibles o de distintos estadios de su ciclo vital a partir de una o pocas células aisladas por micromanipulación que se colocan directamente en los tubillos de PCR (Galgani *et al.*, 1994; Bolch, 2001; Godhe *et al.*, 2002). Estas mejoras se están empezando a aplicar con éxito en especies del género *Dinophysis* (Puel *et al.*, 1998; Marín *et al.*, 2001 a, b; Guillou *et al.*, 2002; Edvardsen *et al.*, 2003)).

TAXONOMÍA MORFOLÓGICA DE LOS DINOPHYSALES.

Familias: DINOPHYSALEAE, AMPHISOLENACEAE.

Orden: DINOPHYSALES

Las microalgas del orden Dinophysales son dinoflageladas tecadas dinocontas, es decir, con flagelos emergentes del poro ventral y estructuradas en dos mitades *quasi* simétricas. Poseen una fuerte compresión lateral, por lo que en muestras fijadas es normal que las células se presenten apoyadas en su mitad izquierda o derecha

y se observen en visión lateral, excepto en el caso de las voluminosas células megacíticas (células en fase mitótica antes de la citocinesis), o de las agrupaciones de células en tétradas o incluso en octetos. La teca se compone de dos grandes placas hipotenciales y dos placas epitecales acompañadas de varias plaquitas. Las placas están ornamentadas con numerosas celdillas o areolas, con o sin pequeños indentados o poros, y las hendiduras transversales y longitudinales aparecen bordeadas de membranas o aletas más o menos prominentes. Poseen un *cingulum* en posición muy anterior, por lo que las dos grandes placas hipotenciales ocupan la mayor parte de la teca. El *sulcus* es difícil de ver en visión lateral.

Morfología del Género *Dinophysis* (*Dinophysiales*, *Dinophysiaceae*)

Las células del género *Dinophysis* presentan tres regiones, que en sentido antero-posterior son: la epiteca (o epicono), el *cingulum*, y la hipoteca (o hipocono) (Fig. 2.3). La epiteca puede ser baja (prácticamente indistinguible en visión lateral), o alta. El *cingulum* es estrecho y está delimitado por dos listas o aletas, anterior y posterior. Las aletas o listas cingulares pueden ser de desarrollo mediano o pobre, con o sin costillas. La aleta sulcal izquierda (ASI) suele ser muy prominente, y sostenida por 3 costillas (o radios) bien visibles (R1, R2, R3), aunque en algunas especies la costilla R3 es muy reducida o incluso ausente. Por el contrario, la aleta sulcal derecha (ASD) está muy poco desarrollada, no está sostenida por costillas, y es difícil de vislumbrar en visión lateral izquierda. El *sulcus* ocupa buena parte del margen ventral y es poco visible en visión lateral. La forma del *cingulum* y el *sulcus* da a las células de *Dinophysis* una orientación dorso-ventral. La característica más conspicua es la aleta sulcal izquierda, que delimita por este lado al *sulcus*. La fisionomía de la hipoteca de las especies de *Dinophysis* es muy variable y puede presentar una prolongación (proyección o proceso) en la región antapical, como *D. caudata*, o dos prolongaciones, en la región antapical y en el margen dorsal, como *D. tripos* y *D. miles*; prolongaciones membranosas irregulares, como *D. cornuta*; excrescencias o nódulos cortos e irregulares, como *D. acuminata* y *D. tuberculata*; o incluso una espina o membrana triangular en forma de asta, como *D. hastata* y *D. swezyae*. Las especies fotosintéticas presentan cloroplastos con pigmentos y estructura similares a los de las microalgas de la familia Cryptophyceae, es decir, contienen ficoeritrinas y ficocianinas que fluorescen en color naranja cuando se observan las células vivas al microscopio de epifluorescencia con filtro de infrarrojo (Schnepf & Elbrächter, 1988; Hewes *et al.*, 1998). Trabajos recientes de secuenciación de ADN han presentado evidencias filogenéticas de que el origen del plástido de las *Dinophysis* fue una Cryptophyta (Hackett *et al.*, 2003), desterrando en cierto modo la hipótesis de que los cloroplastos de *Dinophysis* fueran secuestrados (cleptocloroplastos).

El género *Dinophysis* fue descrito por Ehrenberg en 1839 partiendo de *Dinophysis acuta* como especie tipo. Pavillard (1916) distribuyó las especies del género *Dinophysis*

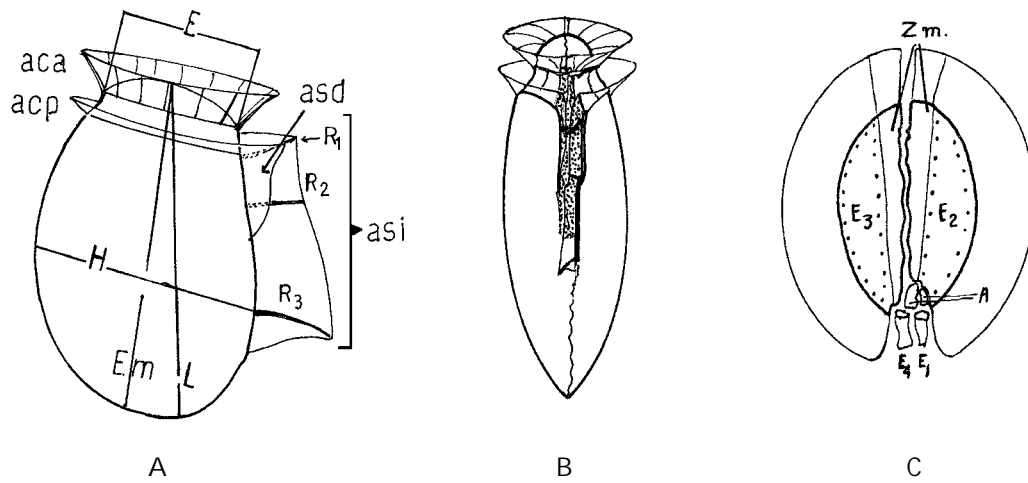


Fig. 2.3. Esquema de las distintas partes de una célula de *Dinophysis*. A. Vista lateral derecha de un *Dinophysis* mostrando la forma de tomar las principales medidas. a.c.a., aleta cingular anterior, con radios; a.c.p. aleta cingular posterior; a.s.d., aleta sulcal derecha; a.s.i., aleta sulcal izquierda con sus tres costillas: R₁ o anterior, R₂ o media y R₃ o posterior; la porción que se extiende por debajo de R₂ se llama retrocostal; E, profundidad (= ancho dorso-ventral) de la epiteca; H, lo mismo de la hipoteca; L, eje longitudinal (longitud); E.m., eje medio. B. *Dinophysis* en vista ventral. En grisado, el *sulcus*, entre las dos aletas sulcales. C. Vista anterior o apical de la epiteca de un *Dinophysis*, con sus componentes ligeramente separados. E₁, E₂, E₃ y E₄, placas epitecales. A, placas apicales. Zm., zona o banda megacítica. Obsérvese que casi toda la epiteca está formada por las dos epitecales dorsales (E₂ y E₃) y que las cuatro de la serie contribuyen a integrar la aleta cingular anterior, pero que la porción de aleta que corresponde a las pequeñas ventrales (E₁ y E₄) es reducidísima (tomado de figs. 2-3-4 de Balech, 2002).

en 5 secciones, a las que designó con el nombre de la especie más representativa: Homunculus, Acuta, Sacculus, Hastata y Sphaerica. Jörgensen (1923) estableció 6 secciones y además definió breves diagnósticos para caracterizar cada una de ellas: Acutae, Ovum, Sphaericae, Homunculus, Hastatae y Scolops. Por último, Kofoid & Skogsberg (1928) consideraron 3 grupos: Acuta, Caudata y Hastata. Estos autores hicieron una profunda revisión del género *Dinophysis*, consideraron que comprendía especies principalmente distribuidas en aguas tropicales, subtropicales o cálido-templadas de baja densidad, reflexionaron sobre las distintas morfologías del género y sugirieron que estas morfologías constituían adaptaciones para conseguir una mayor flotabilidad. Así, las especies del grupo Homunculus (*sensu* Pavillard), como *D. caudata*, *D. tripos* y *D. miles*, frecuentes en mares tropicales o subtropicales, poseen grandes aletas cingulares y sulcales, y marcadas prolongaciones y protuberancias, siendo *D. miles* la especie de morfología más llamativa. Por el contrario, las especies autóctonas de mares templados y fríos, como *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. norvegica*, presentan una constitución más robusta y aletas sulcales de menor tamaño.

Tai & Skogsberg (1934) fueron los primeros autores en describir la tabulación general del género, posteriormente modificada por Balech (1976). Las dinoflageladas del género *Dinophysis* poseen 18 placas: 4 placas epitecales (E1-E4), 4 hipotenciales

(H1-H4), 4 cingulares (C1-C4), 4 sulcales y 2 plaquitas alrededor del poro apical. Curiosamente *D. acuta*, la especie tipo, carece de una de las plaquitas anteriores y posee sólo 17 placas. La mayor parte de la teca de *Dinophysis* está ocupada por las dos grandes placas hipotenciales (H2, H3), y en mucho menor medida por las dos grandes epitecales (E2, E3) (Fig. 2.3).

Existe cierta controversia en la utilización del nombre genérico *Phalacroma* y su relación con *Dinophysis*. De hecho, muchos autores consideran *Phalacroma* un sinónimo de *Dinophysis*. Para aquéllos que consideran *Phalacroma* un género distinto, los rasgos que lo diferencian de *Dinophysis* son: a) poseen una epiteca detectable, en visión lateral, por encima de la aleta cingular anterior; b) las aletas cingulares son estrechas y proyectadas hacia afuera perpendicularmente a la células (no orientadas formando un corto embudo); c) son especies no fotosintéticas y de distribución predominantemente oceánica (revisado en Steidinger & Tangen, 1996). Originalmente se incluyó en el género *Phalacroma* a los miembros con epiteca convexa que sobresalía por encima de las aletas cingulares. Abé (1967) y Balech (1976), tras estudios independientes basados en análisis morfométricos y en disección de las placas cingulares respectivamente, concluyeron que no había diferencias significativas en las características morfológicas que justificaran la existencia de dos géneros. El nombre de *Phalacroma* fue reintroducido por Hallegraeff & Lucas (1988) y posteriormente por Steidinger & Tangen (1996) en base a la morfología ya mencionada de la epiteca, y del predominante carácter heterótrofo de las especies incluidas en este género, pero su uso sigue siendo motivo de controversia. En el presente capítulo lo consideraremos un sinónimo de *Dinophysis* y evitaremos el término *Phalacroma*.

Hallegraeff & Lucas (1988) sugirieron que la morfología de las pequeñas placas o la ornamentación tecal podían ser caracteres útiles para la clasificación taxonómica. Estos autores clasificaron las especies de *Dinophysis* en 5 tipos según la ornamentación de las grandes placas hipotenciales:

Tipo A: Teca lisa o con areolas muy superficiales. Tan sólo una de cada 5-10 areolas posee poro. Existen unas filas de poros, más próximos entre sí, que bordean el interior de las aletas cingulares y el margen de las dos grandes placas hipotenciales.

Tipo B: Teca con areolas más profundas que en A. Tan sólo una areola de cada grupo de 5-10 areolas posee poro.

Tipo C: Reticulación hexagonal y poco profunda con poro en casi todas las areolas.

Tipo D: Areolas grandes, prominentes y casi esféricas. Poro en la areola central de cada grupo de 3-5 areolas.

Tipo E: Areolas circulares o hexagonales más o menos prominentes, con un profundo poro en casi todas las areolas.

De acuerdo con el Atlas de Sournia (1986), *Dinophysis* es uno de los géneros de dinoflageladas con mayor número de especies descritas (más de 200). El estudio del patrón de placas o tabulación de *Dinophysis* requiere un trabajo extremadamente laborioso que se ha llevado a cabo con muy pocas especies de este género. No se conoce nada sobre posibles variaciones intraespecíficas o interclonales de las plaquitas (Larsen & Moestrup, 1992). De las 200 especies descritas, muchas son difíciles de distinguir siguiendo las descripciones tipo, y el género requiere urgentemente una profunda revisión.

Por todas las dificultades expuestas, la clasificación rutinaria de especies de *Dinophysis* se realiza sobre la base de rasgos morfológicos de la célula completa, fundamentalmente la silueta celular. Los principales rasgos utilizados en el diagnóstico taxonómico son:

- Tamaño relativo, proporciones y contorno de las células;
- Ornamentación de las dos grandes placas hipotecales (H₂, H₃);
- Morfología de la aleta sulcal izquierda (ASI);
- Presencia o ausencia de cloroplastos.

A finales de la década de los 80, Yasumoto *et al.* (1978) describieron la intoxicación diarreogénica por bivalvos (Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP) como un síndrome causado por toxinas termoestables de origen no bacteriano y dos años más tarde (Yasumoto *et al.*, 1980) identificaron al dinoflagelado *Dinophysis fortii* como el principal causante de este síndrome en Japón. A partir de entonces, se intensificaron las observaciones sobre las especies del género *Dinophysis*, que debido a su escasez y/o estacionalidad, habían suscitado relativamente poca atención en el pasado. Hasta principios de la década de los 90, se ignoraba la existencia de procesos sexuales en especies del género *Dinophysis*. Jorgensen (1923) fue el primero en citar la coexistencia, en muestras de campo, de dos clases de talla de *Dinophysis schuetii* Murray & Whitting. Posteriormente Taylor (1976) observó el mismo fenómeno en *D. swezyae* Kofoid et Skogsberg.

En el presente capítulo se hace una descripción morfológica de las principales especies de *Dinophysis* asociadas a la presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos (DST = Diarrhetic Shellfish Toxins) en las costas gallegas, su variabilidad morfológica intraespecífica, y los procesos que contribuyen a esta variabilidad. La descripción incluye:

- Descripción general de la especie basada en las fuentes y/o en revisiones detalladas del género (Abé, 1967; Balech, 1976 y 1988; Dodge, 1982; Jorgensen, 1923; Kofoid, 1907; Kofoid & Skogsberg, 1928; Larsen & Moestrup, 1992; Paulsen, 1949; Solum, 1962; Sournia, 1986; Taylor, 1976; Wood, 1954).

- Descripción de los morfotipos observados en Galicia, con especial énfasis en observaciones originales de distintos estadios del ciclo vital, del ciclo celular, y distintos morfotipos de la misma especie observados durante proliferaciones de *Dinophysis* en las rías.

Estas descripciones contribuyen al estudio de la variabilidad morfológica intraespecífica de estas especies, fuente de incertidumbre en la clasificación rutinaria de los programas de seguimiento de especies potencialmente tóxicas. Las descripciones también resultan útiles para llenar lagunas de conocimiento sobre el ciclo vital de las especies del género. En el capítulo 3 se analiza en detalle el proceso de la formación de células pequeñas e intermedias de *Dinophysis spp.* y su posible función como estrategia reproductora y de crecimiento frente a distintas condiciones ambientales. Se interpretan las distintas formas observadas y se presenta un ciclo sexual hipotético que se cree común para todas las *Dinophysis* analizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las observaciones presentadas en este capítulo se hicieron sobre muestras de fitoplancton de las Rías de Vigo y Pontevedra (Rías Bajas Gallegas) y la Ría de Ares (Rías Altas) de la comunidad de Galicia, procedentes de muestreos semanales del programa de «Investigación y Control de Mareas Rojas» del IEO (hasta 1992), de muestreos mensuales del Programa «Radiales» del Instituto Español de Oceanografía, y de muestreos semanales rutinarios del programa de seguimiento del «Centro de Control do Medio Mariño» de la Xunta de Galicia (a partir de 1992). Otras observaciones se hicieron sobre el material recogido en el transcurso de muestreos intensivos de 24 h diseñados para estudios de crecimiento *in situ*. En contadas ocasiones se trabajó con muestras de agua que se concentraban en el laboratorio mediante filtración inversa (Anexo I).

Se observaron muestras de arrastres verticales de red, tomados con malla de 10-20 μm , tanto en vivo como fijados con formol neutro, muestras tomadas con botellas de inversión y muestras integradas (0-15 m) tomadas con manguera (Lindahl, 1986) fijadas con lugol ácido. Las muestras de agua (botella o manguera) concentradas en el laboratorio por filtración inversa se emplearon preferentemente para aislamiento de células vivas por micromanipulación e incubaciones posteriores en cámaras de cultivo celular.

Las observaciones se hicieron con un microscopio óptico ZEISS AXI OVERT 135, dotado de lámpara de epifluorescencia con aumentos de 100 y 400 x. Para las observaciones de núcleos, se emplearon muestras de arrastres de red cuidadosamente escurridos y resuspendidos en metanol helado, que se mantenían en el congelador hasta el momento de análisis. Las muestras mantenidas en metanol se centrifugaron

y resuspendieron en solución de tampón fosfato (PBS) dos veces y se tiñeron con el fluorocromo DAPI (2'4-diamidino-2-fenilindol) según el método de Carpenter & Chang (1988); posteriormente se observaron alícuotas al microscopio de epifluorescencia con filtro de excitación ultravioleta. Para el análisis morfométrico de *D. acuminata* en 1991 (Bravo *et al.*, 1995a) se tomaron micrografías que se revelaron en papel. Las mediciones de la longitud (L), del ancho dorso-ventral de la hipoteca (H) y de la convexidad (alfa) de la gran placa hipotecal se tomaron manualmente a partir de las fotos debidamente calibradas. A los datos obtenidos se les aplicó, mediante un paquete estadístico SPSS, un análisis de cluster empleando un método centroide, es decir, un método en el que se consideran las distancias de cada punto del contorno a un punto central de la hiperesfera denominado centroide. Las medidas de L y H de *D. acuminata* correspondientes a los ciclos celulares de junio y octubre de 1994 se hicieron directamente al microscopio mediante un ocular micrométrico. A los datos se les aplicó un análisis de escala multidimensional (Clarke & Warwick, 1994). Para la obtención de cada valor medio se midieron aproximadamente 50 ejemplares. Las mediciones de los ejemplares de 1998 se hicieron a partir de imágenes digitalizadas de las células obtenidas con un sistema de video (SONY Hi Resolution CCD-IRIS) conectado al microscopio y a un ordenador con un programa de análisis de imagen (IPPLUS 4.0).

RESULTADOS

De la Fig. 2.4 a la Fig. 2.12 se presentan micrografías de células de las especies más frecuentes de *Dinophysis* en la costa gallega y sus formas pequeñas. Se incluyen también algunas imágenes de especies de *Dinophysis* de otras partes del mundo, para contrastar diferencias morfológicas entre morfotipos de la misma especie en distintas regiones.

Descripción morfológica de las principales especies del género *Dinophysis* en las costas gallegas.

A continuación se describen las células vegetativas típicas de las 7 especies de *Dinophysis* más comunes en las costas de Galicia: *Dinophysis acuminata*, *D. sacculus*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. tripos*, *D. rotundata* y *D. fortii*, y algunas de las formas pequeñas de estas especies (*D. skagii*, *D. dens*, *D. diegensis*, *D. diegensis* var. *curvata* y *D. parvula*).

***Dinophysis acuminata* Claparède et Lachmann**

Principales sinónimos:

D. acuminata var. *granulata*? Jorgensen

D. simplex Böhm

D. lachmannii Paulsen, *D. borealis* Paulsen, *D. bohemi* Paulsen, *D. böhmi* Paulsen

Descripción morfológica

Célula de talla pequeña-mediana (L: 38-58 μm), más o menos ovalada y alargada (Figs. 2.4A-C). El margen dorsal es convexo y el margen ventral ligeramente convexo. La anchura máxima (H) se sitúa cerca del punto medio de la longitud máxima (L). El antápice es redondeado y puede presentar 2-4 pequeñas protuberancias o nódulos. La ASI no es muy grande y su R3 se extiende hasta la mitad o los 2/3 de la longitud máxima de la hipoteca. La epiteca es baja, plana o ligeramente convexa, y no es visible en presentación lateral. Placas hipotecales con areolas circulares prominentes con un poro en casi todas ellas (tipo E). Cloroplastos presentes. Los rasgos que se suelen considerar para la clasificación de esta especie son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas de las grandes placas hipotecales. Cociente L:H
- Contorno y convexidad del margen dorsal
- Tamaño y aspecto de la ASI

Los ejemplares de esta especie en Galicia presentaron una gran variabilidad en el tamaño y forma de sus grandes placas hipotecales, Se observaron con frecuencia formas intermedias difíciles de identificar como *D. acuminata* o *D. sacculus*.

Los resultados del análisis de *cluster* aplicado a las medidas (longitud, anchura, convexidad del margen dorsal) de 124 individuos tomados durante distintas épocas del año (entre junio y diciembre) en las rías gallegas en 1991 (Bravo *et al.*, 1995a), agruparon a los individuos en tres morfotipos:

- F1 (\bar{L} : 43.2 μm , \bar{H} : 25 μm), predominante en la proliferación de septiembre (82%). Corresponde a un tipo de *Dinophysis* de pequeña talla, alargado ($\bar{L}:\bar{H} = 1.72$), con el margen dorsal casi recto, difícil de adscribir a la descripción de *D. acuminata* o de *D. sacculus*, similar al de la Fig. 2.4C.
- F2 (\bar{L} : 49 μm , \bar{H} : 34 μm), predominante en la proliferación de junio (54%) junto con F3 (42%). Corresponde a la descripción típica de célula vegetativa de *D. acuminata*, de buen tamaño, margen dorsal claramente convexo y cociente $\bar{L}:\bar{H} = 1.44$, similar a la Fig. 2.4A
- F3 (\bar{L} : 46.5 μm , \bar{H} : 32.5 μm), predominante (79%) en una proliferación tardía en diciembre. Fue el morfotipo que presentó una mayor convexidad dorsal; células voluminosas, más cortas que las del tipo F2 y con el valor mínimo del cociente $\bar{L}:\bar{H}$ (1.43), similar a la Fig. 2.4.B

En la Tabla 2.1 se presentan las medias, error estándar, y rango de tallas obtenidos en posteriores mediciones de *D. cf acuminata* de las rías de Pontevedra y Vigo,



Fig. 2.4 Micrografías (contraste de fase, 630X) de distintas formas celulares de *D. acuminata* (A-D) de las Rías Bajas gallegas y *D. sacculus* de las Rías Altas (E). A. Ejemplar grande de célula vegetativa de *D. acuminata*; B. Célula vegetativa de tamaño medio recién dividida con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izquierda, cargada de vacuolas digestivas; C. Célula vegetativa de pequeño tamaño con aspecto intermedio entre *D. acuminata* y *D. sacculus*; D. *D. skagii*, célula pequeña con función de gameto de *D. acuminata*; E. *D. sacculus* típica con silueta similar a una alubia riñón.

así como de individuos mantenidos en laboratorio. En muestras de campo, los valores máximos se observaron en junio del 94 (\bar{L} : 53 μm , \bar{H} : 36.3 μm ; $\bar{L}:\bar{H}$ = 1.46, n = 50), y septiembre del 98 (\bar{L} : 51.5 μm , \bar{H} : 35.9 μm ; $\bar{L}:\bar{H}$ = 1.43, n = 45) y los mínimos en octubre del 94 (\bar{L} : 45.3 μm ; \bar{H} : 28.8 μm ; $\bar{L}:\bar{H}$ = 1.57). En poblaciones naturales, concentradas por filtración inversa y mantenidas en laboratorio, se pudo observar una gran variación en la composición de tallas a los 6 días. Si bien la población inicial, formada por células vegetativas de *D. acuminata* de buen tamaño era relativamente homogénea, a los pocos días aparecieron células pequeñas similares a *D. skagii*. Se obtuvieron observaciones similares en incubaciones de individuos aislados por micromanipulación y mantenidos en pocillos de cámaras de cultivos de tejidos (ver capítulo 3).

Tabla 2.1. Longitud y anchura (medias y desviación estándar), rangos de talla observados y cociente L:H medidos en distintas especies de *Dinophysis* de la costa gallega.

Especie	Fecha	n	Longitud \bar{L} (μm)	Anchura \bar{H} (μm)	Rango L	Rango W	Cociente L:W
<i>D. acuminata</i>	06.91	56	49.1 \pm 2.8	34.2 \pm 3.4			
	09.91	44	43.2 \pm 1.9	25.1 \pm 2.6			
	12.91	24	46.5 \pm 2.1	32.5 \pm 3.2			
	06.94	50	53.0 \pm 3.5	36.3 \pm 3.8			1.46
	09.94	50	45.3 \pm 2.7	28.8 \pm 2.9			1.47
<i>D. acuta</i>	09.98	45	51.5 \pm 3.6	33.9 \pm 3.8	44.1-58.7	24.3-43.4	1.44 \pm 0.1
	09.89	22	73.8 \pm 2.3	54.9 \pm 3.4	68.9-77.7	48.6-59.5	1.34 \pm 0.06
<i>D. caudata</i>	10.97	49	68.7 \pm 3.4	51.9 \pm 3.6	59.6-74.9	42.8-63.3	1.33 \pm 0.07
	10.94	50	90 \pm 4	47 \pm 4	85-100	41.3-65.1	1.91 \pm 0.1
<i>D. fortii</i>	10.97	50	90 \pm 4	45 \pm 4	82-103	32.4-56.2	1.99 \pm 0.2
	09.99	58	62.4 \pm 2.1	43.6 \pm 2.9	58.3-68.5	36.5-50.4	1.4 \pm 0.08
<i>D. rotundata</i>	10.99	65	61.4 \pm 3.6	41.8 \pm 4.5	48.8-67.3	28.2-50.6	1.5 \pm 0.12
	09.94	43	37.4 \pm 3.5	41.9 \pm 2.5	31.6-52.8	38.2-52.7	0.9 \pm 0.05
<i>D. tripos</i>	10.94	20	130.3 \pm 4.4	71.8 \pm 2.42	120.5-138.5	67.3-75.9	1.82 \pm 0.07

Datos ecológicos y biogeográficos

Especie costera cosmopolita, con amplia distribución geográfica en aguas templadas y frío-templadas del océano Índico, Pacífico (costa oeste de EE UU, sur de Chile, Japón, Tasmania, Nueva Zelanda) y del Atlántico (Uruguay, Argentina, Suráfrica), incluyendo toda la costa europea, donde constituye la especie más abundante del género. También presente en el mar Mediterráneo y el Adriático, donde se confunde fácilmente con *D. sacculus*. Durante los proliferaciones suele alcanzar concentraciones que oscilan entre 10^3 - 10^5 cel \cdot l⁻¹ pero en años excepcionales se han detectado auténticas mareas rojas de esta especie, con valores hasta 10^6 cel \cdot l⁻¹ en la costa holandesa en la Ensenada Sur del Mar del Norte (Kat, 1979), costa oeste de Escocia (Anonymous, 1993; MacDonald, 1994), y costa sur de Noruega mezclada con *D. acuta* y *D. norvegica* (Dahl *et al.*, 1996). Es la especie más abundante y persistente del género en las rías gallegas. El valor máximo detectado ha sido 35×10^3 cel \cdot l⁻¹ en una muestra integrada (10-15 m) en la parte central de la Ría de Vigo en 1991 (Reguera, datos no publ.).

Dinophysis skagii Paulsen

Sinónimos:

D. amygdalus? Paulsen

Descripción Morfológica

Células pequeñas (L: 35-45 μm) y escasamente pigmentadas, en las que el núcleo ocupa una gran parte del volumen total (Fig. 2.4D). Epiteca convexa. Margen dorsal

convexo y oblicuo. El margen ventral muestra una curvatura más brusca que el dorsal en visión lateral. Aletas sulcales pequeñas y de aspecto delicado, nódulos antapicales presentes ocasionalmente.

Debido a su escasez, los trabajos de variabilidad morfológica de este «especie» son inexistentes. Se observan a veces, durante floraciones de *D. acuminata* en las rías gallegas, formas intermedias difíciles de adscribir a *D. acuminata* o a *D. skagii*. *D. skagii* apareció siempre coincidiendo con *D. acuminata*. En una sección posterior se presentan evidencias de que *D. skagii* no es sino un estadio del ciclo vital de *D. acuminata* y en el capítulo 3 se muestra la aparición de individuos muy similares a *D. skagii*, de $31.6 \pm 2.7 \mu\text{m}$ de largo, a partir de incubaciones de células vegetativas de *D. acuminata*.

***Dinophysis sacculus* Stein**

Sinónimos:

Dinophysis acuminata f. *reniformis* Pavillard

Dinophysis pavillardii Schröder

Dinophysis reniformis (Pavillard) Kofoid & Skogsberg

Dinophysis ventrecta Schiller

Dinophysis phaseolus Silva

Descripción Morfológica

Células pequeñas (L: 40-60 μm), irregularmente ovaladas, con margen dorsal recto u ondulado, con una concavidad que le confiere a la célula un típico aspecto de cacahuete o de alubia riñón (Fig. 2.4E). Ocasionalmente presenta nódulos o protuberancias en la región antapical cerca del margen ventral. El margen ventral también es ondulado, convexo en la mitad anterior y a veces cóncavo en la mitad posterior. La ASI no es muy grande, alcanzando como máximo la mitad de la longitud de la hipoteca. Hipoteca cubierta de pequeños poros, irregularmente diseminados, rodeados o no de prominentes areolas (Zingone *et al.*, 1998). Anchura máxima de la placa hipotecal entre la R2 y R3 o incluso más abajo, lo que le da un aspecto típico de saco. Cloroplastos presentes. Los detalles a considerar son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas de las grandes placas hipotecales, cociente L:H.
- Contorno y concavidad del margen dorsal
- Antápice no afilado como en *D. acuminata*, sino con aspecto de saco
- Ornamentación de las placas hipotecales

La principal diferencia entre *D. sacculus* y *D. acuminata* es que la primera presenta un margen dorsal recto o cóncavo, y una cierta forma de saco, con su centro de gravedad en la mitad posterior de la gran placa hipotecal. *D. acuminata* tiene un

margen dorsal convexo y su silueta se afina hacia el antápice. Presenta una gran variabilidad de forma en su contorno, lo que justifica la gran lista de sinónimos con que ha sido denominada, y que ha sido detalladamente revisada por Zingone *et al.* (1998). Entre los ejemplares gallegos, el *D. sacculus* con forma de alubia de riñón se observó tan solo en las Rías Altas, al norte de Cabo Finisterre. En las Rías Bajas se observaron formas intermedias entre la descripción de *D. acuminata* y *D. sacculus*, de difícil clasificación (Bravo *et al.*, 1995 a, b).

Datos ecológicos y biogeográficos

Especie de distribución más costera que *D. acuminata*, de aguas cálido-templadas. Muy común en la costa Mediterránea, el Adriático y en la costa Atlántica de la península Ibérica y Francia, donde alcanza densidades de $2-3 \times 10^4$ cel · l⁻¹. Curiosamente, no existen citas de esta especie fuera de Europa.

***Dinophysis acuta* Ehrenberg**

Descripción Morfológica

Células de tamaño medio-grande (L: 50-95 µm). Los 2/3 anteriores de la hipoteca van gradualmente aumentando en anchura en dirección hacia el extremo antapical, dándole un aspecto «barrigudo» (Fig. 2.5a). El tercio posterior forma un triángulo de vértice redondeado. La parte más ancha de la hipoteca se sitúa por debajo del punto medio de la longitud máxima. El margen ventral de la hipoteca es recto o ligeramente convexo hasta la base de la R3, a partir de donde gira abruptamente hacia el margen dorsal hasta formar un ángulo en la región antapical. El margen ventral se curva gradualmente hasta llegar al antápice. La ASI es amplia y vigorosa. Areolas hexagonales muy prominentes y con poro (tipo E). Epiteca no visible en presentación lateral. Cloroplastos presentes. Los caracteres utilizados en su identificación son:

- Longitud (L) y anchura (H); cociente L:H
- Convexidad del margen dorsal
- Distancia desde la línea de anchura máxima hasta el antápice
- Forma angulosa del antápice

D. acuta se puede confundir con *D. norvegica* (Fig. 2.6A) en regiones de aguas frías donde ambas especies coexisten. No obstante, *D. norvegica* presenta su anchura máxima hacia la mitad de la longitud máxima de la gran placa hipotecal, es de menor talla y la teca es de aspecto más tosco. Otra especie muy similar a *D. acuta* es *D. schroederi*, considerada por Balech (1988) una variante de aguas cálidas de la primera.

Las células de *D. acuta* de las costas gallegas (L: 59.6-77.7; H: 42.8-63.3) representan un morfotipo de tamaño moderado si se compara con el rango superior (95 µm) de la descripción general de la especie. Presentaron cierta variabilidad de talla y del

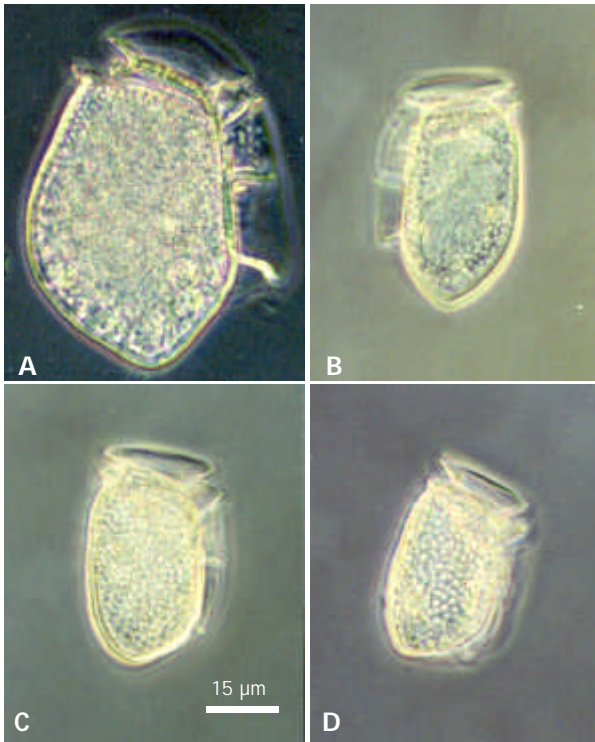


Fig. 2.5 Micrografías (contraste de fase, 400 X) de *Dinophysis acuta* de las Rías Bajas gallegas: A. Célula vegetativa típica; B-C. Formas intermedias entre *D. acuta* y *D. dens*; D. *D. dens*, célula pequeña con función de gameto, de *D. acuta*.

cociente L:H, pero la forma de la célula era siempre bastante regular, no ocasionando grandes problemas en la identificación. El problema de la coincidencia de *D. acuta* con *D. norvegica* o con *D. schroederi* no ocurre en la costa Atlántica de la Península Ibérica, pero podría presentarse en la costa Mediterránea, donde sí ha sido citada *D. schroederi* (Rampi & Bernhard, 1980).

Datos ecológicos y biogeográficos

Distribución nerítica. Ampliamente registrada en aguas frías y templadas del Pacífico (Chile, Nueva Zelanda) y de la costa Atlántica europea (excepto en la parte sur del Mar del Norte). En la península Ibérica se presenta sobre todo en la costa galaico-portuguesa (Reguera *et al.*, 1993b, Palma *et al.*,

1998), donde los máximos de esta especie aparecen en masas de agua con estrechos márgenes de salinidad (>34.5 psu) y temperatura (15-17 °C). La concentración máxima observada en muestras integradas dentro de las rías fue de $52 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Anonymous, 1996). En las Rías Altas (norte del Cabo Finisterre) aparece en números muy bajos y nunca asociada con episodios de DST. En países noreuropeos (Irlanda, Noruega, Suecia...) y en el Sur de Chile (regiones X y XI) aparece a finales de verano-principios de otoño en rías y fiordos cuando la temperatura del agua superficial y la estratificación alcanzan su máximo anual.

***Dinophysis dens* Pavillard**

Sinónimos

Dinophysis vermiculata ? Pouchet

Descripción morfológica

Células de tamaño mediano-pequeño (L: 45-60 µm; H: 31-35 µm), y muy poco pigmentadas, en las que el núcleo ocupa una gran parte del volumen total (Fig. 2.5D). Epiteca aplastada en vista lateral. Hipoteca subtrapeciforme de ancho casi cons-



Fig. 2.6. Micrografías (campo claro, 630 X) de *Dinophysis* spp del Gullmarfjord (Skagerrak, Suecia). A. *Dinophysis norvegica*; B. *D. acuta*, indistinguible de los morfotipos de la costa gallega. (1 mm = 0.90 micras)

tante. El margen dorsal es recto en la primera mitad, y después gira suavemente hacia el extremo antapical. Margen ventral recto hasta la base de la ASI, a partir de donde gira formando un ángulo hacia el extremo antapical. Antápice puntiagudo. ASI larga, y estrecha entre los costillas R2 y R3. Aletas cingulares lisas sin costillas. Lanceolada y angosta en vista frontal. Ornamentación de poroides muy diminutos.

En las Rías Gallegas, *D. dens* aparece siempre acompañando a *D. acuta* y representando numéricamente un pequeño porcentaje de ésta (1-10%) excepto contadas excepciones. Son células de menor tamaño que *D. acuta*, de quien se distinguen fácilmente por el margen dorsal casi recto y oblicuo, las aletas sulcales más delicadas, casi hialinas, y estrechas, y por la forma trapezoidal de la hipoteca. Se han observado formas intermedias entre *D. acuta* y *D. dens* (Figs. 2.5B,C) difíciles de adscribir a una u otra morfoespecie. Existe, pues, un *continuum* de formas entre *D. acuta* y *D. dens*, del cual *D. dens* constituye el límite inferior de tamaño. Las observaciones de muestras de campo, así como los resultados de incubaciones de laboratorio en las que se obtuvieron individuos de *D. dens* a partir de células de *D. acuta* aisladas por micromanipulación (Reguera *et al.*, 2002) evidencian que *D. dens* no es sino un estadio del ciclo vital de *D. acuta* que actúa como gameto negativo (donador).

***Dinophysis caudata* Saville Kent**

Sinónimo principal

Dinophysis homunculus Stein

Descripción morfológica

Células grandes (L: 70-110 μ m), de forma subovalada irregular, con una larga y llamativa proyección o proceso ventral o antapical (Fig. 2.7A, F). El margen ventral

de la hipoteca es recto o ligeramente ondulado hasta la R3 de la ASI. A partir de este punto, sufre un brusco giro hacia el margen dorsal para formar el proceso antapical. El contorno del margen dorsal es muy variable, pero presenta siempre una curva más o menos abrupta en su mitad posterior dirigida hacia el proceso antapical. La aleta cingular anterior es ancha, troncocónica, con forma de embudo y provista de numerosos costillas. La ASI es grande y ancha, y con una pronunciada nerviación en los individuos adultos. Es frecuente observar células en parejas a cualquier hora del día. Placas hipotecales con areolas circulares o hexagonales muy marcadas y con poro (tipo E). La epiteca no es visible en presentación lateral. Poseen cloroplastos. Ocasionalmente se observan células fuertemente pigmentadas y con una densa vacuolación. Los detalles a considerar son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas; cociente L:H.
- Contorno del margen dorsal
- Contorno de la curva formada entre el extremo posterior del margen dorsal y el proceso antapical
- Longitud de la proyección antapical
- Anchura de la ASI

D. caudata presenta una gran variabilidad morfológica entre los ejemplares distribuidos en distintas partes del mundo, lo que justifica la enorme lista de sinónimos con los que fue denominada en el pasado (Kofoid & Skogsberg, 1928). Las principales fuentes de variabilidad en la especie son la longitud y forma del proceso antapical respecto al cuerpo principal, el cociente L:H y la envergadura de la ASI. Algunos morfotipos presentan recto el tercio anterior del margen dorsal y recto o ligeramente convexo, casi paralelo al margen ventral, los dos tercios posteriores (Fig. 2.7F); otros morfotipos presentan una curvatura gradual en todo el margen dorsal hasta llegar a la base del proceso antapical. Otro detalle que puede presentar grandes variaciones es el giro que se origina entre el extremo posterior del margen dorsal y el comienzo del proceso antapical, ya que en algunas formas intermedias es casi inexistente observándose una curvatura continua desde el margen dorsal hasta el antápice.

Las dimensiones de los individuos de aguas gallegas (Fig. 2.7A) fueron L: 82-103 μm ; H: 32-65 μm . En estos morfotipos, en visión lateral izquierda, el margen dorsal es convexo, y gira gradualmente hasta llegar a la base (o zona más ancha) del proceso. Se trata de individuos cortos y robustos, similares a la var. *abbreviata* de Jorgensen (1923), con un cociente L:H de 1.7-2.2, y proceso antapical relativamente corto, menos estilizados que los morfotipos observados en aguas más cálidas similares a la descripción de *D. caudata* alias *Allieri* f^a *speciosa* (Jorgensen, 1923). No se observaron diferencias significativas en la morfología de individuos de *D. caudata* procedentes de dos episodios, distanciados 3 años entre sí, pero desarrollados en la mis-

ma época otoñal (segunda quincena de octubre), y en muestras tomadas a la misma hora del día (6.30 GMT).

Datos ecológicos y biogeográficos

Especie cosmopolita fundamentalmente nerítica, e incluso oceánica, pero ocasionalmente abundante en aguas costeras tropicales, subtropicales y cálido-templadas del Mar Caribe, océanos Pacífico (California, México, Costa Rica, Perú, Chile, Tailandia, Japón, Australia), Índico (India, Mozambique, Madagascar) y Atlántico (Brasil, Uruguay, Marruecos, Península Ibérica), Mar Arábigo y Golfo Pérsico. Común en el Mediterráneo, y estacionalmente (finales de verano-principios de otoño) en la costa Atlántica y Mar Cantábrico en la Península Ibérica. Suele aparecer en concentra-

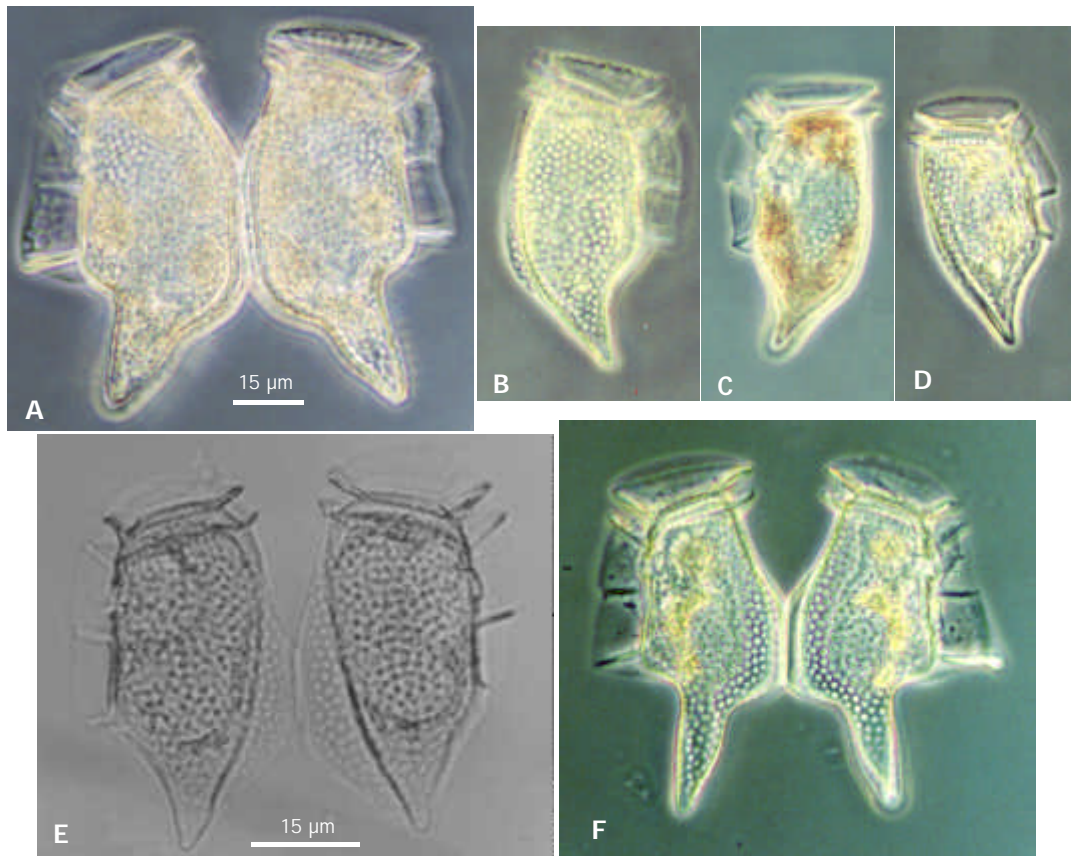


Fig. 2.7. A-D. Micrografías de *D. caudata* de la costa gallega (contraste de fase, 400X): A. Pareja de células vegetativas similares a *D. caudata* var. *abbreviata* (en Jorgensen, 1923); B-C. Formas intermedia entre *D. caudata* y *D. diegensis*; D. *D. diegensis*, célula pequeña con función de gameto de *D. caudata*. E. Micrografía (campo claro, 630 X) de una pareja de *D. diegensis* formada tras división depauperante de *D. caudata*, mostrando aún restos de la porción de las placas hipotecales de la célula madre de *D. caudata* que sobresale de las placas recién formadas de *D. diegensis*. F. Pareja de células vegetativas de *D. caudata* (contraste de fases, 400 X) de la costa Mediterránea de Marruecos, de silueta más estilizada similar al *D. caudata* alias *Allieri* f^a *speciosa* de Jorgensen (1923).

ciones moderadas ($< 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), pero en años excepcionales se han registrado hasta $3.5 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en las costas gallegas (Anonymous, 1996).

***Dinophysis diegensis* Kofoid**

Descripción morfológica

Células de tamaño mediano (L: 50-68 μm), y escasamente pigmentadas, en las que el núcleo ocupa una gran parte del volumen total (Fig. 2.7D). Los márgenes ventral y dorsal de la hipoteca son casi paralelos hasta la base de la R3 en la ASI. El margen dorsal es ligeramente convexo y presenta una curvatura continua. En el margen ventral, a partir de R3, la hipoteca se estrecha abruptamente dando un ápice puntiagudo, ligeramente redondeado (Kofoid, 1907). Presenta una protuberancia alrededor del poro flagelar. Placas hipotecales con ornamentación indistinguible de la de *D. caudata* en observaciones al microscopio electrónico de barrido (Delgado *et al.*, 2000). Plasma hialino y epiteca muy corta indistinguible en vista lateral.

Dada su escasez, no existe información sobre su variabilidad intraespecífica. No obstante, en las costas gallegas se ha observado un *continuum* de formas (Fig. 2.7B,C) cuyos extremos serían la célula vegetativa típica de *D. caudata*, y la célula de *Dinophysis diegensis* según la descripción de Kofoid (1907) (ver capítulo 3). Las observaciones de muestras de campo, así como los resultados de incubaciones de laboratorio en las que se obtuvieron individuos de *D. diegensis* a partir de células de *D. caudata* aisladas por micromanipulación (Reguera *et al.*, 2002) evidencian que *D. diegensis* no es sino un estadio del ciclo vital de *D. caudata* que actúa como gameto negativo (donador).

***Dinophysis tripos* Gourret**

Células grandes (L: 95-120 μm), asimétricas, con dos proyecciones antapicales, la ventral mucho más larga que la dorsal (Fig. 2.8A). Margen ventral de la hipoteca recto o ligeramente ondulado hasta la base de la R3 en la ASI, a partir de la cual gira abruptamente ($>90^\circ$) hacia el margen dorsal para formar la proyección antapical ventral. El margen dorsal es recto en su tercio anterior, después oblicuo hacia fuera, y después recto de nuevo (a modo de una S muy estirada y aplanada), formando la proyección dorsal. La aleta cingular anterior es amplia, troncocónica, formando un embudo armado de numerosos costillas. La ASI es grande y ancha. Las placas hipotecales poseen areolación tipo E. La epiteca no es visible en presentación lateral. Poseen cloroplastos. El principal carácter morfológico que diferencia a *D. caudata* de *D. tripos* (Fig. 2.8A) es que esta última posee dos proyecciones antapicales: una ventral o antapical, similar a la única de *D. caudata*, y otra proyección dorsal de menor tamaño. Pero a veces se presentan individuos con la proyección dorsal muy reducida - posiblemente formas intermedias de *D. tripos* - difíciles de clasificar como *D. caudata* o *D. tripos* (Fig. 2.8B). Detalles a considerar son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas de las grandes placas hipotecales. Cociente L:H.
- Contorno del margen dorsal.
- Contorno y longitud de la proyección dorsal.
- Longitud de la proyección ventral antapical.
- Ancho de la ASI .

Esta especie se ha detectado estacionalmente, en bajas concentraciones, y no todos los años, en las Rías Gallegas. Los ejemplares gallegos medidos (L: 120.5-138.5 μm ; H: 67.3-75.9 μm) mostraron un gran tamaño en relación con la descripción general, pero al ser una especie poco abundante, la información disponible es escasa. A veces se observaron individuos difíciles de clasificar como *D. caudata* o *D. tripos*, ya que tenían el aspecto de un *D. tripos* que hubiera perdido casi por completo la proyección antapical dorsal (Fig. 2.8b). No obstante, la clave para no confundir a ambas especies en estos casos es la observación del margen dorsal claramente distinto de *D. tripos* con su parte anterior recta y posterior curvatura hacia fuera.

Datos ecológicos y biogeográficos

Especie costera, nerítica y oceánica, ampliamente distribuida en aguas cálidas y templadas del Atlántico y el Pacífico, y en el Mediterráneo, y ocasionalmente en aguas más frías. En la Península Ibérica aparece en concentraciones muy bajas (<200 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) acompañando a *D. caudata*, pero no todos los años.

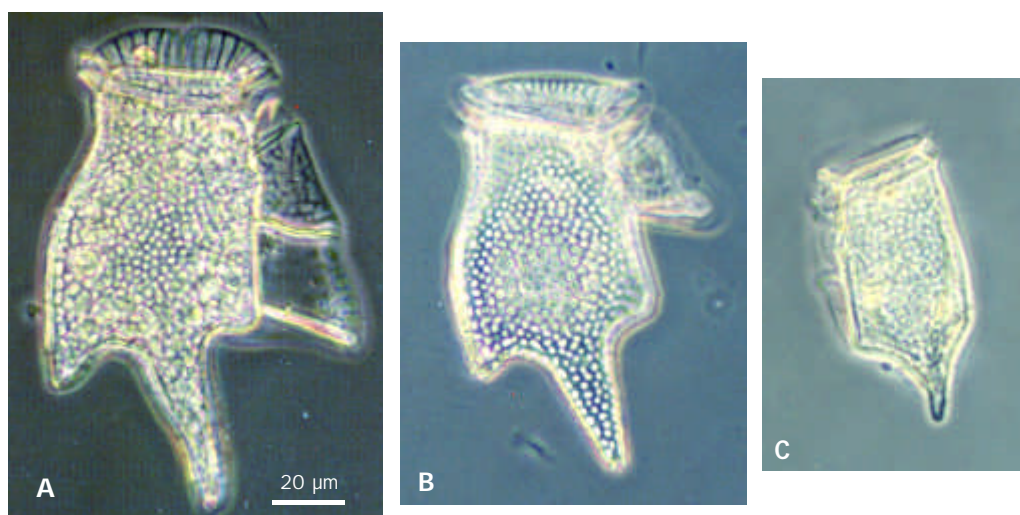


Fig. 2.8 Micrografías (contraste de fase, 400 X) de *Dinophysis tripos* de la costa gallega. A. Célula vegetativa típica de *D. tripos*; B. Forma intermedia recién dividida, con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izquierda (ASI), que muestra el proceso dorsal poco pronunciado. C. Célula pequeña, posiblemente con función de gameto, de *D. tripos*, y que ha sido denominada *D. diegensis* var. *curvata*.

Dinophysis fortii Pavillard

Sinónimos:

Dinophysis intermedia Pavillard

Descripción Morfológica

Células grandes (L: 60-80 μm) subovaladas, con el margen ventral muy recto hasta la base de R3 en la ASI, girando posteriormente para dar lugar a un antápice amplio y redondeado. Aleta sulcal izqda. reticulada (Fig. 2.9A). Placas hipotecales con areolas hexagonales muy marcadas y con poro (tipo E). Epiteca no visible en visión lateral. Cloroplastos presentes. Los detalles a considerar son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas; cociente L:H
- Convexidad del margen dorsal.
- Margen ventral muy recto hasta la base de la R3
- Reticulación característica de la ASI

Las medidas de los ejemplares de la costa gallega, que fueron L: 48.8-68.5 μm ; H: 28.2-50.6 μm , indican que se trata de un morfotipo relativamente pequeño con células mucho menores que el límite inferior dado en la descripción general de la especie. No se observó una variabilidad apreciable de forma en estos ejemplares, lo que se debe en parte a su escasez, y a que esta especie no se presenta con regularidad todos los años en estas latitudes.

Datos ecológicos y biogeográficos

Especie nerítica y oceánica, ampliamente distribuida en mares templados y fríos del Pacífico (Japón, Australia, Tasmania, California), Atlántico (Brasil, Península Ibérica) y Mediterráneo, pero también se puede encontrar en aguas tropicales y subtropicales. En Europa abunda sobre todo en el Mar Adriático. Presente esporádicamente en concentraciones muy bajas en la costa galaico-portuguesa. Su aparición en Australia, California y norte de Japón se asocia con el transporte de masas de agua cálida en primavera y principios de verano.



Dinophysis rotundata Claparède & Lachmann

Sinónimos:

Phalacroma rotundatum Kofoid & Michener

Dinophysis whittingae Balech

Fig. 2.9 Micrografía (contraste de interfase diferencial, 400 X) de *Dinophysis fortii* de las costas gallegas.

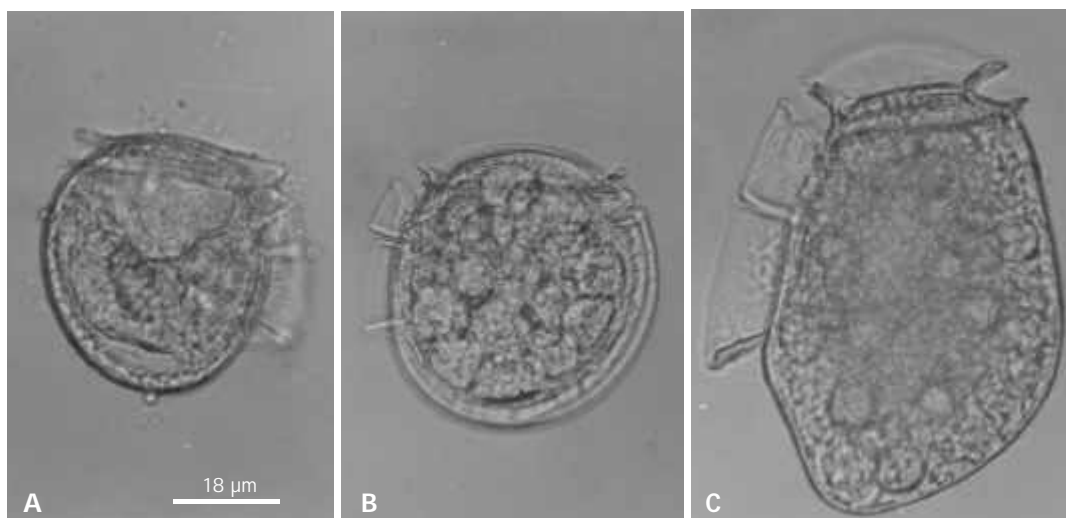


Fig. 2.10 Micrografías de *Dinophysis* spp de la costa gallega (campo claro, 630 X): A. Células vegetativa típica de *Dinophysis rotundata*: B. Célula de *D. rotundata* y D. Célula de *D. acuta* ambas repleta de vacuolas digestivas.

Descripción Morfológica

Célula de talla media (L: 36-56 µm), circular, ligeramente ovalada y asimétrica en vista lateral, y elipsoidal en vista apical (Fig. 2.10a). La epiteca es baja, uniformemente redondeada y visible en visión lateral. Este carácter, unido a la ausencia de cloroplastos, condujo a algunos taxónomos a incluir a esta especie en el género *Phalacroma*. Aletas cingulares estrechas y sin costillas. Las aletas sulcales son relativamente estrechas, y largas (3/5 - 1/1 de L). La anchura máxima se encuentra entre las R2 y R3 de la ASI. Placas hipoteczales con areolas muy finas con poro en una de cada grupo de 5-10 areolas (tipo A). Especie que se puede confundir con *D. rudgei*, de la que se diferencia por tener la epiteca más baja. Los detalles a considerar son:

- Longitud (L) y anchura (H) máximas; cociente L:H
- Altura de la epiteca
- Areolación de las placas hipoteczales

Especie poco abundante pero frecuente en Galicia. Las medidas de los ejemplares gallegos fueron L: 31.6-52.8 µm y H: 38.2-52.7 µm. No se observaron variaciones apreciables de forma; tan sólo pequeñas variaciones de talla y ejemplares fuertemente pigmentados y cargados de vacuolas digestivas.

Datos ecológicos y biogeográficos

Ampliamente distribuida en aguas templadas y frías del Pacífico, y en toda la costa Atlántica de Europa. Presente todo el año en concentraciones muy moderadas (<200 cel · l⁻¹) y con frecuencia en aguas más profundas que otras especies de *Dinophysis* mixótrofas o pigmentadas. Las concentraciones récord en Europa (20 · 10³ cel · l⁻¹) se han registrado en la costa holandesa del Mar del Norte (Anonymous, 1993).

***Dinophysis parvula* (Schütt) Balech**

Sinónimos:

Phalacroma prodictym Stein var. *parvula* Schütt

Phalacroma parvulum (Schütt) Jorgensen

Células pequeñas (L: 36-45 μm), elípticas u ovaladas, anchas en visión lateral; epiteca redondeada visible, región apical redondeada y a veces ligeramente más aguda que la región apical. Aletas cingulares lisas y angostas (aunque a veces pueden presentar algunos radios muy cortos). La ASD se extiende hasta el punto medio de la distancia entre R2 y R3; la ASI izquierda es de costillas finas que aumentan ligeramente su longitud de la R1 a la R3. Paredes tecales gruesas con areolas pequeñas y poros dispersos. Teca oval ancha en vista frontal.

Dada su escasez en Galicia, no se dispone de datos morfométricos. Aparece coincidiendo con *D. rotundata*, especie de células con silueta similar pero más grande y con costillas más vigorosas. En una muestra de la Ría de Vigo se observó una pareja de *Dinophysis rotundata* y *D. cf parvula* fuertemente conectadas por el margen ventral a la altura del poro flagelar (ver Fig. 3.9 en el capítulo 3).

Variaciones morfológicas de la posición nuclear y del contorno celular a lo largo del ciclo celular

A lo largo del ciclo celular de *Dinophysis* spp. se observaron variaciones notables en la morfología (aparición de células binucleadas) y posición del núcleo, en el tamaño y volumen celular, y en la aparición de células en parejas y células recién divididas con reparto asimétrico de las aletas sulcales.

Las observaciones sobre variaciones del núcleo se realizaron sobre todo con *D. acuminata*. Las células mitóticas de *D. acuminata*, observadas varias horas antes de la citocinesis, presentaban fisión nuclear longitudinal respecto al mismo plano lateral según el cual procede la división citoplasmática (Fig. 2.11), por lo que resultaba casi imposible observarlos a no ser que se rotaran las células, con agujas emangadas, para verlas en presentación dorsal. La posición y morfología del núcleo de las distintas especies de *Dinophysis* mostró gran variabilidad a lo largo del ciclo. Las células vegetativas «normales» no implicadas en procesos mitóticos o sexuales presentaban un núcleo subsférico cerca del antápice (Figs. 2.12 A, D, E), mientras que otras células, posiblemente implicadas en procesos de conjugación sexual, presentaban el núcleo cerca del ápice, o mostraban dos núcleos con una geometría distinta que la de los núcleos en fase de fisión nuclear (Fig. 2.12C)

Todas las especies de *Dinophysis* estudiadas presentaron el mismo patrón de división celular por desmosquisis, es decir, cada célula hija hereda una mitad de la



Fig. 2.11. Célula binucleada de *D. acuminata*, teñida con DAPI, en representación dorsal.

madre y sintetiza *de novo* la otra mitad. Antes de la citocinesis, las células megacíticas (en proceso de división) aumentaban considerablemente de volumen, sobre todo de profundidad o distancia intervalvar. La dilatación tenía lugar sobre todo a lo largo de la denominada zona de crecimiento intercalar, situada entre las dos placas hipotecales, y podían entonces observarse los individuos en presentación dorsal o ventral (Fig. 2.11), lo cual no es frecuente en las comprimidas células vegetativas de *Dinophysis*. La fisión celular tenía lugar a lo largo de un plano longitudinal que dividía a la célula madre en dos partes casi idénticas. Tras la

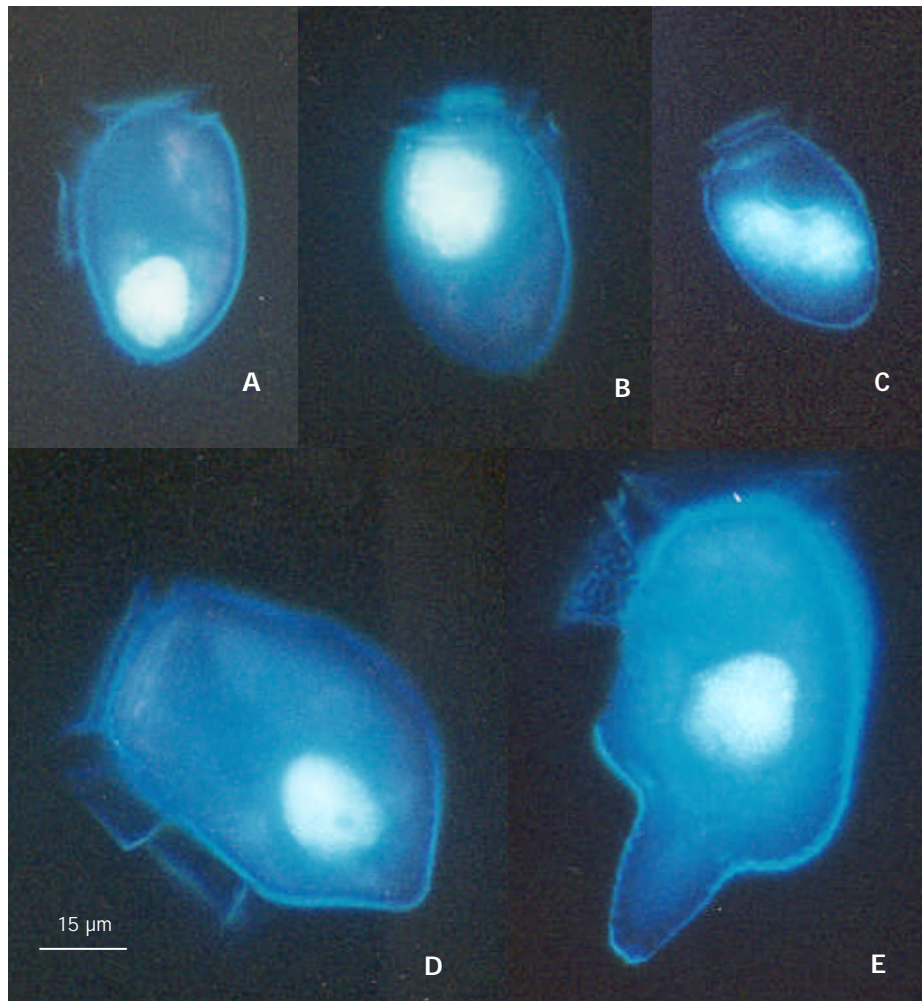


Fig. 2.12. Micrografías de *Dinophysis* tratadas con metanol y posteriormente teñidas con DAPI. A-C: *D. acuminata* con el núcleo en posición antapical (A), dorso-apical (B) y con dos núcleos fusionándose (C). D. *D. acuta* y E. *D. caudata*, ambas con núcleo en posición normal para células en reposo.

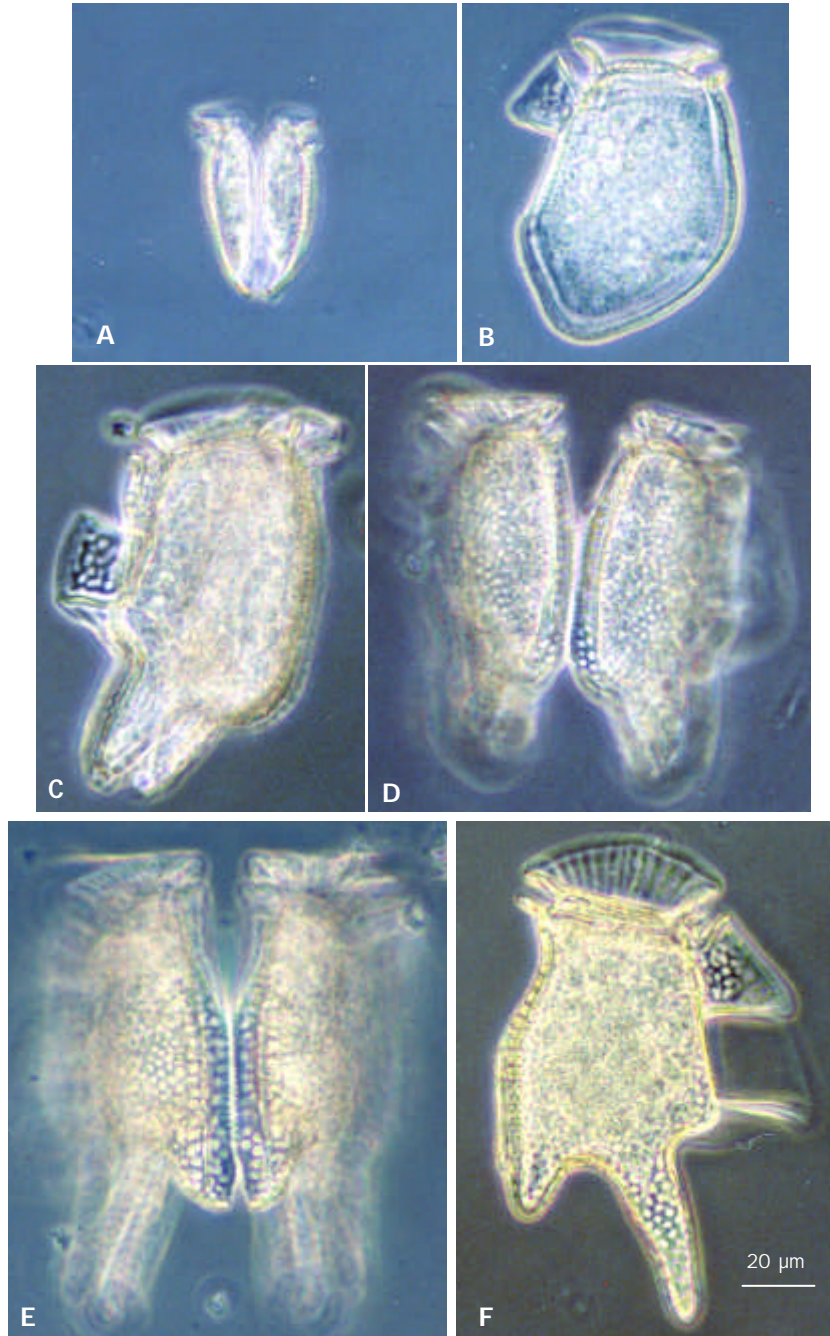


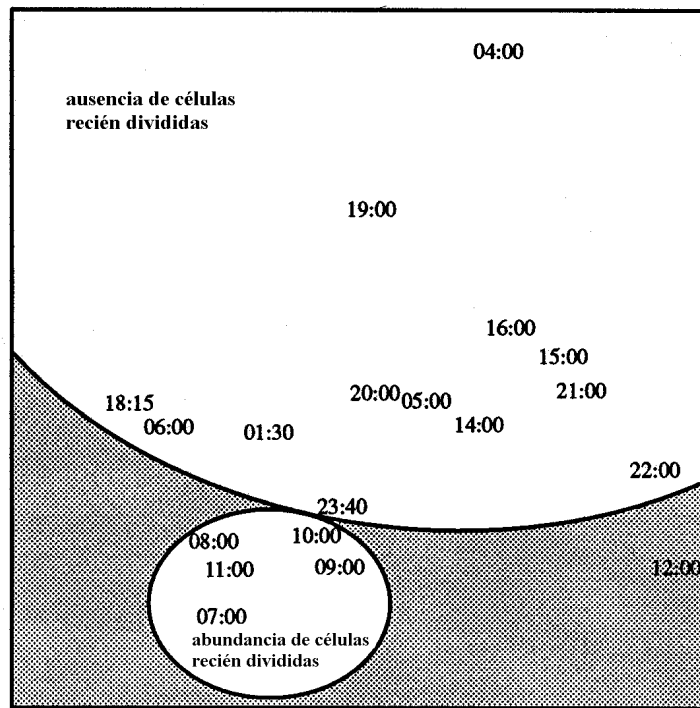
Fig. 2.13 Micrografías (contraste de fase, 400 X) de *Dinophysis* spp durante o después de la citocinesis. A. Presentación dorsal de pareja de *D. acuminata*. B. Célula recién dividida de *D. acuta* con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izquierda (ASI); C. Pareja "abriéndose" de células de *D. caudata* en visión lateral; D-E. Parejas "abriéndose" de células de *D. caudata* (D) y de *D. tripos* (E) en presentación dorsal, unidas por el puente megacístico; F. Célula recientemente dividida de *D. caudata* con desarrollo de los 3 radios de la ASI, pero con la porción posterior de la aleta con aspecto hialino sin nerviaciones (entre R2 y R3)

citocinesis y antes de la separación, las dos células se mantenían unidas dorsalmente por el puente megacítico, situado en la mitad posterior del margen dorsal en la zona de crecimiento intercalar. La posición más o menos postero-dorsal variaba según la especie (Fig. 2.13). En el caso de *D. acuminata* y sobre todo de *D. sacculus*, la unión era en la región dorsal posterior cerca del antápice; en *D. acuta*, a la altura de la parte más ancha de las células en el tercio inferior. Tras la citocinesis, había un reparto desigual de las aletas sulcales: una célula hija heredaba la mitad anterior de la gran ASI con la costilla R1, la otra heredaba la mitad posterior de la ASI con las costillas R2 y R3, y la pequeña ASD completa (Figs. 2.13B,C). La ASI de cada célula hija no completaba su desarrollo hasta un tiempo (una a varias horas) después de la citocinesis. En la Fig. 2.13 se presentan imágenes de *Dinophysis* spp en distintas etapas de la citoquinesis y de la regeneración de la ASI. En el capítulo 6 (Fig. 6.2) se presenta un diagrama simplificado de los cambios morfológicos del contorno celular que se producen durante la división vegetativa de *Dinophysis* spp. Dos de las especies estudiadas, *D. caudata* y *D. tripos* mantenían las dos células hijas unidas un tiempo indefinido tras la citocinesis, incluso cuando ya ambas habían desarrollado por completo sus aletas sulcales. Además, en estas dos especies, cuya ASI está llena de nerviaciones, era fácil reconocer, por su aspecto hialino, la porción de ASI recién producida en las células hijas (Fig. 2.13F).

La variación de tamaño de *D. acuminata*, analizada mediante escalado multidimensional (MDS) de las medidas (L, H) de 50 individuos tomados en distintos puntos del ciclo durante los muestreos intensivos de *D. acuminata* en junio y octubre del 94, mostraron una tendencia común: tallas medias mínimas en las horas posteriores a la citocinesis, aumento progresivo a lo largo del día, y tallas máximas en las 4 horas previas a la división (Fig. 2.14). Las diferencias en las tallas medias máximas y mínimas se muestran en la Tabla 2.1. Asumiendo una forma de esferoide, se calcula que las células aumentaron un 12.5% de volumen durante las 13 horas que siguieron a la división. Los incrementos unidimensionales de longitud y anchura fueron inferiores al 5% en junio, e inferiores al 4% en septiembre. Las células mostraron un crecimiento de talla sobre todo en la zona de la banda megacítica Z_m (Fig. 2.3C), es decir, aumentando la distancia entre las dos grandes placas hipotocales, en la zona de las bandas intercalares, pero desafortunadamente este parámetro, cuya medida requiere microscopios capaces de medir profundidad de campo, no fue cuantificado.

Variaciones morfológicas asociadas con distintos estadios del ciclo vital

En todas las especies de *Dinophysis* estudiadas se pudo observar en algún momento del crecimiento poblacional un fenómeno común: la aparición de un tipo de división reductora, o depauperante (*sensu* von Stosch, 1973), en la que de cada célula madre se formaban dos células hijas con las dos grandes placas hipotocales desiguales (la grande heredada de la madre y una mucho más pequeña producida de



stress = 0.05

Fig. 2.14. Escalado multidimensional (MDS) de la morfología celular de *Dinophysis acuminata* durante un ciclo de 24 en junio de 1994 (hora local = GMT + 1h).

novo). El contorno de placa hipotecal más pequeña producida durante esta división reductora coincidía con el de otros morfotipos de *Dinophysis* que habían sido descritos como especies distintas. Así pues, cada especie de *Dinophysis* estudiada mostró su correspondiente forma pequeña, disimilar (no sólo en tamaño sino también en la silueta) de la forma vegetativa normal. Se observaron parejas aparentemente conjugadas de células vegetativas de tamaño normal con su correspondiente forma pequeña de: *D. acuminata*-*D. skagii*, *D. acuta*-*D. dens*, *D. caudata*-*D. diegensis*, *D. rotundata*-*D. parvula* (ver cap. 3 y cap. 5). A diferencia de las parejas resultantes de división asexual, que aparecían unidas por el margen dorsal, las parejas conjugadas aparecían conectadas mediante un hilo o pedúnculo, por la mitad anterior del margen ventral, a la altura del complejo del poro flagelar. Los pasos siguientes que parecían tener lugar entre la conjugación y la fusión de las dos células se describen en el capítulo 2. En la Fig. 2.15 se muestran micrografías de baja resolución tomadas durante incubaciones de células de *D. caudata* y *D. acuta* aisladas del medio natural por micromanipulación. Las Figs. 2.15 C-D muestran dos etapas del proceso de fusión entre una célula grande de *D. caudata* y su correspondiente forma pequeña (*D. diegensis*) formada a partir de células vegetativas normales durante el experimento

de incubación. En la Fig. 2.16 se muestran micrografías digitalizadas de campo claro de células fijadas procedentes de los mismos incubaciones.

Durante la etapa final de proliferaciones excepcionales de *D. acuta*, como fue el caso en los años 1989 y 1990, se pudieron observar células no móviles, con morfolo-

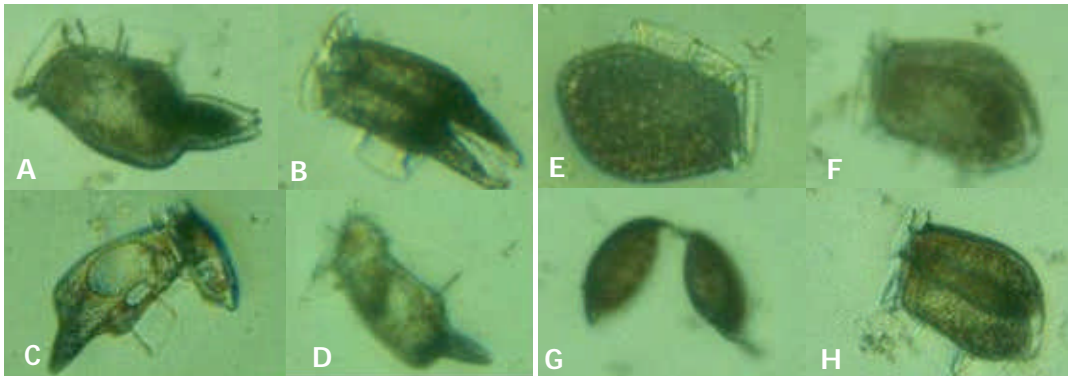


Fig. 2.15. Micrografías de baja resolución (100x) de células vivas de *D. caudata* y *D. acuta* nadando en pocillos de placas de cultivo celular. A-B. Células en división de *D. caudata* en presentación lateral (A) y dorsal (B); C-D. Secuencia de dos pasos del proceso de engullimiento de una célula pequeña (*D. diegensis*) por la célula grande de *D. caudata* tras la conjugación y paso de material nuclear de la pequeña a la grande (observación tras 8 días de incubación de un grupo de 15 células vegetativas de *D. caudata*); E. Célula muy pigmentada (un planozigoto?) y F. Célula vegetativa normal de *D. acuta*; G-H. Células en división de *D. acuta* en presentación antapical (G) y dorso-lateral (H).

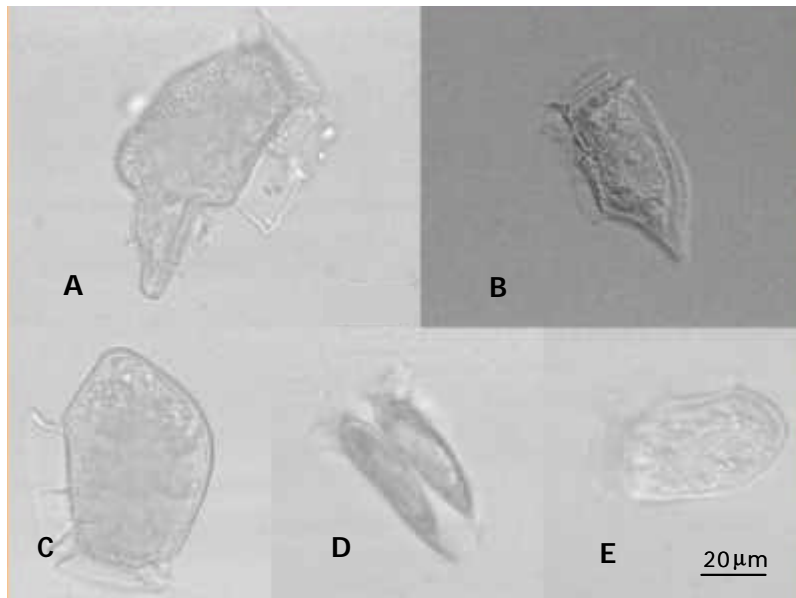


Fig. 2.16. A. Célula vegetativas de *D. caudata*; B. Célula de *D. diegensis* formada a partir de incubaciones de las anteriores en pocillos de placas de cultivo celular; C. Célula vegetativa de *D. acuta*; D. Pareja de *D. acuta* en división depauperante y E. célula de *D. dens* ambas obtenidas a partir de incubaciones de células vegetativas de *D. acuta* (imágenes digitalizadas de campo claro tomadas a 400 X).

gía que representaba un *continuum* entre células con un contorno similar al de la región hipotecal de las células vegetativas típicas (desprovistas de epicono, aletas cingulares y aletas sucales) (Fig. 2.17H) hasta formas ovoides, y en cualquier caso con un fuerte engrosamiento de las paredes. La superficie de estos hipotéticos quistes estaba ornamentada de forma similar a las placas hipotecales de las células vegetativas. Estas formas se encontraron en concentraciones muy moderadas ($\leq 20 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), que representaban aproximadamente un porcentaje del 0.1-0.2% de la concentración total de *D. acuta*. En el capítulo 5 se trata con más detenimiento sobre estos hipotéticos estadios del ciclo sexual de *D. acuta*, que se han podido observar tan sólo en años de excepcional abundancia de esta especie, y su posible relación con las condiciones ambientales y el fase o etapa del desarrollo poblacional.

También en un año de abundancia excepcional, en este caso de *D. caudata*, se observó en una muestra de arrastre fitoplanctónico vivo, a principios de diciembre de 1994, un espécimen con un movimiento rotatorio lento, análogo al de la «danza sexual» de gametos (von Stosch, 1973) y de aspecto muy similar a las ilustraciones interpretadas en el trabajo de Moita & Sampayo (1993) como planozigotos putativos de *D. tripos*. Se hizo un seguimiento de los cambios de forma de este ejemplar mantenido en un pocillo de una placa de cultivo celular (Fig. 2.17A-F). La forma inicial era subovalada con un pequeño proceso en la región posterior, y en su interior se distinguía una forma similar a una célula vegetativa de *D. caudata*. Tenía una cubierta de placas sueltas, hialinas, que recordaban a *Helgolandinium (Fragillidium) subglobossum* cuando está en fase de formación de quiste y emite las tecas, que se mantienen alrededor pero separadas del contorno del quiste. En el caso del quiste putativo de *D. caudata*, estas placas hialinas estaban casi tocando el contorno del quiste en formación. Posteriormente la pared interior se fue ovalando, y al cabo de la séptima semana se habían desprendido las placas envolventes iniciales. Este potencial planozigoto en proceso de formación de hipnozigoto se mantuvo vivo ocho semanas, hasta sufrir una fuerte contaminación bacteriana. En otras muestras fijadas con formol, de principios de otoño de 1994, se pudieron observar otros individuos de morfología análoga a los quistes putativos de *D. tripos* descritos por Moita & Sampayo (1993) en los que se adivinaba una división del contenido citoplasmático (Fig. 2.17G); en las mismas muestras se observaron tétradas de *D. caudata* que se presentaban en visión polar anterior, mostrando los cuatro grupos de aletas cingulares (anteriores y posteriores) de la tétrada dispuestos como los cuatro pétalos de una flor (Fig. 2.18). La agrupación en tétradas también se pudo observar en células de *D. acuminata* en una muestra de octubre del 94 en la etapa final de una densa proliferación de esta especie.

Variaciones morfológicas asociadas con el comportamiento nutricional

En todas las especies de *Dinophysis* estudiadas se han podido observar ejemplares hinchados y cargados de vacuolas con coloración rojiza intensa (Figs. 2.4B; 2.10B,C). En dos ocasiones, cuando se aislaron individuos de *D. acuminata* con este aspecto y se mantuvieron en pocillos, se observó división y dos nuevas células hijas a las 24-48 h siguientes, lo que sugiere que se trataba de células que habían ingerido presa recientemente y no planozigotos cargados de sustancias de reserva..

DISCUSION

Identificación morfológica de las especies de *Dinophysis*. Variación interespecífica.

La identificación morfológica de las especies de *Dinophysis*, basada en el contorno celular, no presentó problemas en Galicia en el caso de especies con silueta fácil de distinguir de la de otras especies del género que coaparecen en la misma localidad. Tal es el caso de *D. acuta*, que en aguas noruegas pudiera confundirse con ciertos ejemplares de *D. norvegica*, y en aguas argentinas y del Mediterráneo con *D. schroederi*. Otras dos especies fáciles de distinguir fueron *D. caudata* y *D. tripos*,

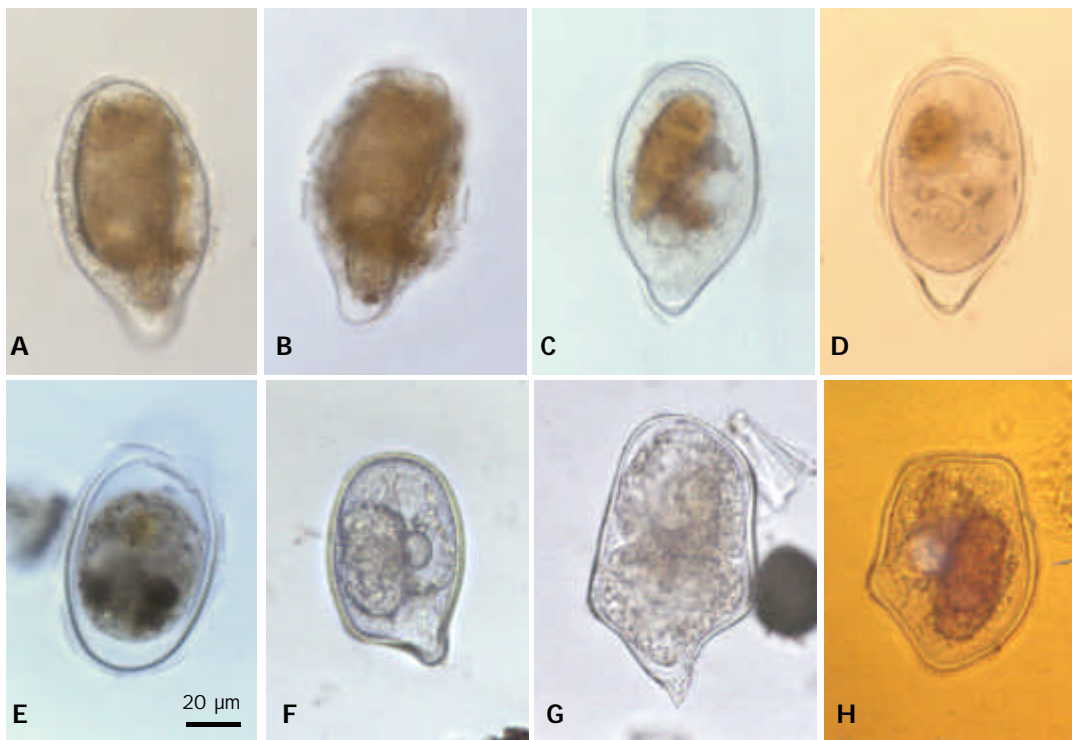


Fig. 2.17. A-F. Evolución morfológica de un hipotético quiste de *Dinophysis caudata* aislado de una muestra de arrastre de red de la Ría de Vigo en diciembre e incubado en laboratorio, el día 1 (A, B y C), día 5 (D), día 19 (E) y día 33 (F). G. Hipotético quiste de *D. tripos* durante la primera división mitótica; H. Hipotético quiste de *D. acuta* con el núcleo *teñido* con DAPI mostrando color azul. (Fotos tomadas a 400 x con contraste de fase)



Fig. 2.18. Visión antapical de una tetrada de *D. caudata* (micrografía de campo claro, a 400X).

excepto casos aislados en que las formas pequeñas e intermedias de ambas especies coaparecieron en las mismas muestras y causaron incertidumbre en la clasificación. Las escasas células de *D. fortii* pudieron, en ocasiones, ser pasadas por alto en observaciones poco cuidadosas si aparecían mezcladas con células abundantes de *D. acuminata* y *D. acuta*, pero su gran tamaño y su margen ventral muy recto la diferenciaban bien de la primera, y el antápice redondeado de la segunda.

El principal quebradero de cabeza en aguas gallegas lo constituyó el par de especies *D. acuminata* - *D. sacculus*. Ambas especies son muy próximas morfológicamente pero cada una de ellas presenta a su vez una amplia variabilidad

intraespecífica. El problema no es menos apreciable si se tiene en cuenta que ambas especies tienen un poder toxigénico muy distinto, por lo que es importante cuantificarlas debidamente. Resulta sencillo diferenciar el morfotipo de *D. sacculus* típico de la descripción de Stein (1883) - con forma de alubia de riñón o cacahuete- del morfotipo de *D. acuminata* típico de la descripción de Claparède et Lachmann (1858-1859) -con margen dorsal bien convexo- pero por desgracia ambas morfoespecies presentan una gran variabilidad morfológica intraespecífica, y presentan formas pequeñas y formas intermedias, lo cual crea aún más incertidumbre en la clasificación cuando ambas especies coinciden en la misma localidad. En Galicia, el morfotipo de *D. sacculus* típico (correspondiente a la descripción original) tan sólo se observó en las Rías Altas, lo que constituye un ejemplo más de las diferencias biogeográficas observadas en las regiones costeras al norte y al sur del Cabo Finisterre respectivamente. La problemática separación de ambas especies también ha sido experimentada por los expertos de la costa Atlántica francesa (donde Lassus & Bardouil, 1991, acuñaron la expresión «*D. acuminata* complex» para agrupar a *D. acuminata*, *D. sacculus*, y todas las formas intermedias difíciles de adscribir a una u otra especie), Italia (Giacobbe & Gangemi, 1997) y Grecia (Koukaras & Nikolaidis, 2002). La revisión de Zingone *et al.* (1998) sobre *D. sacculus* y los criterios morfológicos expuestos en ella no solucionan el problema, ya que se han podido observar, en incubaciones *in vitro*, células de *D. acuminata* que disminuyen de tamaño y pierden la convexidad del margen dorsal, y células de *D. sacculus* cuyo aspecto de saco en la región antapical no es tan obvio.

Variabilidad Morfológica Intraespecífica

A lo largo de este estudio se identificaron importantes variaciones intraespecíficas, en especies de *Dinophysis* de una misma localidad, asociadas con distintas etapas del ciclo celular, distintos estadios del ciclo vital y con el comportamiento nutricional.

La variación de tamaño y forma ha sido ampliamente discutida y documentada en el caso de *Dinophysis acuminata*. Solum (1962) sugirió que estos cambios de forma eran la respuesta a condiciones cambiantes de salinidad y temperatura, y que las células aclimatadas a salinidades inferiores a 25 psu eran más grandes. Años antes López (1955), en su detallado estudio morfométrico de *Ceratium tripos*, había encontrado una correlación inversa entre temperatura y tamaño celular. En el estudio morfométrico de ejemplares de *D. acuminata* de la Ría de Pontevedra durante el año 1991, se hizo una interpretación similar, es decir, que las distintas formas, agrupadas como morfotipos F1, F2 y F3, no representaban variabilidad genética (distintas cepas) de la misma especie sino respuestas fenotípicas a condiciones ambientales cambiantes de salinidad, temperatura y nutrientes. En la Fig. 10 de Bravo *et al.*, (1995a) se ilustra un ejemplar de *D. acuminata* que presentaba varias bandas intercalares en la hipoteca, como si indicara distintas etapas de crecimiento, lo que probaría que el tamaño y forma de la teca responden a condiciones ambientales cambiantes. A la luz de observaciones posteriores, mi interpretación actual de estos distintos morfotipos es la siguiente:

Morfotipo F2 (Fig. 2.4A): célula vegetativa típica de *D. acuminata*, de talla grande, común en primavera (mayo-junio) durante la estación de afloramiento costero;

Morfotipo F1 (Fig. 2.4C): célula mucho más pequeña que se puede observar tras largos períodos de crecimiento de la población de *D. acuminata*, antes del declive poblacional;

Morfotipo F3 (Fig. 2.4B): células hinchadas, rojizas, cargadas de vacuolas, debido a comportamiento mixótrofo en algunos casos, y que en otros pudieran constituir poblaciones residuales de invierno (Reguera, 2002b).

Otra especie cuya variabilidad morfológica ha sido muy documentada es *D. caudata*, lo cual justifica la enorme lista de distintos nombres específicos y variedades con los que fueron designados los distintos morfotipos por los taxónomos de finales del S. XIX y principios del S. XX (Kofoid & Skogsberg, 1928). La variabilidad de morfotipos de *D. caudata* procedente de distintas regiones se podría explicar por la distribución de esta especie bajo amplios rangos de latitud, temperatura y salinidad. Balech (1988), basado en sus observaciones en el Atlántico Sudoccidental, comentó que si bien *D. caudata* es una especie más o menos termófila, parece ser muy tolerante, pues se la encuentra en un amplio rango de temperatura y salinidad.

Balech registró esta especie en abundancia tanto en zonas neríticas como oceánicas, y sugirió que los individuos de aguas más o menos costeras eran más toscos, anchos, de paredes más gruesas, y proceso antapical más corto y grueso. En el caso de las costas gallegas, las observaciones sobre *D. caudata* están basadas en organismos recolectados a principios de otoño, la única época del año en que se detectó en concentraciones apreciables (superiores a $200 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$). Los individuos recolectados en octubre de 1994 y octubre de 1997, todos ellos adultos y con las aletas sulcales totalmente desarrolladas, presentaron una morfología muy uniforme, y que se correspondería con los individuos costeros, toscos y poco estilizados *sensu* Balech, o con la variedad *abbreviata* ilustrada por Jörgensen (1923) de las costas de Málaga. En este muestreo no se incluyó el pequeño porcentaje de células similares a *D. diegensis* y formas intermedias entre éste y *D. caudata*. Las dimensiones de longitud y profundidad de los individuos muestreados se mantuvieron dentro de los rangos dados para *D. caudata*. Se observaron pequeñas variaciones de tamaño, pero la forma era estable y respondía a un morfotipo común.

La variación morfológica intraespecífica de las especies de *Dinophysis* examinadas en Galicia y en otras partes del mundo muestra que las especies costeras con amplia distribución temporal, como *D. acuminata* y *D. sacculus*, sometidas a grandes cambios de salinidad, temperatura y estabilidad de la columna de agua, presentan una mayor variabilidad morfológica intraespecífica en sus respectivas localidades.

A su vez, las características ambientales de cada región darán lugar a las variaciones intraespecíficas observadas en morfotipos de una misma especie distribuida en regiones muy dispares, como es el caso en especies, como *D. caudata*, de amplia distribución geográfica (zonas tropicales, subtropicales y templadas). *D. acuta*, de carácter estenohalino y estenotermo y ocurrencia estacional marcada en la Península Ibérica, donde presenta escasa variabilidad morfológica, prolifera bajo condiciones mucho más extremas de temperatura y salinidad en los fiordos chilenos, pero las cepas chilenas son distinguibles de las Ibéricas por su menor tamaño y su acentuada angulosidad. En general, las especies del género *Dinophysis* parecen presentar una gran plasticidad en sus grandes placas hipotcales, que reflejan en su tamaño y forma las condiciones ambientales a las que son expuestos los individuos.

Variaciones morfológicas a lo largo del ciclo celular

Las células en proceso mitótico dieron lugar a formas transitorias -células megacíticas, binucleadas, parejas unidas por el margen dorsal, células con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izda.- que, al menos en las especies estudiadas, no representaron un problema para la clasificación taxonómica. Sin embargo, sí podría representarlo en el caso de especies como *Dinophysis hastata* y *D. odiosa*, dotadas de una prominente espina o asta en la región antapical. Este asta constituye uno de

los principales rasgos morfológicos empleados en su clasificación, pero tras la citocinesis, el asta completa de la célula madre va a una de las células hijas, y la otra, durante un tiempo determinado, carece de ella hasta que la sintetiza *de novo* (ver Figs. 52-54, Pl. 5 en Taylor, 1976). Por el contrario, las transiciones morfológicas que sufren las células mitóticas de las especies de *Dinophysis* estudiadas en Galicia, de fácil observación al microscopio óptico, constituyen un valioso marcador de la división que permite cuantificar la fracción de células en estado mitótico y las células recién divididas en los estudios de ciclo celular y en las estimaciones de tasas de división *in situ* (ver capítulo 6).

Otros rasgos que presentaron una gran variabilidad fueron la ornamentación de las grandes placas hipotocales y las nerviaciones de las aletas sulcales de algunas especies. Las células «jóvenes» y las formas pequeñas de *Dinophysis* presentaron generalmente poros más diminutos y areolas menos excavadas que las de los individuos adultos. Por ello, debería aplicarse con precaución la ornamentación de las placas (sugerido por Hallegraeff & Lucas, 1988) como criterio morfológico. La ausencia de nerviaciones en las porciones de aletas sulcales recién generadas es especialmente conspicua en las especies de fuertes aletas, tales como *D. caudata* y *D. tripos* (Fig. 2.13F), por lo que sería posible utilizar también este rasgo morfológico en estudios de tasas de división.

Variaciones morfológicas asociadas con distintos estadios del ciclo vital

Hasta 1990 se asumía que no existían procesos sexuales ni formación de quistes en el género *Dinophysis*. Las proliferaciones inusualmente altas de *D. acuta* y *D. acuminata* en Europa y Nueva Zelanda a finales de la década de los 80, unidas al gran interés suscitado por el carácter diarregénico de estas especies, enfocaron la atención de los expertos y dieron paso a numerosas observaciones nuevas que permitieron dilucidar aspectos desconocidos de su ciclo vital.

La observación de células dimórficas de *D. acuta* en Galicia, con una mitad correspondiente a la descripción de la forma vegetativa de la especie y la otra mitad a la de otra forma pequeña, descrita como *D. dens*, fue clave para descifrar el misterio de las células pequeñas, que en reducido número aparecían acompañando a las células grandes. La posterior observación de pares conjugados célula grande-célula pequeña constituyó una nueva evidencia de procesos sexuales en el género. Observaciones similares en *D. acuta* y *D. caudata* fueron realizadas en Portugal (Moita & Sampayo, 1993). Bardouil *et al.* (1991) presentaron imágenes de células dimórficas, con una teca como *D. sacculus* y la otra como *D. skagii*, y de parejas *D. sacculus/D. skagii* aparentemente conjugadas, unidas por el margen dorsal. En el capítulo 3 se trata en detalle la formación de células pequeñas, su significado fisiológico y ecológico, y se propone un modelo de ciclo vital común para las especies de *Dinophysis*.

Tanto las observaciones de muestras de campo como posteriores incubaciones *in vitro* demuestran que una parte importante de la variabilidad morfológica descrita en *Dinophysis*, y la aparición de formas pequeñas e intermedias, está relacionada con la aparición de distintos estadios del ciclo vital.

Curiosamente, en las escasas ocasiones en que se han observado pares conjugados 'célula grande/célula pequeña' en especies de *Dinophysis*, se ha hablado de una fuerte conexión entre las dos células a la altura del poro flagelar, e incluso se ha citado la existencia de un 'tubo de fertilización' (Reguera *et al.*, 1995). ¿Servirá el mismo tubo para los procesos nutricionales y para la conjugación de potenciales gametos?. Algunos autores han mencionado la existencia de dos orificios en la región del poro flagelar en *Dinophysis*. Una posible hipótesis es que un orificio sea el de salida del pedúnculo de fertilización, y el otro sea el punto de salida del pedúnculo alimenticio. Serán necesarios estudios de microscopía electrónica de la superficie celular de pares conjugados y de células con pedúnculo alimenticio proyectado para aclarar estas cuestiones, pero uno de los principales impedimentos es que estas estructuras (pedúnculos) sólo se observan en individuos en pleno proceso de conjugación (escasísimos) o de mizocitosis (sólo observada hasta la fecha en *D. rotundata*).

Las descripciones de hipotéticos quistes permanentes (hipnozigotos) de *Dinophysis* de este trabajo, junto con otras escasas informaciones de expertos portugueses (Moita & Sampayo, 1993), son aún muy preliminares. Hasta la fecha, no se han producido hipnozigotos en incubaciones de laboratorio (excepto el caso aislado de un posible quiste de *D. caudata* descrito en este capítulo), ni se han observado en múltiples análisis de sedimentos en distintas partes del mundo. La ausencia de estos quistes en los sedimentos pudiera deberse a que no poseen paredes resistentes a los tratamientos habituales previos a los análisis, o a que quizás se depositan en lugares que escapan a la observación de los muestreos convencionales.

Otra incógnita surgida es el significado de las tétradas. La formación de tétradas como resultado de las dos primeras divisiones meióticas tras la germinación del quiste ha sido ilustradas en cultivos de *Prorocentrum micans* (Bhaud *et al.*, 1988) y *Prorocentrum lima* (Faust, 1993). Taylor (1976) mencionó la presencia de tétradas como algo común en muestras de *D. caudata* y *D. tripos* procedentes de zonas costeras tropicales muy estables en el océano Índico. En muestras de la costa gallega, las tétradas de *D. caudata* se observaron tan sólo ocasionalmente, en un año de abundancia excepcional y coincidiendo con la ocurrencia de potenciales quistes en fase de primera división meiótica. Además, no se observaron tétradas cuando se mantuvieron en laboratorio, sin aireación, densos arrastres de poblaciones naturales ricas en *D. caudata* durante varios días, lo cual sería de esperar si se tratara de parejas que se mantuvieran unidas tras una segunda división en una columna de agua sin agitación alguna. Se sugiere, pues, que las tétradas observadas serían un eslabón

más del ciclo vital de especies del género *Dinophysis* propuesto en el capítulo 3. Las tétradas, por analogía con los procesos sexuales de *P. micans*, podrían resultar de las dos divisiones meióticas que tienen lugar tras la germinación de quistes. Las tétradas observadas por Taylor (1976) corresponderían a *D. caudata* en zonas tropicales de crecimiento óptimo, con frecuente germinación de quistes *in situ*. No obstante no podemos descartar que bajo condiciones óptimas con elevadas tasas de división vegetativa las parejas se dividan de nuevo antes de haberse separado tras la división previa, dando lugar a tétradas. Mediante incubaciones de laboratorio, será necesario probar que los hipotéticos quistes son efectivamente hipnozigotos, e investigar el significado real de las tétradas.

Variaciones morfológicas asociadas con el comportamiento nutricional

Hansen (1991) describió el comportamiento alimenticio de *D. rotundata* mediante un mecanismo conocido como «mizocitosis», que es un tipo de fagocitosis en el que el predador perfora la cubierta de su presa con un pedúnculo de alimentación y succiona su contenido. *D. rotundata*, tras dar unas vueltas alrededor del ciliado *Tiarina fusus*, acababa inyectando el pedúnculo en la lorica de la presa. Finalizada la succión del contenido, quedaba la lorica vacía del ciliado como desecho, y la célula de *D. rotundata* aumentaba considerablemente de volumen y aparecía intensamente pigmentada y cargada de vacuolas. Entre las distintas especies de *Dinophysis*, tan sólo en *D. rotundata*, heterótrofa estricta, se ha podido observar directamente el proceso de inyección del pedúnculo alimenticio y mizocitosis. El pedúnculo, que parte de la región del poro flagelar, es visible tan sólo durante el proceso de alimentación, y nadie ha podido mostrarlo en células en reposo de ninguna especie de *Dinophysis*, por lo que me atrevo a hipotetizar que la formación de este pedúnculo se podría inducir al ponerse la célula de *Dinophysis* en contacto con su presa.

Se han mostrado evidencias indirectas -presencia de restos de tintínidos en el interior de vacuolas alimenticias- de fagotrofia en *D. acuminata*, *D. norvegica* (Jacobson & Andersen, 1994), y *D. fortii* (Koike *et al.*, 2000). Jacobson & Andersen (1994) señalaron que los individuos que hubieran ingerido presas recientemente correspondían a los que se mostraban hinchados y con intensa vacuolación, por lo que cabría esperar que estas especies habrían adquirido su presa mediante un mecanismo análogo al empleado por *D. rotundata*. No obstante, no hay que olvidar que células de *D. acuminata* con tonalidad rojiza fueron descritas por McLachlan (1993) como supuestos planozigotos, ya que poseían dos flagelos longitudinales, si bien McLachlan no asocia estas formas con la presencia de vacuolas e hinchazón, sino con un posible descenso de los niveles de clorofila y carotenoides, bajo ciertas condiciones ambientales, que harían más evidente el contenido de ficoeritrinas de los *Dinophysis*. Ushida *et al.* (1999), en observaciones *in vivo* de fusión de potenciales gametos de *D. fortii* comentaron que el tamaño y aspecto del planozigoto era similar al de la célula

vegetativa tipo. Así pues, la fusión de células sexuales en *Dinophysis*, en los dos casos mencionados, no va acompañada de aumento apreciable de tamaño celular y podríamos inclinarnos a relacionar siempre la presencia de células voluminosas y vacuoladas con la fagotrofía. No obstante, no existe información sobre la evolución posterior del aspecto del planozigoto y la posible formación de vacuolas con sustancias de reserva en su interior. Queda pendiente para estudios futuros: a) confirmar que las células vacuoladas resultantes de procesos de fagotrofía contienen una dotación simple de ADN (y no doble como sería de esperar en los planozigotos); b) observar *in vitro* la evolución posterior de los planozigotos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Las especies de *Dinophysis* muestran una amplia variación morfológica dentro de la misma morfoespecie desarrollada en distintas regiones geográficas. Dentro de una misma localidad, se han observado también importantes variaciones intraespecíficas del tamaño y forma celular que se corresponden con transiciones morfológicas durante el proceso de división vegetativa o mitosis, distintos estadios del ciclo vital, o estados transitorios tras la ingestión de una presa. Las variaciones de tamaño y forma se han confirmado en incubaciones de laboratorio de individuos aislados por micromanipulación y en muestreos intensivos de campo en ciclos de 24 h. La existencia de formas pequeñas y formas intermedias en todas las especies estudiadas crea a veces incertidumbre en la clasificación taxonómica. En cuanto a las diferencias interespecíficas, la principal fuente de incertidumbre en aguas gallegas la constituye el par de especies muy allegadas *D. acuminata* - *D. sacculus*, cuando coexisten en una localidad con sus respectivas formas pequeñas e intermedias.

En numerosos casos, los expertos se han cuestionado si estaban tratando con distintas formas de una misma especie o con distintas cepas. Sin embargo la respuesta definitiva a estas interrogantes sólo puede obtenerse con estudios, frenados hasta tiempos recientes por la falta de cultivos, sobre la variabilidad genética (secuenciación de ADN) de estos organismos.

En los dos últimos años se ha conseguido prescindir de los cultivos y obtener avances significativos, gracias a técnicas de biología molecular (Edwardsen *et al.*, 2000, 2003; Marín *et al.*, 2001a, 2001b; Guillou *et al.*, 2002) que han permitido la amplificación mediante PCR y secuenciación del ADN de especies de *Dinophysis* con muestras de tamaño mínimo (1 ó varias células). Los resultados preliminares sugieren que las especies de *Dinophysis* presentan una baja variabilidad genética interespecífica. Sobre la base de la secuencia del 5.8S rADN y los espaciadores intergénicos del operón del rRNA, Edwardsen *et al.* (2000) encontraron que los distintos morfotipos de *D. acuminata* y *D. norvegica* aislados en aguas noruegas presentaban una misma secuencia. Asimismo, la comparación de las secuencias obtenidas

de *D. sacculus* del Mediterráneo (Giacobbe *et al.*, 2000) y de Galicia (Marín *et al.*, 2001b) mostraron que eran secuencias idénticas en la región analizada. Los resultados de Marín *et al.* (2001b) demostraron importantes diferencias entre *D. sacculus*-*D. tripos* y *D. acuminata*-*D. tripos*. Esta distancia, no obstante, es menos considerable que la existente entre *Phalacroma (Dinophysis) rotundata* y las otras especies estudiadas en Escandinavia (*D. acuminata*, *D. norvegica* y *D. acuta*) que mostraron una proximidad entre sí comparable a la proximidad de *D. acuminata*-*D. sacculus* en Galicia. Estos resultados son considerados por los autores escandinavos como evidencias de la pertenencia de *D. rotundata* a un género distinto, el género *Phalacroma*.

Los conocimientos sobre la estructura genética de los *Dinophysis* no han hecho sino comenzar a aflorar, pero serán clave para resolver las cuestiones taxonómicas pendientes. Es posible que se requiera secuenciar mayores porciones de ADN que las secuenciadas hasta la fecha, que han revelado muy pocas diferencias entre las distintas especies de *Dinophysis* y ninguna entre las distintas cepas o morfotipos (Marín *et al.*, en prep.). Será muy interesante determinar en el futuro si los morfotipos de la misma morfoespecie procedentes de distintas partes del mundo son idénticos, similares o distantes genéticamente. Las técnicas moleculares permitirán también determinar directamente si los supuestos estadios del ciclo celular de una especie observados en muestras de campo realmente lo son. Por último, el desarrollo de sondas moleculares para especies muy próximas, como *D. acuminata* y *D. sacculus*, su validación y su posterior aplicación en los muestreos rutinarios supondrá una ayuda considerable para los análisis fitoplanctónicos en estudios ecológicos y programas de seguimiento de especies potencialmente tóxicas.

CAPÍTULO 3

FORMACIÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS Y CÉLULAS INTER- MEDIAS EN EL CICLO VITAL DE ESPECIES DE *DINOPHYSIS* (DINOPHYCEAE, DINOPHYSIALES)

FORMACIÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS E INTERMEDIAS EN EL CICLO VITAL DE ESPECIES DE *DINOPHYSIS* (DINOPHYCEAE, DINOPHYSIALES)

RESUMEN

Las primeras observaciones de dos clases de tallas, con similar forma, en poblaciones naturales de *Dinophysis Ehrenberg* fueron citadas por Jorgensen (1923). Wood (1954) describió formas intermedias que constituían un continuum entre la típica célula vegetativa y la hipotética célula pequeña de la misma especie. La gran atención centrada en las especies del género *Dinophysis* agentes de DSP en la última década, ha dado como resultado la observación de nuevos casos de células pequeñas en especies del género - a veces con forma distinta que la de la correspondiente célula vegetativa - individuos dimórficos, y parejas acopladas célula grande/célula pequeña. Este trabajo, basándose en observaciones in situ durante muestreos intensivos para estudios del ciclo celular de *Dinophysis acuminata* Claparède et Lachmann, *Dinophysis acuta* Ehrenberg, *Dinophysis caudata* Saville-Kent, y *Dinophysis tripos* Gourret; en incubaciones en laboratorio de *D. acuminata* y en una amplia revisión de la información documentada disponible sobre variabilidad morfológica de *Dinophysis* spp, muestra que: a) Durante la división in situ, la mayor parte de las células en división presentan una fisión longitudinal normal, pero algunas (1-10%) sufren una fisión "depauperante" que da lugar a pares de células dimórficas con mitades distintas; b) Después de la separación y regeneración de las listas sulcales, estas células dimórficas se convierten en células similares a las descritas como *D. skagii* Paulsen, *D. dens* Pavillard, *D. diegensis* Kofoed y *D. diegensis* Kofoed var. *curvata*, que también pueden observarse formando parejas *D. acuminata*/*D. skagii*, *D. acuta*/*D. dens*, *D. caudata*/*D. diegensis* unidas por sus márgenes ventrales; c) las células pequeñas pueden crecer de nuevo alcanzando la talla normal, tal como se ha demostrado en incubaciones de laboratorio de *D. acuminata*, explicando en parte los casos de individuos con bandas intercalares, y las formas intermedias.

Si bien es cierto que el carácter sexual de las células pequeñas no quedará demostrado inequívocamente hasta que se pruebe la germinación de los potenciales quistes de resistencia, y que algunas formas intermedias podrían corresponder a estadios no descritos posteriores a la germinación de quistes, las observaciones aquí presentadas sugieren un patrón común de ciclo vital de las especies de *Dinophysis*. La variabilidad morfológica intraespecífica de *Dinophysis* spp. en una región geográfica concreta se puede atribuir en gran parte al proceso de formación de células pequeñas - que quizás son parte del ciclo sexual de estas especies- como respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Las células pequeñas parecen ser capaces de aumentar de tamaño dando lugar a formas intermedias y posteriormente a células vegetativas en el curso de un hipotético ciclo vital que sigue un patrón de tres bucles, común para las especies de *Dinophysis* estudiadas.

SMALL CELL AND INTERMEDIATE CELL FORMATION IN SPECIES OF *DINOPHYSIS* (DINOPHYCEAE, DINOPHYSALES)

ABSTRACT

Observations of two distinct size classes with similar shape in natural populations of *Dinophysis Ehrenberg* were first reported by Jorgensen in 1923, and intermediate forms exhibiting a continuum between the typical vegetative cell and a putative small cell by Wood in 1954. Focused attention on *Dinophysis* spp. associated with diarrhetic shellfish intoxications in the last decade has provided new examples of small cells in the genus, sometimes with contours dissimilar from the corresponding vegetative cells; dimorphic individuals and large/small cell couplets. This work, based on in situ observations during intensive samplings for cell cycle studies of *Dinophysis acuminata* Claparède et Lachmann, *Dinophysis acuta* Ehrenberg, *Dinophysis caudata* Saville-Kent, and *Dinophysis tripos* Gourret; on laboratory incubations of *D. acuminata*; and on a thorough search of documented information on morphological variability of *Dinophysis* spp. shows that: i) During in situ division, most dividing cells exhibit a normal longitudinal fission, but some (1-10%) undergo a "depauperating" fission leading to pairs of dimorphic cells with dissimilar moieties; ii) After separation and sulcal list regeneration, these dimorphic cells become *D. skagii* Paulsen, *D. dens* Pavillard, *D. diegensis* Kofoid and *D. diegensis* Kofoid var. *curvata*-like individuals, that can also be observed forming couplets *D. acuminata*/*D. skagii*, *D. acuta*/*D. dens*, *D. caudata*/*D. diegensis* attached by their ventral margins; iii) small cells can grow again to large size, as shown in laboratory incubations of *D. acuminata*, thus partly explaining observations of thecal intercalary bands, and intermediate forms. Although the sexual nature of the small cells will not be unequivocally demonstrated until controlled germination of the alleged cyst forms is achieved, and some intermediate forms may correspond to undescribed stages after cyst germination, these observations suggest common patterns in the life cycle of *Dinophysis* spp. Intraspecific morphological variability of *Dinophysis* spp. in a given geographic area can largely be attributed to small cell formation, as a response to changing environmental conditions, and may be as part of the sexual cycle of these species. Small cells seem to be able to enlarge leading to intermediate cell and further vegetative cell formation as part of a three-looped life history pattern in *Dinophysis*.

INTRODUCCIÓN

El término «célula pequeña» en estudios de dinoflageladas fue empleado por primera vez por Silva (1971). Silva & Faust (1995) revisaron las observaciones de «células pequeñas», ya fuera en cultivos o en floraciones naturales, sobre 34 especies de dinoflageladas y discutieron sus posibles orígenes y función. La aparición de células pequeñas de *Dinophysis* Ehrenberg, con la morfología típica de la especie, se citó por primera vez en poblaciones de *Dinophysis schuetii* Murray & Whitting del Mediterráneo (Jorgensen, 1923). Posteriormente, Taylor (1976) describió células pequeñas de *Dinophysis swezyae* Kofoid & Skogsberg en Mozambique (océano Índico). En ambos casos, las células pequeñas tenían la misma forma pero distinto tamaño que las células vegetativas normales. Wood (1954) se mostró convencido de que *Dinophysis caudata* Saville Kent, *Dinophysis diegensis* Kofoid, y una serie de formas intermedias difíciles de adscribir a una u otra «especie» no eran sino un *continuum* dentro de una misma especie. En años recientes, y coincidiendo con abundancias excepcionales de *Dinophysis acuta* Ehrenberg en 1989 en Big Glory Bay (Nueva Zelanda), MacKenzie (1989, 1992) observó células pequeñas similares a *Dinophysis dens* Pavillard coincidiendo con la anterior, así como parejas *D. acuta*/*D. dens* unidas por el margen ventral. Observaciones similares se dieron en 1989 en Galicia (Reguera *et al.*, 1990, 1995) y Portugal (Moita & Sampayo, 1993) donde también se encontraron hipotéticos quistes de *D. acuta* e individuos dimórficos con una mitad correspondiente a *D. acuta* y la otra mitad a *D. dens*. En estos casos las células pequeñas, con forma distinta que las células vegetativas típicas, habían sido previamente clasificadas como taxones separados. Posteriormente se describieron observaciones de células pequeñas, individuos dimórficos y/o parejas célula grande/célula pequeña aparentemente conjugadas en *Dinophysis acuminata* Claparède et Lachmann y *Dinophysis sacculus* Stein (cuyas células pequeñas, en ambos casos, se describieron como parecidas a *Dinophysis skagii* Paulsen) (Bardouil *et al.*, 1991; MacKenzie, 1992); *Dinophysis norvegica* Paulsen (célula pequeña similar a *Dinophysis crassior* Paulsen) y *D. acuta* (Hansen, 1993); y *D. caudata* (células pequeñas similares a *D. diegensis*) (Reguera *et al.*, 1990, 1995; Moita & Sampayo, 1993). Delgado *et al.* (1996) demostraron la formación de células pequeñas a partir de células de *D. sacculus* aisladas y mantenidas en el laboratorio, y también el crecimiento de una célula pequeña hasta alcanzar el tamaño de una *D. sacculus* típica. En la Tabla 3.1 se muestra una relación de los casos citados de células pequeñas de especies de *Dinophysis* ya sea co-ocurriendo con las poblaciones naturales de las células vegetativas correspondientes, o formando parte de individuos dimórficos o de parejas célula grande/célula pequeña aparentemente conjugadas.

Las células pequeñas de *Dinophysis* suelen representar una pequeña proporción (< 10%) de la población total en determinadas etapas del crecimiento poblacional (Reguera *et al.*, 1995), pero en algunas ocasiones pueden alcanzar hasta un 45% del

Tabla 3.1: Casos registrados de células pequeñas de *Dinophysis* que co-aparecían con sus correspondientes poblaciones vegetativas o formando parte de un par acoplado "célula grande/célula pequeña".

Especies	Designación de la "célula pequeña"	Localidad	Referencias
<i>Dinophysis schuettii</i> Murray et Whitting	Small size class of <i>D. schuettii</i>	Mediterranean Sea	Jorgensen, 1923
<i>D. swezyae</i> Kofoid et Skogsberg	Small size class of <i>D. swezyae</i>	Mozambique, Indian Ocean	Taylor, 1976
<i>Dinophysis fortii</i> Pavillard	<i>D. lapidistrigiliformis</i> Dwarf cells of <i>D. fortii</i>	Sanriku coast, Japan Gokasho Bay, Japan	Fukuyo, 1981 Ushida <i>et al.</i> , 1999
<i>D. acuta</i> Ehrenberg	<i>D. dens</i> Pavillard	Big Glory Bay, New Zealand Galicia, NW Spain Portugal	Mackenzie, 1989, 1992 Reguera <i>et al.</i> , 1990, 1995 Moita & Sampayo, 1993 Hansen, 1993
<i>D. acuminata</i> Claparède et Lachmann	<i>D. skagii</i> Paulsen	Kattegat, Denmark	Bardouil <i>et al.</i> , 1991
<i>D. norvegica</i> Claparède et Lachmann	<i>D. crassior</i> Paulsen	Brittany, France	Hansen, 1993
<i>D. sacculus</i> Stein	<i>D. skagii</i>	Kattegat, Denmark	Bardouil <i>et al.</i> , 1991
<i>D. pavillardi</i> Schroeder	Small cells of <i>D. sacculus</i>	Brittany, France	Delgado <i>et al.</i> , 1996
<i>D. rotundata</i> Claparède et Lachmann	Small cells of <i>D. pavillardi</i>	Catalonia, NE Spain	Giacobbe & Gangemi 1997
<i>D. caudata</i> Saville-Kent	<i>D. cf. parvula</i> (Schütt) Balech <i>D. diegensis</i> Kofoid	Sicily, Tyrrhenian Sea Galicia, NW Spain Galicia, NW Spain	Reguera & González-Gil 2001 Reguera <i>et al.</i> , 1990, 1995 Moita & Sampayo, 1993
<i>D. tripos</i> Gouret	<i>D. diegensis</i> <i>Dinophysis taylorii</i> sp. nov. <i>Dinophysis diegensis</i> var. <i>curvata</i>	Portugal Gulf of California, Mexico Galicia, NW Spain	Moita & Sampayo, 1991, 1993 Hernández-Becerril, 1992 Reguera & González-Gil, 2001

total, tal como ocurrió durante floraciones excepcionales de *D. acuta* y *D. acuminata* en Big Glory Bay (Nueva Zelanda) (MacKenzie 1992). La descripción original de estas «especies» se ha basado, frecuentemente, en observaciones de unos pocos individuos encontrados en muestras de red cuya apertura de malla era demasiado grande para poder retenerlas cuantitativamente. Esto explica el por qué casi todas las observaciones de células pequeñas de *Dinophysis* en los últimos 10 años han sido observaciones oportunistas realizadas en el transcurso de muestreos de programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico, y coincidiendo con abundancias máximas de las células vegetativas correspondientes.

La división vegetativa o asexual en *Dinophysis* se ajusta a la descripción de «desmoschisis» dada por Bold & Wynne en 1978 (Pfiester & Anderson, 1987), es decir, el desarrollo de las paredes del protoplasto recién dividido se inicia adyacente a, y a continuación de, las paredes de la célula madre; las paredes de los protoplastos jóvenes se mantienen en estrecho contacto durante al menos un corto período de tiempo hasta que se produce la citocinesis. Las células se dividen longitudinalmente: cada célula hija retiene una de las grandes placas hipotecales de la madre y produce una nueva. Después de la citocinesis, las dos células hijas se mantienen unidas por una zona de crecimiento intercalar, el puente megacítico dorsal, durante un período de tiempo que varía según la especie, entre menos de una hora (*D. acuminata*), hasta varias horas o incluso días (*D. caudata*, *D. tripos*) (ver capítulo 8). Las células de *Dinophysis* en fase de división incrementan notablemente su volumen a lo largo de los márgenes de la línea de fisura sagital que divide la pared celular en dos porciones; a estos individuos hinchados se les denomina «células megacíticas». Este patrón de división ha sido bien descrito en el caso de *Ornithocercus* (Taylor 1973). Debido a la fuerte compresión bilateral de las células de *Dinophysis*, los individuos megacíticos sólo se pueden reconocer en visión ventral o dorsal (las células se presentan normalmente en visión lateral). Sin embargo, algunas partes de la célula madre no se distribuyen equitativamente, como es el caso de las listas sulcales: una célula hija hereda la lista sulcal derecha (pequeña) completa y la porción posterior de la lista sulcal izquierda (grande); la otra célula hija hereda la porción anterior de la lista sulcal izquierda. Este desarrollo incompleto de las listas sulcales permite reconocer fácilmente a las células hijas recién divididas.

En este capítulo se describe un tipo distinto de fisión, longitudinal, en la que las células hijas recién formadas y sus placas hipotecales son de tamaño muy inferior al de la célula madre. Por tanto, al completarse la citocinesis, cada célula hija posee una placa hipotecal grande heredada de la célula madre, y otra recién formada mucho más pequeña (como un bivalvo con valvas desiguales) que se corresponde con la descripción de otra especie distinta (Fig. 3.10). A este tipo de célula la llamaremos *dimórfica*, y al tipo de fisión longitudinal que las produce *división depauperante*, ya

que es similar a la descripción que dio von Stosch (1973) de este término como «una división que da lugar a células hijas de menor biomasa, más pobres en plástidos y en pigmentos que las vegetativas. Obviamente estas células empiezan a dividirse en etapas más tempranas de la interfase, cuando la síntesis citoplasmática no ha progresado hasta el punto que lo haría si se fueran a formar dos descendientes vegetativos». Los pares acoplados se definen aquí como pares formados por una célula grande y otra pequeña firmemente unidas a la altura del margen ventral anterior. En el caso de *D. acuta* (Reguera *et al.*, 1995) y de *D. fortii* (Ushida *et al.*, 1999) se ha descrito la existencia de un tubo que emerge de la célula más grande, y conecta a las dos células a la altura de la región del poro flagelar.

En ocasiones se observan formas intermedias en las muestras difíciles de adscribir a una especie u otra de *Dinophysis*, lo cual crea muchas incertidumbres en la clasificación y cuantificación de especies que se lleva a cabo en programas de seguimiento y proyectos de investigación sobre autoecología de especies de *Dinophysis*. Este problema es especialmente notorio en el caso del «complejo *D. acuminata*» (Lassus & Bardouil, 1991; Bravo *et al.*, 1995a, 1995b). En otros casos, tal como se documenta en este trabajo, se observan formas intermedias difíciles de clasificar entre la especie que denomina a la célula vegetativa típica, y la que denomina a las células pequeñas. Las incertidumbres son aún mayores cuando coinciden en las muestras las formas pequeñas de dos especies de *Dinophysis* próximas morfológicamente, como es el caso cuando coinciden *D. caudata* y *D. tripos* Gourret.

Solum (1962), en un detallado estudio biométrico de varias especies de *Dinophysis*, en el que analizó muestras de distintos lugares de la costa Noruega en distintas estaciones del año, reconoció la gran variabilidad morfológica de *D. acuminata* y la existencia de formas intermedias, lo cual habría conducido a Paulsen (1949) a dividir esta especie, sin fundamento, en varias distintas (*D. lachmanii*, *D. borealis*, *D. acuminata*). Solum creyó que estas formas intermedias no eran sino la respuesta fenotípica a los cambios de salinidad, temperatura y otros factores ambientales. Por el contrario, Zingone *et al.* (1998), tras un examen exhaustivo de morfotipos de *D. sacculus* de distintas regiones de Europa, no pudieron encontrar ninguna relación entre el tamaño y forma de las células con los factores hidrográficos. Pero es un hecho bien documentado que existen importantes variaciones fenotípicas de la misma especie procedente de distintas regiones (Taylor 1987c). Por ello, y mientras no dispongamos de más información sobre variabilidad genética de las especies de *Dinophysis*, sería más prudente hablar de «morfoespecies».

En este capítulo se presentan observaciones de células pequeñas y células intermedias de *Dinophysis* obtenidas durante muestreos intensivos *in situ* del ciclo celular de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos*; de incubaciones en el laboratorio de poblaciones fitoplanctónicas mixtas o de individuos aislados de *Dinophysis*; y

de observaciones adicionales en muestras de campañas o programas de seguimiento en las rías gallegas. Estas células pequeñas presentan diferencias de tamaño y forma, en relación con las células vegetativas, mucho más acusadas que las diferencias que se pueden observar entre variedades regionales de la misma especie, o que las variaciones estacionales de forma comúnmente observadas en *D. acuminata*.

Por primera vez se citan las células pequeñas de *D. tripos* (distinguibles de las células pequeñas de *D. caudata*), y de *Dinophysis rotundata* Claparède et Lachmann. Se discute el origen y la potencial función de las células pequeñas e intermedias en el ciclo vital de las especies de *Dinophysis*. Se hipotetiza que gran parte de la variación morfológica intraespecífica que se observa en una especie de *Dinophysis*, en una región dada, se debe a los procesos de formación de células pequeñas y a su posterior crecimiento hasta convertirse en células intermedias, y posteriormente en células vegetativas normales. Así pues, las formas pequeñas e intermedias de especies de *Dinophysis* pudieran representar distintos estadios de un ciclo vital polimórfico. Desde esta perspectiva, la formación de células pequeñas (putativo ciclo sexual), y el crecimiento de las células pequeñas dando lugar a formas intermedias, serían procesos pertenecientes a dos distintos circuitos de un ciclo vital de tres bucles, que posiblemente sea un patrón común a todas las especies de *Dinophysis* estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las observaciones descritas en este capítulo se hicieron a partir de muestras tomadas para actividades de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico entre 1986 y 1999; estudios de ciclo celular *in situ* de especies de *Dinophysis* (1994-1998); e incubaciones de laboratorio de poblaciones mixtas o de células de *Dinophysis* aisladas individualmente.

Seguimiento de Fitoplancton

Se tomaban rutinariamente muestras semanales o dos veces por semana en estaciones fijas de las rías gallegas a la misma hora del día y a lo largo del año. Los análisis fitoplanctónicos se hacían a partir de muestras integradas de agua tomadas a 0-5, 5-10, 10-15 m con manguera según diseño descrito por Lindahl (1986). Se tomaban alícuotas de 100 ml de cada tramo y se fijaban inmediatamente con solución ácida de lugol para su posterior observación al microscopio invertido.

Estudios in situ del Ciclo Celular

Se tomaron muestras mediante arrastre vertical de red de 10-20 μm de apertura de malla en la capa superior de 15-20 m. Simultáneamente, se hicieron lances de CTD y de botellas oceanográficas a 0, 5, 10 y 20 m. Se tomaron muestras cada 2 h, 1 h, o incluso cada media hora. Cada muestra de arrastre se dividió en dos mitades: una se

fijó con formol neutro para posterior estimación de frecuencias de células en fase mitótica (células en parejas, unidas dorsalmente por el puente megacítico), y de células recién divididas (individuos con desarrollo incompleto de la lista sulcal izqda.) con un microscopio Zeiss AXI OVERT 135 tal como se describe en el capítulo 8; la otra mitad se escurrió en malla de 10 μm , y el material retenido y escurrido se resuspendió en metanol helado y se congeló hasta el momento de la tinción con DAPI (Carpenter & Chang, 1988) para observación del material nuclear al microscopio de epifluorescencia. Se revisaron entre 300 y 1000 individuos de cada especie para cada dato representado en el gráfico de frecuencias. En todos los casos, se continuó el examen de las muestras tomadas en las horas de división, hasta que se registraron al menos 30 sucesos (células en división).

Se consideró que las células dimórficas eran recién divididas si su lista sulcal izqda. no estaba completamente desarrollada, o si se observaban restos de la placa hipotecal grande de la célula madre sobresaliendo del contorno de la placa hipotecal de la célula dimórfica recién formada. En las parejas de células que resultan de la fisión vegetativa, y en las parejas de células dimórficas que resultan de una «división depauperante», las dos células hijas se mantienen unidas por la parte media o posterior del margen dorsal (Fig. 3.10).

Incubaciones de Laboratorio

Se concentraron muestras de agua mediante filtración inversa (Dodson & Thomas, 1978) a través de malla de 20 μm , y se mantuvieron en cámara isoterma a 15 °C (± 1 °C) con fotoperíodo 16:8 L:O en probetas de 100-500 ml. Las probetas se forraron con papel de aluminio, excepto los 3-4 cm superiores, para favorecer la acumulación de dinoflageladas nadadoras en la capa superior iluminada. De esta forma, las células de *Dinophysis* que nadaban activamente (saludables) se concentraban en una nube cerca de la superficie, de forma similar al protocolo descrito por Maestrini *et al.* (1995). Los individuos de *D. acuminata* se aislaron mediante micromanipulación, con pipeta capilar, a partir de la nube de dinoflageladas saludables, acumulados en la parte superior de la probeta, que se succionaba con un fino tubo de silicona. Los aislamientos se hicieron al microscopio invertido utilizando aumentos de 25 X y 100 X. Cada célula se transfirió 2-3 veces a porta-objetos con gotas de agua de mar esterilizada, mediante filtración por filtros Millipore de 0.2 μm , y por último se colocó en pocillos de 0.2 ml de placas de cultivos celulares que contenían agua de mar filtrada de la zona de origen, o medio K (Keller *et al.*, 1987) modificado que contenía tan sólo amonio (25 μM) como fuente de nitrógeno, y glicerofosfato (10 μM) como fuente de fósforo. Los cultivos incluían células aisladas (una por pocillo), y grupos de 12-15 células por pocillo. Para las observaciones de cambios de corto término de tamaño y forma de *D. acuminata*, se establecieron 12 pocillos y un control con 15 individuos cada uno. Cada día se examinaba el contenido de los pocillos al microscopio.

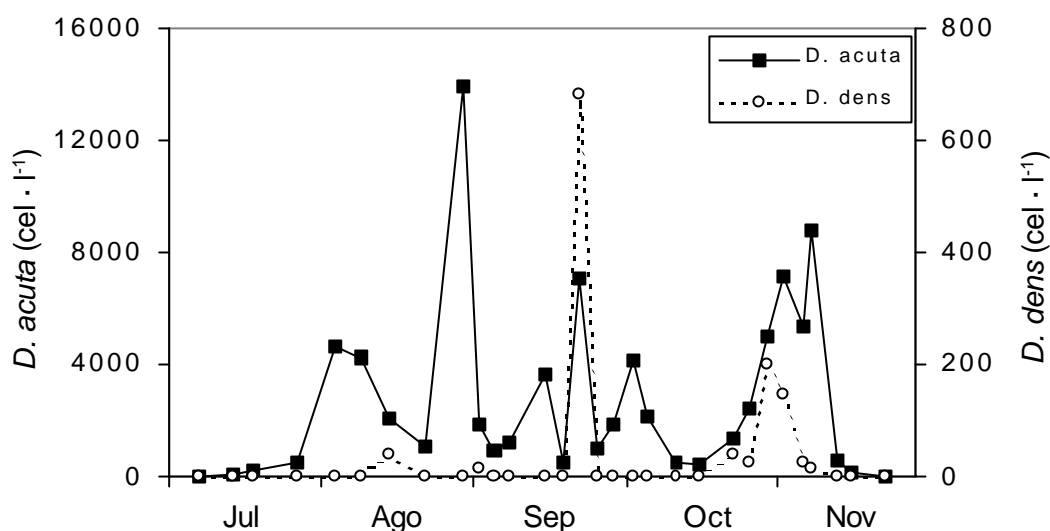


Figura 3.1. Concentración celular media (cel·l⁻¹) en muestras integradas (0-15 m) de *Dinophysis acuta* + *D. cf dens* (línea continua) y *D. cf dens* (línea discontinua, nótese diferencia de escala) entre julio y noviembre de 1989 en la estación de Bueu en la Ría de Pontevedra.

pio invertido y se sacrificaba el contenido de un pocillo, que se fijaba con formol neutro para posterior análisis morfométrico de las imágenes digitalizadas obtenidas con un sistema de video (SONY Hi Resolution CCD-I RI S) conectado al microscopio y a un ordenador con un programa de análisis de imagen (I PPLUS 4.0).

RESULTADOS

Aparición de células pequeñas de Dinophysis durante el período de crecimiento de poblaciones naturales

La Fig 3.1 muestra la abundancia de *Dinophysis dens* en relación con la población total de *Dinophysis acuta* + *D. dens* en una estación de la ría de Pontevedra, entre julio y noviembre de 1989, el año con concentraciones máximas registradas de esta especie en las rías gallegas entre 1980 y 1999. Las células de *D. dens* eran muy escasas o indetectables durante el crecimiento exponencial *in situ* (a juzgar por la abundancia de células en parejas) de la población de *D. acuta* en agosto, cuando se alcanzaron máximos de $23 \cdot 10^3$ cel · l⁻¹ a 5-10 m. Tan sólo en dos ocasiones se encontró *D. dens* en concentraciones superiores a 200 cel · l⁻¹: a) el 21 de septiembre (1760 cel · l⁻¹), durante un segundo máximo celular de *D. acuta* ($2 \cdot 10^4$ cel · l⁻¹ en muestras integradas a 10-15 m) justo antes del rápido declive de la población; b) a finales de Octubre (320 cel · l⁻¹), durante un repentino incremento numérico de la población asociado a un episodio de hundimiento. Las células pequeñas representaron el 9 y el 4% respectivamente de la población total de *D. acuta*.

En poblaciones naturales de *D. acuminata* (datos no presentados), especie que puede presentar varios máximos entre mayo y septiembre, no se observaron células pequeñas similares a *D. skagii* en las etapas iniciales del crecimiento poblacional (abril-

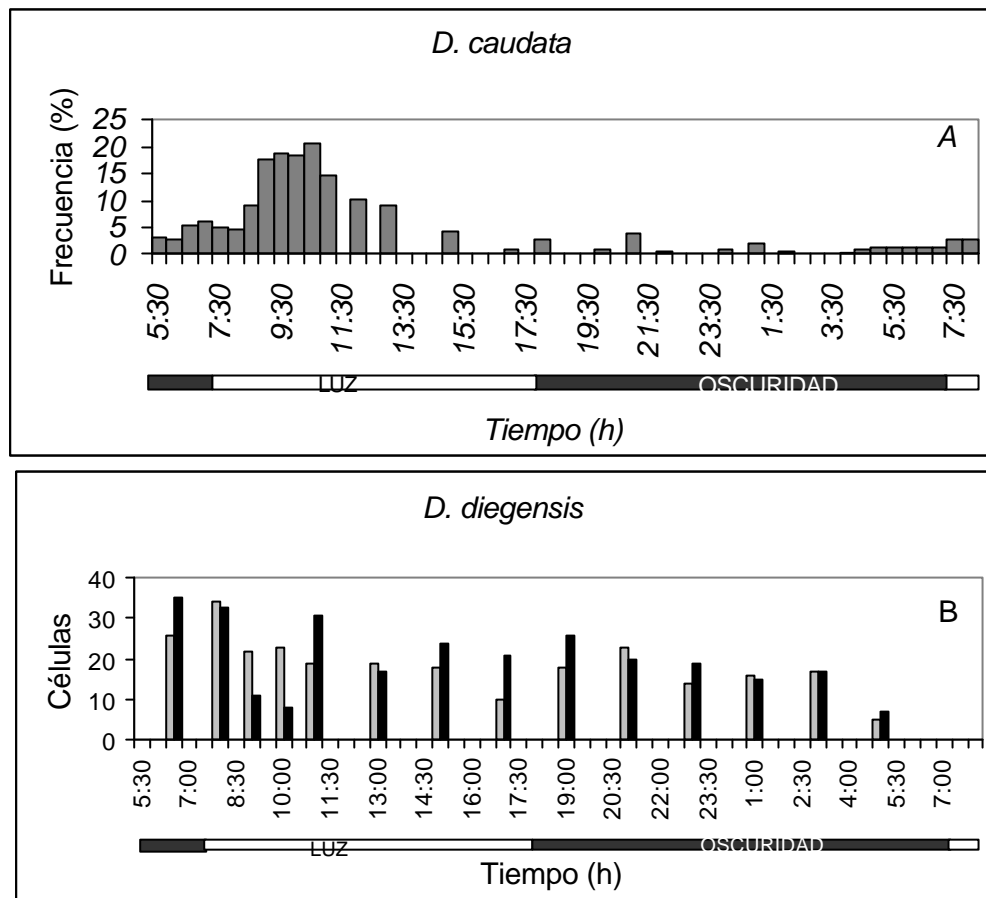


Figura 3.2. (A) Frecuencia de división vegetativa (células en división + células recién divididas) durante in ciclo *in situ* de 24 h de *Dinophysis caudata*. (B) Abundancia de células dimórficas individuales y en parejas (barras negras) en relación con el número de células *D. cf. diegensis* completamente desarrolladas (barras grises).

mayo), pero se observaron frecuentemente a finales de junio y en julio -en poblaciones establecidas al menos desde dos meses antes-, o a finales del período de crecimiento anual (septiembre - octubre) -durante los episodios de hundimiento que favorecen la concentración de dinoflageladas nadadoras en las rías por el forzado del viento-.

Formación de células pequeñas y células intermedias durante el ciclo celular de *Dinophysis*

Durante muestreos intensivos *in situ* del ciclo celular de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos*, se observó que una pequeña fracción de células (0.1-5%) de cada especie de *Dinophysis* presentaba un proceso de división longitudinal «depauperante» que daba lugar a dos células hijas dimórficas, es decir, con una placa hipotecal heredada de la célula madre y otra placa hipotecal, recién formada, con distinto tamaño y forma, correspondiente a la descripción de otra especie. Las placas hipotecales recién formadas de las células hijas eran de menor tamaño; presentaban un margen dorsal más oblicuo, prácticamente paralelo al margen ventral; su forma se correspondía con las descripciones previas de *D. skagii*, *D. dens*, *D.*

diegensis y *D. diegensis* var *curvata* respectivamente. La Fig. 3.2 muestra la frecuencia de células en fase de división vegetativa en *D. caudata* (Fig. 3.2 A) y la aparición de células dimórficas (mitad *D. caudata*, mitad *D. diegensis*) en relación con el número total de células de *D. diegensis* (Fig. 3.2B) durante un muestreo de 24 h para estudio del ciclo celular de *Dinophysis*. La distribución de células dimórficas (resultantes de una división depauperante) no mostró un patrón temporal similar al de distribución de frecuencias de células en división vegetativa. No obstante, la proporción de células dimórficas respecto a la población total era tan baja, que no se puede considerar que estos resultados sean estadísticamente representativos. Los valores máximos de células dimórficas se encontraron entre las 0630 y las 0730, es decir, 2 h antes que la hora en que se registró el máximo de frecuencia de células en fase de división vegetativa.

Excepto en el caso de *D. tripos*, la especie menos abundante ($< 200 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de las cuatro, se observaron casos aislados de acoplamiento célula grande/célula pequeña de *D. acuminata/D. skagii*; *D. acuta/D. dens*; y *D. caudata/D. diegensis*, fuertemente unidas por el margen ventral anterior a la altura del poro flagelar. Una vez completamente desarrolladas, las pequeñas células mostraban en común su coloración dorado-verdosa -mucho más pálida que la de las correspondientes células vegetativas- margen dorsal de la hipoteca oblicuo, casi paralelo al margen ventral; lista sulcales y cingulares, y costillas de la aleta sulcal izqda. de aspecto delicado, y con frecuencia ausencia de la tercera costilla; y un gran núcleo, que en las tinciones con DAPI se mostraba ocupando una gran parte del volumen celular. En algunos casos, la tercera costilla de la lista sulcal izda. estaba ausente, incluso después de haberse desarrollado por completo la mitad posterior de la lista. Pero también se observaron células intermedias, con tamaño y forma que hacían su clasificación incierta, y que eran difíciles de adscribir a una forma vegetativa de menor tamaño, o a una célula pequeña más grande de lo normal. Se observaron distintos estadios de la división vegetativa normal así como del paso de células vegetativas a células pequeñas (o viceversa) que se ilustran en el caso de *D. caudata* y *D. tripos* (figs. 3.3 y 3.4) y que se pueden resumir en:

- a) Células vegetativas individuales o en parejas (unidos por el margen dorsal), de *D. caudata* (3.3 A) y *D. tripos* (3.4 A, 3.4B);
- b) Células recién divididas vegetativamente, que muestran desarrollo incompleto de la lista sulcal izd. (Fig. 3.4C)
- c) Parejas de células dimórficas en fase de apertura, que acaban de completar la fisión longitudinal y se encuentran aún en planos distintos unidas por el puente megacítico (Fig. 3.4D). A esta forma la denominamos «pareja abriéndose». Cada célula conserva una de las grandes placas hipotecales de la madre, y presenta una nueva de menor tamaño. En visión lateral podrían dar la impresión engañosa

- de que hay una célula pequeña en el interior de una grande, pero en visión ventral las dos viejas valvas hipotecales y las dos nuevas son fácilmente distinguibles;
- d) Parejas de células dimórficas recién divididas, ya completamente abiertas y situadas en el mismo plano; cada célula hija carece de la mitad anterior o la mitad posterior de la lista sulcal izqda. (Fig. 3.3B);
- e) Células dimórficas recién divididas, que muestran aún restos de la porción de la antigua placa hipotecal de la madre que sobresale sobre la recién formada, y en algunos casos con la lista sulcal izqda con desarrollo incompleto (Fig. 3.3C);

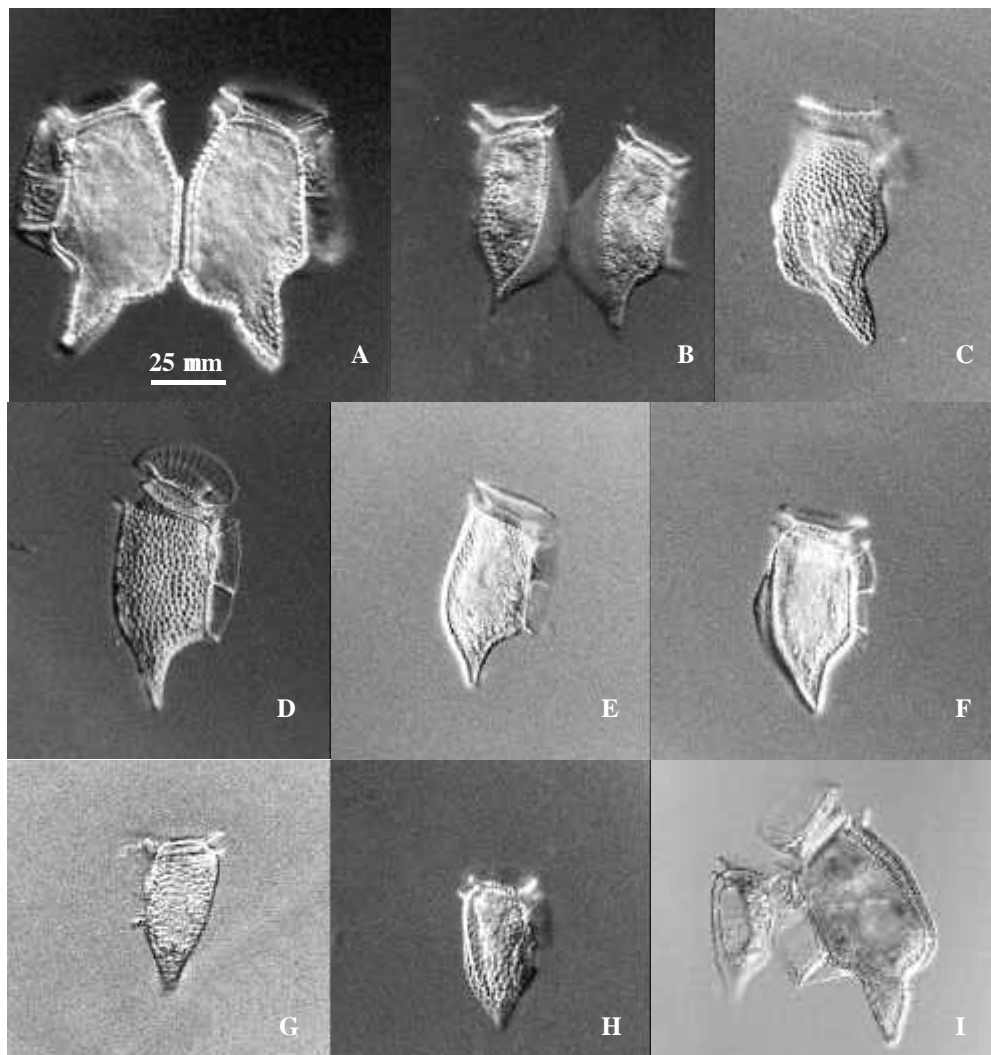


Figura 3.3. Micrografías (contraste de fase interdiferencial = DIC) de células de *Dinophysis caudata* y *D. cf. diegensis* procedentes de una estación de la Ría de Vigo durante un ciclo de 24 h. (A) Pareja completamente desarrollada de células vegetativas de *D. caudata*. (B) Pareja de células dimórficas resultantes de una "división depauperante" de *D. caudata*, con placas hipotecales de *D. cf. diegensis* recién formadas. (C) Célula dimórfica recién formada carente de la porción inferior de la lista sulcal izquierda. (D-F) Formas intermedias entre *Dinophysis caudata* y *D. cf. diegensis*. (G, H) Células pequeñas de *D. cf. diegensis*. (I) Microfotografía (contraste de fase) de un par aparentemente conjugado de *Dinophysis caudata* y *D. cf. diegensis*, unidas por el margen ventral a la altura del poro flagelar (Barra de calibración = 25 μ m de la figura 3A aplicable a todas las microfotografías).

f) Células pequeñas completamente desarrolladas, con o sin la tercera costilla de la lista sulcal izda. (Fig. 3.3G-H; 3.4J a 3.4L).

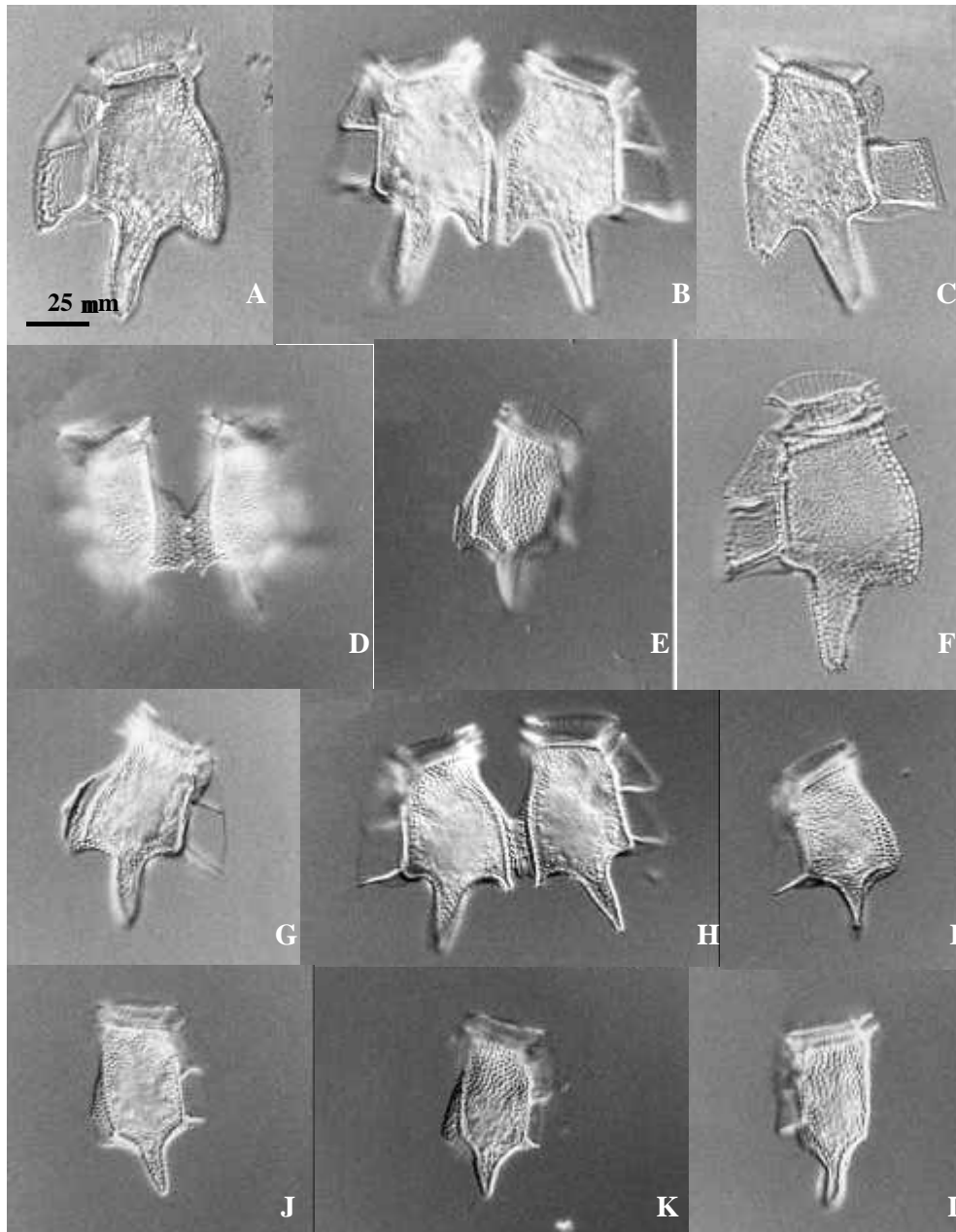


Figura 3.4. Microfotografías (contraste de fase interdiferencial = DI C) de células de *Dinophysis tripos* tomadas de una estación de la Ría de Vigo durante un muestreo de 24 h. (A) Célula vegetativa completamente desarrollada, y (B) pareja vegetativa completamente desarrollada de *D. tripos*. (C) Célula vegetativa recién dividida de *D. tripos* mostrando la lista sulcal derecha y la porción inferior de la lista sulcal izquierda. (D) Pareja "abriéndose" de células dimórficas resultantes de una división depauperante de *D. tripos*, con placas hipotecales de *D. cf diegensis* var. *curvata* recién formadas. (E, G-I) Formas intermedias entre *D. tripos* y *D. cf diegensis* var. *curvata* mostrando una regresión del proceso dorsal. (F) Forma intermedia de *D. tripos*, muy voluminosa, de naturaleza no determinada. (J-L) Células pequeñas de *D. cf diegensis* var. *curvata* (barra de calibración = 25 µm de la imagen A aplicable a todas las imágenes).

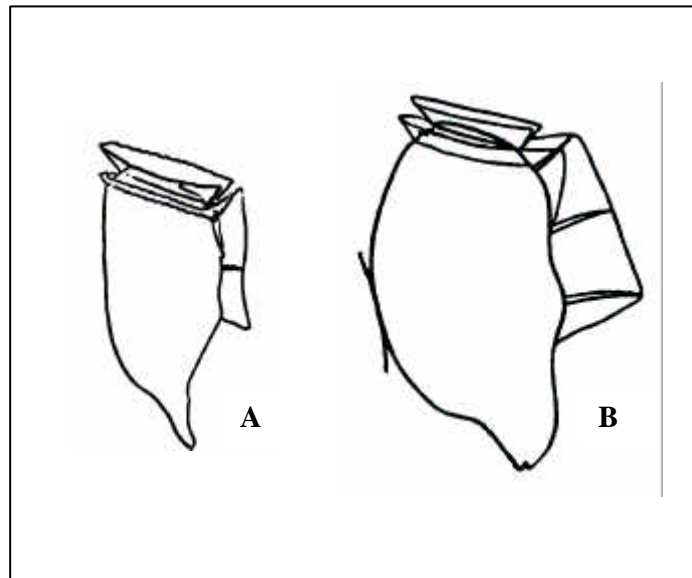


Figura 3.5. Ilustraciones de (A) *D. diegensis* var. *curvata* redibujadas a partir de la Fig. 61, lámina XXXIII, en Kofoid (1907). (B) *D. diegensis* var. *acutoides*, redibujado de la Fig. 46 en Kofoid & Skogsberg (1928).

- g) Individuos o parejas (no dimórficas) de células con tamaño y forma intermedios entre la típica célula vegetativa y las células pequeñas (figs. 3.3D a 3.3F; 3.4E, 3.4G a 3.4I).
- h) Parejas acopladas de célula grande/célula pequeña firmemente unidas por el margen ventral (Fig. 3.31)

Las parejas de células intermedias y las células intermedias completamente desarrolladas no carecían nunca de la tercera costilla de la lista sulcal izda. y sus células no eran dimórficas, es decir, sus dos grandes placas hipotecales eran idénticas. Algunas células intermedias mostraban restos del puente dorsal megacítico, pero en ningún caso restos de una placa hipotecal grande de la célula madre como era el caso en las parejas recién divididas de células dimórficas.

En octubre de 1994, cuando coincidieron *D. caudata* y *D. tripos*, a menudo resultó difícil la discriminación entre células pequeñas-intermedias de *D. caudata* -similares a *D. diegensis*-, y de *D. tripos* -similares a *D. diegensis* var. *curvata sensu* Kofoid & Skogsberg (Fig. 3.5A)-. Durante el proceso de formación de células pequeñas en ambas especies, se observaron profundas modificaciones en el tamaño y forma que afectaban sobretudo al contorno de su proceso antapical (y del proceso dorsal posterior de *D. tripos*). En las células pequeñas de ambas especies, el margen ventral de la hipoteca es recto hasta la altura de la tercera costilla de la lista sulcal izquierda, y a partir de ahí gira bruscamente hasta el extremo antapical, pero los márgenes dorsales son claramente distinguibles en visión lateral:

- a) En las células pequeñas de *D. caudata*, la discontinuidad en la mitad posterior del margen dorsal de la que parte el proceso antiapical, desaparece en las células pequeñas, formándose una suave curva continua (células tipo *D. diegensis*); las listas sulcales son muy delicadas, hialinas y sin nerviaciones, y la tercera costilla de la lista sulcal izda. está a veces ausente. En las formas intermedias, algunas de las cuales son similares a la descripción de *D. diegensis* var *acutoides sensu* Kofoid & Skogsberg (1928) (Fig. 3.5 B), apenas se distingue discontinuidad en la curvatura dorsal;
- b) En las células pequeñas de *D. tripos*, el margen dorsal es recto, casi paralelo al margen ventral, y en el tercio posterior gira hacia el antápice para formar una proyección antapical bien marcada; las células se parecen a las ilustraciones de *Dinophysis diegensis* var *curvata* que aparecen en el trabajo de Kofoid (1907) (Fig. 3.5 A), y a los ejemplares descritos recientemente Hernández-Becerril (1992) como *Dinophysis taylorii*, especie nueva. Tanto las células intermedias, como los restos de la gran placa hipotecal materna que sobresale de la pequeña recién formada en las células dimórficas, muestran vestigios de la pronunciada proyección dorsal posterior de los *D. tripos* típicos; estos vestigios no existen en las formas pequeñas e intermedias de *D. caudata*/*D. diegensis*.
- c) Las formas intermedias de *D. caudata* y *D. tripos* pueden presentar nerviaciones en la lista sulcal izquierda, aunque nunca tan marcada como la de las células vegetativas adultas; la tercera costilla estaba presente excepto en el caso de células recién divididas. La tercera costilla de la lista sulcal izda. está siempre presente en las formas intermedias de ambas especies excepto si se trata de células recién divididas.
- d) Por último, las formas pequeñas e intermedias de *D. tripos* son más grandes (L: 70-85 μm) que las de *D. caudata* (L: 50-68 μm), y poseen costillas más robustas en la lista sulcal izda.

Reguera *et al.* (1995) describieron la existencia de células dimórficas (individuales o en pares) con una mitad correspondiente a *D. acuta* y la otra mitad correspondiente a *D. dens*; pares acoplados de estas dos «especies» (*D. acuta*/*D. dens*); un hipotético tubo de fertilización que emerge de la región del poro flagelar de la célula grande de la pareja; e hipotéticos quistes de *D. acuta* con contorno similar a la hipoteca de las células vegetativas pero con paredes engrosadas y desprovistos de listas sulcales y cingulares, durante floraciones de *D. acuta*. Las formas intermedias entre *D. acuta* y *D. dens* (no mostradas aquí) no muestran los cambios de forma tan espectaculares observados durante el mismo proceso en *D. caudata* y *D. tripos*. Las formas intermedias de *D. acuta*/*D. dens* parecen células de *D. acuta* con un valor

máximo del cociente 'Profundidad (D)/Longitud (L)' reducido; o células de *D. dens* con los dos tercios anteriores de los márgenes dorsal y ventral ligeramente divergentes.

Lassus & Bardouil (1991), y Bravo *et al.* (1995a, 1995b), han comentado la gran variación de tamaño y forma observada en poblaciones naturales de *D. acuminata* y *D. sacculus*, con formas intermedias difíciles de adscribir a una u otra especie. Sus observaciones se han confirmado en nuevas observaciones a lo largo de este estudio. Durante floraciones densas de *D. acuminata*, se pudo observar una pequeña proporción (< 5%) de células pequeñas similares a *D. skagii*, pero también formas intermedias difíciles de discriminar entre una «especie» u otra. Asimismo, se han observado formas similares en incubaciones de células de poblaciones naturales de *D. acuminata*, tal como se describe en la siguiente sección. La figura 3.9 muestra una pareja acoplada de *D. rotundata*, unida ventralmente a una célula pequeña que se asemeja a la descripción de *Dinophysis* cf *parvula* (Schütt) Balech.

Formación de células pequeñas de *D. acuminata* en incubaciones de laboratorio

En un pocillo control con 0.2 ml de medio K modificado, se observó una primera duplicación de la población inicial (15 células) 2 días más tarde (día 2), y una segunda duplicación el día 5. Se podían reconocer con facilidad las parejas resultantes de fisión longitudinal, unidas por el margen dorsal; y, con desarrollo incompleto de la lista sulcal izquierda. El día 3 se observaron las primeras células pequeñas (4 de 32), y su proporción fue en aumento en los días siguientes. A partir del día 6 se pudieron observar dos o más parejas 'célula grande/célula pequeña' aparentemente conjugadas. Estas parejas presentaban un movimiento de rotación similar al de la danza nupcial de gametos, y en algunos casos la célula grande y la célula pequeña se orientaban en planos perpendiculares. Pero con frecuencia, cuando los pares conjugados se sometían a una observación casi continua, las dos células acababan separándose y nadando por separado. Ocasionalmente, se observaron pares acoplados de dos células de igual tamaño. El día 7 se observó una célula pequeña que parecía estar siendo engullida por la grande a través de la sutura epitecal. La mitad posterior de la célula aparecía engullida y la otra mitad presentaba el cíngulo en paralelo con el de la célula grande, que mantenía un movimiento rotatorio. El día 10 había más de 100 individuos en el pocillo, equivalentes a una concentración superior a $500 \text{ células} \cdot \text{l}^{-1}$ y una elevada proporción de células pequeñas, con lo que resultaba cada vez más imprecisa la observación y conteo de los organismos, que nadaban con gran rapidez. Las células pequeñas nadaban a mayor velocidad que las grandes, describiendo una trayectoria errática y zigzagueante. Por el contrario las células grandes nadaban más lentamente describiendo una trayectoria en forma de espiral. A partir del día 18 se interrumpieron las observaciones diarias del pocillo control; cuando se

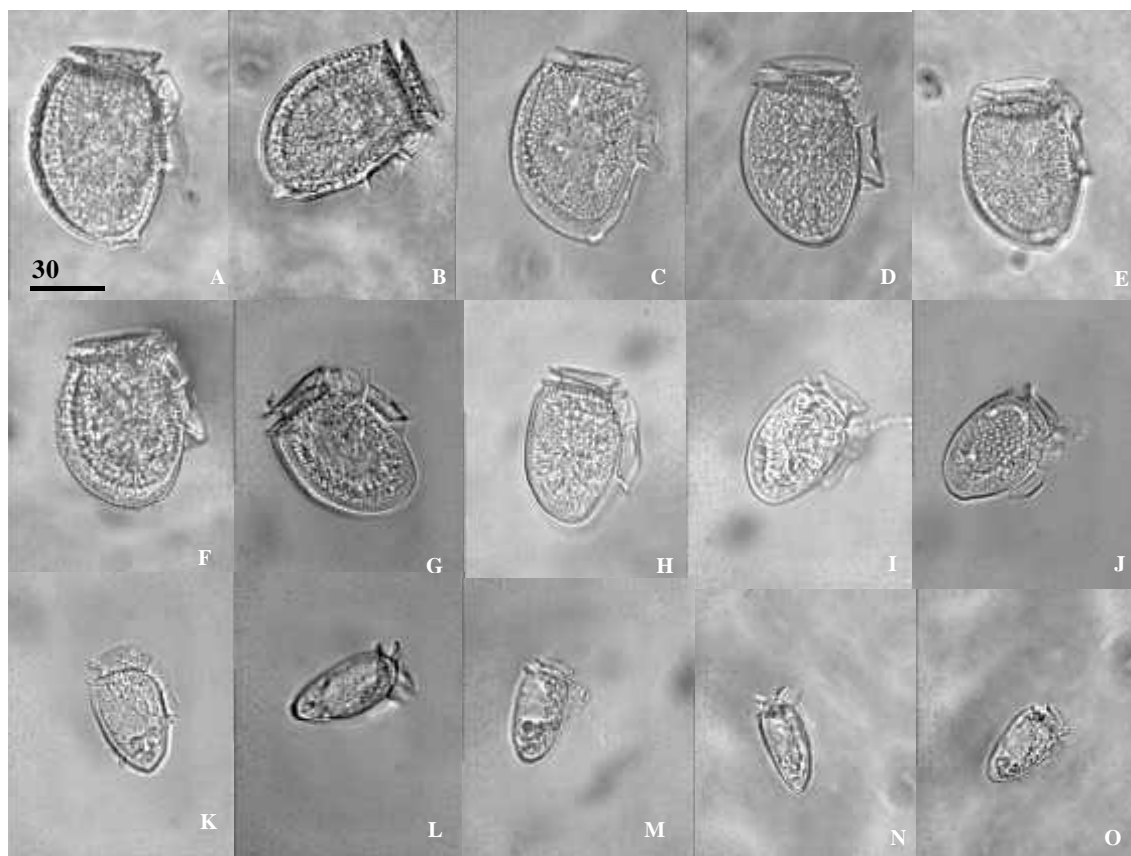


Figura 3.6. Microfotografías (campo claro) digitalizadas de células de *Dinophysis acuminata* (formadas a partir de una población natural de tamaño homogéneo) mostrando cambios de tamaño y forma en individuos aislados e incubados a lo largo de 12 días, en medio K modificado, en pocillos de placas de cultivos celulares. (A, B, F) Células con bandas intercalares. (C) Célula con placas hipotecales distintas, la nueva recién formada ligeramente más pequeña que la materna. (D) Células vegetativas típicas de *D. acuminata*. (E, G) Células vegetativas de tamaño mediano. (H-L) Células intermedias de distintos tamaños. (M-O) Células pequeñas de *D. acuminata* con tamaño y forma similares a *D. skagii* (La barra de calibración de la imagen A, 30 μm , es aplicable a todas las imágenes).

reiniciaron el día 28, no había ninguna célula pequeña, siendo todas de tamaño similar (mediano-grande). Se alcanzó una población final de 120 individuos (lo cual equivale a una concentración de $600 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$). Lamentablemente estas células no se midieron, sino que se mantuvieron vivas para ser utilizadas como inóculo para futuras observaciones.

En los otros doce pocillos se pudieron observar formas análogas a las descritas en el control. La figura 3.6 muestra imágenes tomadas de células de *D. acuminata* resultantes de la inoculación de una población inicial de 12-15 individuos y homogénea en tamaño y forma, incubadas de 1 a 12 días. Las figuras 3.6 (A, B y F) muestran un individuo con bandas intercalares pero con el citoplasma lleno, sugiriendo una expansión de la hipoteca de menor tamaño a una forma más grande. La figura 3.6 C muestra una célula recién dividida con placas hipotecales de diferente tamaño, siendo la mitad recién formada ligeramente más pequeña que la mitad heredada de la

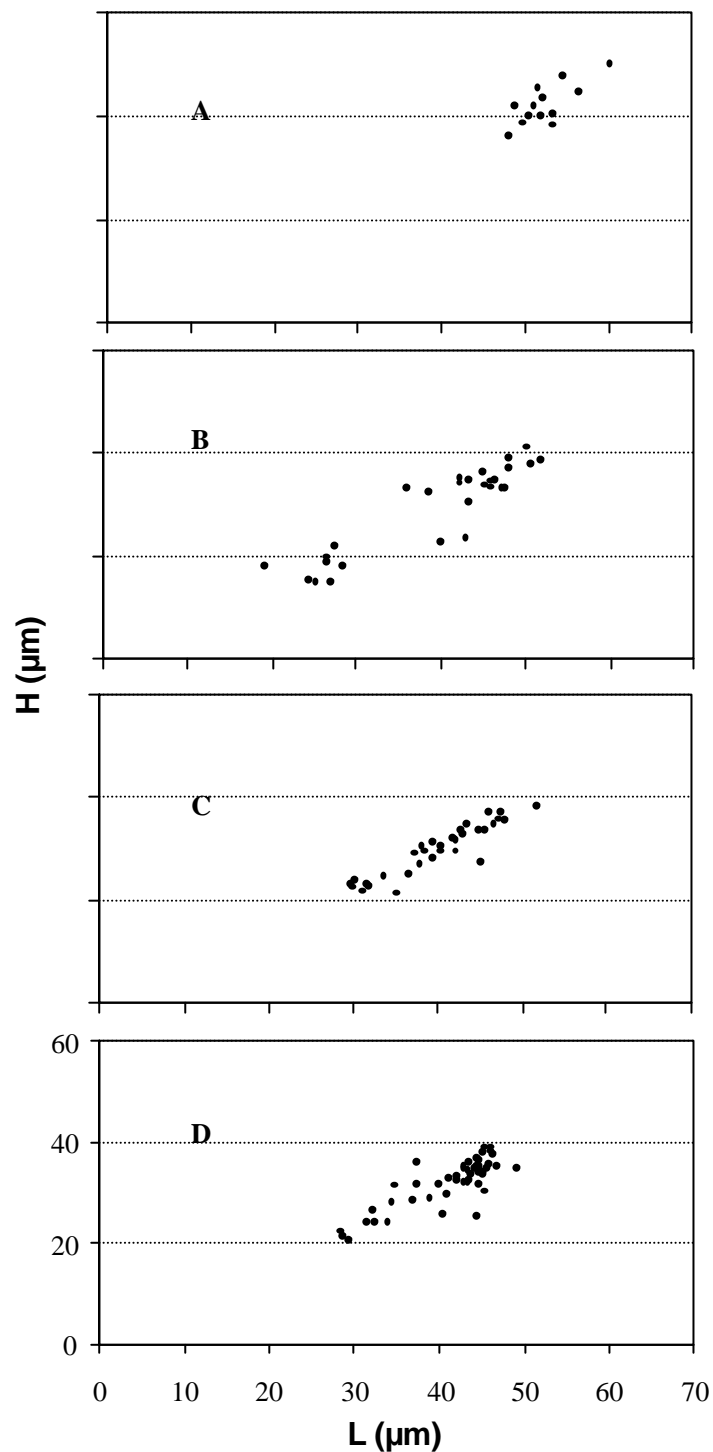


Figura 3.7. Mediciones de células de *Dinophysis acuminata* mantenidas en placas de cultivo celular (L, longitud; H, ancho dorso-ventral de la hipoteca) durante 12 días, en el (A) día 1, (B) día 6, y (C) día 9, y de (D) células de una población natural multispecifica mantenida en la cámara de cultivos durante 7 días.

célula madre. El espacio entre la placa más grande, y la pequeña recién formada está vacío, sugiriendo un hipotético proceso de división previa con disminución de tamaño. Las figuras 3.6 I-L muestran individuos con tallas intermedias entre *D. acuminata* y *D. skagii*; y las figuras 3.6 M-O, individuos con tamaño y forma similares a *D. skagii*.

La Fig. 3.7 muestra la representación gráfica de las medidas (longitud L *versus* ancho dorso-ventral de la hipoteca H) de los individuos incubados en los pocillos y cosechados y fijados los días 1, 6 y 9 respectivamente. El día 1 (Fig. 3.7 A) muestra una población muy homogénea ($L = 52.5 \pm 3.3 \mu\text{m}$; $H = 42.2 \pm 4.0 \mu\text{m}$), y la distribución de puntos forma una nube. El día 6, la distribución de los puntos es en dos nubes distintas (Fig. 3.7B), que a *grosso modo* se corresponderían con las medidas de células pequeñas (similares a *D. skagii*) y células grandes (similares a *D. acuminata*), si bien los valores máximos de longitud y profundidad ($L: 39.5 \pm 9.7 \mu\text{m}$; $H: 29.2 \pm 8.5 \mu\text{m}$) son menores que los del día 1. El día 9, la distribución de puntos forma un *continuum* (Fig. 3.7C), con puntos representando individuos de longitud y profundidad similares a *D. skagii*, a *D. acuminata*, y a formas intermedias difíciles de adscribir a una u otra especie. Los valores máximos de longitud y profundidad del día 9 fueron menores que los del día 1 y los valores medios de longitud y profundidad ($L: 40.0 \pm 6.0 \mu\text{m}$; $H: 29.7 \pm 4.9 \mu\text{m}$) fueron similares a los del día 6, pero las desviaciones estándar fueron considerablemente menores.

La muestra de agua de mar original, concentrada por filtración inversa, y mantenida en una probeta de 250 ml en la cámara de cultivo sin ningún aditivo, mostró también una variedad de tallas y diversos morfotipos a lo largo de 7 días. Los valores medios el 7º día fueron $L: 41.3 \pm 5.3 \mu\text{m}$; $H: 32.0 \pm 4.8 \mu\text{m}$ (Fig. 3.7D). Así pues, tanto la muestra de agua natural de una población multiespecífica incubada en la cámara de cultivo, como los grupos de individuos aislados e incubados en pocillos de 0.2 ml con un medio K modificado, mostraron cambios similares en la distribución de tallas, y aparición de células pequeñas, parejas conjugadas, y un descenso de la talla media.

DISCUSIÓN

Designación taxonómica de las células pequeñas.

Cuando las células vegetativas y las hipotéticas células pequeñas de una especie aparecen juntas en poblaciones naturales, resulta difícil decidir si las células pequeñas se adscriben o no a la misma especie si estas últimas tienen una forma ligeramente distinta, y si además la conexión entre las distintas formas no puede demostrarse en cultivos de laboratorio. Este ha sido el caso con las especies de *Dinophysis* estudiadas, a lo que hay que añadir las complicaciones asociadas a la baja densidad habitual en las poblaciones naturales. No obstante, el desarrollo de poblaciones excepcionales de *D. acuta* y *D. acuminata* en años recientes (Mac Kenzie 1992; Reguera *et al.*, 1990, 1995; Moita & Sampayo, 1993; Bardouil *et al.*, 1991), en los que se pudieron observar células pequeñas, pares de células dimórficas y pares acoplados (célula grande/ célula pequeña) llevó a sus observadores a sugerir que las células pequeñas y las células vegetativas no eran sino distintos estadios del ciclo vital de una misma especie.

La descripción original de algunas células pequeñas de *Dinophysis* clasificadas como especies distintas se ha basado con frecuencia en la observación de unos pocos ejemplares. Así, la descripción de Paulsen (1949) de *Dinophysis skagii* (la hipotética célula pequeña de *D. acuminata*) se hizo a partir de dos ejemplares que encontró entre una mezcla de *D. lachmanni* y *D. borealis* (ambas considerados por Solum como morfotipos de *D. acuminata*). Solum (1962) encontró tres ejemplares entre sus muestras de aguas noruegas que clasificó como *D. skagii* Paulsen. La descripción de Balech (1976) se hizo sobre la base de un sólo ejemplar, pero aún así, este autor fue capaz de diagnosticar que las placas sulcales presentaban las mismas características que las de *D. acuminata*. Bardouil *et al.* (1991) mostraron individuos dimórficos de *D. sacculus*, y sugirieron que la célula pequeña resultante era similar a *D. skagii*. Esta sugerencia posiblemente sea un error, ya que en sus muestras tenían una mezcla de dos especies muy próximas, *D. acuminata* y *D. sacculus*. Pero si estas dos especies se pretenden mantener separadas en el futuro, sería más apropiado sugerir que las células pequeñas que emergen de los pares de células dimórficas en Bardouil *et al.* (1991) son similares a *D. microstrigiliformis*, una pequeña forma de *Dinophysis* que Balech (1976), basado en análisis de morfología de placas, encontró extremadamente próxima y difícil de separar de *D. sacculus*. Jorgensen (1923) estaba convencido de que *D. dens* era una forma «degenerada» de *D. acuta*, de la misma forma que *D. diegensis* lo sería de *D. caudata*. En su obra «Mediterranean Dinophyceae» ilustró una *D. caudata* var. *subdiegensis* (Fig. 3.8 A) y una *D. diegensis* (Fig. 3.8 B), que parecen formas intermedias entre *D. caudata* y *D. diegensis*. Conviene señalar que el ejemplar de su Fig. 36, llamado *D. diegensis*, parece excesivamente grande y podría tratarse de un error de los aumentos indicados. Jorgensen también ilustró una «*D. diegensis*, una forma degenerada» (Fig. 3.8 C) que coincide con nuestra descripción de células dimórficas de *D. caudata*. Wood (1954), basado en estudios de la distribución de *D. caudata*, *D. diegensis* y *D. tripos* en aguas australianas, apoyó la opinión de Kofoid & Skogsberg (1928) de que *D. caudata* y *D. tripos* eran dos especies separadas, pero sugirió que *D. caudata* y *D. diegensis* eran formas de la misma especie; también mencionó una larga lista de autores que consideraban a *D. tripos* como una variedad de *D. caudata*. Posiblemente estos autores estaban observando formas intermedias entre *D. tripos* y su célula pequeña (*D. diegensis* var. *curvata*), en las cuales la proyección dorsal posterior –el principal rasgo morfológico que distingue a *D. caudata* de *D. tripos*– es difícil de detectar (como en la Fig. 3.4 F de este trabajo)

Así pues, *D. caudata* es una especie de *Dinophysis* que muestra una gran variabilidad morfológica entre distintas cepas regionales, pero también dentro de la misma región, lo que explica la compleja lista de sinónimos que se presentan en la revisión de Kofoid & Skogsberg (1928) sobre esta especie. Wood (1954) encontró que «cada región de Australia parecía tener su forma característica de *D. caudata* que era razonablemente estable para esa zona, por lo que estas formas debían tener un

significado ecológico». Estas observaciones concuerdan bien con las de Jorgensen (1923), quién describió unas cuantas variedades de *D. caudata*, cada una de ellas característica de regiones diferentes del Mediterráneo (Figs. 3.8 D-F). Nuestras observaciones de *D. caudata* apoyan las opiniones de Wood (1954) y Jorgensen (1923).

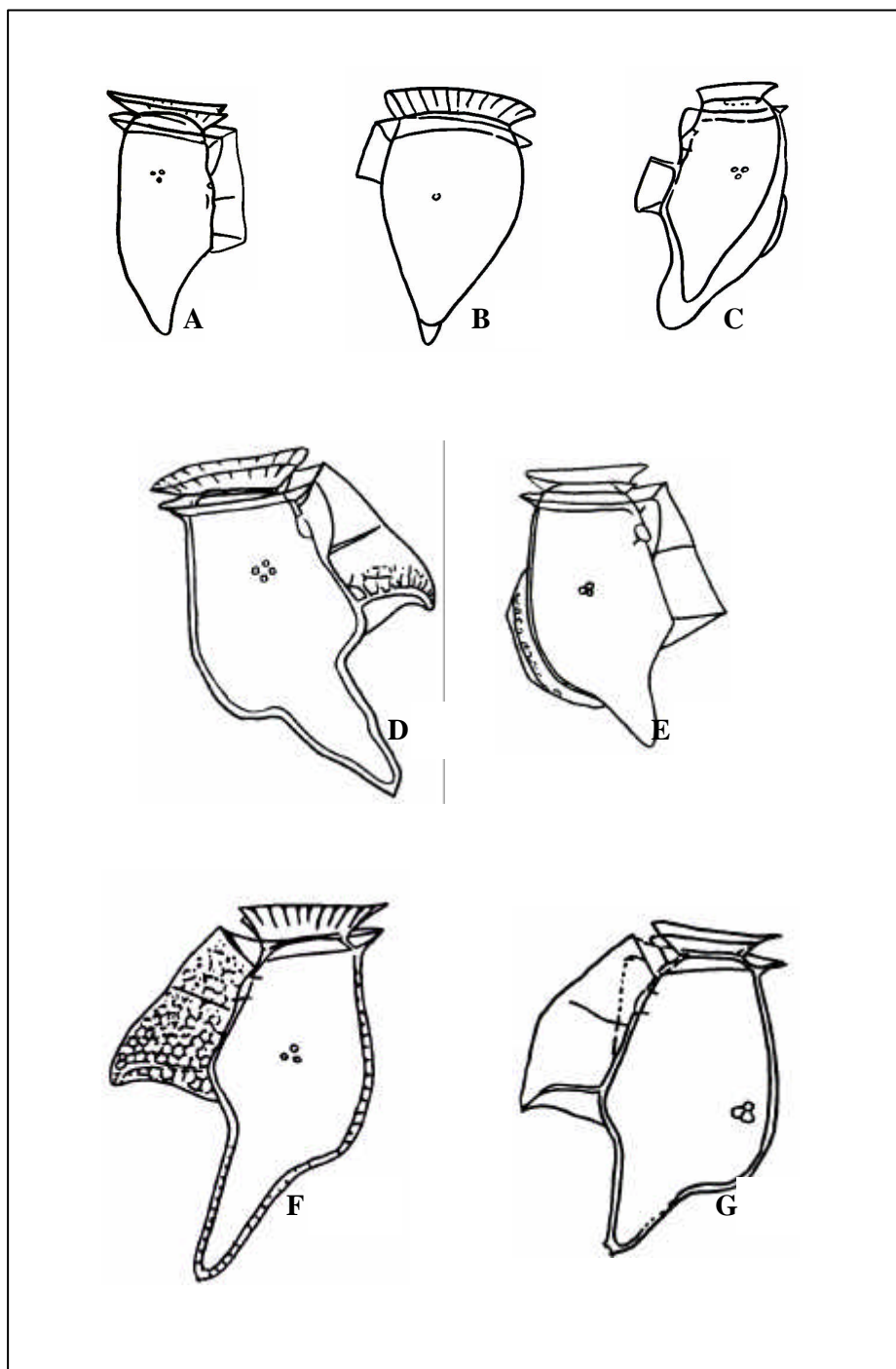


Figura 3.8. Ilustraciones de *Dinophysis caudata* redibujadas a partir de las Figs. 30-37 en Jorgensen (1923): (A) *D. caudata* var. *subdiegensis* (Fig. 35); (B) *D. diegensis* (?) (Fig. 36); (C) *D. caudata*, forma degenerada (Fig. 37); (D) *D. caudata* var. *abbreviata* (Fig. 31); (E) *D. caudata* var. *ventricosa* (Fig. 32); (F) *D. caudata* a Allieri f^a *speciosa* (Fig. 30); (H) *D. caudata* f^a *pontica* (Fig. 34).

La mayoría de los individuos de *D. caudata* observados en Galicia en años distintos son muy similares a la descripción de *D. caudata* var. *abbreviata* de Jorgensen (Fig. 3.8 D), un morfotipo robusto con proyección antapical reducida que encontró en la costa de Málaga (SE España), en una zona de intensos intercambios de agua Atlántica y Mediterránea próxima al Estrecho de Gibraltar. Las formas de *D. caudata* observadas en Galicia que difieren de esta descripción de la variedad *abbreviata* bien podrían ser interpretados, en la mayoría de los casos, como distintos estadios resultantes del proceso de formación de células pequeñas, a partir de divisiones depauperantes *sensu* von Stosch (1973), y el posterior crecimiento de las células pequeñas que daría lugar a células intermedias y a células de tamaño y forma típicos de la célula vegetativa.

La regresión parcial del proceso dorsal posterior en las células intermedias de *D. tripos*, y su práctica desaparición en sus células pequeñas y dimórficas explica el por qué algunos autores consideraron que *D. caudata* y *D. tripos*—cuya principal diferencia del primero es la presencia de un segundo proceso en posición dorsal posterior—eran la misma especie. También explica el que los autores clásicos, como Kofoid (1907), clasificaran a las células pequeñas de *D. tripos* como variedades de *D. diegensis*, y que Moita & Sampayo (1993) hipotetizaran que *D. diegensis* podía ser el gameto de *D. caudata* o de *D. tripos*. De hecho, la figura 6 de Moita & Sampayo (1993) es un claro ejemplo de pareja de células dimórficas de *D. tripos* que aún muestran restos de la proyección dorsal posterior de las grandes placas hipotécales maternas. En las rías gallegas, la comparación de formas de células pequeñas e intermedias de una floración simultánea de *D. caudata* y *D. tripos* en 1994 con las de otra floración en 1997 en la que la segunda especie estaba ausente, permitió la discriminación entre las formas pequeñas e intermedias de *D. caudata* y *D. tripos*.

Los procesos de polimorfismo han sido bien documentados en estudios de varios dinoflageladas de agua dulce (por ej., Pfiester & Popovsky, 1979; Kimmel & Holt, 1988), pero la información equivalente para dinoflageladas marinas es casi inexistente, con la excepción del complejo ciclo vital de *Pfiesteria piscicida* y otros «predadores tiende-emboscadas» (Burkholder *et al.*, 1992a, 1992b, 1998). Esta falta de información origina serios problemas en la sistemática de dinoflageladas que son difíciles de resolver si no se dispone de cultivos de la especie en estudio.

Distribución de las células pequeñas durante la época de aparición de *Dinophysis*

Las observaciones de años recientes muestran que la abundancia de células pequeñas de *Dinophysis* en relación con la abundancia de células vegetativas es muy variable. Durante una floración excepcional de *D. acuta* en las rías gallegas en 1989, las células de *D. dens* aparecieron en proporción significativa (9%) tan sólo durante



Figura 3.9. Microfotografía (contraste de fase) de un par aparentemente conjugado de *Dinophysis rotundata* y *D. cf. parvula*, unidas ventralmente a la altura del poro flagelar.

estadios tardíos del crecimiento poblacional que precedieron a la fase de declive. MacKenzie (1992) hizo observaciones similares durante una floración de *D. acuta* en Big Glory Bay (Nueva Zelanda). *D. dens*, que comprendía como promedio el $15 \pm 7\%$ de la población total de *D. acuta*, aumentó hasta alcanzar un 45% del total durante las etapas tardías y el declive de la floración. En una pluma del río Rin, Peperzak *et al.* (1996) detectaron las primeras células pequeñas coincidiendo con el máximo de una floración de *D. acuminata*, justo antes del declive poblacional. Moita & Sampayo (1993) encontraron *D. dens* y *D. cf. diegensis*, individuos dimórficos, e hipotéticos quistes de *D. acuta* y *D. tripos* tras detectarse los máximos de las poblaciones vegetativas de ambas especies, quizás por el estrés mecánico sufrido por las células durante un episodio de hundimiento. Todas estas observaciones apoyan la hipótesis de que las células pequeñas desempeñan un papel de gametos anisógamos positivos, que preceden al declive de la población y a la potencial formación de quistes.

Formación de células dimórficas, células pequeñas y células intermedias durante el ciclo celular de *Dinophysis*. Algunas hipótesis interconversiones.

El estudio del ciclo celular *in situ* de especies de *Dinophysis* para estimar las tasas de división mediante el modelo del índice mitótico (ver capítulo 8), requirió la recolección y concentrado de muestras de campo a intervalos de 1-2 h, y la observación de miles de células de *Dinophysis* de cada especie. Este ejercicio permitió la descripción de hipotéticas células pequeñas e intermedias de *Dinophysis* claramente distinguibles de las células vegetativas típicas. Coincidiendo con, o unas pocas horas antes del máximo de división vegetativa, se observó un pequeño porcentaje (0.1-10%) de células que estaban sufriendo una fisión celular -distinta que la división vegetativa normal- que daba lugar a parejas de células dimórficas (una mitad co-

rrespondía a la célula vegetativa grande, y la otra mitad a la descripción de otra «especie» más pequeña (Fig. 3.10 D), y posteriormente a dos pequeñas células hijas (Fig. 3.10 F). La silueta de las placas hipotenciales más pequeñas y recién formadas de las células dimórficas era la misma que la de pequeñas células de *Dinophysis* originalmente descritas como *D. skagi*, *D. dens*, *D. diegensis* y *D. diegensis* var *curvata* respectivamente, y que también se habían observado formando pares acoplados 'célula grande/célula pequeña' con su correspondiente célula vegetativa (Fig. 3.10 F), excepto el caso de *D. tripos*/*D. diegensis* var *curvata*.

Hasta la fecha, no se ha prestado mucha atención a las células intermedias de *Dinophysis*. El principal motivo es la dificultad en trazar los límites entre células grandes, intermedias y pequeñas que pudieran pertenecer o no a la misma especie. En el caso de *D. acuta*, las formas intermedias son como un *D. acuta* delgado, o como un *D. dens* ancho con las regiones anteriores de sus márgenes dorsal y ventral no paralelas, sino ligeramente divergentes. Pero en el caso de *D. caudata* y *D. tripos*, las profundas modificaciones observadas en las prolongaciones o procesos posteriores permitieron visualizar una posible secuencia de eventos. El aspecto necrótico de los restos de la gran placa hipotecal materna que sobresale de la recién formada, sin presentar bordes nítidos (Fig. 3.10 D), apoya la existencia de una división reductora tras la cual las dos células hijas resultantes son de un tamaño considerablemente menor. Esta clase de fisión celular es muy similar a la descripción de «división depauperante» dada por von Stosch en 1973. Por el contrario, las parejas de células intermedias recién divididas no eran dimórficas, las dos grandes placas hipotenciales tenían el mismo tamaño y forma, y tan sólo se podían observar restos de un puente dorsal megacítico normal (Fig. 3.10 O). Estas observaciones sugieren que las células intermedias son el resultado de la expansión de células pequeñas y no de la reducción de células vegetativas típicas. Este proceso de expansión explicaría la observación de algunos ejemplares de *D. acuminata* con bandas intercalares en sus grandes placas hipotenciales (Fig. 10 de Bravo *et al.*, 1995a; Figs. 3.6 A y C de este capítulo), como si el aumento de talla hubiera tenido lugar en varias etapas. Algunos autores han sugerido que las zonas de crecimiento intercalar muy amplias se podrían emplear como indicadoras de estados zigóticos, ya que la fusión del gameto anisógamo positivo con el femenino durante la reproducción sexual supondría un gran incremento de volumen en la célula resultante. Sin embargo en el hipotético ciclo sexual de *Dinophysis*, el potencial gameto anisógamo positivo es una célula muy pequeña, y no se han observado aumentos significativos de tamaño tras la fusión celular, en incubaciones de laboratorio, de *D. pavillardii* (Giacobbe & Gangemi, 1997) y de *D. fortii* (Ushida *et al.*, 1999). Por el contrario, se ha descrito un considerable aumento de volumen y presencia de abundantes vacuolas digestivas en el heterótrofo *D. rotundata* tras la ingestión de presa (Hansen, 1991). En las cuatro especies de *Dinophysis* contempladas en este estudio se han podido observar células hinchadas

cargadas de vacuolas, y hay evidencias de comportamiento mixotrofo en *D. acuminata* y *D. norvegica* (Jacobson & Andersen 1994), y en *D. fortii* (Koike *et al.*, 2000). Por tanto, es posible que además de los cambios de tamaño asociados con el crecimiento celular (crecimiento vegetativo, formación de cigoto), también la expansión celular causada por el comportamiento mixótrofo pueda dejar huellas en forma de bandas intercalares en la hipoteca.

Formación y crecimiento de las células pequeñas en incubaciones en laboratorio de *D. acuminata*.

Si bien no se llevaron a cabo incubaciones de células de *D. caudata* o *D. tripos*, las observaciones obtenidas durante las incubaciones de *D. acuminata* apoyan las hipótesis previas sobre formación de células pequeñas e intermedias. En los pocillos de las cámaras de incubación se observaron células pequeñas 4-5 días después de los aislamientos; también se observaron en las poblaciones multiespecíficas mantenidas en la cámara de cultivo. Las dos nubes separadas que se obtuvieron en la representación gráfica de las medidas celulares el día 6 (Fig. 3.7 B), y la distribución posterior el día 9 formando un *continuum* (Fig. 3.7 C) sugieren que las células pequeñas se forman al poco tiempo de someter las células naturales a condiciones de laboratorio, y que las formas intermedias aparecen después de la formación de las pequeñas. Pero simultáneamente se pudo observar un descenso gradual de la talla máxima celular. Este descenso, que correspondería a las células recién formadas - cuyas placas hipotecales son ligeramente menores pero con un contorno paralelo al de la gran placa hipotecal materna (Fig. 3.6 C)- podría interpretarse como el resultado de sucesivas divisiones vegetativas en condiciones subóptimas.

Así pues, se sugieren dos mecanismos distintos, superpuestos, causantes ambos de un descenso de la talla media poblacional:

- «División depauperante», que da lugar a la formación de dos células dimórficas que se convierten después en dos células pequeñas, con distinto tamaño y forma que la célula madre;
- División vegetativa en condiciones subóptimas, que da lugar a dos células hijas cuyas hipotecas tienen la misma forma pero tamaño ligeramente menor que el de la célula madre.

Función potencial de las células pequeñas de *Dinophysis*

La producción de células pequeñas mediante una «división depauperante» *sensu* von Stosch (1973) parece constituir una rápida respuesta de la población cuando se expone a cambios ambientales que posiblemente sean estresantes. Estas células pequeñas no se producen por gemación, y el pequeño porcentaje que representan de la población total no apoya la idea de que la formación de células pequeñas sean una alternativa para incrementar la tasa de división poblacional - tal como se ha descrito

en *Karenia* (*Gymnodinium*) *mikimotoi* (Partensky & Vaulot, 1989). Las células pequeñas muestran un comportamiento natatorio muy distinto, y su distribución vertical en la columna de agua no siempre va en paralelo con la de la población de células grandes; los pares aparentemente conjugados se distinguen fácilmente de los pares de células, unidas por el margen dorsal, que resultan de la fisión vegetativa. Bhaud *et al.* (1988) mostraron la inducción de gametogénesis en cultivos de *Prorocentrum micans*, cuando se transferían las células a medios de cultivo distintos, y la posterior fusión de isogametos mediante un tubo de fertilización y posterior deterioro de la célula donadora (o gameto isógamo positivo). Pero en el caso de células pequeñas de *Dinophysis*, parece que una vez que las células se han aclimatado a las nuevas condiciones, son capaces de crecer y alcanzar la talla vegetativa normal. Una explicación alternativa en el caso de las incubaciones en pocillos con elevada densidad celular sería que los restos de células grandes muertas habrían suministrado los nutrientes limitantes; no obstante Delgado *et al.* (1996) demostraron la formación de una célula grande de *Dinophysis sacculus* a partir de una pequeña incubada en un pocillo. Existen abundantes referencias de células pequeñas que se convierten en intermedias, y lo contrario, en cultivos (Silva & Faust, 1995). Por tanto, si las células pequeñas son formas diferenciadas con función de gametos, parece que las condiciones ambientales pueden provocar tanto el proceso de diferenciación, como el proceso de desdiferenciación, que hace que la célula pequeña se convierta en intermedia y posteriormente en célula vegetativa grande, una vez que las células se han aclimatado o que se han restablecido las condiciones de crecimiento óptimas. Así pues, la formación de células pequeñas puede ser una rápida respuesta fisiológica a condiciones ambientales transitorias. Las observaciones en especies de *Dinophysis* en Galicia y Portugal se ajustan bien a esta interpretación: *D. acuminata*, la especie que presenta una mayor variación morfológica en la región, es una especie costera con una estación de crecimiento muy larga (primavera a otoño), que tolera rangos muy amplios de temperatura y salinidad. Por el contrario, *D. acuta*, especie con morfología muy estable, presenta una distribución muy estacional y tolera rangos muy estrechos de temperatura y salinidad (Reguera *et al.*, 1993; Palma & Moita, 1998).

El descenso gradual de talla media poblacional de las células vegetativas pudiera resultar de un mecanismo distinto de la «división depauperante», y representar una respuesta de crecimiento en condiciones subóptimas. El descenso de tamaño en este caso es lento, las células no sufren cambios muy marcados de tamaño, y mantienen una forma similar a la de las células vegetativas. Otra posible explicación sería que las células de *Dinophysis*, después de cada división vegetativa, producen una mitad complementaria ligeramente menor. Si bien las células de *Dinophysis* no están sujetas a las restricciones físicas de las diatomeas, no se sabe durante cuánto tiempo pueden durar las grandes placas hipotecales maternas de la población inóculo inicial, transmitidas sucesivamente al 50% de individuos de cada generación posterior. En

este contexto, la formación de células pequeñas mediante división depauperante podría constituir un mecanismo de rejuvenecimiento que aseguraría la formación de material tecal nuevo, ya fuera a través de un ciclo sexual, o mediante el crecimiento de células pequeñas a intermedias y posteriormente a grandes.

Si los cambios bruscos en las condiciones ambientales provocan una rápida formación de células pequeñas en las poblaciones naturales, la alternancia de condiciones buenas para el crecimiento (ej: una marcada y persistente estratificación) y condiciones transitorias estresantes (ej: afloramiento intenso que rompe la estratificación, hundimientos..), dará como resultado una población con una mezcla de clases de edad en la que coexistirán células grandes, pequeñas e intermedias. En otras palabras, la composición de tallas de la población de una especie dada de *Dinophysis* puede ser un buen reflejo de la historia previa de condiciones ambientales a las que ha estado expuesta la población.

La formación de células pequeñas, mediante divisiones depauperantes, durante las etapas tardías del crecimiento poblacional (observaciones de campo), o cuando las células se transfieren bruscamente a condiciones de cultivo distintas (observaciones de laboratorio), su pequeño tamaño y escasa pigmentación, y el gran núcleo que poseen estas células, son un conjunto de hechos que apoyan las hipótesis previas sobre el carácter sexual de éstas. Otras observaciones adicionales que apoyan este punto de vista son: a) la observación de un hipotético «tubo de fertilización» que conecta la célula grande con la pequeña en pares acoplados *D. acuta/D. dens* (Reguera *et al.*, 1995), y *D. fortii/D. fortii* pequeña (Ushida *et al.*, 1999), y b) La aparente migración de los núcleos de estas parejas (*D. acuta/D. dens*) a posiciones anteriores próximas al área del poro flagelar en poblaciones naturales de *D. acuta* (MacKenzie 1992) y en estudios del ciclo celular con individuos teñidos con DAPI (Reguera *et al.*, 1996). En incubaciones de laboratorio también se han observado parejas de dos células pequeñas, prácticamente del mismo tamaño, unidas por el margen ventral. Estas observaciones podrían sugerir que la conjugación entre dos células pequeñas (además de entre una célula grande y una pequeña) es posible. No obstante, la unión de estas dos células no tiene por qué acabar en fusión si no son dos individuos sexualmente compatibles, y si no se da la conexión íntima necesaria para inducir la formación del tubo de fertilización. Se necesitan nuevas observaciones de los procesos de fusión y de germinación de los hipotéticos quistes *in vitro* para completar y aclarar los eslabones aún desconocidos del ciclo sexual de *Dinophysis*. Pero puede que esto no sea tan fácil de conseguir si se tiene en cuenta que durante las floraciones excepcionales de *D. acuta* y *D. acuminata* en Big Glory Bay (Nueva Zelanda), MacKenzie encontró pares acoplados *D. acuta/D. dens* (2.5 % de la población total) en tan sólo una muestra, a 5 m de profundidad, a las 19:00, y parejas *D. acuminata/D. skagii* durante otro muestreo (29% de la población total) en una muestra de superficie. Así pues, es posible que la formación de pares acoplados sea un proceso

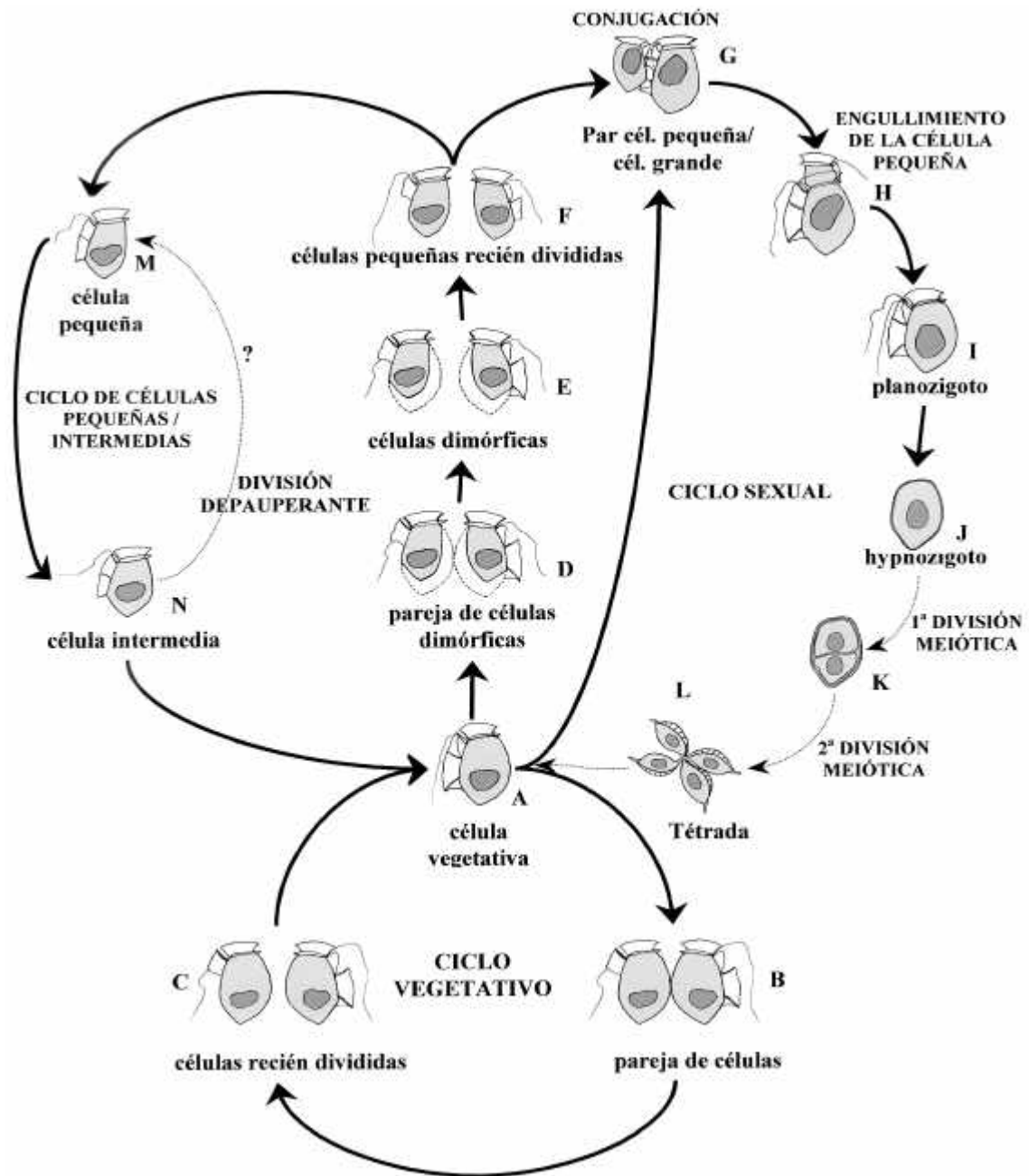


Figura 3.10. Diagrama esquemático sobre pasos confirmados (línea continua) y estadios hipotéticos (línea discontinua) del ciclo vital de *Dinophysis* spp. (A-C) Ciclo asexual o vegetativo: (A) Células vegetativas completamente desarrolladas, (B) células en parejas y (C) células recién divididas mostrando desarrollo incompleto de la lista sulcal izquierda. (A-L) Ciclo sexual: (D) Pareja de células dimórficas resultantes de una división depauperante, y (E) células dimórficas recién separadas (la línea discontinua indica los bordes de las placas hipotecales maternas). (F) Células pequeñas recién divididas que muestran aún un desarrollo incompleto de la lista sulcal izquierda. (G) Célula pequeña (actuando como un putativo gameto (+) anisógamo) y célula grande (actuando como un putativo gameto (-) anisógamo), con los núcleos migrados a posiciones anteriores, firmemente conectadas por el margen ventral y aparentemente conjugadas. (H) Engullimiento de la célula pequeña por la célula grande a través de la sutura apical del *sulcus*. (I) Planozigoto con dos flagelos longitudinales. (J) Hipotético hipnozigoto con doble pared. (K) Hipotética primera división meiótica. (L) Tétrada. (M-N) Esquema simplificado de un hipotético ciclo de células pequeñas/células intermedias.

muy rápido y puntual, que tiene lugar en determinadas circunstancias, en una estrecha ventana de tiempo y espacio, y que será muy difícil observar este proceso si no se realiza un muestreo muy frecuente (cada 30 min o incluso más frecuente) a la hora del día apropiada.

La observación de parejas de potenciales gametos anisógamos, y de la célula grande de la pareja engulléndose a la pequeña (Fig. 3.10 G) fue descrita originalmente por von Stosch (1964, 1965) en sus estudios sobre el ciclo sexual de *Ceratium cornutum*. También se han citado células grandes engulléndose a las correspondientes células pequeñas en poblaciones naturales de *D. acuta* (Fig. 11 en MacKenzie 1992), y en incubaciones de laboratorio de *D. pavillardii* (Figs. 19-21 en Giacobbe & Gangemi, 1997) y de *D. fortii* (Fig 1d en Ushida *et al.*, 1999). Estos últimos autores denominaron «pares fusionándose» a los pares formados por una célula normal engullendo a una «enana», pero sugirieron que el engullimiento de las células pequeñas por las grandes podría ser un acto de canibalismo desarrollado como estrategia de supervivencia en situaciones subóptimas. Esto, por cierto, pudiera ser un fenómeno dependiente de la densidad, ya que todas las observaciones de engullimiento se hicieron durante floraciones naturales con alta densidad celular, o en incubaciones de laboratorio. No obstante la observación de individuos con dos flagelos longitudinales en *D. acuminata* (MacLachlan, 1993) y en *D. sacculus* (Delgado *et al.*, 1996), señal clara de que hubo una fusión previa de gametos - y la migración de los núcleos a posiciones anteriores cerca del poro flagelar (MacKenzie, 1992; Reguera *et al.*, 1996) no apoyan el argumento del canibalismo.

Existen otros procesos que afectan al tamaño y forma celular en *Dinophysis*. La longitud y profundidad de las células recién divididas son menores que las de las células vegetativas maduras; se observó que la talla media celular, asumiendo una forma de esferoide, era 12.5% superior en las horas previas a la división (Reguera *et al.*, 1996); pero los cambios más pronunciados se notan cuando se observan las células megacíticas en visión ventral, ya que las células se expanden sobretodo por la región de la sutura sagital, tal como ha sido descrito en la división de *Ornithocercus* (Taylor, 1973). Otro proceso que afecta al tamaño y forma de *Dinophysis* es el comportamiento heterótrofo/mixótrofo. Hansen (1991) ha descrito cómo las células de *D. rotundata* se hinchan cargadas de vacuolas cuando acaban de ingerir a su presa mediante un proceso de «mizocitosis» (Schnepf & Deichgräber, 1984); el mismo proceso podría darse en *D. acuminata* y *D. norvegica* (Jacobson & Andersen, 1994). En todas las especies de *Dinophysis* de las rías gallegas estudiadas en este trabajo se han podido observar individuos vacuolados. Pero las células vacuoladas y fuertemente pigmentadas también se han asociado con putativos planocigotos de *D. acuminata* (MacLachlan, 1993). Las células de *Dinophysis* no están sujetas a las restricciones físicas de las diatomeas que sufren un descenso de talla gradual hasta que la repro-

ducción sexual les permite recuperar el tamaño original. Pero en poblaciones establecidas durante meses (como es frecuente en el caso de *D. acuminata* en las rías gallegas), en las que la división puede desarrollarse en condiciones subóptimas, se observa una tendencia de descenso de talla. Este proceso justificaría la presencia de individuos cuya placa hipotecal recién formada es ligeramente menor que la de la célula madre, es decir, tiene la misma forma pero es ligeramente más pequeña, como el individuo de la figura 3.6 C.

Pero los cambios de tamaño, y también de forma, son mucho más acusados durante la formación de células pequeñas por división depauperante. En el caso de *D. caudata* en las rías, el tamaño y forma de las células vegetativas completamente desarrolladas es muy estable, y próxima a la ilustración de *D. caudata* var. *abbreviata* (Fig. 3.8 D) de Jorgensen (1923). Su ilustración de *D. caudata* var. *ventricosa* presentada en la misma revisión (Fig. 3.8 E) probablemente corresponde a células intermedias recién divididas de *D. caudata* con la proyección antapical muy reducida, y que conservan restos del puente megacítico. Las formas más estilizadas que Jorgensen denominó *D. caudata* a. *Allieri* f^a *speciosa* (Fig. 3.8 F), y la robusta *D. caudata* f^a *pontica* (Fig. 3.8 H) no se han observado nunca en Galicia. Así pues, gran parte de la variabilidad morfológica observada aquí podría deberse a los procesos de formación de células pequeñas y al crecimiento de células pequeñas hasta formar células intermedias y grandes. No se sabe si las células pequeñas se forman tan sólo a partir de células grandes, o si también pueden hacerlo a partir de células intermedias, pero esta pregunta se podrá contestar con los resultados de futuras incubaciones de células aisladas en el laboratorio. Otro eslabón del ciclo sexual que está completamente inexplorado es el de la germinación de los hipotéticos quistes de *Dinophysis*. No obstante, Moita & Sampayo (1993) observaron posibles quistes de *D. tripos* con su interior en aparente fisión, y en el presente trabajo se observaron tétradas (Fig. 3.10 L) de *D. caudata*. Es posible que algunas formas intermedias correspondan a los meiocitos que resultan de las primeras divisiones meióticas tras la germinación de quistes, de igual manera que los descritos meiocitos de *Ceratium cornutum* (von Stosch, 1964, 1965) que muestran mitades complementarias aberrantes, distintas en tamaño y forma a las células vegetativas.

Los últimos avances en la aplicación de técnicas de biología molecular han permitido secuenciaciones de ADN a partir de muestras incluso de una sola célula (Marín *et al.*, 2001a, 2001b). Los estudios en curso aplicarán estas técnicas a los aislamientos de células individuales pequeñas e intermedias de poblaciones naturales de *Dinophysis*, lo que permitirá determinar inequívocamente su conexión con las células vegetativas. La rápida formación de las células pequeñas con posible función de gameto anisógamo positivo o *swarmer* cuando las condiciones ambientales son desfavorables, pero que al mismo tiempo son capaces de crecer y convertirse de nuevo en

células grandes una vez aclimatadas a las nuevas circunstancias, o cuando mejoran las condiciones ambientales, parece constituir una estrategia común de las especies de *Dinophysis* estudiadas. Esta estrategia puede resultar especialmente útil en el caso de especies, como *D. acuminata* en las rías gallegas, que están presentes durante largos períodos de tiempo (hasta 8-9 meses en un año), son poco abundantes, y están expuestas a condiciones muy variables. Es de esperar que estas especies muestren una gran variabilidad morfológica. Pero una gran parte de esta variabilidad queda explicada por los ciclos sucesivos de formación de células pequeñas y de crecimiento de células pequeñas para formar células intermedias y grandes. Estos ciclos se solapan dando lugar a un *continuum* de formas cuyos extremos son la célula grande vegetativa y el pequeño hipotético gameto anisógamo positivo de la especie.

CAPÍTULO 4

TENDENCIAS EN LAS POBLACIONES DE *DINOPHYSIS* SPP EN AGUAS GALLEGAS

Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S. & Carbonell, A. (1993). Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp in Galician coastal waters. In: Smayda T.J. & Shimizu Y. (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 559-564 (REVI SADO).

TENDENCIAS EN LAS POBLACIONES DE *DINOPHYSIS* SPP EN AGUAS GALLEGAS

RESUMEN

Dinophysis acuminata y *D. acuta* son agentes de episodios de presencia de toxinas diarreogénicas (DST) en aguas gallegas. Entre 1985 y 1990, *D. acuminata* proliferó entre abril y septiembre en las Rías Bajas y hasta noviembre en las Rías Altas, y *D. acuta* a finales de verano o principios de otoño tan sólo en las Rías Bajas. Las etapas tempranas de incremento de la concentración de *D. acuminata* se asociaron con el calentamiento primaveral de la temperatura superficial del mar y establecimiento de marcados gradientes de temperatura y salinidad durante la época de afloramiento, y las de incremento de *D. acuta*, con marcados gradientes térmicos (termoclinas/picnoclinas) a mayor profundidad en agosto. Las proliferaciones de *D. acuminata* aparecieron bajo rangos más amplios de temperatura (12.5-22 °C) y salinidad que las de *D. acuta*, que mostraron preferencia por rangos más estrechos de temperatura (15-17.5 °C) y salinidades superiores a 35.0 psu. Cuando ambas especies coincidieron en el tiempo, ocuparon capas diferenciadas de la columna de agua. Las concentraciones de *D. acuminata* aumentaban hacia el norte, y dentro de cada ría, los valores máximos se detectaron en las zonas medias. Las concentraciones de *D. acuta* aumentaban hacia el sur y mostraron un gradiente positivo desde la parte interna de las rías hacia las bocas durante las proliferaciones de verano. En 1988, 1989 y 1990, *D. acuta* proliferó a principios de agosto, en la época en que se habían detectado concentraciones elevadas de *D. acuminata* en los años anteriores. Se sugiere que las apariciones habituales de *D. acuta* a principios de otoño eran poblaciones de la plataforma adyacente introducidas en las rías; por el contrario en 1988, 1989 y 1990, las poblaciones se desarrollaron in situ dentro de las rías. Se cree que los veranos extremadamente secos y cálidos de esos tres años, combinados con episodios de afloramiento moderados – que permitieron el establecimiento de termoclinas persistentes a la profundidad adecuada en el interior de las rías- crearon las condiciones óptimas para las inusuales proliferaciones de agosto de *D. acuta* y el declive temprano de las poblaciones de *D. acuminata* entre 1988 y 1990. Se presenta un modelo conceptual simplificado sobre los mecanismos de proliferación y mantenimiento de poblaciones de *Dinophysis* spp. en las rías.

TRENDS IN THE OCURRENCE OF *DINOPHYSIS* SPP IN GALICIAN WATERS

ABSTRACT

Dinophysis acuminata and *D. acuta* are agents of Diarrhetic Shellfish Toxins (DST) episodes in Galician waters. Between 1985 and 1990, *D. acuminata* proliferated from April to September in the Rías Bajas and until November in the Rías Altas, and *D. acuta* in late summer or early autumn only in the Rías Bajas. Early increase in *D. acuminata* concentrations was associated with spring warming of sea surface temperature and establishment of temperature and salinity gradients during the upwelling season, and of *D. acuta* with marked temperature gradients and deeper thermocline/pycnoclines in August. Proliferations of *D. acuminata* occurred over wider ranges of temperature (12.5-22 °C) and salinity than those of *D. acuta*, which seemed to prefer a narrower temperature range (15-17.5 °C) and salinities above 35.0 psu. When both species coincided in time, they occupied different levels in the water column. *D. acuminata* concentrations increased northwards, and within each ría maximum values were found in the middle parts. *D. acuta* concentrations increased southwards and showed positive gradients from the inner parts to the mouths of the rías during summer proliferations. In 1988, 1989 and 1990, *D. acuta* proliferated in early August, at the time when high numbers of *D. acuminata* were found in previous years. It is suggested that previous occurrences of *D. acuta* in the Rías Baajs at the beginning of autumn were advected shelf populations, whereas in 1988, 1989 and 1990, populations developed in situ within the rías. It is also suggested that extremely dry, hot summers combined with moderate upwelling pulses, which allow thermoclines to persist at suitable depths within the rías, created the optimum conditions for unusual August blooms of *D. acuta* and for the early decline of *D. acuminata* between 1988 and 1990. A simplified conceptual model is presented on the mechanisms of proliferation and maintenance of *Dinophysis* spp populations within the rías.

INTRODUCCIÓN

Oceanografía de las Rías Gallegas

Las rías son estuarios invadidos por el mar en los que los aportes de agua dulce del río y de la escorrentía forman una capa de agua salobre menos densa que circula por superficie hacia el océano. Este flujo superficial hacia fuera se compensa por una entrada de agua oceánica por el fondo (circulación estuárica positiva). No deben confundirse las rías con los fiordos, estructuras costeras comunes en las costas de Escandinavia y Escocia, con un umbral en su desembocadura que restringe sobremanera la circulación por el fondo, y favorece los procesos de estratificación y anoxia en verano.

Las rías gallegas y su plataforma adyacente (Fig. 4.1), se encuentran en el límite septentrional del sistema de afloramiento del noroeste de África y, por lo tanto, están sometidas a episodios intermitentes de afloramiento con un marcado carácter estacional. El afloramiento costero, inducido por vientos de componente norte, aporta agua fría y rica en nutrientes que entra en las rías por el fondo. La posición del anticiclón de las Azores condiciona el régimen de vientos dominante en la zona. Entre marzo y octubre este anticiclón se desplaza hacia el norte y determina que los vientos dominantes sean de componente norte, favorables al afloramiento. El resto del año, la costa gallega queda bajo la influencia de las bajas presiones con vientos dominantes de componente sur desfavorables al afloramiento (Fraga, 1981; Fraga *et al.*, 1982; Blanton *et al.*, 1982). Los pulsos de afloramiento costero provocan la intensificación de la circulación estuárica positiva de las rías, con entrada de agua aflorada por el fondo y la correspondiente salida de agua por superficie. Por el contrario, durante los períodos de relajación del viento o de cambio a vientos de componente sur, la circulación de las rías se invierte. El agua oceánica superficial, más cálida y empobrecida en nutrientes, penetra en el interior de las rías por superficie, donde se apila y se hunde para salir hacia el océano por el fondo. Al final de la temporada de afloramiento es frecuente observar en la plataforma adyacente chorros de agua cálida superficial con dirección hacia el polo. Estos chorros dan lugar a hundimientos de agua en la boca de las rías que bloquean la circulación estuárica (Fraga *et al.*, 1987; Figueiras & Ríos, 1993; Figueiras *et al.*, 1998; Sordo *et al.*, 2001). Separando la circulación en dos capas está la pycnoclina, a través de la cual se produce mezcla, más o menos intensa en función de la intensidad de la circulación, pero en la que el flujo horizontal es prácticamente nulo. No obstante, la pycnoclina sufre frecuentes desplazamientos verticales ocasionados por los pulsos de afloramiento-hundimiento y por los momentos de relajación (Figueiras & Fraga, 1990; Fraga *et al.*, 1992).

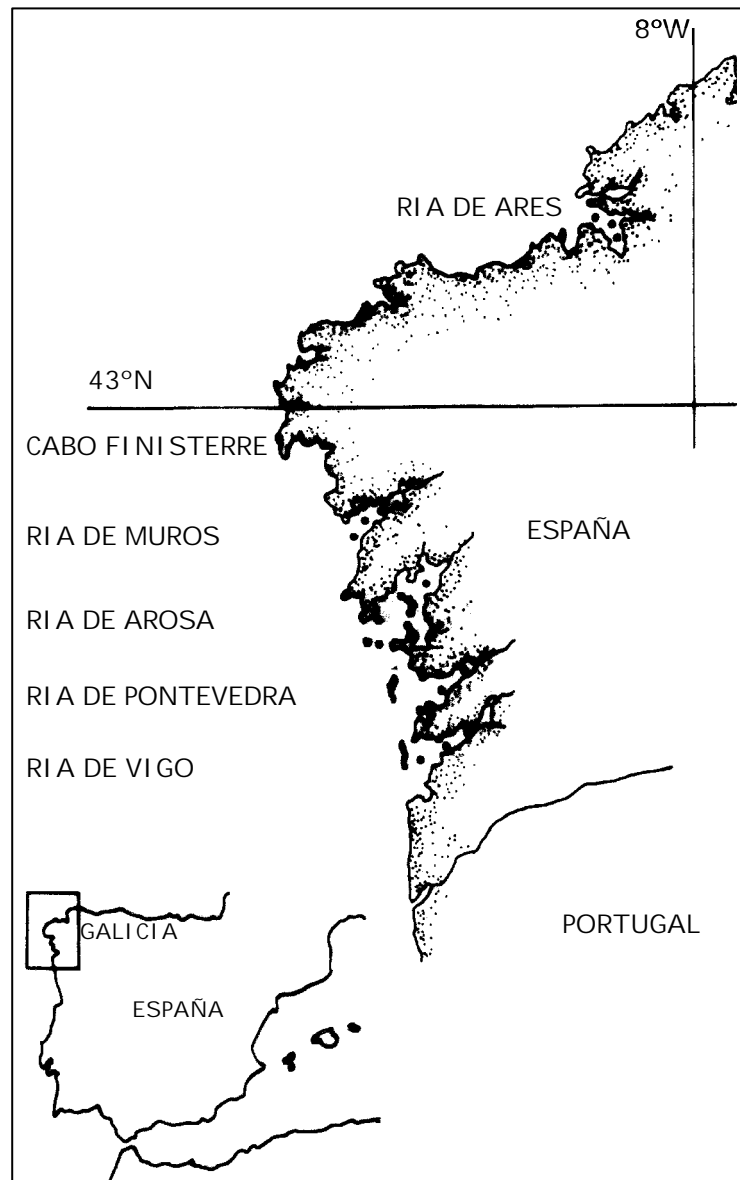


Fig. 4.1. Mapa de localización de las Rías Gallegas.

Los pulsos de afloramiento conllevan un enriquecimiento de la capa fótica con nutrientes de aguas oceánicas profundas, lo que favorece el desarrollo de elevadas concentraciones de fitoplancton, fundamentalmente diatomeas, en el interior de las rías (Mariño *et al.*, 1985; Varela *et al.*, 1987a, 1987b; Figueiras *et al.*, 1990). Los pulsos de afloramiento también pueden tener un efecto de "siembra", reintroduciendo en las rías poblaciones de fitoplancton previamente hundidas en la plataforma (Varela *et al.*, 1991). El patrón de circulación de las rías presenta caracteres distintivos entre los dos grupos de rías (Altas y Bajas), y en cada ría particular, determinados por su orientación y topografía. Estas diferencias microescalares se reflejan en importantes variaciones en la estructura vertical de la columna de agua, y en la composición y abundancia del fitoplancton entre distintas zonas de cada ría, por lo

que tienen una gran influencia en la intensidad y persistencia de los episodios de microalgas nocivas en ellas.

Aplicando un modelo de cajas a la circulación de la Ría de Vigo, Fraga *et al.* (1992) pudieron estimar el balance de nutrientes y determinaron que en una situación de afloramiento moderado, el agua aflorada alcanzaba la superficie tan sólo en las partes más internas de la ría. En las zonas medias, la capa superficial permanecía empobrecida de nutrientes y la nitroclina se encontraba a una profundidad aproximada de 10 m. En estas condiciones, Prego (1987) estimó que la elevación de agua sería de $21 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$, por lo que la fertilización de la capa superior desde los 10 m de profundidad llevaría un tiempo considerable (~48 días), muy por encima del tiempo de duplicación del fitoplancton. Ríos *et al.* (1996), aplicando el mismo modelo de cajas, estimaron que en la zona media de la ría de Vigo, durante un episodio otoñal de proliferación de *Gymnodinium catenatum* y de afloramiento débil, la incorporación de nutrientes por el fitoplancton tan sólo tenía lugar en la capa intermedia donde se encontraba la nitroclina, mientras que en la capa superficial empobrecida se producía síntesis de carbohidratos sin asimilación de nutrientes. En la capa inferior tenían lugar procesos de remineralización. Así pues, a finales de verano el amonio podía ser la principal fuente de nitrógeno, dominando la producción regenerada sobre la producción nueva. Figueiras & Ríos (1993) presentaron un modelo conceptual según el cual la segunda mitad de la estación de afloramiento (julio-octubre), cuando se dan condiciones de estabilidad física de la columna de agua y la nitroclina se sitúa a aproximadamente 10 m de profundidad, sería la época más probable para la aparición de proliferaciones de grandes dinoflageladas migratorias. La intensidad del afloramiento sería el factor crítico para el mantenimiento de estas condiciones: si fuera demasiado intenso, se destruiría la estratificación, favoreciendo el predominio de diatomeas; si fuera débil, la nitroclina se situaría por debajo de la capa fótica y tendrían más posibilidades de éxito las microalgas flageladas migratorias, o las capaces de adaptarse a condiciones de baja intensidad luminosa.

Variaciones estacionales e interanuales de *Dinophysis spp* en las rías gallegas.

Las especies del género *Dinophysis* Ehrenberg son componentes habituales del fitoplancton de las rías gallegas. Las especies más abundantes son *Dinophysis acuminata* Claparede & Lachmann, y *Dinophysis acuta* Ehrenberg, con concentraciones máximas anuales que oscilan entre 10^3 y $5 \cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$. Con ambas especies se asocian episodios de presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos (DST) de la región (Reguera *et al.*, 1993a, 1993b; Blanco *et al.*, 1995). Otras especies del género que se observan habitualmente pero en menores concentraciones son: *D. sacculus*

Claparède & Lachmann, *D. rotundata* Claparède & Lachmann, *D. caudata* Saville-Kent, *D. tripos* Gourret, *D. hastata* Stein and *D. fortii* Pavillard. Debido a su escasez, las especies de este género no han merecido especial atención en una gran serie de trabajos de ecología del fitoplancton desarrollados hasta finales de los años 70. No obstante, desde la identificación del síndrome de intoxicación diarreogénica por bivalvo (Yasumoto *et al.*, 1978) y la confirmación de *D. fortii* como agente de este síndrome en aguas japonesas (Yasumoto *et al.*, 1980), las especies del género *Dinophysis* se convirtieron en organismos "diana" en los programas de seguimiento de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas, y en estudios intensivos de taxonomía, autoecología y toxicología.

En este trabajo se describe la variación estacional de *D. acuminata*, y *D. acuta*, las dos especies de *Dinophysis* más abundantes en las Rías Bajas, y de *D. acuminata* (*D. acuminata* + *D. sacculus*) en las Rías Altas, así como las fluctuaciones interanuales observadas entre 1985 y 1990. Se presta especial atención a la distribución vertical de las células de *Dinophysis* spp. en relación con la meteorología, la estructura térmica de la columna de agua y las especies acompañantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos empleados se obtuvieron durante el programa de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico, en el cual se muestreaban una o dos veces por semana varias estaciones de las rías de Muros, Arosa, Pontevedra, Vigo (Rías Bajas) y Ares-Betanzos (Rías Altas). En cada muestreo se midió la temperatura de la columna de agua y se tomaron muestras para determinar la composición y abundancia del fitoplancton. Las muestras de fitoplancton se recogieron con botellas de inversión a 0, 5 y 10 m de profundidad en 1985 y 1986, y con manguera de tramos acoplados (0-5, 5-10, 10-15, y a veces también 15-20 m) tal como la descrita por Lindahl (1986) a partir de 1986. Simultáneamente se tomaban arrastres verticales de red, desde 15-20 m de profundidad hasta la superficie, para observación de muestras *in vivo* y detección precoz de especies de interés cuya concentración se encontraba por debajo de los límites de detección ($20 - 40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de los recuentos habituales.

Los análisis de fitoplancton se realizaron al microscopio invertido por el método de Utermöhl, tras sedimentación de columnas de 25-50 ml durante 24 h. Para la identificación y recuento de dinoflagelados grandes se observó todo el fondo de la cámara de sedimentación. Los índices de afloramiento se tomaron del trabajo de Lavín *et al.* (1991). Los datos de temperatura del aire y pluviosidad fueron suministrados por el Observatorio Meteorológico de La Coruña y del aeropuerto de Vigo.

RESULTADOS

Los datos de temperatura del aire, tomados en el aeropuerto de Vigo (Tabla 4.1), muestran que en el verano y principios de otoño entre 1985 y 1990 existió una tendencia general hacia el calentamiento, lo que concuerda con la tendencia global observada en la década de los 80 (Jones, 1991). Los valores máximos de temperatura superficial del mar (TSM) en las rías durante los mismos meses también mostraron la misma tendencia. Las precipitaciones fueron normalmente bajas durante el verano (julio-agosto) y muy variables en septiembre-octubre (Tabla 4.1). La Fig. 4.2 muestra los índices de afloramiento diarios entre junio y noviembre para los años 1986 y

Tabla 4.1. Anomalías (°C) de la temperatura del aire en relación con la media de los últimos 30 años; máximo anual de temperatura superficial del agua del mar y precipitación mensual total (mm) entre 1985 y 1990 en la P2 de la Ría de Pontevedra.

	Anomalías de la Temperatura del Aire (°C)				TSM _{max} (°C)	Total Precipitaciones mensuales (mm)			
	Jul	Agos	Sept	Oct		Jul	Agos	Sept	Oct
1985	+0.7	-1.0	+3.2	+1.6	19.9	61.0	45.2	10.2	85.4
1986	+1.7	-1.3	+0.6	+1.6	20.1	4.2	64.7	231.7	84.5
1987	+2.1	+2.0	+2.1	-1.5	20.0	4.1	34.8	119.6	544.1
1988	-0.8	+0.1	+1.5	+0.7	20.4	124.7	10.2	18.2	213.7
1989	+3.2	+2.1	+0.6	+3.1	20.9	9.5	21.0	5.2	160.9
1990	+2.8	+2.2	+1.8	-0.1	22.0	25.9	12.8	51.9	428.1

1989, y la distribución vertical de temperatura en la estación P2 de la Ría de Pontevedra (Rías Bajas). Se escogieron estos dos años por ser los más extremos en lo que a proliferaciones de *D. acuta* se refiere. Destaca la estratificación térmica de la columna de agua durante el verano y la homogeneización de otoño.

Variación espacio-temporal de la distribución de *D. acuminata*

La Fig. 4.3 muestra la distribución de *D. acuminata* en una estación fija de la Ría de Ares (Rías Altas) entre junio y diciembre de 1989, la Fig. 4.4 la distribución de temperatura, salinidad y concentración media de *D. acuminata* durante 1990 en la misma estación, y la Fig. 4.5 la distribución de temperatura y de *D. acuminata* en la P2 de la Ría de Pontevedra durante 1991.

En las Rías Altas, *D. acuminata* presentó una prolongada estación de crecimiento, mostrando una alternancia de máximos y mínimos durante la estación de afloramiento. En las Rías Bajas la situación fue similar, excepto en los años de aparición temprana de *D. acuta*, en los que el declive de la población de *D. acuminata* coincidió con

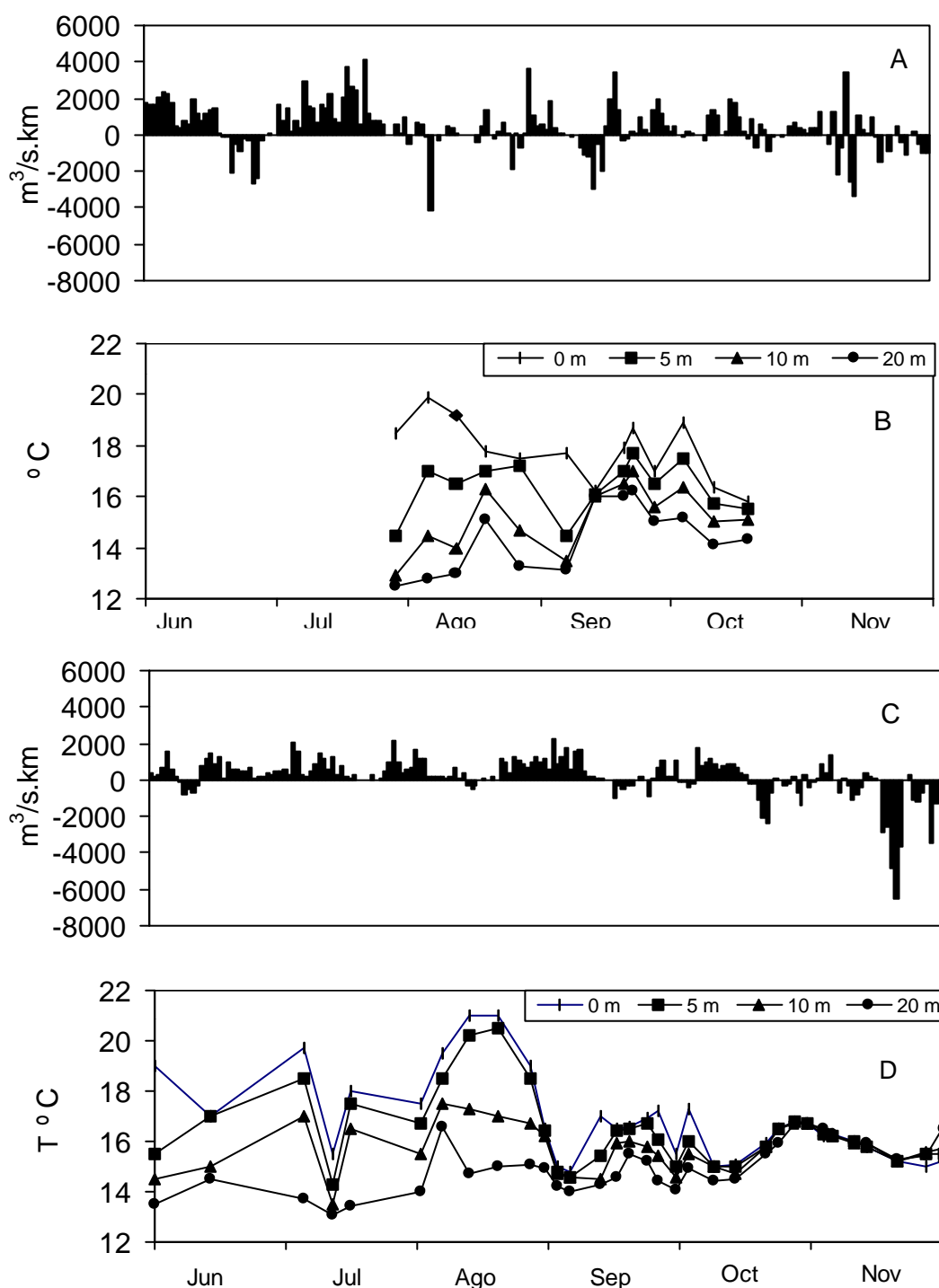


Fig. 4.2. Índices de afloramiento diarios entre junio y noviembre para los años 1986 (A) y 1989 (C) y distribución vertical de temperatura (B, 1986; D, 1989) en la estación P2 de la Ría de Pontevedra.

el comienzo de la proliferación de *D. acuta*. Los años de excepcional abundancia de *D. acuta* en las Rías Bajas lo fueron también en cuanto a escasez de *D. acuminata*. Células aisladas de esta especie se observaron todo el año en toda la costa gallega, y en un rango de temperaturas (13-21 $^{\circ}\text{C}$) mucho más amplio que *D. acuta* (15.5-17 $^{\circ}\text{C}$). En la somera ría de Ares (Rías Altas) los máximos celulares se encontraron normal-

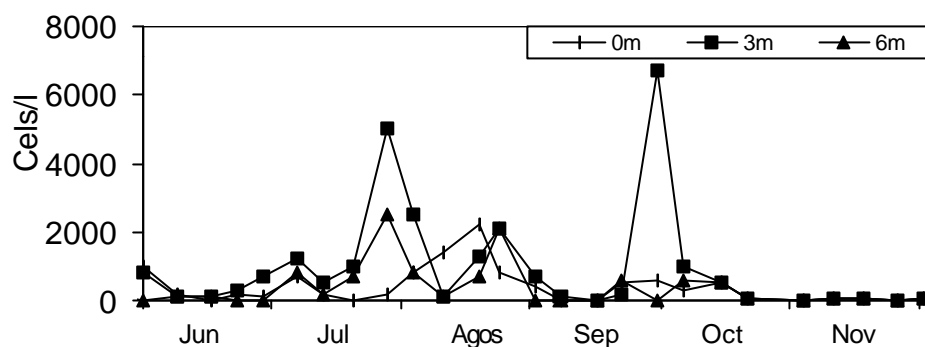


Fig. 4.3 Distribución anual de *D. acuminata* en una estación fija de la Ría de Ares (Rías Altas) en 1989.

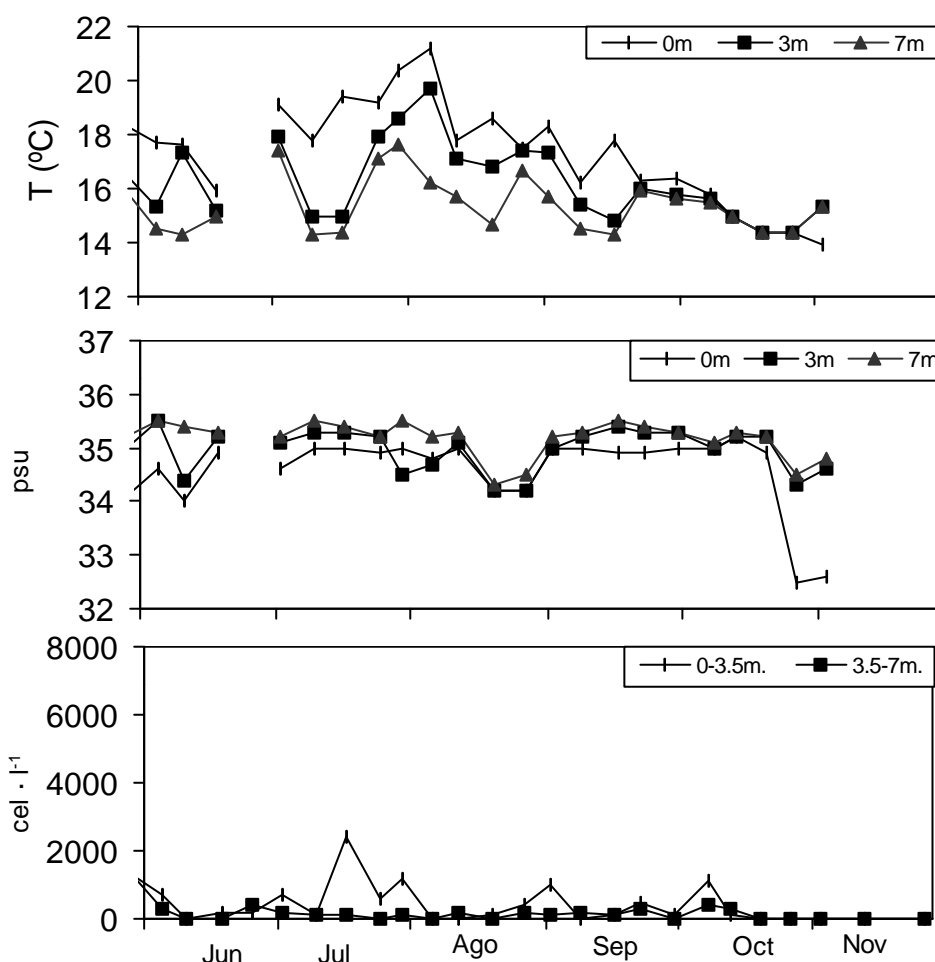


Fig. 4.4 Distribución de temperatura, salinidad y concentración media de *D. acuminata* durante 1990 en una estación fija de la Ría de Ares (Rías Altas)

mente a 3 m, en la misma zona donde se observaba una marcada pycnoclina subsuperficial en mayo-junio. Así pues, los máximos celulares de *D. acuminata* se observaron a 13-16 °C y bajo la capa de agua más salobre (30-34 psu) (Fig. 4.4). En septiembre-octubre, cuando desapareció la estratificación, y la temperatura era de 13-16 °C, apareció un máximo otoñal de *D. acuminata*, a veces más intenso que los máximos primaverales o estivales. En las Rías Bajas, mucho más profundas, los máxi-

mos primaverales de *D. acuminata* se observaron en mayo-junio, en las partes medias-externas de las rías, en la zona de termoclina subsuperficial a 5-10 m con temperaturas de 13-15 °C (Fig. 4.5). Los máximos primaverales de *D. acuminata* aparecieron junto con máximos de diatomeas pennadas (*Pseudo-nitzschia* spp) o pequeños dinoflagelados (*Scrippsiella* spp., *Prorocentrum micans*). Los máximos de *D. acuminata* observados en julio y agosto - en 1988, 1989 y 1990 - cuando la capa superficial alcanzó temperaturas de hasta 22°C y la estratificación se extendía hasta los 15-20 m, se distribuyeron en la capa superficial (0-5 m) y correspondieron a fases finales de la población. Los máximos otoñales de *D. acuminata* en las Rías Bajas se dieron bajo circunstancias similares a las mencionadas en los máximos otoñales de *D. acuta* (incremento brusco de la concentración celular, máximos en la capa superficial y extendidos por toda la ría, asociados con relajación del afloramiento y hundi-

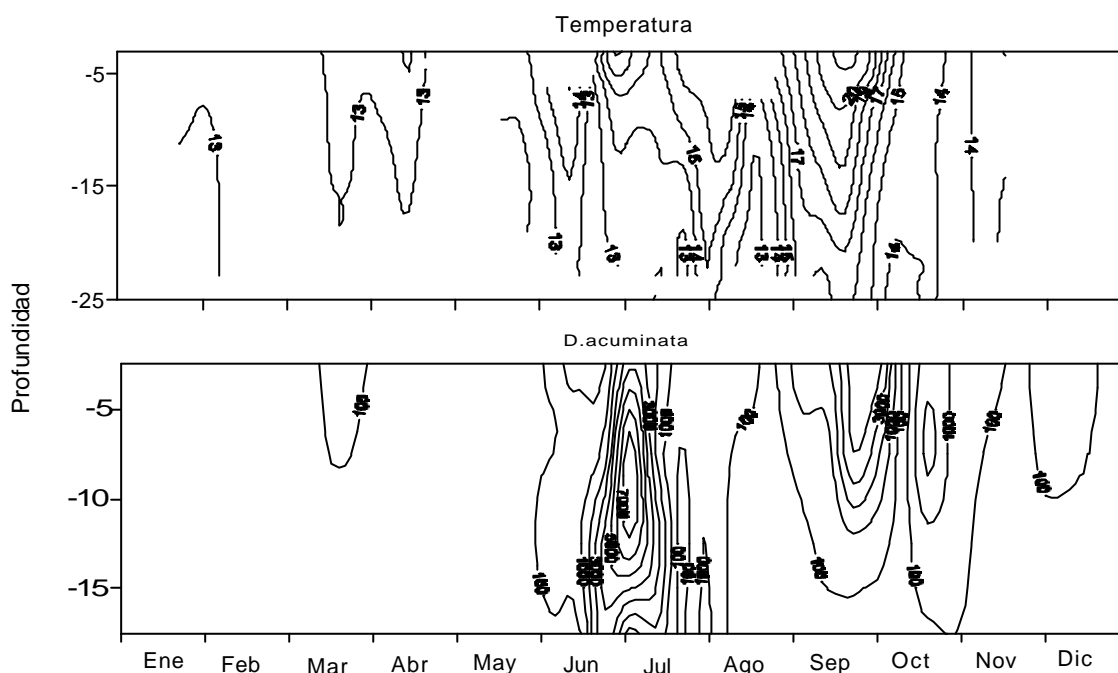


Fig. 4.5. Distribución de *D. acuminata* y temperatura en la estación de P2 de la Ría de Pontevedra durante 1991.

miento, dominancia de *Dinophysis* spp. con otros grandes dinoflagelados), y en algunos casos acompañaban al máximo anual de *D. acuta*.

Variación espacio-temporal de la distribución de *D. acuta*

En las Rías Altas, las concentraciones de *D. acuta* observadas fueron casi siempre muy bajas (por debajo del nivel de detección de los análisis cuantitativos) y nunca se registraron episodios de DST asociados a esta especie. Por el contrario en las Rías Bajas, *D. acuta* apareció cada año en concentraciones altas ($>10^3$ cel · l⁻¹) y asociado con episodios de DST, si bien sus apariciones presentaban un marcado ca-

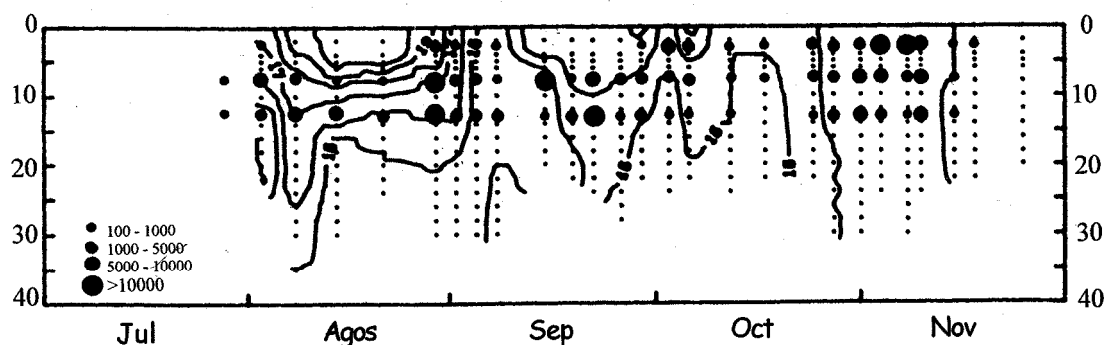


Fig. 4.6. Distribución vertical de *Dinophysis acuta* (cel · l⁻¹) en la estación P2 de la Ría de Pontevedra entre julio y diciembre de 1989.

rácter estacional (Fig. 4.6). Las proliferaciones de esta especie se registraron normalmente en otoño (septiembre-octubre), al final de la estación de afloramiento, cuando desaparecía la estratificación estival y la columna de agua se homogeneizaba a una temperatura de 16-17°C. Los máximos de concentración de células siempre se observaron en estos casos en la capa superficial de 0 a 5 m. Sin embargo en 1988, 1989 y 1990 se observaron valores moderados de *D. acuta* (10²-10³ cel. · l⁻¹) desde el mes de julio y densas proliferaciones en el mes de agosto (Reguera *et al.*, 1990). Estas inusuales abundancias de *D. acuta* en los meses de verano, no se observaron en años posteriores a 1990 (Blanco *et al.*, 1998) y se desarrollaron bajo condiciones

Tabla 4.2. Comparación de patrones y condiciones ambientales durante las proliferaciones de *D. acuta* de verano (agosto) y otoño (finales de septiembre-octubre).

Proliferaciones de verano de <i>D. acuta</i>	Proliferaciones otoñales de <i>D. acuta</i>
Poblaciones persistentes que se mantienen durante 2 ó más meses	Aparición brusca de poblaciones densas pero efímeras (1-2 semanas)
Máximo celular localizado en la capa de discontinuidad térmica (a aprox. 10 m) en un rango de T de 15.5-17 °C	Máximo celular en la capa superficial de 0-5 m; columna de agua isoterma (15-17 °C); proliferación extendida por toda la ría
Años excepcionalmente cálidos y secos en los que la TSM _{max} fue > 20 °C	Años "normales" con TSM _{max} de 18-20°C
<i>Dinophysis acuta</i> representaba un pequeño porcentaje de una comunidad fitoplanctónica dominada por diatomeas pennadas y/o dinoflagelados desnudos	<i>D. acuta</i> era una de las especies dominantes, junto con otros grandes dinoflagelados migratorios; ausencia de diatomeas
Estación de afloramiento: alternancia de pulsos de afloramientos y períodos de relajación	Fin de la estación de afloramiento; pulsos de hundimiento

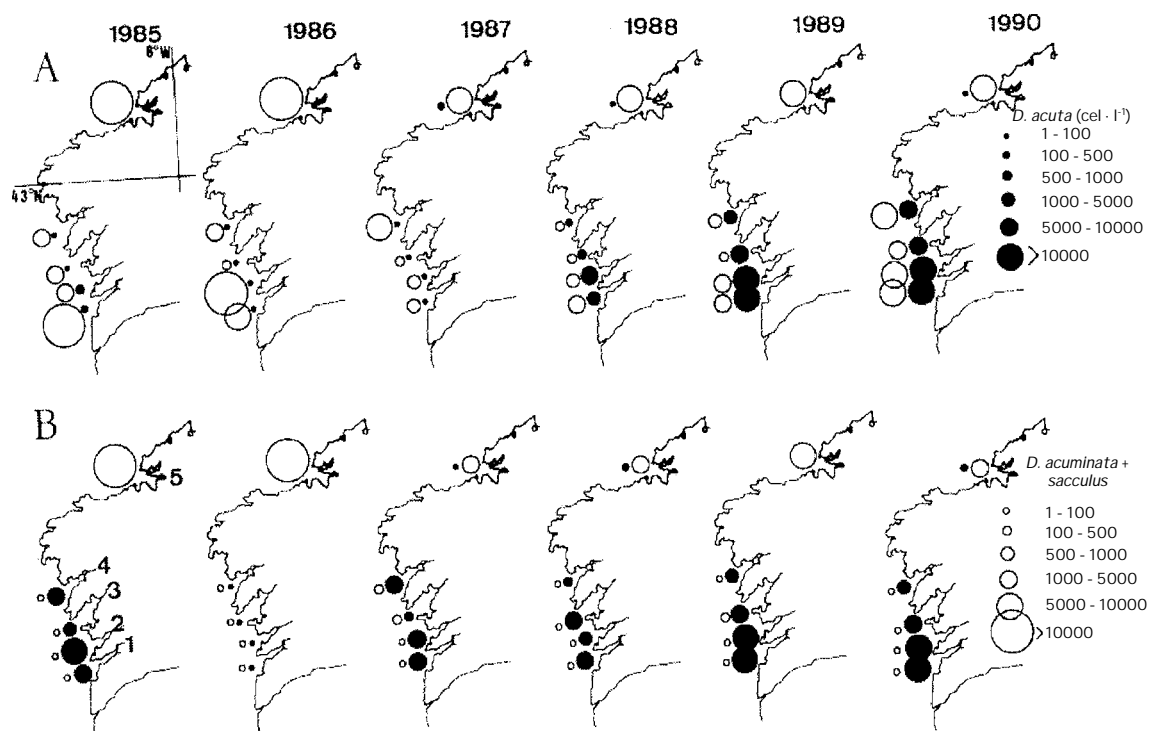


Figura 4.7. Variabilidad interanual de la abundancia de *D. cf acuminata + sacculus* y *D. acuta* en las Rías Gallegas entre 1985 y 1990 (concentración máxima, en $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$, registrada en cada ría). A = condiciones de primavera-verano (estratificación + pulsos intermitentes de afloramiento); B = condiciones de otoño (columna de agua isoterma). 1 a 4 = Rías Bajas: 1 = Vigo. 2 = Pontevedra. 3 = Arosa. 4 = Muros; 5 = Rías Altas: Ría de Ares.

ambientales muy distintas a las reinantes durante los episodios de otoño. La comparación de condiciones ambientales durante los episodios de aparición de proliferaciones de *D. acuta* de verano y otoño se resume en la Tabla 4.2.

Fluctuaciones interanuales de la abundancia de *D. acuminata* y *D. acuta*

La Fig. 4.7 resume las fluctuaciones interanuales de la abundancia y estacionalidad de *D. acuminata* y *D. acuta* en las rías gallegas entre 1985 y 1990. El rasgo más destacado lo constituyen las densas proliferaciones de *D. acuta* observadas en las Rías Bajas en agosto de 1988, 89 y 90, mientras que en años previos sólo se detectaron células aisladas de esta especie en verano y las proliferaciones aparecían asociadas a los períodos de hundimiento de otoño, con advección de agua de la plataforma al interior de las rías. Además, se observó un gradiente norte sur en las poblaciones de *D. acuta*, que alcanzaron siempre concentraciones más elevadas en las rías de Pontevedra y Vigo. Los dos años extremos en la aparición de esta especie fueron 1986, en que las concentraciones fueron mínimas, y 1989 donde se alcanzaron los máximos de la serie. Las concentraciones de *D. acuminata* en las Rías Altas declinaron a partir de 1987, observándose los valores mínimos en 1988. En las Rías Bajas, los valores máximos de primavera-verano se registraron en 1985 y 1986, coincidiendo

con los años de valores mínimos de *D. acuta*. Los máximos otoñales fueron muy moderados durante el período de estudio, cosa que no es habitual en esta especie, como lo muestran los datos de la Fig.4.6, correspondientes a un estudio posterior, en 1991, en la Ría de Pontevedra, y datos más recientes de Blanco *et al.* (1998).

DISCUSIÓN

La estación de crecimiento, es decir, el período del año durante el cual se registró una alternancia de máximos y mínimos, de *D. acuminata* en las rías Altas fue muy prolongado. La profundidad a la cual se detectaron los máximos concuerda con observaciones en aguas someras de autores franceses (Lassus *et al.*, 1988; Bardouil *et al.*, 1991). No obstante en la costa atlántica francesa las proliferaciones de *D. acuminata* se citan coincidiendo con el declive de floraciones primaverales de diatomeas, mientras que en las rías gallegas se encuentran los máximos coincidiendo con y después de densas proliferaciones de diatomeas (*Pseudo-nitzschia* spp.) y asociados con otros dinoflagelados, especialmente *Prorocentrum micans* y *Ceratium furca*. La explicación a esta diferencia sería que en las rías se da un crecimiento *in situ* de *D. acuminata*, mientras que en las observaciones en aguas francesas someras se trataría de poblaciones desarrolladas en mar abierto e introducidas en las bahías y estuarios por acción del viento y las mareas, tal como ya ha sido interpretado por Delmas *et al.* (1992). La asociación de *D. acuminata* con *P. micans* es bastante común en otras regiones europeas, lo que justifica la errónea adscripción del síndrome diarreogénico a *P. micans* en la década de los 70 (Kat, 1979) cuando esta especie aparecía como dominante en la comunidad fitoplanctónica y aún no se habían publicado los resultados de Yasumoto *et al.* (1980) en los que se asoció el síndrome diarreogénico con las proliferaciones de *Dinophysis fortii*.

Los máximos de primavera en las rías (mayo-junio) aparecieron después de los primeros pulsos de afloramiento, tras aumento de la insolación y de la temperatura de la superficie del agua y el establecimiento de una estratificación termohalina a 5-10 m de profundidad. Esta especie presentó altas concentraciones en un amplio rango de temperaturas: entre 13 y 15 °C en los incrementos de primavera, e incluso a 22°C en fases tardías de crecimiento de la población en las Rías Bajas. Las variaciones de concentración se relacionaron fundamentalmente con la intensidad de los pulsos de afloramiento y la duración de los períodos de relajación, es decir, con el régimen del afloramiento. Los pulsos intensos de afloramiento, que intensifican la circulación estuárica positiva y causan un descenso de temperatura, provocaron que los máximos se situaran en las bocas de las rías o incluso que las células se dispersaran hacia la plataforma. Por el contrario, la incidencia de vientos de componente sur provocaron transportes transversales a la plataforma hacia el interior de las rías, aumento de temperatura y acumulación de poblaciones de *Dinophysis* incluso en las

estaciones más internas. *D. acuminata* se registró en las rías con salinidades iguales o mayores que 34.5 psu, pero se ha citado en rangos más amplios, de 28-32 psu, en Francia (Lasus *et al.*, 1988) y Holanda (Kat, 1984).

D. acuta presentó una distribución más nerítica y sus máximos se establecieron en aguas estratificadas en las que la picnoclina se situaba a mayor profundidad (≥ 10 m). Los máximos, localizados en la capa estratificada y en las estaciones más externas de las rías y en la plataforma adyacente, se encontraron hasta 20 m de profundidad, en aguas de salinidad igual o superior a 35.0 psu, valor común en las partes externas de las rías en verano y a principios de otoño antes de la temporada de lluvias. El desarrollo excepcional de esta especie en 1989 se describe con detalle en el capítulo 5. Durante 1986, año en que se observaron valores mínimos de *D. acuta*, se registraron índices de afloramiento inusualmente intensos en el mes de julio (Fig. 4.2) que posiblemente impidieron el establecimiento de poblaciones iniciales en el interior de las rías. Las temperaturas en la capa de 10-20 m eran casi 2 °C inferiores a las alcanzadas en 1989, y los índices de afloramiento en el mes de agosto fueron muy bajos. El año 1987 se caracterizó por un verano muy cálido pero con abundantes precipitaciones. Las condiciones de 1989, año en el que se dio una combinación de pulsos de afloramiento moderados, verano muy cálido, marcada estratificación a los 10-15 m de profundidad y una inusual sequía, parecieron crear la situación óptima para el desarrollo de poblaciones estables de *D. acuta* dentro de las Rías Bajas.

A partir de la información disponible hasta la fecha, nos podemos aventurar a presentar un modelo conceptual simplificado que explica las etapas de proliferación, mantenimiento y declive de las poblaciones de *D. acuminata* y *D. acuta*. En la Fig. 4.8 se presenta un esquema de dos situaciones extremas de una población de *D. acuminata*. En invierno se detectan concentraciones celulares muy bajas (presencia en arrastres de red, concentración inferior a $40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) que se distribuyen homogéneamente en la columna de agua, si bien no hay que descartar la existencia de poblaciones residuales de invierno concentradas en puntos/profundidades desconocidas y no exploradas en los controles habituales de los programas de seguimiento. El incremento numérico ($200 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) temprano se registra a finales de marzo-principios de abril asociado con mayor insolación, incremento de la temperatura superficial y de la estabilidad de la columna de agua por la formación de marcadas picnoclinas, tras el *bloom* primaveral. En estas condiciones, el máximo celular de *D. acuminata* se localiza en la capa de discontinuidad termohalina. La agregación en esta capa de discontinuidad presenta las siguientes ventajas: a) Biológicas: posible efecto Allee de estimulación del crecimiento por sustancias segregadas por las propias células a partir de un umbral de concentración determinado u otro tipo de estímulo dependiente de la densidad o tamaño mínimo de inóculo. Incluso si no se diera un efecto Allee, se requiere un tamaño mínimo de inóculo para que una población pueda crecer y mantenerse (Slobodkin, 1953). Además, la región de la picnoclina

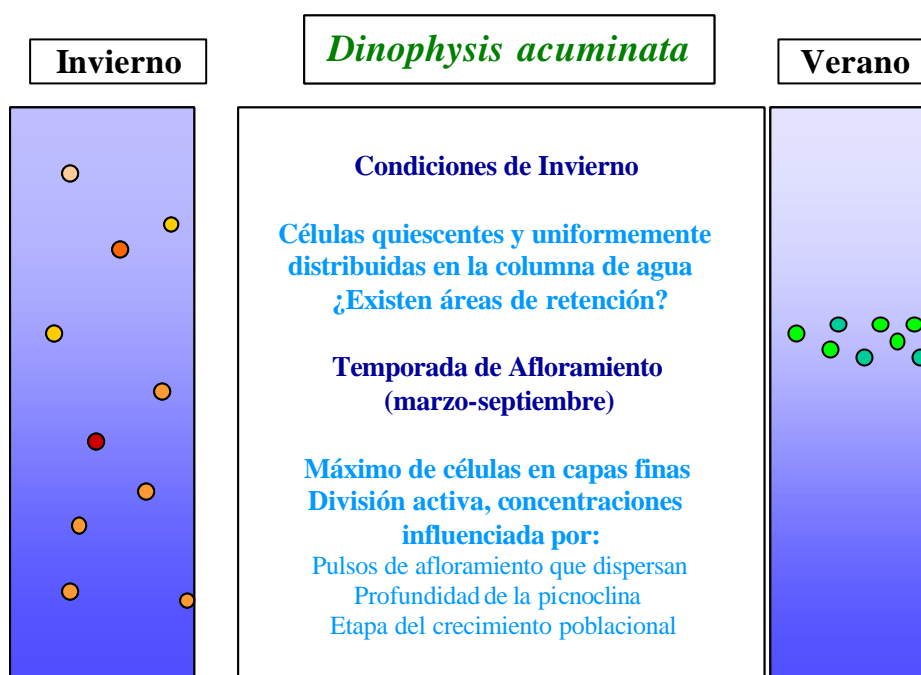


Fig. 4.8. Diagrama simplificado dos escenarios extremos en los que se pueden encontrar las poblaciones de *Dinophysis acuminata* en Galicia en invierno y verano.

ha sido descrita con frecuencia como un «frente vertical» en donde se dan complejas interacciones tróficas y producción de nitrógeno regenerado por el microplancton heterótrofo; b) Químicas: zona de interfase entre la capa superficial donde los nutrientes son utilizados con mayor velocidad por las diatomeas y las capas más profundas y ricas en nutrientes por difusión de la NACW aflorada; c) Físicas: si se acepta el modelo de circulación estuárica en dos capas, con flujo del agua superficial hacia afuera, compensado por entrada de agua (incluido el afloramiento) por el fondo, la capa de discontinuidad o pycnoclina constituiría una zona de desplazamiento horizontal casi nulo que facilitaría el desarrollo y mantenimiento de poblaciones de dinoflagelados con tasas de división moderadas ($\leq 0.5 \text{ div} \cdot \text{d}^{-1}$). Cada uno de estos factores o los tres conjugados justificarían su asociación con los incrementos numéricos de la población en el escenario descrito.

Una vez establecida la población inicial, el incremento numérico, la dispersión de células hacia fuera ó su acumulación dentro de las rías serán controlados por el régimen de afloramiento (intensidad, duración de períodos de relajación entre pulsos) y las mareas. Los pulsos de afloramiento debilitan la estratificación y causan una elevación de las isopletras donde se localiza el máximo celular; si son intensos, causan dispersión y flujo de las poblaciones hacia fuera, pero si son moderados, contribuyen a acentuar la estratificación y la heterogeneidad de la distribución vertical de las células; por el contrario, los vientos de componente sur causan un apilamiento de agua en el interior de las rías y pulsos de hundimiento que favorecen la congregación de dinoflagelados nadadores (incluido *D. acuminata*) en la capa superficial de agua.

Entre finales de mayo y mediados de junio se detecta el primer máximo ($> 10^3$ cel \cdot l $^{-1}$) de *D. acuminata*. y desde entonces hasta el máximo otoñal (septiembre-octubre), se pueden observar una serie de máximos y mínimos determinados por el régimen de afloramiento y de mareas. En años «normales», el declive de la población tiene lugar a mediados de otoño, cuando se homogeniza la columna de agua, desaparece la estratificación y aumenta la turbulencia y profundidad de la capa de mezcla. Así pues, las proliferaciones de esta especie coaparecen con las de distintas diatomeas, y el incremento primaveral se observa típicamente durante y después de las proliferaciones de diatomeas pennadas del género *Pseudo-nitzschia*, entre las que se encuentra la especie toxígena *P. australis*, productora de ácido domoico.

En años excepcionales, tales como 1889 y 1990, en los que se dieron proliferaciones tempranas de *D. acuta*, el declive de la población de *D. acuminata* se observó en verano (julio-agosto) coincidiendo con las temperaturas máximas (20-22° C) del agua superficial, y el establecimiento de picnoclinas más profundas (> 10 m). En estas etapas finales se observaron complejas distribuciones de tallas de la población de *D. acuminata*, que incluía células pequeñas e intermedias, y pares conjugados «célula grande-célula pequeña». Las diferencias interanuales en la distribución temporal de *D. acuminata* y *D. acuta* en los años «inusuales», tales como 1989 y 1980, podría justificarse en base a los distintos requerimientos fisiológicos de ambas especies en lo que concierne a profundidad de la capa de discontinuidad térmica. *D. acuta*, especie mucho más grande y voluminosa que *D. acuminata*, será capaz de recorrer mayores distancias verticales en el transcurso de sus ritmos circadianos, y se desarrollará con más éxito en las partes medias-externas de las rías en años en que la picnoclina se sitúa a mayor profundidad. El cociente entre la velocidad vertical del agua y la profundidad de la picnoclina fue sugerido por Figueiras *et al.* (1994) como un factor clave en la selección de especies con posibilidades de crecimiento *in situ* en condiciones de estratificación.

En los años que se observaron poblaciones densas de *D. acuminata*, se detectaron poblaciones relevantes (> 200 cel \cdot l $^{-1}$) de esta especie desde finales de marzo, mientras que en años «pobres» en *D. acuminata* se presentaron poblaciones muy escasas, con frecuencia detectables tan sólo en los arrastres de red (< 40 cel \cdot l $^{-1}$), hasta principios de junio (Blanco *et al.*, 1998). Puede que en esta especie sea importante un «efecto inóculo», dependiente del tamaño de la población hibernante, que deberá considerarse en futuros modelos predictivos sobre la iniciación y declive de proliferaciones de esta especie. No obstante, queda pendiente por resolver la posible existencia de áreas de retención en la que se congregarían células hibernantes o alguna forma equivalente de resistencia que contribuiría como inóculo en las poblaciones del año siguiente.

CAPÍTULO 5

AUTOECOLOGÍA Y ALGUNOS ESTADIOS DEL CICLO VITAL DE *DINOPHYSIS ACUTA* EHRENBORG

AUTOECOLOGIA Y ALGUNOS ESTADIOS DEL CICLO VITAL DE *DINOPHYSIS ACUTA* EHRENGERG.

RESUMEN

En el verano-otoño de 1989, hubo una floración persistente e inusual de Dinophysis acuta Ehrenberg en las Rías Bajas gallegas asociada a episodios de presencia de toxina diarreica en los bivalvos (DST), en concentraciones no aptas para el consumo, que afectaron a la comercialización de mejillón entre agosto y mediados de diciembre. Se tomaron muestras integradas (0-5, 5-10 y 10-15 m) de agua semanalmente en seis estaciones de las rías de Vigo (V1, V2, V3) y Pontevedra. (P1, P2, P3), y dos veces por semana en las estaciones V1 y P2. Los valores máximos de concentración de D. acuta (hasta $2.3 \cdot 10^4$ cel·l⁻¹), localizados en la pycnoclina, y de porcentaje de células en fase de división (hasta 31%), se registraron en agosto. Las concentraciones celulares mínimas se observaron tras pulsos de afloramiento que rompieron la estratificación. Se registraron de nuevo valores elevados de D. acuta (hasta $1.8 \cdot 10^4$ cel·l⁻¹), en la capa superficial de agua, a finales de octubre, cuando vientos persistentes de componente sur provocaron una inversión de la circulación estuárica positiva. Así pues, los dos máximos celulares se registraron durante condiciones oceanográficas muy distintas, pero en ambos casos en un rango de temperatura de 15.5-17°C. Se sugiere que los máximos observados durante períodos de estratificación y durante episodios de hundimiento se corresponden con una predominancia de crecimiento in situ y de acumulación física respectivamente, y que las condiciones meteorológicas excepcionales de temperatura y sequía durante 1989 crearon el escenario óptimo para una inusual presencia (en intensidad y época del año) de D. acuta en las partes externas de las Rías Bajas gallegas. Durante esta floración, se observaron numerosas células dimórficas, con una placa hipotecal correspondiente a D. acuta y otra distinta y de menor tamaño similar a las de Dinophysis dens Pavillard, así como células de Dinophysis dens, que se cree constituyen un estadio del ciclo vital de D. acuta. Otras observaciones inéditas fueron las de formas con doble pared y carentes de listas cingulares o sulcales que pudieran constituir un tipo de quiste; y un hipotético "tubo fertilizante" que emergía de la célula grande en pares acoplados D. acuta/D. dens.

AUTOECOLOGY AND SOME LIFE HISTORY STAGES OF *DINOPHYSIS ACUTA* EHRENBERG*

ABSTRACT

A persistent and unusual bloom of D. acuta Ehrenberg in the Rías Bajas (Northwest Spain) from early July to mid-November 1989, was associated with events of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish above regulatory levels (DST) and prevented mussel extraction in some areas from early August to mid-December. Integrated samples (0-5, 5-10, 10-15 m) were taken once or twice a week at six stations in the rías of Vigo (V1, V2, V3) and Pontevedra. (P1, P2, P3). Maximum numbers of D. acuta (up to $2.3 \cdot 10^4$ cell·l⁻¹ in the integrated samples) and percentage of observed dividing cells (up to 31%) appeared in August, and formed a maximum in the pycnocline. Cell numbers were minimal when upwelling caused a breakdown of stratification. High numbers of D. acuta (up to $1.8 \cdot 10^4$ cell·l⁻¹), appeared again when persistent south winds in late October caused a reversal of the estuarine circulation. Thus, the two cell maxima occurred during two distinct hydrographic regimes, but in both cases at temperatures of 15.5-17°C. It is suggested that the maxima during stratification and during downwelling episodes could correspond to periods with a predominance of in situ growth and physical accumulation, respectively, and that the exceptional meteorological conditions during 1989, with very high temperatures and low rainfall, provided the optimum scenario for the unusual occurrence -in intensity, persistence and time of the year - of D. acuta. Numerous dimorphic cells, with one large hypothetical plate typical of D. acuta but the other one reduced in size and similar to those of D. dens Pavillard, were seen during the bloom, as well as Dinophysis dens cells that are believed to be a life cycle stage of D. acuta. Other observations included double-walled, unwinged forms that are perhaps some kind of cyst, and a hypothetical 'fertilizing tube' emerging from the larger cell of a D. caudata/D. dens couplet.

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Dinophysis* Ehrenberg son componentes habituales del fitoplancton de las Rías Bajas gallegas. *Dinophysis acuminata* Claparede & Lachmann, y *Dinophysis acuta* Ehrenberg son las dos especies más abundantes del género y los principales agentes de episodios de presencia de toxina diarreogénica en los bivalvos (DST) en la región (Campos *et al.*, 1982; Reguera *et al.*, 1993 a; Blanco *et al.*, 1995, 1998). *Dinophysis sacculus* Claparede & Lachmann, *D. rotundata* Claparede & Lachmann, *D. caudata* Saville-Kent, *D. tripos* Gouret, *D. dens* Pavillard, *D. fortii* Pavillard, y *D. hastata* son otras especies del género que se presentan en concentraciones menores.

Desde la identificación del síndrome diarreico conocido como *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) (Yasumoto *et al.*, 1978), y la subsiguiente identificación de *D. fortii* como el agente de estos episodios en aguas japonesas (Yasumoto *et al.*, 1980), las poblaciones de especies de *Dinophysis* spp. se convirtieron en objetivo prioritario en los programas de seguimiento de fitoplancton potencialmente tóxico. Existen hoy día numerosos trabajos que relacionan la aparición de toxinas diarreogénicas con proliferaciones de especies de *Dinophysis* en aguas europeas. *D. acuta* ha sido asociada con episodios de DSP en Portugal (Alvito *et al.*, 1990) e Irlanda (McMahon & Silke, 1998), y en menor grado en Noruega (Dahl & Yndestad, 1985), y Suecia (Hageltorn, 1989). *D. acuta* es también el principal agente de episodios de intoxicación diarreogénica en la región de los fiordos en Chile (Lembeye *et al.*, 1981, 1993), y en Nueva Zelanda (MacKenzie, 1992). No obstante, los estudios sobre la ecología fisiológica, ciclo vital y respuestas de esta especie a distintas condiciones hidrográficas son escasos, y dificultan el progreso en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales, y en la predicción de sus proliferaciones.

En las rías de Vigo y Pontevedra, distintas especies de *Dinophysis* se pueden detectar, en concentraciones muy bajas (presencia en arrastres de red, $<20 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) incluso en los meses de invierno. *D. acuminata* incrementa su concentración de mayo a septiembre. *D. acuta* puede aparecer en bajas concentraciones ($0.4-2 \cdot 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) en julio-agosto, pero los máximos anuales se detectan en otoño (septiembre - octubre), al final de la estación de afloramiento, en proliferaciones repentinas (de una semana a otra) que preceden a las de la dinoflagelada *Gymnodinium catenatum*, agente de intoxicaciones de tipo paralizante (PSP) (Reguera *et al.*, 1990, 1993 b). No obstante, durante otoños suaves, se pueden encontrar valores moderados ($< 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de ambas especies de *Dinophysis* incluso a mediados de diciembre (Blanco *et al.*, 1995). En el presente trabajo se describe la distribución de *D. acuta* en las rías de Vigo y Pontevedra durante el verano-otoño de 1989 -año que se puede considerar excepcional en cuanto a abundancia y persistencia de esta especie- y su relación con las condiciones meteorológicas y la estructura de la columna de agua. Esta excep-

cional abundancia permitió registrar una variedad de estadios del ciclo vital y del ciclo celular de *D. acuta* que habían pasado inadvertidos con anterioridad. Se presta especial atención a la asociación de estas formas con distintos regímenes hidrográficos, como una posible estrategia de la especie en respuesta al medio. Las observaciones utilizadas para el presente estudio se realizaron de forma oportunista como parte del programa del Instituto Español de Oceanografía de seguimiento de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas en las Rías Bajas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre julio y noviembre de 1989 se tomaron muestras semanales en tres estaciones de la Ría de Vigo (V1, V2, V3), y tres estaciones de la Ría de Pontevedra (P1, P2, P3) (Fig. 5.1). Una estación de cada ría (V1 y P2) se muestreó dos veces por semana. Estas dos estaciones, situadas cerca de la boca de las respectivas rías, son las que según datos previos del programa de seguimiento suelen mostrar valores máximos de concentraciones de *Dinophysis* spp a lo largo del año. En total se examinaron 453 muestras durante los 5 meses de muestreo. En cada estación se recogieron muestras integradas a 0-5 m, 5-10 m, y 10-15 m utilizando una manguera muestreadora tal

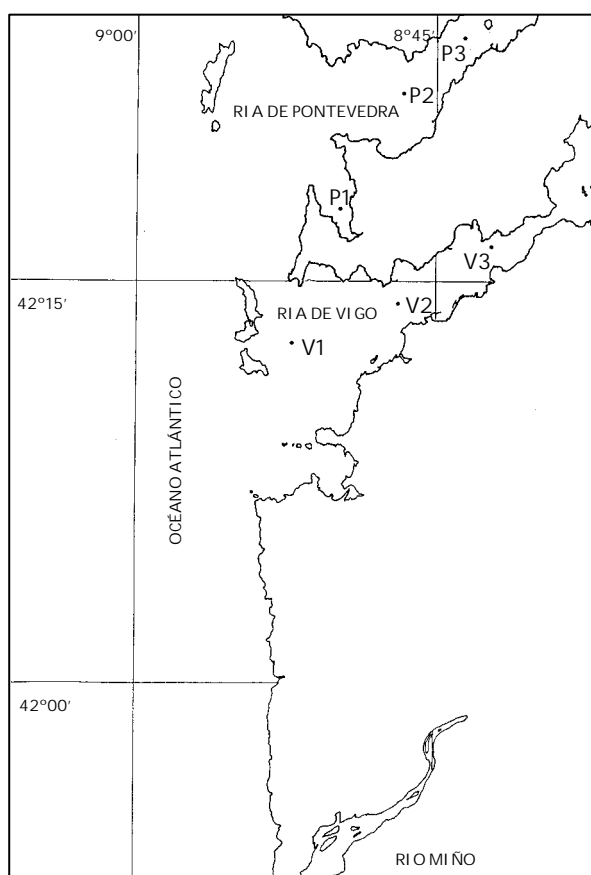


Fig. 5.1 Localización de las estaciones de muestreo en la Ría de Vigo (V1, V2 y V3) y Ría de Pontevedra (P1, P2, P3).

como la descrita por Lindahl (1986). De cada muestra integrada se tomaron alícuotas de 100 ml que eran fijadas inmediatamente con solución ácida de lugol, para posterior análisis fitoplanctónico al microscopio invertido según el método de Utermöhl (1931). Simultáneamente se realizaron arrastres verticales con red de 10 μm de apertura de malla, para observación de los organismos *in vivo* y detección de presencia en concentraciones por debajo del nivel de detección de los contajes habituales (10-20 cel $\cdot \text{l}^{-1}$). Se obtuvieron distribuciones verticales de la temperatura y del gradiente térmico (DT/DZ) mediante un batitermógrafo. Los valores de transparencia se calcularon a partir de lances del disco Secchi. Los datos meteorológicos se obtuvieron del Instituto Nacional de Meteorología. Los índices de afloramiento, calculados utilizando la fórmula de Bakun (1973), se tomaron del trabajo de Lavín *et al.* (1991).

RESULTADOS

Lluvias y Temperatura del aire

El verano y principios de otoño de 1989 (hasta mediados de Octubre) fueron inusualmente cálidos en el noroeste de España y habían sido precedidos por un invierno y primavera excepcionalmente secos (Tabla 5.1). Las precipitaciones fueron prácticamente nulas entre julio y la segunda quincena de Octubre, excepto 21 mm registrados el 16 de Agosto. Entre junio y septiembre, todos los meses presentaron importantes anomalías negativas (en relación con los 39 años precedentes), y septiembre de 1989 registró los valores mínimos de lluvia de los últimos 39 años. A partir del 19 de octubre comenzaron las condiciones típicas de fin de la temporada de afloramiento, con predominio de vientos de componente sur, fuerte transporte de

Tabla 5.1. Comparación de las medias mensuales de lluvia y de temperatura del aire en 1989 en relación con las medias de las series temporales de los últimos 39 y 30 años respectivamente.

	Lluvia mensual (mm)			Temperatura media del aire (°C)		
	1951-1989	1989	Anomalía	1960-1989	1989	Anomalía
Junio	77.6	47.0	-30.6	16.9	18.8	+1.8
Julio	38.7	9.5	-29.2	18.9	22.1	+3.2
Agosto	46.0	21.0	-25.0	18.8	20.9	+2.1
Septiembre	107.9	5.2	-102.7	17.9	18.5	+0.6
Octubre	191.5	160.9	-30.6	14.6	17.7	+3.1
Noviembre	216.3	341.7	+125.4	11.0	12.4	+1.4

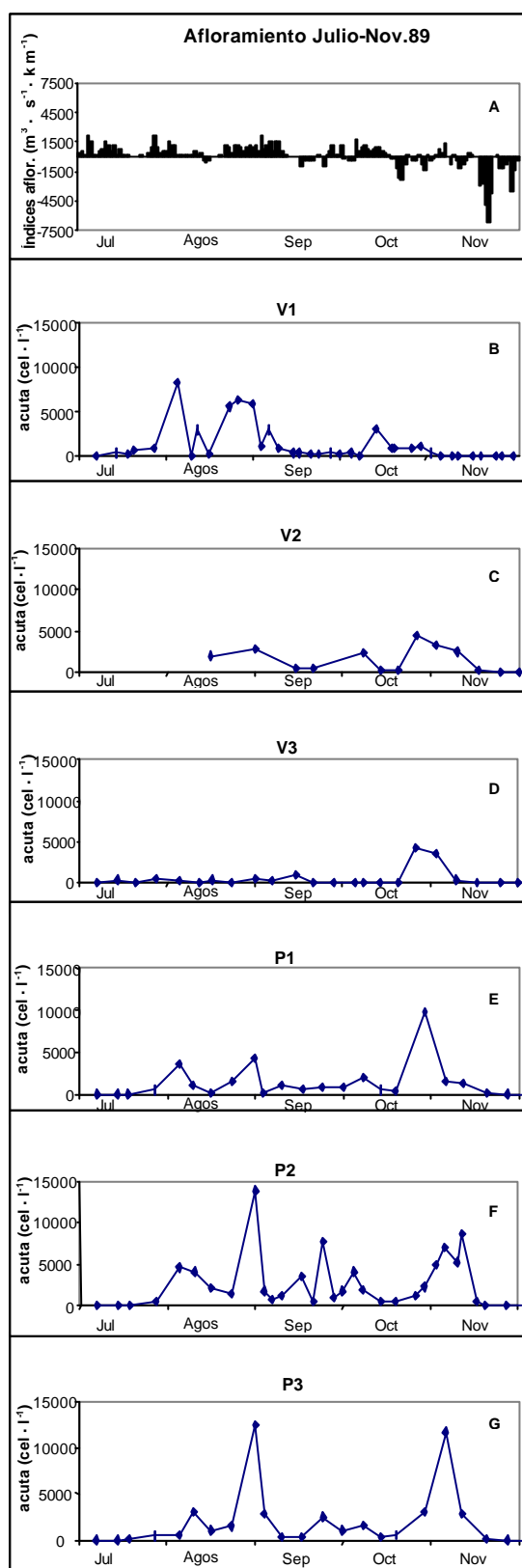


Fig. 5.2. (A) Índices de afloramiento diarios (calculados según el método de Bakun 1973) entre julio y noviembre de 1989. (B-G) Concentraciones celulares de *D. acuta*, en muestras integradas de 0-15 m, en las estaciones V1, V2 y V3 de la Ría de Vigo y las P1, P2 y P3 de la Ría de Pontevedra.

Ekman hacia la costa (Figueiras *et al.*, 1994), y precipitaciones intensas que duraron hasta finales de Noviembre.

Índices de Afloramiento

En la Fig. 5.2 A se representan los índices de afloramiento diarios para el período julio-noviembre de 1989. Se puede considerar que, en lo que a índices de afloramiento entre abril y julio se refiere, 1989 fue un año «normal». Sin embargo se registraron importantes anomalías positivas en los índices de agosto, septiembre y octubre (521 , 389 , y $6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}$ respectivamente), comparado con las medias de los 24 años anteriores (391 , 102 , $-136 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}$ respectivamente) y una gran anomalía negativa en noviembre (-952 comparado con la media, $-187 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}$, de los 24 años).

Estructura Térmica de la Columna de Agua

En la Fig. 5.3 se muestra la distribución vertical de temperatura en la estación P2 de la Ría de Pontevedra y en la Fig. 5.4 se muestran los perfiles de distribución vertical de la temperatura, gradiente térmico (DT/DZ) y concentración de *D. acuta* en la misma estación, que presentó los valores máximos de concentración y persistencia de esta especie entre julio y noviembre. En julio y agosto se establecieron fuertes gradientes térmicos entre 0 y 20 m, suavizados ocasionalmente por la intrusión de aguas frías de niveles inferiores. A pesar de los altos índices de afloramiento durante estos meses, las temperaturas superficiales se mantuvieron muy elevadas y llegaron a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ en agosto. Normalmente, las temperaturas de las aguas superficiales de la zona oscilan entre $15\text{-}18 \text{ }^\circ\text{C}$ por efecto del afloramiento. Entre el 8 y el 29 de agosto se mantuvo una marcada estratificación.

A principios de septiembre tuvo lugar un pulso de afloramiento que causó un importante descenso de temperatura y rompió la estratificación. La columna de agua

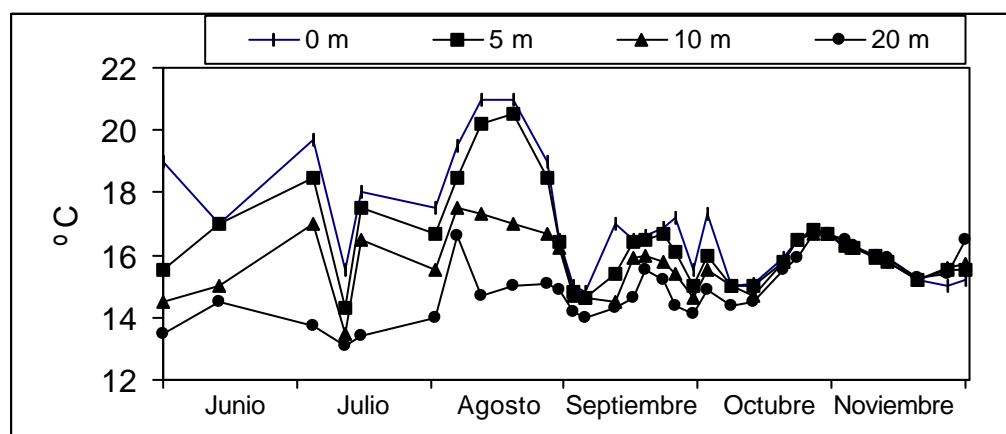


Fig. 5.3. Distribución vertical de la temperatura, entre junio y noviembre de 1989, en la estación P2 de la Ría de Pontevedra.

se volvió prácticamente isoterma, con una temperatura de 15 °C. La estratificación entre 3-10 m se reestableció el 14 de septiembre, y se mantuvo 2 semanas, con ligeras modificaciones causadas por sucesivos pulsos de afloramiento. Tras 15 días con continuos índices positivos de afloramiento, se observó de nuevo la columna de agua *quasi*-isoterma el 11 y el 16 de octubre, con temperaturas de 14.5-15 °C. A partir del 19 de octubre, asociado al cambio del régimen de vientos de componente norte (favorables para el afloramiento) a vientos de componente sur, y a la advección de agua superficial más cálida de la plataforma hacia las rías, se observó un abrupto incremento de casi 2 °C, y una homogenización de la temperatura de la columna de agua. Estas condiciones, con una ausencia total de estratificación, continuaron hasta el

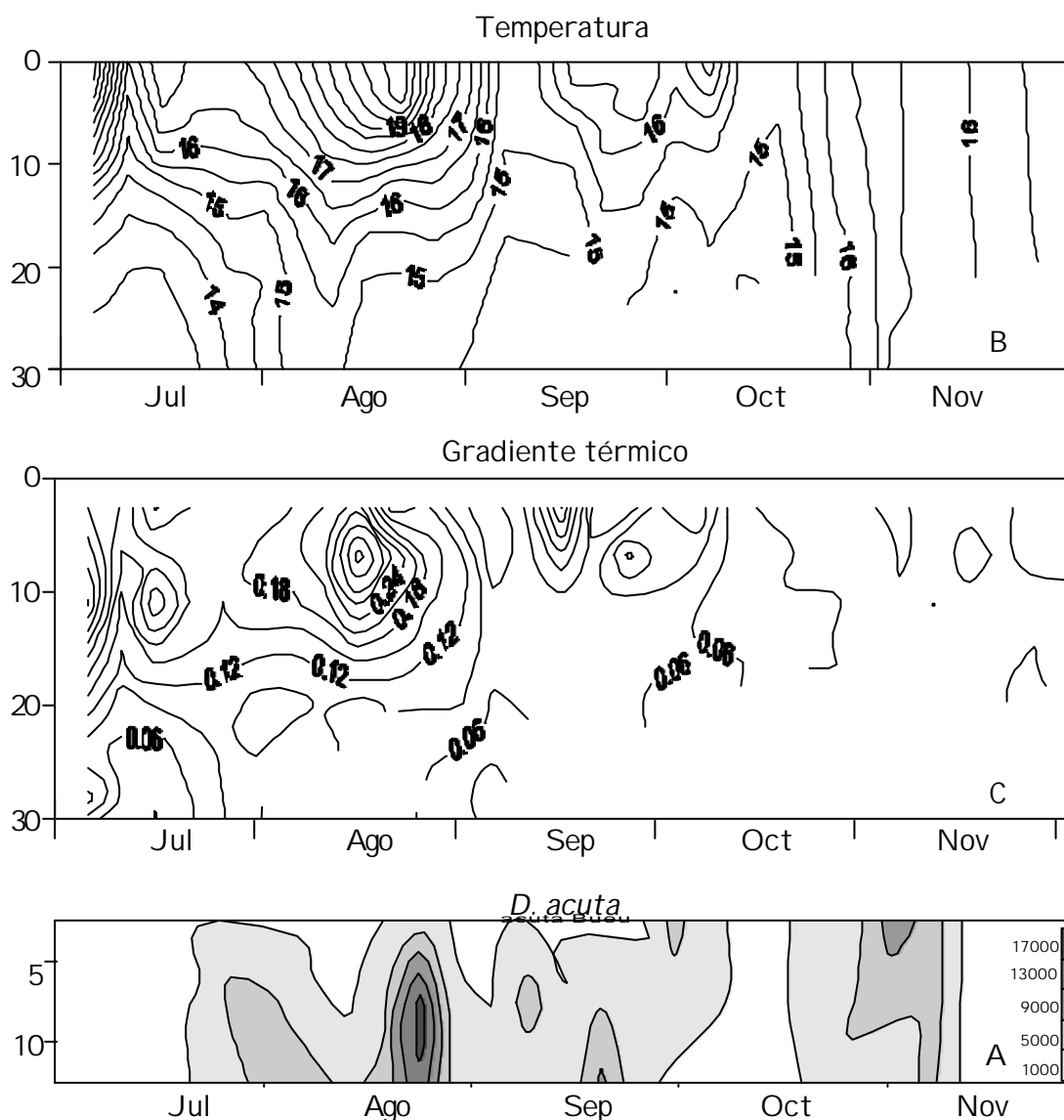


Figura 5.4. a) Distribución vertical de las concentraciones de *D. acuta* (cel · l⁻¹) en muestras integradas de tres intervalos de profundidad (0-5, 5-10, 10-15 m). b) Distribución vertical de la temperatura, de 0 a 35 m y c) distribución del gradiente térmico entre agosto y noviembre de 1989 en la estación P2 de la Ría de Pontevedra.

16 de noviembre, con un descenso gradual de la temperatura. A partir de esta fecha se establecieron las condiciones típicas de invierno y período de fuertes lluvias, con descenso de salinidad y temperatura en las capas superficiales, y desarrollo de «inversión térmica».

La sucesión fitoplanctónica

En la Tabla 5.2 se presenta un esquema simplificado de la sucesión planctónica (especies dominantes) durante el período de proliferación de *Dinophysis acuta*.

En julio y agosto, asociado con una marcada estratificación térmica de la columna de agua, se observó dominancia de diatomeas pennadas (*Leptocylindrus minimus*, acompañado a veces de *Pseudo-nitzschia* spp) entre 0-10 m, y de dinoflageladas (un *Gyrodinium* sp de color verde esmeralda al que denominaremos «dinoflagelada verde», a veces mezclado con *Heterosigma akashiwo*) entre 10-15 m. A principios de julio, *Dinophysis acuminata* mantenía aún concentraciones de hasta $2.8 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ a 0-5 m, que fueron en descenso hasta su declive a finales de este mes. Este descenso paulatino a 0-5 m se superpuso con la aparición y aumento progresivo de *D. acuta* a 10-15 m. Así pues, las dos especies de *Dinophysis* coincidieron en el tiempo (julio), pero ocupando capas bien diferenciadas de la columna de agua. La dinoflagelada verde alcanzó niveles de mancha en agosto ($>10^6 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en muestras integradas) y realizaba migraciones verticales, de forma que las manchas se hacían visibles después del mediodía. También es de destacar la aparición de niveles moderados ($2.5 \cdot 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *Gymnodinium catenatum* (agente de PSP) en la misma zona que *D. acuta*.

En la primera semana de septiembre se disipó la dinoflagelada verde tras agregarse en una capa de aproximadamente 1 m de espesor en la parte interna de las rías a 5-6 m de profundidad (observación mediante escafandra autónoma). Predominaron entonces pequeñas diatomeas céntricas formadoras de cadenas (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros* spp) y *Pseudo-nitzschia* spp. y se mantuvieron las poblaciones moderadas de *G. catenatum*.

Entre el 18 de septiembre y el 5 de octubre, la especie dominante entre 10-15 m fue un pequeño *Gymnodinium* sp, que antes de su declive también alcanzó niveles formadores de manchas ($9.8 \cdot 10^5 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) a 0-5 m en ambas rías. A partir de principios de octubre el fitoplancton, muy escaso por debajo de los 5 m, estaba compuesto de poblaciones poco densas de diatomeas centrales y pennadas (*Thalassiosira* spp, *Chaetoceros* spp y *Pseudo-nitzschia* spp.) hasta el día 19, cuando cambió el régimen de vientos y abundaron las precipitaciones. Tras estos episodios meteorológicos, hubo un brusco cambio en la composición fitoplanctónica. Las diatomeas prácticamente desaparecieron y el fitoplancton quedó dominado por grandes dinoflageladas (*Gonyodoma polyedricum*, *Ceratium fusus*, *C. furca*, *G. catenatum* y *Dinophysis* spp) y

Tabla 5.2. Esquema simplificado de la sucesión planctónica entre julio y noviembre de 1989 en las rías de Pontevedra y Vigo. Se listan las especies dominantes observadas en las muestras integradas a 0-5, 5-10 y 10-15 m de profundidad, así como la presencia de especies agentes de episodios de intoxicación diarreaica (*Dinophysis* spp.) y paralizante (*Gymnodinium catenatum*) por consumo de bivalvos.

	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	
0-5 m	<i>Leptocylindrus minimum</i> <i>Pseudonitzschia</i> spp <i>Dinophysis acuminata</i>	<i>Leptocylindrus minimum</i> <i>Pseudonitzschia</i> spp	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Chaetoceros</i> spp <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Thalassiosira</i> spp. <i>Chaetoceros</i> spp. <i>Pseudonitzschia</i> spp.	<i>Gonyo polyedricum</i> <i>Ceratium fuscus</i> <i>Ceratium furca</i> <i>Dinophysis acuta</i> <i>Dinophysis</i> spp.
5-10 m	<i>Leptocylindrus minimum</i> <i>Pseudonitzschia</i> spp	<i>Leptocylindrus minimum</i> <i>Pseudonitzschia</i> spp	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Chaetoceros</i> spp <i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>Thalassiosira</i> spp. <i>Chaetoceros</i> spp. <i>Pseudonitzschia</i> spp.	<i>Gonyo polyedricum</i> <i>Ceratium fuscus</i> <i>Ceratium furca</i> <i>Dinophysis acuta</i> <i>Dinophysis</i> spp.
10-15 m	<i>Gymnodinium</i> sp <i>Heterosigmaakashii</i> <i>Dinophysis acuta</i>	<i>Gymnodinium</i> sp <i>Dinophysis acuta</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> .	<i>Dinophysis acuta</i> <i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>Gymnodinium</i> sp <i>Dinophysis acuta</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> .	<i>Dinophysis acuta</i> <i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>Gonyo polyedricum</i> <i>Ceratium fuscus</i> <i>Ceratium furca</i> <i>Dinophysis acuta</i> <i>Dinophysis</i> spp.

flageladas picoplanctónicas. Esta comunidad, entre la que se registraron dinoflageladas característicos de aguas cálidas oceánicas (*Ceratium ranipes*, *Ceratocorys armata*), ocupó ambas rías hasta el 16 de noviembre, cuando se detectó una dominancia de grandes diatomeas centrales (*Coscinodiscus* spp.) comunes en invierno.

Distribución de las células de *D. acuta*

En la Fig. 5.2 (B-G) se muestran las concentraciones medias de las 3 muestras integradas (0-5, 5-10 y 10-15 m) de *D. acuta* registradas en cada una de las 6 estaciones entre julio y noviembre de 1989. En general, *D. acuta* fue más abundante y persistente en la Ría de Pontevedra (P1, P2 y P3) que en la Ría de Vigo (V1, V2 y V3). Dentro de cada ría, las estaciones más próximas a la boca presentaron las mayores concentraciones en el mes de agosto, mientras que durante el máximo otoñal se registraron valores elevados en todas las estaciones, incluyendo la estación más interna de la Ría de Vigo (V3) donde las concentraciones de verano eran mínimas.

Se observó una buena correspondencia entre los máximos de *D. acuta* (9 y 14 de agosto y 21 de septiembre) y los períodos de marcado gradiente térmico originados en los períodos de relajación a continuación de pulsos de afloramiento inducidos por el viento (Fig. 5.4). Los máximos celulares ($>2 \cdot 10^4$ cel \cdot l $^{-1}$) a finales de agosto aparecieron entre 4 y 7 días después del máximo de gradiente térmico, coincidiendo con densas ($2.4 \cdot 10^6$ cel \cdot l $^{-1}$) manchas verdes de *Gyrodinium* sp.

Los mínimos del 1 y 7 de septiembre coincidieron con intrusiones de agua fría y ruptura de la estratificación térmica así como con el declive de la floración de la dinoflagelada verde. Tras el desarrollo de una nueva estratificación, más ligera, en el mes de septiembre, se observó un nuevo máximo ($1.7 \cdot 10^4$ cel \cdot l $^{-1}$) que coincidió con poblaciones moderadas de *Gymnodinium catenatum* ($3.4 \cdot 10^3$ cel \cdot l $^{-1}$). Los nuevos mínimos del 11 y 17 de octubre se observaron en el período de relajación al final de la temporada de afloramiento. Coincidiendo con los cambios de régimen de vientos y pulsos de hundimiento, entre el 19 de octubre y el 16 de noviembre se registró un máximo otoñal de *D. acuta* en todas las estaciones asociado a la gruesa capa de agua superficial más caliente que ocupó toda la columna de agua de las rías. Los valores máximos ($1.7 \cdot 10^4$ cel \cdot l $^{-1}$) se registraron ahora en la capa superficial (0-5 m), sobre todo en las partes más internas de la Ría de Vigo (V3) donde las concentraciones habían sido mínimas en verano. Pero tanto en los máximos de verano como en los otoñales, los máximos celulares se distribuyeron en aguas con un rango de temperatura entre 15.5-17 °C.

El máximo otoñal duró 2 semanas en todas las estaciones, y al menos 3 semanas en la estación P2. *Dinophysis caudata* y *D. tripos*, prácticamente ausentes entre julio y septiembre de este año, aparecieron en concentraciones de hasta $3 \cdot 10^2$ cel \cdot l $^{-1}$ y

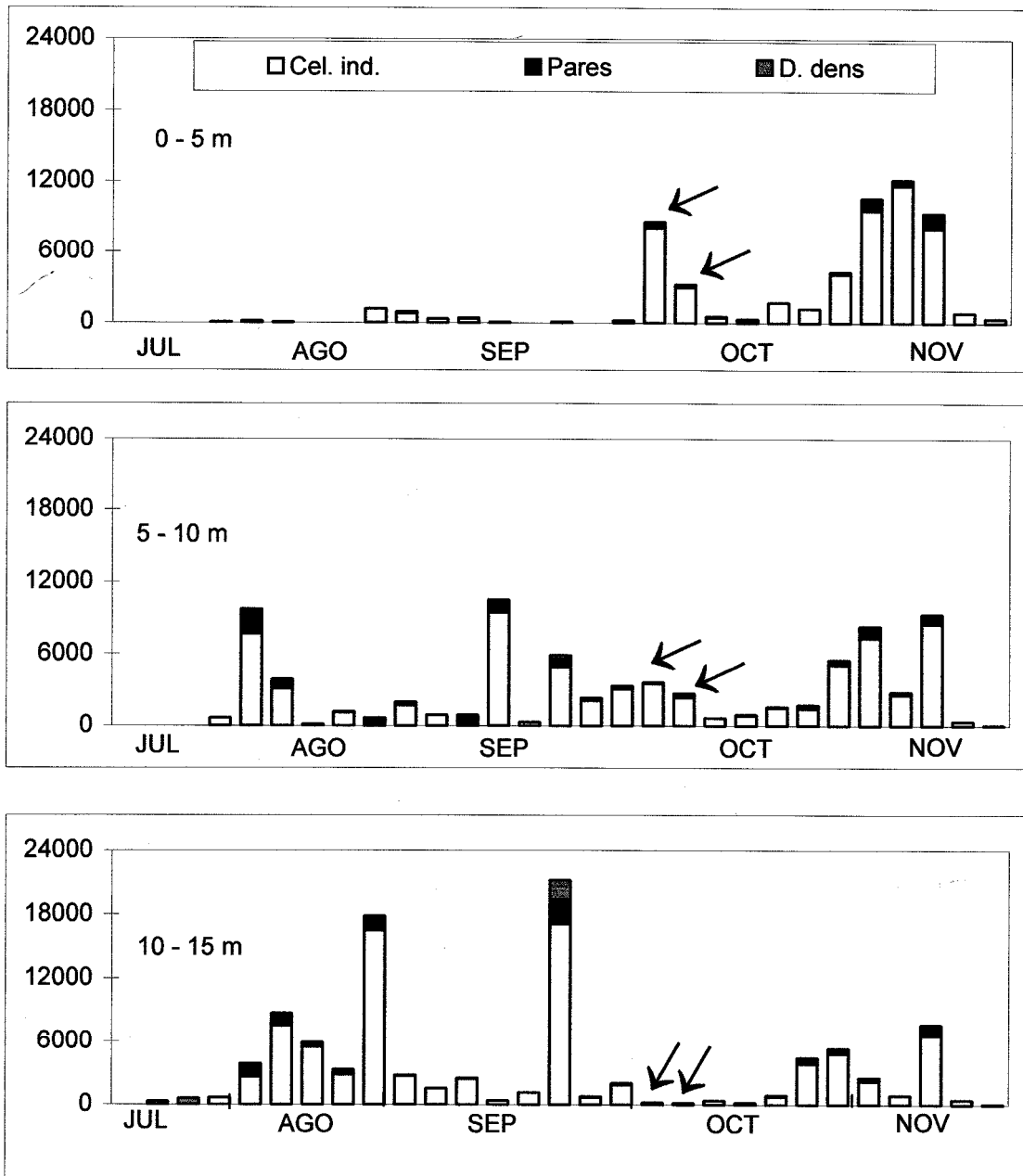


Fig. 5.5. Concentración ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de células individuales y células en parejas de *D. acuta*, y células de *D. dens* a 0-5 m, 5-10 m y 10-15 m, en la estación P2 (Bueu) de la Ría de Pontevedra entre julio y noviembre de 1989 (las flechas marcan las muestras en las que se encontraron concentraciones $> 20 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de quistes).

$7 \cdot 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ respectivamente en esta época. Un 18% de las células de *D. acuta* se encontraban formando parejas, y *D. dens* constituía el 10% de la población. Diez días después de estas observaciones, se detectaron células con la misma silueta que *D. acuta*, pero con paredes dobles (a modo de quistes) y carentes de aletas cingulares y sulcales (Fig. 5.7) y en concentraciones de $20\text{-}40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$.

Observaciones de Morfotipos (o estadios del ciclo vital) de *D. acuta*

De gran interés, durante este estudio, fue la observación de hipotéticos estadios del ciclo vital de *D. acuta*, incluyendo formas comúnmente clasificadas como *D. dens*, que se asociaron a distintas etapas del crecimiento de la población de *D. acuta*. La Fig. 5.5 muestra la abundancia y porcentaje, sobre el total de células, de *D. dens* y de potenciales quistes durante la época de aparición de *D. acuta*. Los pares de células de *D. acuta*, que acababan de sufrir una división longitudinal (Fig. 5.6B), eran el resultado de la reproducción asexual de esta especie por fisión binaria. En estos pares, las dos células eran de idéntico tamaño y forma, y se mantenían unidas por el margen dorsal a través del puente megacítico. En contraste con las especies *D. caudata* y *D. tripos*, que se observan frecuentemente formando parejas, las parejas *D. acuta* resultantes de fisión sólo se podían observar durante un corto período de tiempo (una o varias horas) tras la división en fase (ver capítulo 6). Cada una de las células de las parejas carecía de la porción anterior o posterior de la aleta sulcal izquierda. Este desarrollo incompleto de la aleta se apreciaba también en las células hijas recién separadas y constituyó un excelente marcador de la división celular para los estudios de tasas de crecimiento *in situ*. Los porcentajes de células formando pare-

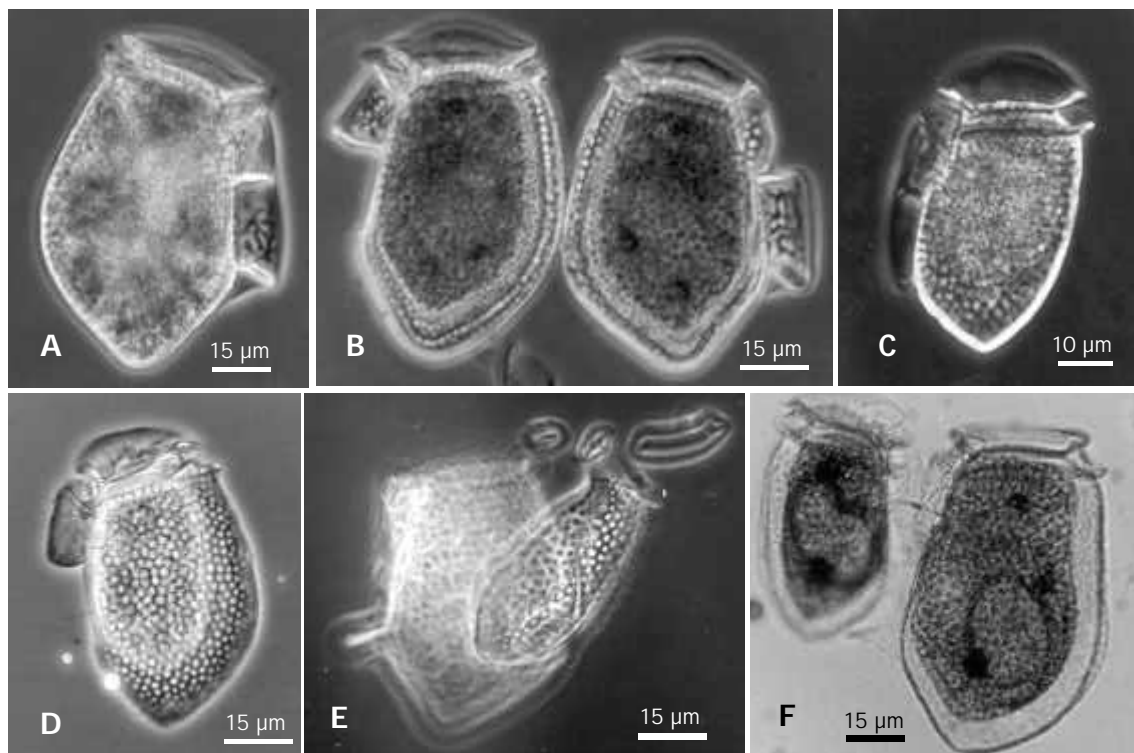


Fig. 5.6. A. Célula vegetativa de *D. acuta*; B. Pareja de células recién divididas, unidas por el margen dorsal y mostrando desarrollo incompleto de la lista sulcal izquierda; C. Célula «dimórfica» con una placa hipotecal típica de *D. acuta* y la otra más pequeña similar a las de *D. dens*; D. Aplastamiento del ejemplar anterior mostrando la disimilitud de las dos placas hipotecales; E. *Dinophysis dens*; F. Par conjugado *D. acuta-D.dens*, unidas por el margen ventral, y en el que se observa un hilillo de conexión entre las dos células a la altura del poro flagelar.

jas fueron máximos en los períodos que precedían a, y durante los máximos de abundancia celular de *D. acuta* en agosto (31%), septiembre y noviembre (Fig. 5.5).

En algunas muestras, *D. acuta* apareció acompañada de un pequeño porcentaje (max. 10%) de pequeñas células de *Dinophysis* similares morfológicamente a *D. dens*. Estas células se presentaron siempre acompañando a *D. acuta* y se diferenciaban de ella por su menor tamaño y por la forma característica de sus grandes placas hipotecales (Fig. 5.6C), con la porción anterior de los márgenes ventral y dorsal casi paralelas. Ocasionalmente se pudieron observar parejas de *D. cf dens* unidas por el margen dorsal, similares a las parejas resultantes de la división vegetativa de *D. acuta*. Las células de *Dinophysis cf dens* aparecieron principalmente durante el máximo de concentración celular de *D. acuta* a mediados de septiembre, y raramente en otras ocasiones.

Es importante señalar que en las mismas muestras (principalmente en septiembre y octubre), se observaron células con una hipoteca típica de *D. acuta* que parecían contener dentro una célula pequeña similar a las descritas como *D. dens* (Fig. 5.6 D). Estos ejemplares carecían de parte de la aleta sulcal izquierda por lo que parecían haber sufrido una fisión celular reciente. Tras disección de uno de ellos se comprobó que en realidad eran células «dimórficas» que poseían una placa hipotecal correspondiente a *D. acuta*, y otra distinta correspondiente a *D. dens* (Fig. 5.6E). Casos similares se observaron en individuos de *D. caudata*, que presentaban una placa hipotecal típica de *D. caudata* complementada por otra similar a la de la descripción de *D. diegensis* (Fig. 5.7A). Un año después, durante una campaña realizada en 1990 en aguas de la plataforma adyacente, se pudieron observar pares de células *D. acuta* / *D. dens* conectados por el margen ventral a la altura del poro flagelar (Fig. 5.6 F). El examen cuidadoso de algunos de estos pares mostró que las dos células estaban conectadas por un tubo o pedúnculo que, tras separación de las células por micromanipulación, emergía de la célula grande del par (Fig. 5.7 B).



Fig. 5.7. A. Célula dimórfica (análoga a la fig. 5.6 C), con una placa hipotecal de *Dinophysis caudata*, y la otra similar a las de *D. diegensis*. B. Célula grande del par conjugado de la Fig. 5.6F tras ser separadas manualmente, mostrando un hipotético tubo de fertilización.

Diez días después de la aparición de abundantes ($1.8 \cdot 10^3$ cells \cdot l⁻¹) células tipo *D. dens* a mediados de septiembre de 1989 (ver flechas en la Fig. 5.5) se observaron, en concentraciones muy bajas (20-40 cells \cdot l⁻¹), unas formas no móviles cuyos contornos oscilaban entre formas similares a la gran placa hipotecal de las células vegetativas y otras formas casi ovaladas (Fig. 5.8 A-D). Estas células poseían una doble pared y ornamentación su-

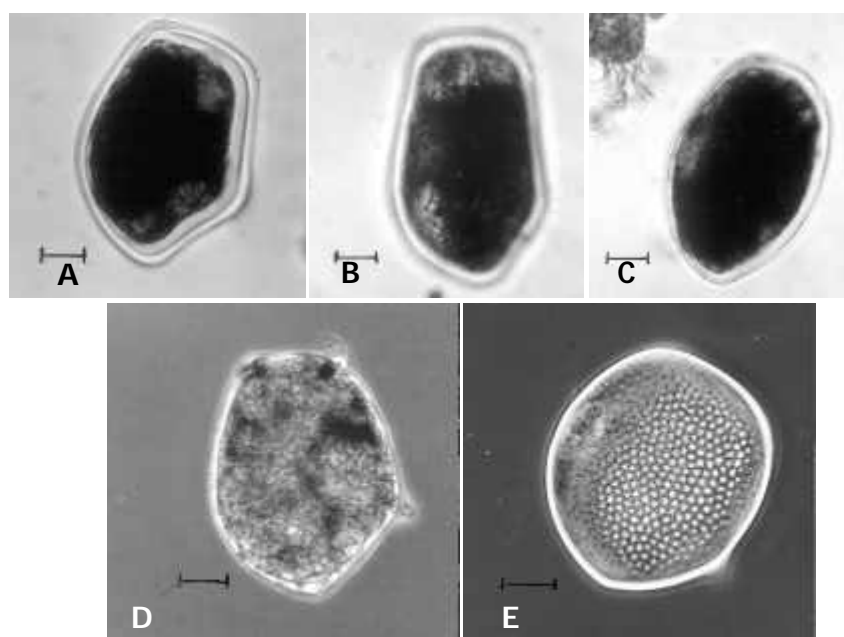


Fig. 5.8. A-C: Formas no móviles (hipotéticos quistes) que aparecieron coincidiendo con la etapa final de la floración excepcional de *D. acuta*. D. Estadio temprano en la formación del hipotético quiste, mostrando vestigios del R3 de la ausente aleta sulcal izquierda. E. La misma célula, aplastada y enfatizando detalles de la ornamentación de la cubierta, idéntica a la de las grandes placas hipotecales de células vegetativas de *D. acuta*.

perficial areolada análoga a la de las células vegetativas de *D. acuta* (Fig. 5.8 E). Estos hipotéticos quistes aparecieron al final de la estación de crecimiento de *D. acuta* en las rías, es decir, tras los últimos pulsos de afloramiento, a principios de octubre, y antes del nuevo máximo celular, asociado a vientos de componente sur y advección de aguas superficiales de la plataforma al interior de las rías, a mediados de octubre. Todos los morfotipos o estadios descritos en este trabajo se observaron en muestras fijadas con lugol, por lo que hay que destacar la posibilidad de que se trataran de artefactos o formas temporales originadas tras la recogida de muestra.

DISCUSION

Proliferación inusual de D. acuta en el verano-otoño de 1989 y su aparición en relación con la sucesión de fitoplancton

Desde el inicio del programa de seguimiento de fitoplancton tóxico en las rías gallegas en 1977, lo habitual era detectar células aisladas de *Dinophysis acuta* en los meses de verano en las rías de Pontevedra y Vigo, y ocasionalmente un máximo a principios de otoño, una vez terminada la estación de afloramiento (Campos *et al.*, 1982; Fraga *et al.*, 1984). No obstante en 1988, y sobre todo en 1989, la presencia de *D. acuta* en concentraciones moderadas ($>10^2$ cel · l⁻¹) comenzó en julio, observándose concentraciones altas ($>10^3$ cel · l⁻¹) a lo largo de agosto, es decir, en períodos caracterizados en años anteriores por la presencia de concentraciones moderadas-

altas de *D. acuminata* y acaso presencia, en arrastres de red, de *D. acuta*. 1989 también fue un año de excepcional abundancia de *D. acuta* en la mitad norte de Portugal (Moita & Sampayo, 1993), lo que sugiere que se trató de un fenómeno de mesoescala que afectó a toda la región de afloramiento de la parte septentrional de la costa oeste de la península Ibérica. Las excepcionales temperaturas de julio y agosto de 1989, precedidas de un invierno y primavera inusualmente secos, unido al registro de índices de afloramiento superiores a la media después de julio, pero sin que el agua aflorada alcanzara la superficie, dieron lugar a una fuerte estratificación térmica entre 0 y 20 m durante un período de tiempo considerable. Figueiras & Ríos (1993) señalaron las condiciones de estratificación, asociadas a afloramiento moderado y nitroclina en una profundidad de aproximadamente 10 m, como el escenario óptimo para el desarrollo de «mareas rojas» en las Rías Bajas. Estas condiciones, en grado muy acentuado, se dieron durante amplios períodos de tiempo durante julio y agosto del año 89, y crearon condiciones propicias para el desarrollo de diversas floraciones causantes de discoloraciones que aparecieron aquel verano: marea verde de *Gymnodinium* spp, marea marrón de *Heterosigma akashiwo*, manchas de *Gymnodinium* sp., etc. (Reguera *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1992). *D. acuta* coincidió con las otras flageladas formadores de manchas, pero las concentraciones alcanzadas, a pesar de constituir números muy elevados para esta especie en las rías, representaron sólo una pequeña fracción de la biomasa total del fitoplancton en verano.

La asociación de poblaciones de *Dinophysis* spp con densas floraciones de otras flageladas es bastante común en otras partes del mundo. En Nueva Zelanda, MacKenzie (1992) registró máximos de *D. acuta* asociados con floraciones de *Heterosigma akashiwo* y *Gonyaulax* sp, y en la costa atlántica francesa, Bardouil *et al.* (1991) describieron máximos de *Dinophysis* cf *acuminata* que coincidieron con una densa floración de *Gymnodinium* sp. Así pues, *D. acuta* forma parte del colectivo de flageladas capaces de explotar las posibles ventajas ambientales de la picnoclina. Esta porción de la columna de agua puede constituir un refugio frente a las elevadas turbulencias que pueden existir en la capa superficial por la acción del viento y en las capas inferiores por las corrientes de marea. Además, en la picnoclina, las pérdidas por transporte hacia fuera son mínimas debido a la escasa velocidad horizontal. Por último, la zona de la picnoclina, con sus fuertes gradientes de luz, temperatura y nutrientes puede constituir un punto de referencia físico en el que las dinoflageladas, mediante agregación, alcanzan concentraciones óptimas para el desarrollo de procesos reproductivos; los fuertes gradientes, al ser atravesados por algunas especies en su migración vertical diaria, pueden favorecer procesos de toma de nutrientes, u otras actividades relacionadas con el ciclo celular que podrían requerir un disparador antes de su inicio. Este característico colectivo de grandes dinoflageladas ha sido descrito en la Ría de Vigo por Figueiras *et al.* (1994), quienes sugirieron que el cociente entre la velocidad vertical del agua y la profundidad de la picnoclina cons-

tituye un factor clave que determina las posibilidades de crecimiento *in situ* de cada especie.

La coincidencia de diatomeas pennadas formadoras de cadenas y de dinoflageladas en aguas estratificadas unidas a un afloramiento moderado en la Ría de Pontevedra ya fue antes descrita por Figueiras & Niell (1987). Este escenario parece contradecir la idea convencional de que las diatomeas no proliferan con éxito en aguas estratificadas. Sin embargo, parece obvio que la débil circulación estuárica positiva de las rías durante la estación seca y las mareas permiten el crecimiento de diatomeas, o quizás éstas provengan principalmente de las zonas más internas de la ría, donde la mayor influencia de aportes terrestres, y mayor mezcla por las mareas en las zonas someras favorece su predominio. No obstante, durante las condiciones inusualmente cálidas y estratificadas de agosto de 1989 en la Ría de Pontevedra, la población de diatomeas en la capa superficial fue a menudo *quasi* monoespecífica, formada por finas cadenas de *Leptocylindrus minimus*.

La combinación de anomalías positivas del índice de afloramiento en agosto, con la fuerte estratificación observada entre 15-20 m de profundidad, muestra que los índices teóricos de afloramiento no siempre reflejan episodios reales de afloramiento de pequeña escala, en este caso en el interior de las distintas rías. Deberían pues, ser interpretados con precaución en procesos que no sean de mesoescala. Cuando la mezcla de agua aflorada (agua central noratlántica, ACNA), y agua subsuperficial de las rías alcanza niveles cercanos a la superficie, es frecuente observar temperaturas superficiales del agua de mar de 15 °C coincidiendo con elevadas temperaturas atmosféricas (≥ 30 °C). No obstante en 1989, la capa superficial en las rías de Pontevedra y Vigo en agosto mostró valores ≥ 20 °C durante todo el mes, y este verano se caracterizó por las invasiones repentinas de medusas (indicadoras de intrusiones de aguas cálidas) en las costas norte y noroeste de la Península Ibérica. Es sabido (datos no publ. del programa de seguimiento de las Rías Bajas) que la Ría de Pontevedra presenta normalmente valores inferiores de biomasa de fitoplancton ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{clor. } a \cdot \text{l}^{-1}$), y del cociente Diatomeas/Dinoflageladas, valores superiores de temperatura superficial, y estratificación estival más marcada que la vecina ría de Vigo. Ello se debe posiblemente a que la topografía característica de la ría de Pontevedra da lugar a pulsos de afloramiento menos intensos, y por tanto tendrá mayores tiempos de residencia del agua. Además, la Ensenada de Bueu (P2) está especialmente resguardada y presenta propiedades oceanográficas de microescala que parecen favorecer la persistencia de la estratificación y de poblaciones de dinoflageladas.

Distintos mecanismos de proliferación de *D. acuta*

D. acuta en las Rías Bajas presentó máximos de concentración celular bajo dos regímenes oceanográficos bien diferenciados: régimen de «verano» con aguas estratificadas hasta los 10-15 m, asociadas con pulsos de afloramiento moderados, y régimen de «otoño», con columna de agua homogénea y más cálida que resulta de la inversión de la circulación estuárica positiva e invasión de las rías por aguas de la plataforma adyacente al cambiar el régimen de vientos al final de la temporada de afloramiento (marzo-octubre). Sin embargo en ambos regímenes, el máximo de *D. acuta* se localizó en un rango estrecho de temperatura (15.5-17 °C).

Los incrementos numéricos de la población de *D. acuta* bajo dos escenarios tan extremos puede explicarse por la existencia de al menos dos mecanismos de proliferación. Las densas poblaciones de verano (agosto) serían el resultado de un crecimiento *in situ* a partir de un inóculo inicial cuyo origen no ha sido establecido, y que se confirmaría por la observación de un elevado porcentaje de la población formando parejas. El declive de esta población coincidiría con la aparición de hipotéticos quistes a principios de octubre. Los rápidos incrementos de *D. acuta* en otoño, tras un período de escasez y acompañado de *D. caudata* y *D. tripos* serían causados por un mecanismo distinto de acumulación por interacciones físico-biológicas. En este escenario de otoño se observó una baja frecuencia de células en división y las especies dominantes fueron *Dinophysis acuta*, *Gonyodoma polyedricum*, *Ceratium fusus*, *Ceratium furca* y *Gymnodinium catenatum*, con una práctica ausencia de diatomeas. El máximo otoñal, pues, estaría formado sobre todo por poblaciones alóctonas, establecidas en la plataforma adyacente, de distribución más nerítica, y que habrían sido empujadas al interior de las rías mediante un transporte transversal forzado por el viento. La localización del máximo en la capa superficial resultaría de la natación vigorosa de las dinoflageladas para contrarrestar las fuerzas verticales de los pulsos de hundimiento asociados a la inversión de la circulación estuárica causada por los vientos de componente sur.

El hundimiento y la ausencia de estratificación no parecen constituir un impedimento para el mantenimiento, e incluso para el crecimiento moderado en algunas estaciones, de *D. acuta* en las rías, mientras que las poblaciones previas de diatomeas serían desplazadas hacia abajo y hacia fuera por la invasión de agua de la plataforma. No es correcto, como se dice a menudo, que en esta situación las diatomeas «se hundan», pues en realidad lo que ocurre es que son desplazadas hacia abajo en la misma masa de agua que se encontraban. Estos episodios de hundimiento también se dan, aunque con mucha menos intensidad, en períodos transitorios de cambio de vientos durante la estación de afloramiento. En este último caso, se puede ver como el máximo subsuperficial de clorofila, dominado por diatomeas, se desplaza hacia capas más profundas (Reguera *et al.*, 1995), pero puede retornar a la profundidad

inicial tan pronto se restablezcan las condiciones previas de circulación estuárica positiva.

La advección de aguas de la plataforma tras la relajación del afloramiento en otoño y el mantenimiento en la capa superficial de agua de las grandes dinoflageladas nadadoras fueron señaladas con anterioridad para explicar las repentinas proliferaciones de la dinoflagelada *Gymnodinium catenatum* en las Rías Bajas gallegas (Fraga *et al.*, 1988, 1989, 1990). Posteriormente, Figueiras *et al.* (1998) sugirieron que la incidencia de la corriente del talud con dirección al polo, que se empieza a manifestar típicamente en esta época, tendría un efecto de cuña en su flujo paralelo a la costa y favorecería con su empuje el transporte transversal, hacia el interior de las rías, de aguas de la plataforma adyacente. En estas circunstancias, es lógico que las estaciones más internas muestren los valores máximos por un efecto de «cul de sac». Estos máximos son situaciones muy transitorias que desaparecen uno o varios días después de cesar el forzamiento del viento de componente sur.

En el presente estudio se observó que en verano, *D. acuta* se acumulaba en la zona de la pycnoclina - situada en esta época en la capa de 10-15 m y a veces en la de 5-10 m - y que los máximos celulares seguían los mismos desplazamientos verticales que las isoterms. Los mínimos coincidieron con pulsos de afloramiento más intensos que rompieron la estratificación térmica y contribuyeron a dispersar los máximos establecidos en la termoclina. Así pues, el crecimiento óptimo tendría lugar en estas capas bien definidas de la columna de agua donde las células parecen agregarse preferentemente en condiciones de estabilidad, y los altibajos en las concentraciones estarían determinados por el régimen de afloramiento. Otro factor, no explorado en este trabajo, que podría influir en la alternancia de máximos y mínimos en la época de afloramiento es el régimen de mareas. Por el contrario, cuando la población de *D. acuta* se encontraba en declive, tras los pulsos de afloramiento de principios de octubre, el máximo celular aparecía en la capa superior (0-5 m) y además la situación era similar en todas las estaciones, incluso en las más internas (V3 y P3).

Desgraciadamente, durante los días en que se hicieron estos muestreos no se llevó a cabo un muestreo intensivo de seguimiento del ciclo celular para determinar tasas de crecimiento *in situ*. La frecuencia de células en parejas, *per se* no es suficiente para indicar la frecuencia total de células que sufrieron mitosis en las horas precedentes. Aceptando el método de la «frecuencia máxima» (ver cap. 8) y asumiendo que en el momento de muestreo era posible reconocer a todas las células que habían sufrido división reciente (lo cual no es muy disparatado, pues las muestras de la estación P2 solían tomarse a las 10-10.30 GMT), habría sido necesario sumar también la frecuencia de células recién divididas (aleta sulcal izqda. incompleta). No obstante, la gráfica de abundancia relativa de células en parejas de la Fig. 5.5 tiene un valor semicuantitativo y nos da una idea de los momentos en que había mayor o

menor frecuencia de división, ya que las muestras se tomaban siempre a la misma hora. Durante una proliferación excepcional de *D. acuta* en Nueva Zelanda, MacKenzie (1992) observó el máximo de *D. acuta* y de *D. dens* a 10 m de profundidad a las 19.00 h, y el máximo de parejas, en la misma profundidad, a las 10.30 h. En nuestro caso, el muestreo se realizó siempre a la misma hora del día (entre 10.00 y 11.00 h), por tanto las diferentes profundidades ocupadas por el máximo celular cuando la población se encontraba en declive reflejarían distintas etapas de la población o distintos estados fisiológicos en respuesta a distintas condiciones oceanográficas y no se podrían achacar a una distinta distribución vertical asociada con ritmos circadianos de *D. acuta*.

El muestreo de este estudio estuvo restringido a estaciones dentro de las rías, pero en una campaña desarrollada en 1990 (Fraga *et al.*, 1993), durante la cual se registró abundancia de *D. acuta*, los máximos celulares en la plataforma adyacente a las rías se registraron a 20 m en la termoclina. En años previos durante los cuales apenas se detectó presencia de *D. acuta* en el interior de las rías en los muestreos semanales del programa de seguimiento, se pudieron observar poblaciones moderadas de *D. acuta* en una campaña desarrollada en la plataforma adyacente (Varela, 1982). Si suponemos que la «ventana ambiental» requerida por *D. acuta* para desarrollar su ciclo vital está determinada por la intensidad del afloramiento y la profundidad de la termoclina estacional, la localización de esta «ventana» en relación con la boca de las rías variará durante la temporada de afloramiento y mostrará además importantes fluctuaciones interanuales. Así pues, las poblaciones de *D. acuta* se moverán hacia dentro y hacia fuera de las rías, más o menos alejadas de la costa en la plataforma adyacente, según interaccionen estos procesos físicos. Quizás las inusuales condiciones meteorológicas de 1989 causaron una oscilación de esta «ventana» a posiciones más próximas a las bocas de las rías, donde las poblaciones de *D. acuta* pudieron ser objeto de nuestras observaciones. En años «normales», aportes fluviales superiores, y una circulación estuárica más intensa, harán que esta ventana favorable al crecimiento de *D. acuta*, con estrechos márgenes de temperatura y salinidad, esté más alejada de la costa.

Aparición de distintos estadios del ciclo de vida de *D. acuta* durante la proliferación

Los estudios taxonómicos disponibles de *Dinophysis* están basados sobre todo en la silueta de las células. Las observaciones de individuos dimórficos - mitad *D. acuta*, mitad *D. dens*- coincidiendo con la presencia de ambas «especies», así como de pares acoplados *D. acuta/D. dens*, han sido citadas para la costa gallega (Reguera *et al.*, 1990, 1995), Portugal (Moita & Sampayo, 1993), Dinamarca (Hansen, 1993) y Nueva Zelanda (MacKenzie, 1992). Todos estos autores coincidieron en sugerir que *D. dens* no era sino un estadio, posiblemente un gameto, del ciclo vital de *D. acuta*.

Moita & Sampayo (1993) presentaron evidencias de potenciales procesos de enquistamiento de *D. tripos* en una zona de hundimiento, y sugirieron que la fuerza descendente del agua pudiera haber estresado a las células y provocado la formación de quistes. Los potenciales quistes permanentes de *D. acuta* aquí descritos no se mencionaron en un mapeo de quistes extensivo de la costa gallega (Blanco, 1988), ni en ningún otro estudio previo de quistes. La forma final de los quistes es ovalada, y podrían fácilmente haber sido pasados por alto en los muestreos de sedimento para estudios de quistes, o incluso haber sido confundidos con huevos de zooplancton. Otra posibilidad es que los hipotéticos quistes de *Dinophysis*, una vez formados, no se acumulen en el sedimento, sino que se adhieran a otras superficies (frústulas de diatomeas, macroalgas) como ya se ha demostrado en el caso de quistes de rafidofíceas que se adhieren a los frústulos de diatomeas (Moestrup, 2002). Sería necesario, pues, aplicar distintas estrategias de muestreo para aceptar o desechar la existencia de quistes permanentes de *Dinophysis* spp. La pregunta que surge tras los resultados aquí presentes es el por qué los hipotéticos quistes no se habían observado con anterioridad pero se registraron simultáneamente, en 1989, en Galicia y Portugal. La respuesta a esta pregunta es que, dadas las bajísimas concentraciones de quistes detectadas ($20 - 40 \text{ q} \cdot \text{l}^{-1}$), y el porcentaje tan bajo que éstos representaban de la población total de *Dinophysis*, tan sólo fue posible detectar estos estadios durante años en que se alcanzaron concentraciones excepcionales ($> 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *D. acuta*. Otra posible explicación sería que los quistes se hubieran formado en las etapas finales del crecimiento poblacional, una vez las células congregadas en la capa superficial de 0-5 m de profundidad hubieran sido transportadas hacia fuera de las rías, por lo que habrían escapado a las observaciones rutinarias del programa de seguimiento.

CAPÍTULO 6

PATRONES DEL CICLO CELULAR Y ESTIMACIÓN DE TASAS DE DIVISIÓN *IN SITU* DE DINOFLAGELADOS DEL GÉNERO *DINOPHYSIS* MEDIANTE UN ÍNDICE POSTMITÓTICO.

Reguera, B., E. Garcés, I. Bravo, Y. Pazos, I. Ramilo & S. González-Gil. (2003). Cell cycle patterns and in situ division rates of dinoflagellates of the genus *Dinophysis* by a postmitotic index. *Mar.Ecol. Prog. Ser.* 249: 117-129.

PATRONES DEL CICLO CELULAR Y ESTIMACIÓN DE TASAS POTENCIALES DE DIVISIÓN *IN SITU* DE DINOFLAGELADOS DEL GÉNERO *DINOPHYSIS* MEDIANTE UN ÍNDICE POSTMITÓTICO

RESUMEN

Se utilizó un método de análisis del ciclo celular, basado en el reconocimiento morfológico de las células en fase de citocinesis y de regeneración de las aletas sulcales, para estimar las tasas de división *in situ* de cuatro especies de dinoflagelados del género *Dinophysis*, productoras de toxinas diarreogénicas de bivalvos (DST), aplicando dos modelos distintos. Se llevaron a cabo muestreos intensivos de 24 h durante cuatro mini-campañas en las Rías Bajas gallegas durante proliferaciones de primavera y de otoño de estas especies. Se estimó la frecuencia de células en parejas y recién divididas en muestras integradas (0-20 m) de agua a intervalos de 30, 60, ó 120 min. Se observó que *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos* presentaban división en fase, pero la forma de las curvas de distribución de frecuencia de las distintas fases así como los valores estimados de tasas de división variaban considerablemente para una misma especie durante distintas estaciones del año y/o campañas. Las frecuencias de células en parejas + células recién divididas fueron máximas al amanecer en el caso de *D. acuminata*, y 2-3 horas más tarde en las otras especies. Estos resultados confirman que la fase de citoquinesis (células en parejas) puede ser muy rápida en las especies de *Dinophysis* (0.3 - 2.2. h), mientras que la fase de regeneración de las aletas sulcales es un proceso más lento que constituye un marcador inequívoco de la división celular. El "índice postmitótico" empleado permitió estimaciones de μ a bajas concentraciones de campo (10^2 - 10^3 cel · l⁻¹) de las especies diana invirtiendo un tiempo razonable en el análisis de muestras (1-2 h por muestra). Se observaron valores entre moderados (0.24) y altos (0.65) de μ bajo condiciones oceanográficas consideradas desfavorables para el crecimiento de *Dinophysis spp.*, y la fase de crecimiento en que se encontraba la población mostró ser un factor clave para este valor. Se presenta una revisión crítica de citas de resultados previos de división asíncrona obtenidos en estudios del ciclo celular de *Dinophysis*. Se sugiere que el seguimiento del contenido de ADN por célula durante el ciclo celular de *Dinophysis* no constituye un método fiable mientras no se disponga de un conocimiento razonable de su comportamiento nuclear durante procesos sexuales y otros procesos no mitóticos, y que, incluso aceptando que la mitosis es un proceso de no retorno, la división celular podría detenerse en una de sus fases, lo que añadiría aún más imprecisiones a las mediciones de tasas de división basadas en la cuantificación de ADN por célula.

CELL CYCLE PATTERNS AND ESTIMATES OF *IN SITU* DIVISION RATES OF DINOFLAGELLATES OF THE GENUS *DINOPHYSIS* BY A POSTMITOTIC INDEX

ABSTRACT

A cell cycle analysis method based on morphological recognition of cytokinesis and sulcal list regeneration was chosen to estimate *in situ* division rates (μ) of four dinoflagellate species of the genus *Dinophysis*, potentially producers of Diarrhetic Shellfish Toxins (DST), following two different models. Sampling over 24 h was conducted on four mini-cruises in the Galician rías during spring and autumn proliferations of these species. Frequencies of paired and recently divided cells in integrated water samples (0-20 m) were measured at 30, 60, or 120 min intervals. Cellular division was phased in *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* and *D. tripos* but the shape of the phase fraction curves and the values of estimated division rates varied considerably between different seasons and cruises for the same species. Frequencies of paired plus recently divided cells were maximal at dawn in *D. acuminata*, and 2-3 h later in the other species. Results presented here confirm that the cytokinetic (paired) phase can be very fast in *Dinophysis* spp. (0.3-2.7 h), but sulcal list regeneration was shown to be a more stable process and an unambiguous marker of cellular division. This "postmitotic index" allowed estimates of μ at low field concentrations ($10^2 - 10^3$ cells l^{-1}) of the target species and required a short time for sample processing (1-2 h per sample). Moderate (0.24) to high (0.57) values of μ were found under oceanographic conditions considered unfavourable for growth of *Dinophysis* spp., and the phase in the population growth season seemed to be a key factor affecting this value. A critical revision of previous results of asynchronous division obtained in cell cycle studies of *Dinophysis* spp. is presented. It is suggested that monitoring the content of DNA per cell through the cell cycle in *Dinophysis* spp. is not a reliable method until a reasonable knowledge on the nuclear behaviour during sexual processes and other non mitotic processes is achieved for these species, and that even accepting that mitosis is a non-return process, cell division may arrest in one of its phases, adding further inconsistencies to μ measurements based on quantification of DNA per cell.

INTRODUCCIÓN

Existen varias especies de *Dinophysis* que son miembros habituales de las comunidades fitoplanctónicas en aguas costeras de Galicia (NO de España). *Dinophysis acuminata* y *D. acuta* son las especies más abundantes (max. anual, $1-5 \times 10^4$ cel · l⁻¹) de *Dinophysis* asociadas a episodios de presencia de toxinas diarreogénicas en los bivalvos (DST) en las Rías Bajas gallegas. *D. acuminata* es el principal agente de los episodios de primavera-principios de verano (mayo-julio), y en ciertos años también de los episodios otoñales (septiembre-octubre), y se han registrado episodios DST asociados incluso a concentraciones menores de 200 cel · l⁻¹ de esta especie (Blanco *et al.*, 1998). *D. acuminata* es muy persistente, y se ha observado su presencia en el 76% de las muestras semanales tomadas en la estación de Bueu (Ría de Pontevedra), como parte de las actividades del programa de seguimiento, entre 1992 y 1998 (Pazos *et al.*, datos no publ.). *D. acuta* es más estacional y suele aparecer en pulsos cortos en septiembre-octubre, excepto en años excepcionales (Reguera *et al.*, 1993b, 1995; Blanco *et al.*, 1995, 1998). Ambas especies pueden presentar máximos durante episodios de hundimiento que favorecen la advección de poblaciones de dinoflageladas desde la plataforma al interior de las rías (Fraga *et al.*, 1988; Figueiras *et al.*, 1994, 1996; Pazos *et al.*, 1995; Reguera *et al.*, 1996), así como durante períodos de marcada estratificación termohalina tras pulsos de afloramiento moderados entre julio y agosto. La ocurrencia de máximos de estas dos especies bajo situaciones oceanográficas muy distintas sugiere la existencia de distintos mecanismos de proliferación. *D. caudata* y *D. tripos* son especies mucho más escasas (max. anual, 10^2-10^3 cel · l⁻¹), que coinciden con las anteriores durante episodios DST otoñales.

Dado el gran impacto socioeconómico de las proliferaciones de especies de *Dinophysis* en la comercialización de bivalvos en Europa, es de gran interés la estimación de tasas de división *in situ* específicas de especie, esencial para identificar la fuente de estas poblaciones y las condiciones oceanográficas que promueven ya sea la división activa *in situ*, o las acumulaciones debidas a interacciones físicas (advección) y biológicas (comportamiento natatorio). A más largo plazo, el objetivo principal es mejorar las capacidades de predicción para optimizar la gestión de los recursos marisqueros afectados por los episodios diarreicos.

La información disponible sobre tasas de división *in situ* de especies de *Dinophysis* es muy escasa ya que la carencia de cultivos impide observaciones del ciclo celular y calibraciones previas en estudios de laboratorio. Otro impedimento considerable es la baja concentración celular y la baja dominancia que suelen presentar las poblaciones naturales de estas especies. Existen pocos casos registrados de poblaciones de *Dinophysis* que hayan alcanzado niveles de «marea roja» (Guzmán & Campodonico, 1975; Subba-Rao *et al.*, 1993, MacDonald, 1994; Dahl *et al.*, 1996; Santhanam & Srinivasan, 1996), y éstos representaban episodios muy transitorios de acumulación

al final de la proliferación anual. Así pues, el estudio de la división *in situ* de poblaciones de baja densidad de *Dinophysis* acompañadas de otras especies dominantes, puede resultar con frecuencia una labor muy dificultosa, si no imposible.

Para hacer un seguimiento de la división *in situ* de *Dinophysis* se han aplicado distintas aproximaciones. Las técnicas basadas en incubaciones no han dado resultados muy satisfactorios. Granéli *et al.* (1992) aplicaron el método de incubación con ^{14}C de Rivkin & Seliger (1981) en concentrados de poblaciones naturales de fitoplancton que contenían *Dinophysis* spp. Se observaron tasas inesperadamente altas de asimilación de C en el período de oscuridad, las cuales se interpretaron como el resultado de alimentación mixótrofa. Chang & Carpenter (1991) realizaron contajes celulares de poblaciones naturales (no concentradas) de *D. acuminata* en Long Island, incubadas en cámaras de difusión cilíndricas de metacrilato, de 115 ml, similares a las descritas por Furnas (1982). No se observó incremento de la población en estas cámaras, mientras que el seguimiento del índice mitótico en la misma población mostró que ésta se dividía activamente. Garcés *et al.* (1997) hicieron observaciones similares durante incubaciones de *D. sacculus* en cámaras de 250 ml, y llegaron a la conclusión de que *Dinophysis* spp. no toleraba el confinamiento en las cámaras. Estos mismos autores sugirieron que la diferencia entre la tasa potencial de división *in situ*, estimada mediante el índice mitótico, y el crecimiento neto, estimado de los contajes celulares en las cámaras de incubación, podría emplearse como un valor de la tasa de lisis celular *in situ*.

En el presente estudio desistimos de emplear contajes celulares u otras aproximaciones en poblaciones confinadas en grandes bolsas de mesocosmos ($> 1 \text{ m}^3$) (Brockmann *et al.*, 1977), ya que no habrían permitido obtener una muestra representativa sin perturbar la heterogeneidad vertical de la columna de agua. Para evitar los efectos secundarios de las técnicas de incubación se decidió aplicar el método de la frecuencia máxima (Swift & Durbin, 1972) y el del índice mitótico (McDuff & Chisholm, 1982) modificados según Vaultot (1992) y Carpenter & Chang (1988) respectivamente. Ambas aproximaciones están basadas en cálculos de la frecuencia o fracción de células que se encuentran en determinadas fases del ciclo celular en muestras tomadas directamente del mar.

Se presentan resultados de cuatro muestreos intensivos *in situ* realizados en las rías de Pontevedra y Vigo cuyos objetivos eran: a) Describir el patrón de división celular de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos* utilizando criterios morfológicos; b) Estimar las tasas específicas de división *in situ* a partir de las frecuencias de células que se encuentran en fase de división (índice mitótico). Se incluye también una revisión crítica de resultados previos obtenidos de análisis del ciclo celular de especies de *Dinophysis* basados en la frecuencia de células binucleadas y en el contenido de ADN por célula.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo de campo

El estudio se realizó sobre muestras tomadas durante cuatro minicampañas realizadas entre 1994 y 1998 en las rías de Vigo (estación V1, 20 m, 42°15'N, 8°50'W) y Pontevedra (estación P2, 27 m, 42°21'N, 8°47'W) (Fig. 6.1) en momentos de incremento numérico de *Dinophysis* spp. y detección de toxinas diarreogénicas en los bivalvos, a finales de primavera (1-2 junio 1994; 18-19 junio 1998), y principios de otoño (27-28 octubre 1994; 15-16 octubre 1997). Estudios previos han mostrado que *D. acuminata* mostraba migración vertical diurna en la Ría de Vigo (Villarino *et al.*, 1995), y que se agregaba en capas finas en aguas del Atlántico en Francia (Gentien *et al.*, 1995). Por ello, se tomaron las muestras de fitoplancton mediante arrastres verticales, con red de 20 μm de apertura de malla en la capa superior de 20 m, para obtener muestras integradas que no se vieran afectadas por las fluctuaciones diurnas y la heterogeneidad vertical. Para eliminar detritus y organismos zooplanctónicos, se filtraron posteriormente las muestras por malla de 150 μm . Simultáneamente, se realizaron lances de CTD (SBE 25 SEALOGGER), que conectado con el ordenador de a bordo permitió obtener perfiles verticales, en tiempo real, de salinidad, temperatura, fluorescencia *in vivo*, y densidad y tomar decisiones de muestreo según las gráficas observadas. Se tomaron muestras de botella a 0, 5, 10 y 15m o a otras profundidades que pudieran parecer de interés tras las lecturas del CTD. La frecuencia de muestreo fue cada dos horas entre las 14:00 y las 20:00 h, cada hora

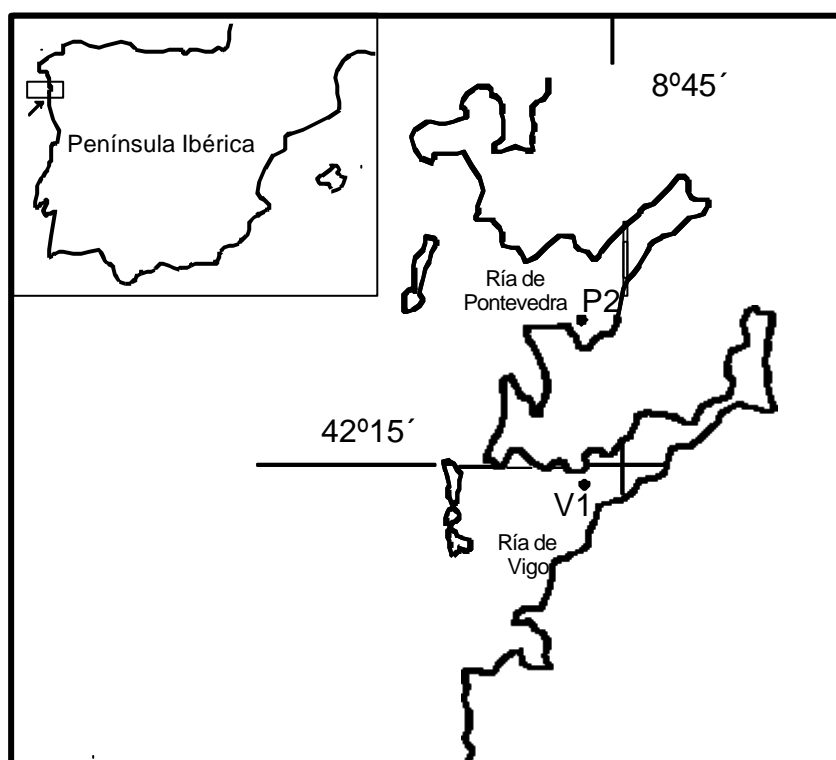


Fig. 6.1. Mapa de las rías de Pontevedra y Vigo mostrando las dos estaciones de muestreo.

entre las 20:00 y las 06:00 e incluso cada media hora entre las 06:00 y las 10:00, el período durante el cual los procesos de citocinesis y de regeneración de aletas sulcales pueden tener lugar con gran rapidez.

Las muestras de red se dividían en dos alícuotas: una mitad se fijaba con formol neutralizado, para posterior determinación al microscopio de la frecuencia de células en fase de división celular (formando parejas) o recién divididas (con la aleta sulcal izda. incompleta); la otra mitad se concentraba y escurría a través de malla de 20 μm , con ayuda de papel de celulosa colocado debajo del pequeño colector para eliminar agua al máximo, y el material obtenido se resuspendía en metanol helado que se lanzaba a chorro con un frasco lavador, recogiendo el lavado en un pequeño vaso. Las muestras se guardaban inmediatamente en el congelador, conservándose congeladas hasta el momento de centrifugación y tinción con DAPI para observación al microscopio de epifluorescencia. De cada muestra de botella se tomaron alícuotas de 100 ml, que eran fijadas inmediatamente con lugol, para posterior cuantificación y estudio de la distribución vertical de las distintas especies de *Dinophysis* según el método de Utermöhl, empleando cámaras de sedimentación compuestas y un microscopio ZEISS (AXI OVERT 35). Si las concentraciones celulares eran escasas (según información previa del centro de monitoreo), se concentraban 1-2 l de agua tomada con botellas oceanográficas en un colector con malla de 10 - 20 μm , se anotaba el volumen del concentrado (para aplicar el factor de conversión en los cálculos cuantitativos) y se fijaba la muestra con lugol en el frasco de 100 ml.

Las concentraciones de especies fitoplanctónicas y otros datos ambientales a lo largo del año fueron suministrados por el Centro de Control de Medio Marino, o tomados de sus informes (Bermúdez de la Puente *et al.*, 2000; Morono *et al.*, 2000). Los datos corresponden a muestras integradas (0-5, 5-10, 10-15 m) tomadas con una manguera muestreadora (Lindahl, 1986) que se desmonta en tres tramos. Los datos de distribución vertical de salinidad, temperatura y fluorescencia *in vivo* fueron obtenidos por CTD (SBE 25 SEALOGGER).

Estimación de frecuencia de células en fase de división nuclear o celular, y recién divididas.

Las muestras mantenidas en metanol se centrifugaron y resuspendieron en solución de tampón fosfato (PBS) dos veces y se tiñeron con el fluorocromo DAPI (2'4-diamidino-2-fenilindol, según el método de Carpenter & Chang (1988), y posteriormente se observaron alícuotas al microscopio de epifluorescencia para estimar la frecuencia de células binucleadas mediante microscopía de epifluorescencia con filtro de excitación UV y aumentos de 100x y 400x.

La frecuencia de células en fase mitótica se estimó en las muestras fijadas con formol neutro sobre la base de criterios morfológicos. La división vegetativa o asexual

en *Dinophysis* es por desmosquiosis. Cada célula hija hereda una mitad de la célula materna y produce otra nueva mitad complementaria. Después de la citocinesis, las dos células hijas permanecen unidas por el margen dorsal en una zona de crecimiento intercalar, el puente megacítico dorsal, formando una pareja de células que se mantienen unidas un período de tiempo que varía de unas especies a otras. No obstante, algunas partes del material materno no se reparten equitativamente, como ocurre en el caso de la gran aleta sulcal izquierda (ASI): una de las células hija hereda la pequeña aleta sulcal derecha (ASD) completa y la mitad posterior (entre las costillas R2 y R3) de la ASI; la otra célula hija hereda la mitad anterior de la ASI (entre R1 y R2) (Fig. 6.2). Este desarrollo incompleto de la aleta sulcal izda. permite un fácil reconocimiento y conteo de las células de *Dinophysis* recién divididas a las que les falta la mitad posterior de la aleta sulcal izda. (equivalente a la mitad del total de células recién divididas, I_c). Las células hijas que heredan la aleta sulcal dcha., y la porción posterior de la aleta sulcal izda. pueden confundirse fácilmente con células vegetativas completamente desarrolladas (I_c), ya que la pequeña aleta sulcal dcha. ocupa el vacío dejado por la mitad anterior de la aleta sulcal izda., dando lugar a un

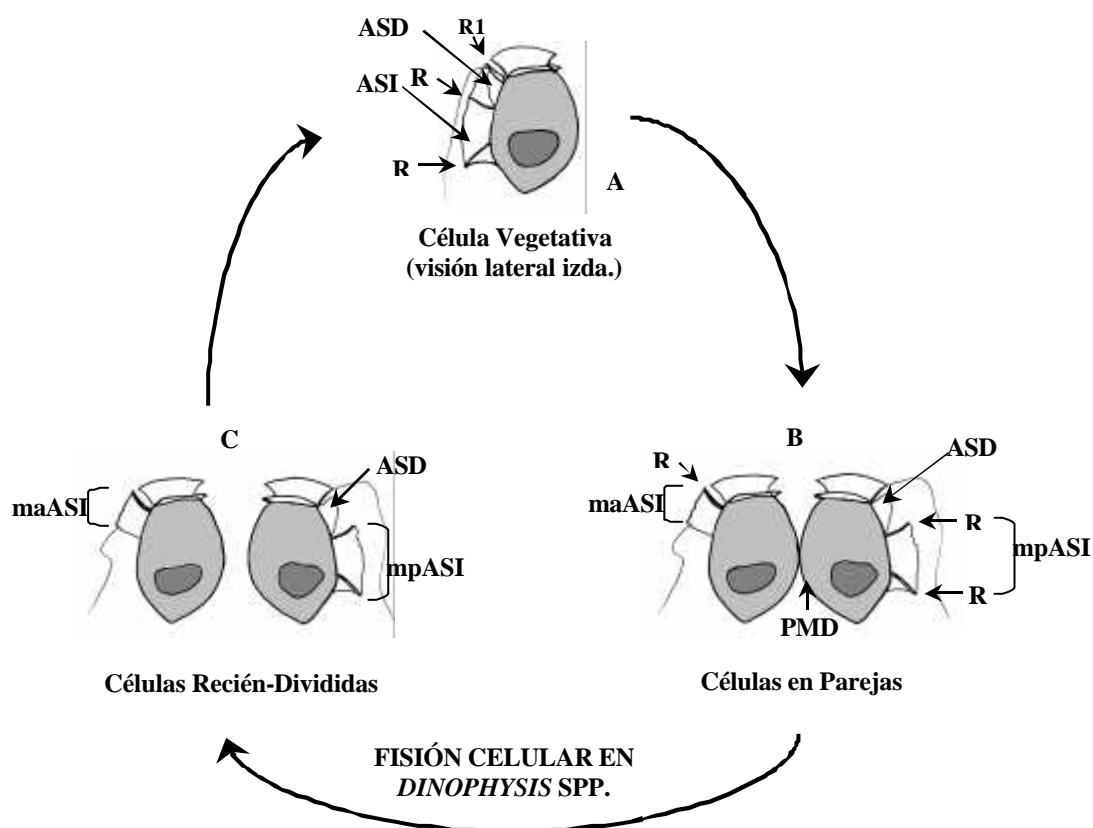


Fig. 6.2. Diagrama simplificado de la fisión celular en *Dinophysis* spp. A. Célula vegetativa completamente desarrollada, con la aleta sulcal izquierda (ASI) armada con la primera, segunda y tercera costilla (R1, R2 y R3). B. Pareja de células hijas unidas por el puente megacítico dorsal (PMD): la célula izqda. muestra la mitad anterior de la ASI (maASI); la célula dcha. muestra la mitad posterior de la ASI (mpASI) y la pequeña lista sulcal derecha (ASD). C. Células recién divididas de *Dinophysis* mostrando desarrollo incompleto de la ASI.

elevado porcentaje de errores en la identificación de esta otra «mitad» de células recién divididas. Por ello, este segundo tipo de células hijas se contabilizó junto con las células completamente desarrolladas (I_c) y el valor resultante equivalía a $I_c + I_r/2$. La frecuencia máxima de células que habían sufrido división (frecuencia de división total: células en parejas + células recién divididas) se estimó según la fórmula:

$$f_{max} = \frac{p + \frac{I_r}{2}}{I_c + p + \frac{I_r}{2}}$$

donde p = células formando parejas; I_c = individuos completamente desarrollados; $I_r/2$ = 50% de las células recién divididas.

Cuando las especies estudiadas eran *Dinophysis caudata* y/o *D. tripos*, fue necesario modificar la ecuación anterior, ya que estas dos especies mantienen las dos células hijas unidas durante un número indefinido de horas (no determinado, pero quizás dependiente de las condiciones de turbulencia o calma de la columna de agua) incluso después de haber completado la regeneración de las aletas sulcales. Así pues, en *D. caudata* y *D. tripos* las células en parejas podían ser: a) células recién divididas en fase de completar la citocinesis y que se disponen en planos distintos formando un ángulo menor de 180° y con desarrollo incompleto de sus aletas sulcales izda.; a éstas las denominamos "parejas abriéndose" (p_o); b) células en pareja recién divididas (las células hijas con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izda.) con las dos células hijas situadas en un mismo plano; las denominamos "parejas recién divididas" (p_r), y c) células en pareja, con desarrollo completo de las aletas sulcales y situadas en el mismo plano; a éstas las denominamos "parejas completas" (p_c) (Fig. 6.3). Por tanto, las parejas completas (p_c) se contaron como si fueran dos individuos, mientras que las parejas abriéndose (p_o) y las recién divididas (p_r) se contaron como uno en la ecuación:

$$f_{max} = \frac{p_o + p_r + \frac{I_r}{2}}{2p_c + p_o + p_r + I_c + \frac{I_r}{2}}$$

donde p_o = parejas abriéndose; p_r = células recién divididas en pareja con desarrollo incompleto de las aletas sulcales; $I_r/2$ = 50% de individuos recién divididos; p_c = pareja de individuos completamente desarrollados; I_c = individuos completamente desarrollados (Fig. 6.3).

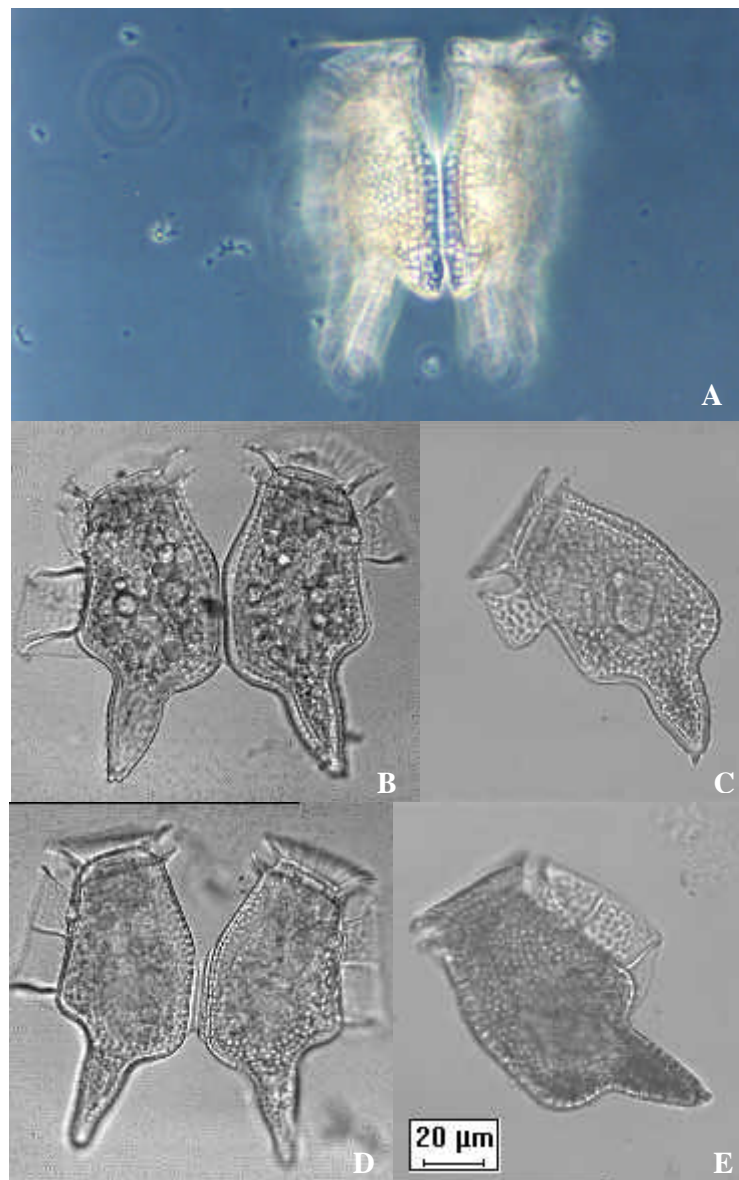


Fig. 6.3. Micrografías de *Dinophysis* spp. mostrando distintas etapas de la forma vegetativa tras la citocinesis. A. Pareja «abriéndose» de *D. tripos* (contraste de fase). B-E. Imágenes de campo claro digitalizadas de *D. caudata*: B. Pareja de células recién divididas y C. Célula individual recién dividida con desarrollo incompleto de la A.S.I. D. Pareja y E. Célula individual, ambos casos con las aletas totalmente desarrolladas.

Determinación de tasas de división específicas

Para estimar tasas de división aplicando el índice mitótico es necesario conocer la duración de las distintas fases, lo cual se hace a partir de la distancia entre los máximos de las curvas de distribución de frecuencia de dos fases consecutivas. Además, es necesario identificar «episodios terminales» -por ej., la división nuclear, la citocinesis, la regeneración de las aletas sulcales- que sean fáciles de contar o medir. La duración de las fases se suele determinar en experimentos controlados de laboratorio. En nuestro estudio, la carencia de datos de laboratorio para calcular estos tiempos en *Dinophysis* se suplió mediante el desarrollo de muestreos intensivos

de campo en los que se tomaron muestras con elevada frecuencia temporal (incluso cada media hora), obteniéndose así curvas muy fiables de la distribución de frecuencias de células de *Dinophysis* en distintas fases del ciclo celular. A pesar de que pudiéramos estar muestreando un agua distinta cada vez, y de que las mareas y otros procesos oceanográficos de pequeña escala espacio-temporal podrían afectar a la microdistribución y abundancia de los organismos en estudio, se asumió que el porcentaje de organismos en división y los rasgos generales de comportamiento seguían un patrón común en el área sujeta a fluctuaciones diurnas. A lo largo de este trabajo emplearemos la expresión «tasa de división», ya que no se trata de mediciones de aumento de biomasa, sino de número de células resultante de la división celular vegetativa.

Una vez estimadas las frecuencias de células que habían sufrido mitosis a través del ciclo celular, se estimaron las tasas de división *in situ* aplicando dos modelos diferentes. La primera estimación se basó en la aproximación de la f_{max} según la modificación de Vaultot (1992) para calcular la tasa de división mínima (μ_{min}):

$$\mu_{min} = \ln \frac{(1 + f_{max})}{(1 + f_{min})}$$

donde f_{max} y f_{min} son los valores máximo y mínimo respectivamente, calculados según las ecuaciones (1) y (2), observados en una muestra a lo largo del ciclo de 24 h, del porcentaje de células que han sufrido división, es decir, la suma de frecuencias de células en la fase citocinética (células en parejas) más la de células en la fase de regeneración de las aletas sulcales (recién divididas). Esta estimación (μ_{min}) no es más que una estimación mínima de la tasa de división y estará próxima al valor real de μ tan sólo en determinados casos (por ej., en el caso de división muy en fase, con la posibilidad de reconocer todas las células en división o recién divididas en un intervalo de tiempo igual o mayor que el intervalo de muestreo, de forma que se puedan observar en una misma muestra).

La segunda estimación, la tasa promedio (en 24 h) de división específica μ , se basó en la aproximación del índice mitótico calculada según el modelo de Carpenter & Chang (1988), utilizando como «eventos terminales» la citocinesis (células en parejas) y la regeneración de las aletas sulcales en la ecuación:

$$\mu = \frac{1}{n(T_c + T_r)} \sum_{i=1}^n (t_s)_i \ln [1 + f_c(t_i) + f_r(t_i)]$$

donde μ es la tasa de división *in situ*, $f_c(t_i)$ es la fracción de células en la fase citocinética del ciclo celular (células formando parejas con desarrollo incompleto de las aletas sulcales) y $f_r(t_i)$ es la mitad de la fracción de células recién divididas

(que carecen de la mitad anterior o posterior de la aleta sulcal izda. en la muestra i^{th} . T_c y T_r son los tiempos de duración de cada una de las fases del ciclo celular previamente definidas, n es el número de muestras tomadas durante el muestreo de 24 h, y t_s es la duración, en h, del intervalo de muestreo. Dada la dificultad de muestrear a intervalos fijos en condiciones de campo, se utilizaron las medias ponderadas de las frecuencias de fases.

La duración de las dos fases consecutivas del ciclo celular elegidas ($T_c + T_r$) se estimaron como el intervalo de tiempo necesario para que una cohorte de células pasara de una fase a la siguiente -en nuestro caso, el intervalo de tiempo ($t_1 - t_0$) entre el tiempo t_0 en el que se localiza el máximo de la frecuencia de células en fase de citocinesis (f_c), y el tiempo t_1 cuando la frecuencia de células recién divididas f_r es máxima (t_1)- según la ecuación:

$$\frac{1}{2} (T_c + T_r) = (t_1 - t_0)$$

donde T_c , T_r , t_1 y t_0 se calcularon tras el ajuste de los datos de frecuencia a una función gaussiana.

En el caso de *D. caudata* y *D. tripos*, se emplearon como episodios terminales la fase de «parejas abriéndose», y la fase de parejas recién divididas (células, sueltas o en parejas, con desarrollo incompleto de la aleta sulcal izqda.). Así pues, T_c sería la duración de la fase de apertura de las parejas.

RESULTADOS

Condiciones oceanográficas antes de y durante los muestreos intensivos.

La Fig. 6.4 muestra la distribución vertical de la temperatura, salinidad y fluorescencia *in vivo* en las estaciones de fondeo, dos días antes del desarrollo de los muestreos intensivos.

Campaña 1 (1-2 Junio 1994). Este período se caracterizó por la formación de picnoclinas con marcados gradientes de salinidad y temperatura en la capa superficial de 10 m. El máximo de clorofila subsuperficial (MCSS) estaba constituido fundamentalmente por grandes diatomeas céntricas (*Chaetoceros didymus*, *Thalassiosira rotula*, *Detonula pumila*) y colonias esféricas de *Ch. socialis* y *Phaeocystis* sp. La concentración de *D. acuminata* era de 1280 cel · l⁻¹ en las muestras integradas (0-15 m), con un máximo de 3040 cel · l⁻¹ en el tramo de 5-10 m. El día de muestreo la capa de agua donde se localizaba el MCSS apareció desplazada por debajo de 20 m. Así pues, las diatomeas desaparecieron prácticamente y la capa superficial de 20 m presentaba dominancia de dinoflageladas. La dinoflagelada más abundante era *D. acuminata*, que presentó los valores máximos a

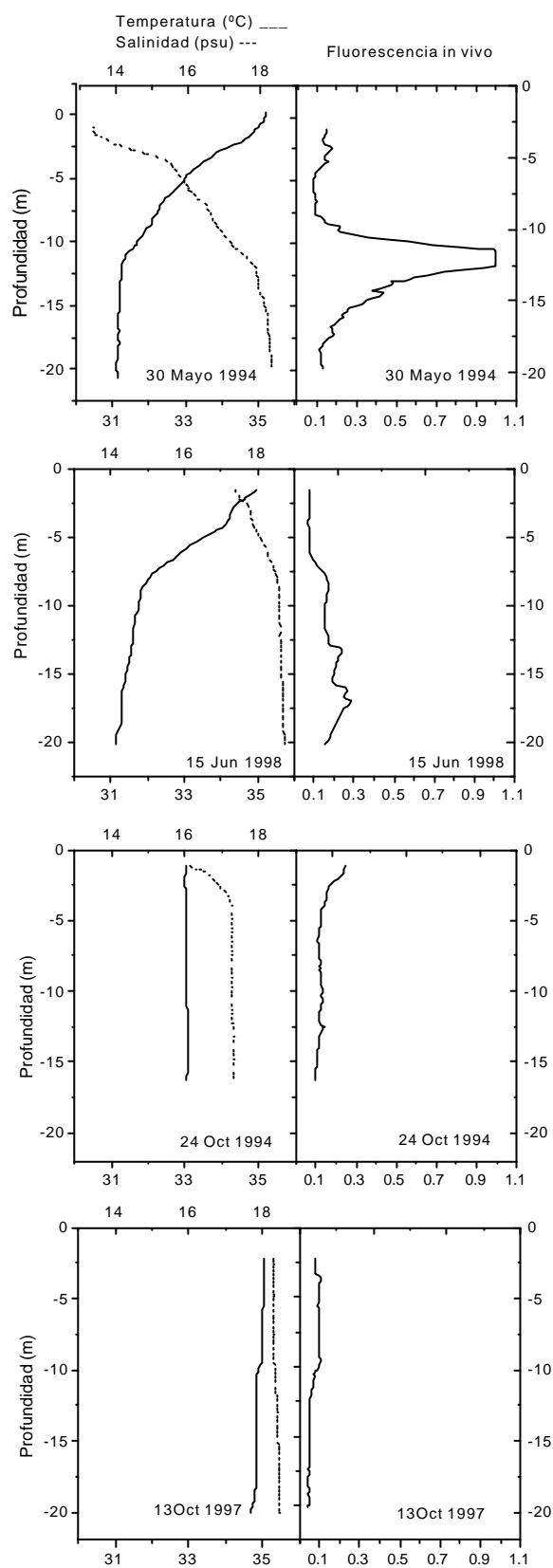


Fig. 6.4. Perfiles verticales, obtenidos mediante sonda CTD, de temperatura (T , °C), salinidad (S , psu) y fluorescencia *in vivo* (unidades arbitrarias) en las estaciones de muestreo 2-3 días antes de las minicampañas: 30 mayo de 1994, 13 de octubre de 1997 y 15 de junio de 1998 (Est. P2 de la Ría de Pontevedra); 25 de octubre de 1994 (Est. V1 de la Ría de Vigo).

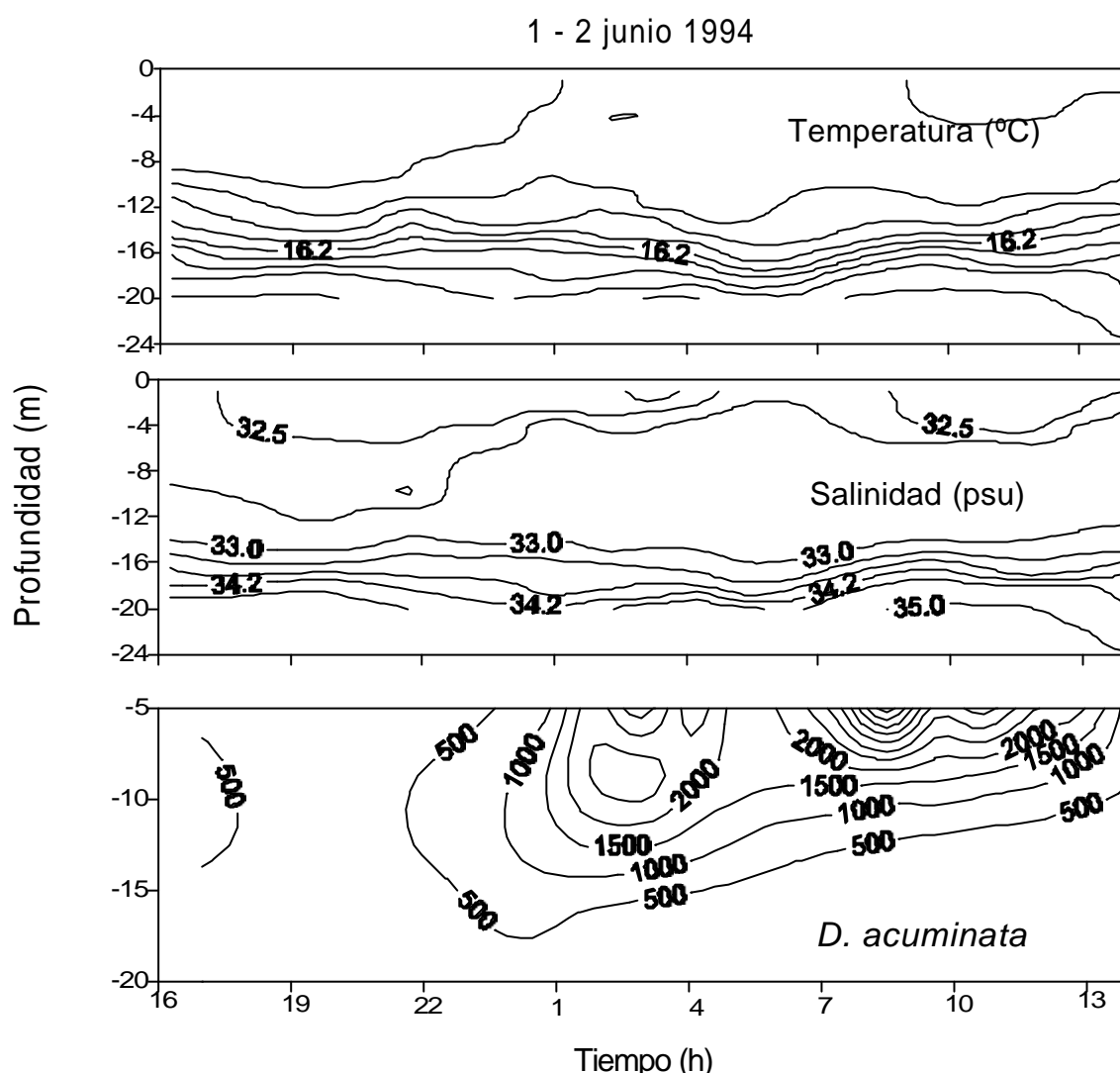


Fig. 6.5. Distribución vertical de temperatura (T , °C) y salinidad (S , psu) obtenida mediante lances de CTD a intervalos de 1 h, y de *D. acuminata* ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$), obtenidas de muestras de botella a 5, 10, 15 y 20 m, en la estación P2 de la Ría de Pontevedra entre las 16:00 h (1 junio) y las 14:00 h (2 junio de 1994) (GMT).

10 m a las 02:00 h ($4379 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) y a 5 m entre 08:00 y 10:00 h (max. $6058 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) (Fig. 6.5).

Campaña 2 (27-28 Octubre 1994): Dos días antes del muestreo intensivo, y durante el mismo, se observó una distribución vertical *quasi* homogénea (excepto en la capa superior de 4 m), de la temperatura ($16.0 \text{ }^\circ\text{C}$), salinidad ($34.0\text{-}34.3 \text{ psu}$) y fluorescencia *in vivo* en la estación muestreada en la Ría de Vigo, condiciones comunes al final de la temporada de afloramiento, promovidas por los episodios de hundimiento y fuertes lluvias (Fig. 6.6). El fitoplancton estaba dominado por bajas concentraciones de *Scrippsiella trochoidea*, *Leptocylindrus danicus*, *Guinardia delicatula*, *Dactyliosolen fragilissimus*, y *Heterosigma akashiwo* ($24490 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$). Había una mezcla de especies de *Dinophysis* spp. en concentraciones moderadas en

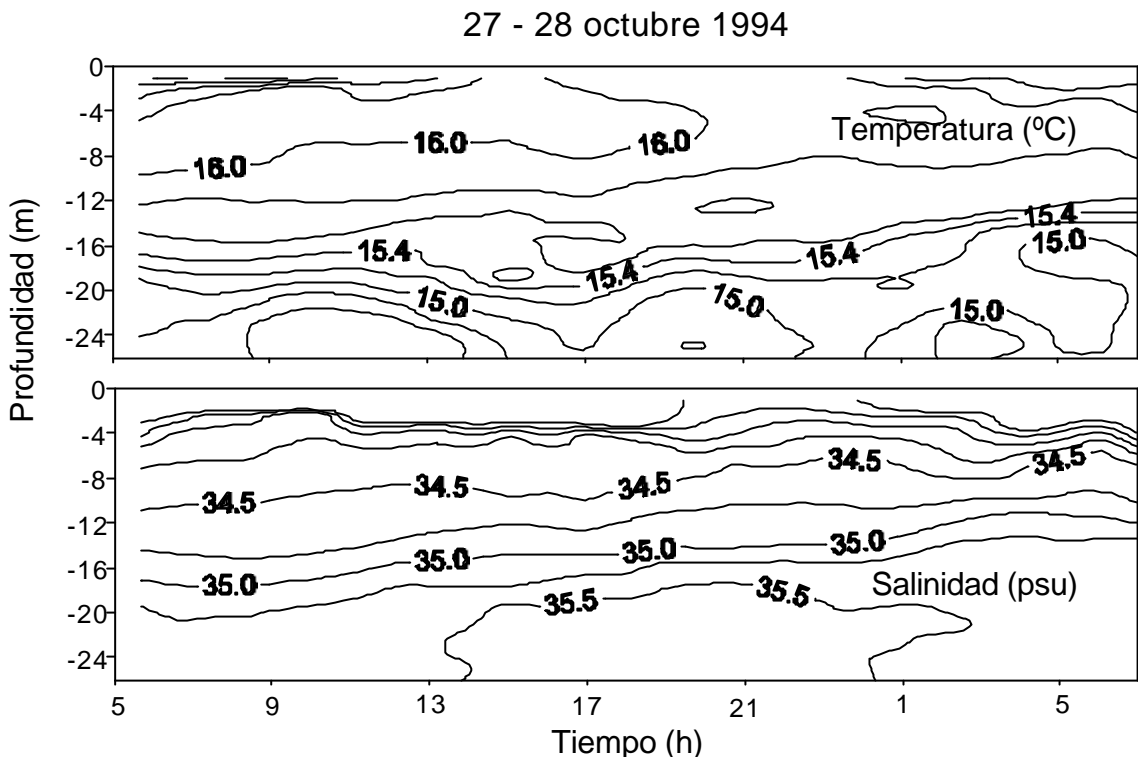


Fig. 6.6. Distribución vertical de temperatura (T , °C) y salinidad (S , psu) obtenida mediante lances de CTD a intervalos de 1 h, en la estación V1 de la Ría de Vigo entre las 05:00 h (27 octubre) y las 09:00 h (28 octubre de 1994) (GMT).

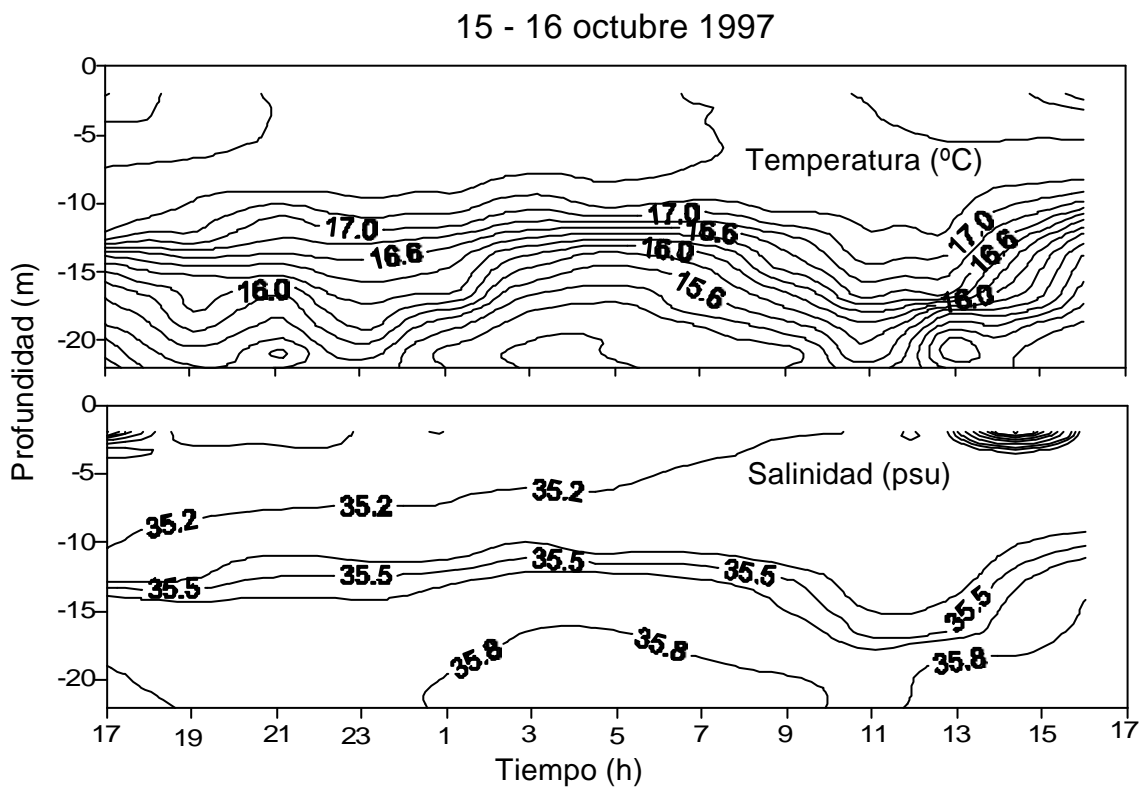


Fig. 6.7. Distribución vertical de temperatura (T , °C) y salinidad (S , psu) obtenida mediante lances de CTD a intervalos de 2 h, en la estación P2 de la Ría de Pontevedra entre las 18:00 h (15 octubre) y las 17:00 h (16 octubre de 1997) (GMT).

las muestras integradas (0-15 m): *D. acuminata*, 840 cel · l⁻¹, *D. acuta*, 360 cel · l⁻¹, *D. caudata*, 160 cel · l⁻¹, *D. rotundata*, 120 cel · l⁻¹ y *D. tripos*, 40 cel · l⁻¹.

Campaña 3 (15-16 Octubre 1997): Desde dos días antes y durante el muestreo intensivo, la estación P₂ de la Ría de Pontevedra mostraba un perfil prácticamente homogéneo de temperatura (17.6-18 °C), salinidad (35.3-35.5 psu) y fluorescencia in vivo (Fig. 6.7). El fitoplancton estaba dominado por pequeñas diatomeas no formadoras de colonias (*Navicula* spp., *Thalassiosira* spp., *Nitzschia longissima*) y flagelados (*Prorocentrum* spp., *Heterosigma akashiwo*). Al igual que en la campaña de octubre de 1994, había una mezcla de *Dinophysis* spp. en concentraciones mo-

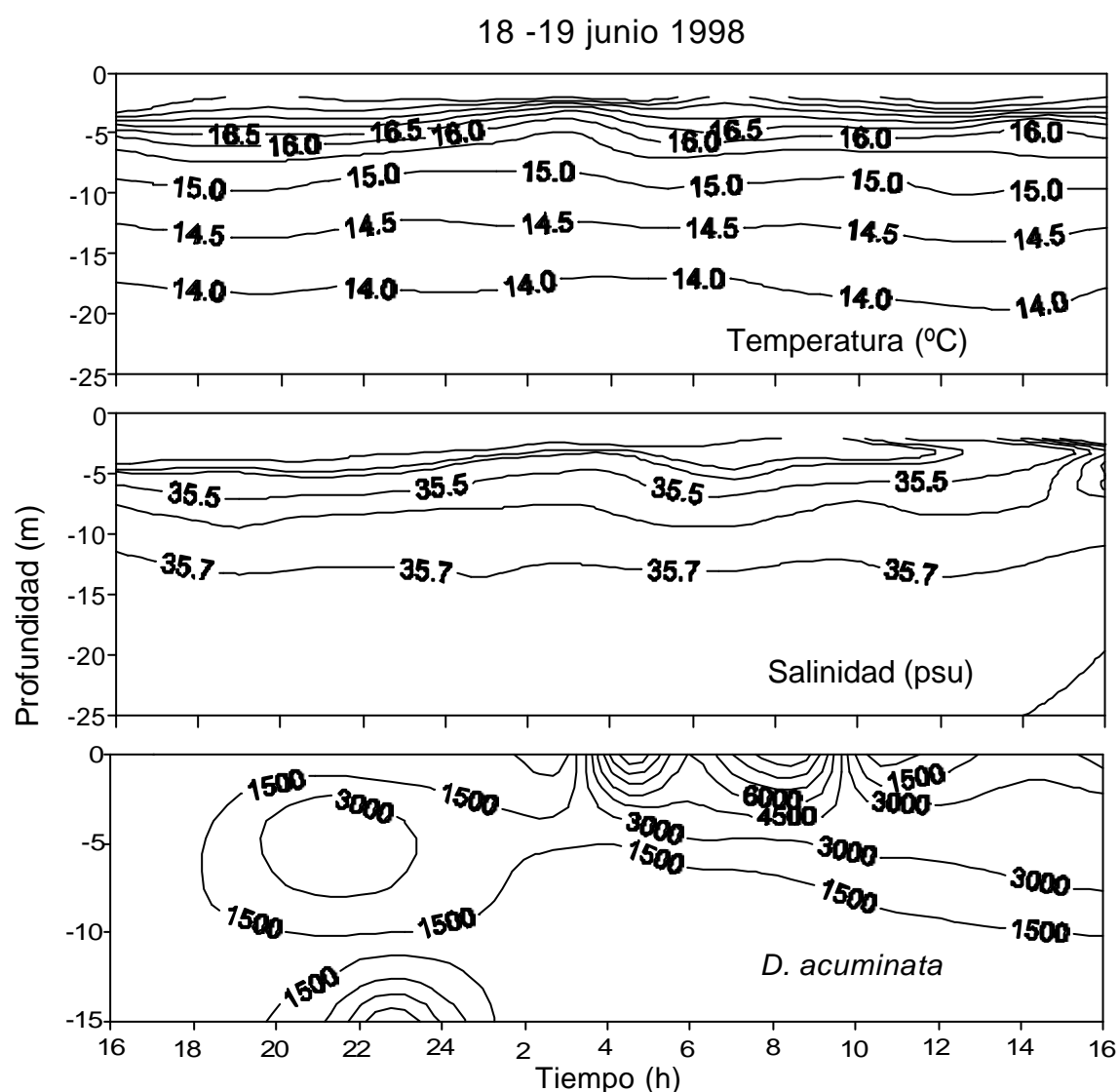


Fig. 6.8. Distribución vertical de temperatura (T, °C) y salinidad (S, psu) obtenida mediante lances de CTD a intervalos de 2 h, en la estación P2 de la Ría de Pontevedra entre las 18:00 h (18 junio) y las 17:00 h (19 junio de 1998) (GMT).

deradas en las muestras integradas (0-15 m): *D. acuminata*, 240 cel · l⁻¹; *D. acuta*, 720 cel · l⁻¹; *D. caudata*, 400 cel · l⁻¹ y *D. rotundata*, 40 cel · l⁻¹.

Campaña 4 (18-19 Junio de 1998): Desde tres días antes y durante el muestreo intensivo, se observaron marcados gradientes de temperatura y salinidad (superficie: 18 °C, 34.3 psu; 8 m: 15 °C, 35.5 psu) en la capa superior de 10 m (Fig. 6.8), pero la fluorescencia *in vivo* mostraba un perfil vertical. El fitoplancton estaba dominado por diatomeas formadoras de cadenas (*Dactyliosolen fragilissimus*, *Guinardia delicatula*, *Leptocylindrus danicus*, *L. minimus*, *Pseudo-nitzschia* spp., *Skeletonema costatum*). En muestras integradas (0-15 m), la concentración de *D. acuminata* fue de 2240 cel · l⁻¹ y el máximo, 5360 cel · l⁻¹, se detectó entre 10 y 15 m.

Ciclo anual de las especies de *Dinophysis* estudiadas en las rías de Vigo y Pontevedra.

La Fig. 6.9 muestra la distribución anual de las concentraciones celulares (muestras integradas de 0-15 m) para cada especie de *Dinophysis* durante cada año en que se estudió su ciclo celular. La campaña 1 (1-2 junio 1994) se desarrolló unos días antes del máximo primaveral de *D. acuminata*, y la campaña 2 (27-28 octubre 1994) durante el declive del máximo otoñal de *D. acuminata* y precediendo a un moderado máximo otoñal de *D. acuta*, *D. tripos* y un máximo inusualmente alto (> 10³ cel · l⁻¹) de *D. caudata*. La campaña 3 (15-16 octubre 1997) tuvo lugar inmediatamente después de los máximos otoñales de *D. acuta* y *D. caudata*, y la campaña 4 ((18-19 junio 1998) tras un máximo primaveral tardío y antes del declive de una población de *D. acuminata* que había presentado altas concentraciones celulares (>10³ cel · l⁻¹) desde principios de mayo.

Frecuencia de División Nuclear

Las tinciones celulares con DAPI de células de *D. acuminata* se llevaron a cabo en muestras del ciclo de 27-28 octubre de 1994. El día 27, la frecuencia máxima observada de células binucleadas fue de 14-18% entre las 05:30 y las 06:30. La distribución de frecuencias (Fig. 6.10) no mostró un patrón claro, pasando del valor máximo a un valor casi nulo entre las 06:30 y la 07:00. El 28 de octubre, una elevada proporción de las células (75% en algunos casos) mostró núcleos que no se habían teñido bien con el DAPI, lo cual dificultó sobremanera el poder obtener una estimación precisa del porcentaje de células binucleadas, y además se observaron abundantes tecas vacías, sobre todo a partir de las 07:00. Por ello, no se representaron gráficamente las frecuencias del segundo día. Se estimó un máximo aproximado del 9% a las 06:30.

La enumeración de células binucleadas de *D. acuminata* resultó ser una labor sumamente engorrosa y difícil, debido al fuerte aplastamiento lateral característi-

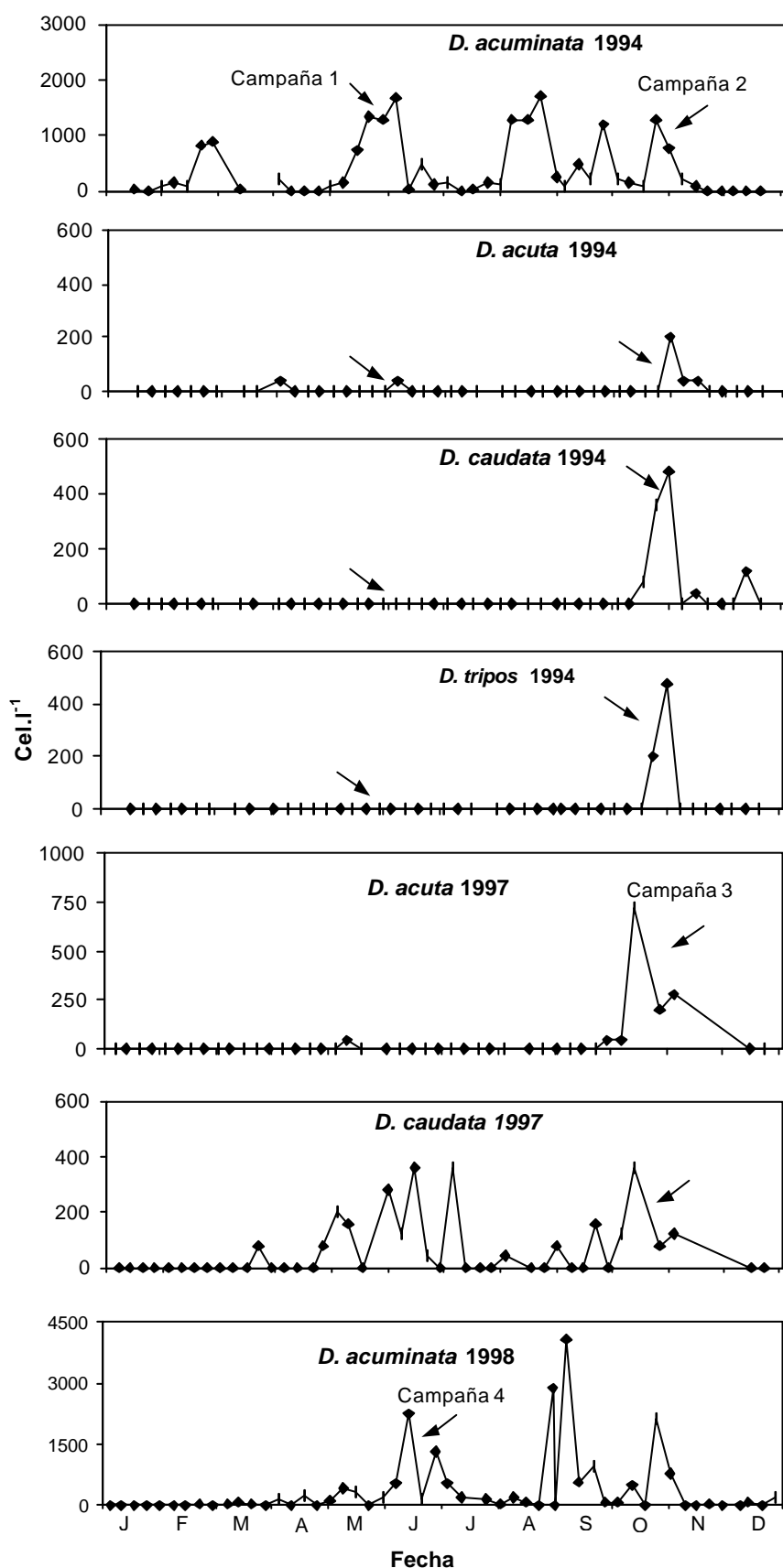


Fig. 6.9. Distribución anual de las concentraciones de células (cel · l⁻¹) (muestras integradas de 0-15 m) de *Dinophysis acuminata* (1994, 1997, 1998), *D. acuta* (1994, 1997), *D. caudata* (1994, 1997) y *D. tripos* (1994). Las flechas indican los días de los muestreos intensivos.

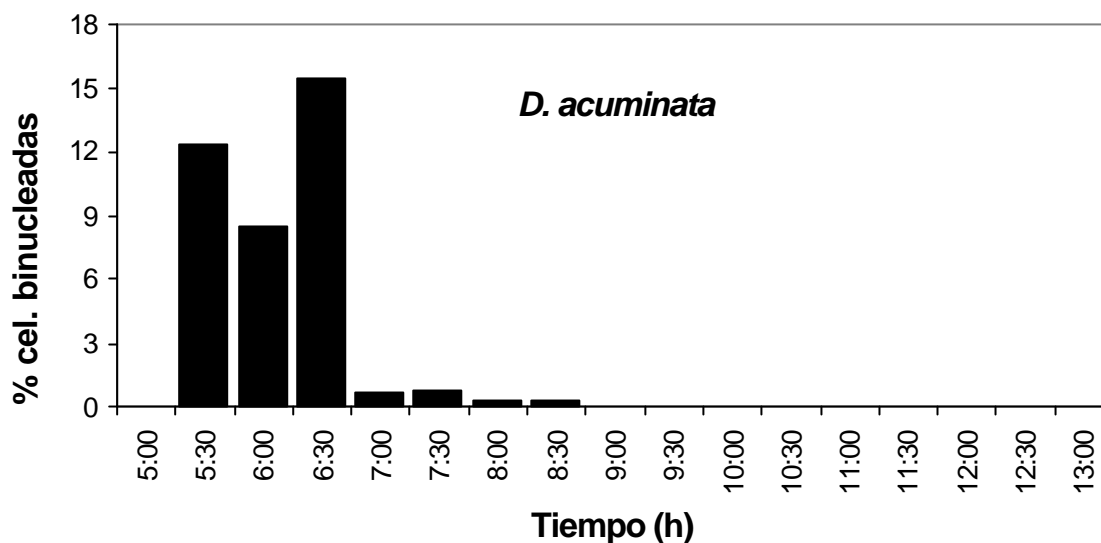


Fig. 6.10. Distribución de frecuencia de células binucleadas de *D. acuminata* en la estación V1 de la Ría de Vigo el 27 de octubre de 1994.

co de las células del orden Dinophysiales. La fisión nuclear y citoplasmática tiene lugar longitudinalmente en relación con un plano paralelo al plano de presentación lateral normal de las células de *Dinophysis*, es decir, un plano dorso-ventral que pasa por el *sulcus*. Con frecuencia, lo que en visión lateral (derecha o izquierda) parecía ser un único núcleo resultaba ser un núcleo doble cuando se conseguía rotar la célula con ayuda de una aguja enmangada. Hacer rotar cada célula para detectar si tiene un núcleo o dos (paralelos al plano sulcal y no visibles en visión lateral) constituye una labor imposible de aplicar a cada muestra durante los estudios de ciclo celular. Por el contrario si se realizara la enumeración haciendo un recorrido de la muestra con las células en presentación lateral, el resultado podrá tener un elevado porcentaje de error.

Frecuencia de células en fase de citocinesis (parejas), y de células recién divididas Estimaciones de μ .

En la Tabla 1 se muestran, para cada especie de *Dinophysis* en cada ciclo estudiado, los valores de μ_{\min} (Vaulot, 1992), y los de la tasa específica (media diaria) μ y los tiempos T_c y T_r . Se emplearon la citocinesis y la regeneración de las aletas sulcales como eventos terminales (μf_{c+r}) (Carpenter & Chang, 1988) y se ajustaron los datos a una función Gausiana.

Dinophysis acuminata (Fig. 6.11). Entre el 1 y el 2 de junio de 1994, la división apareció muy «en fase». La frecuencia máxima de células en parejas, f_c , se presentó en un margen muy estrecho de tiempo (<2 h) tras el amanecer, y la de células recién divididas, f_r , una hora más tarde con una distribución formando una curva menos aguda. El valor estimado μ_{\min} resultó menor que la mitad del valor estimado de μf_{c+r} . Entre el 18 y el 19 de junio de 1998 se observaron frecuencias extremadamen-

Tabla 6.1. Tasas de división (día^{-1}) de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* and *D. tripos* durante cuatro minicampañas. μ_{\min} es el valor mínimo de la tasa de división de acuerdo con el modelo de Vaultot (1992); μf_{c+r} es la tasa de división calculada al aplicar el modelo de Carpenter & Chang (1988), utilizando las fases de citocinesis y de regeneración de las aletas sulcales como episodios terminales.

Especie	Fecha	Temperatura (°C)	Salinidad (ppt)	L/D (h)	T_{c+r} ($T_c + T_r$) (h)	μf_{c+r} (día^{-1})	μ_{\min} (día^{-1})
<i>D. acuminata</i>	1-2 junio 94	17-18	32-33	15/9	4 (1.0 + 3.0)	0.28	0.25
	27-28 oct. 94	14.9-16	30.5-35.3	10.5/13.5	2 (0.3 + 1.7)	0.26	0.13
	15-16 junio 94	13.6-19.7	33-35.4	15.2/8.8	6 (1.0 + 5.0)	0.09	0.08
<i>D. acuta</i>	27-28 oct. 94	14.9-16.0	30.5-35.3	10.5/13.5	1 (0.24 + 0.76)	0.65	0.20
	15-16 oct. 97	14.6-18.0	33-35.4	11/13	3.6 (2.2 + 1.4)	0.33	0.17
<i>D. caudata</i>	27-28 oct. 94	14.9-16.0	30.5-35.3	10.5/13.5	3.8 (1.2 + 2.6)	0.24	0.19
	15-16 oct. 97	14.6-18.0	33-35.4	11/13			0.25
<i>D. tripos</i>	27-28 oct. 94	14.9-16.0	30.5-35.3	10.5/13.5	2 (0.4 + 1.6)	0.50	0.19

te bajas. La distribución de frecuencias de división era muy amplia y achatada en contraste con la distribución del ciclo de junio de 1994, y los tiempos T_c y sobre todo T_r más largos, pero de nuevo, el valor máximo de f_c se registró inmediatamente después del amanecer. Durante el ciclo de otoño del 27-28 de octubre de 1994, la distribución de f_c no presentó un patrón tan claro tras el amanecer como el de los ciclos de primavera. En todos los casos, los valores máximos observados de f_c fueron casi la mitad de los observados de f_r .

Dinophysis acuta (Fig. 6.12). Entre el 27 y el 28 de octubre de 1994, el máximo de f_c se observó a las 09:30, 2.5 h después del amanecer, formando un agudo pico, pero no se vio una sincronización muy fuerte. Los tiempos T_c y T_r fueron muy cortos. Al día siguiente, la frecuencia de división total entre las 07:00 y las 08:00 (2, 2, y 2%) fueron mucho más bajas que las observadas el día anterior a la misma hora (5, 3 and 14%). Entre el 15 y 16 de octubre del 97, el máximo de f_c también se observó 2.5 h después del amanecer. Las distribuciones de f_r y f_c fueron más dispersas (menos sincronización) y los tiempos T_c y T_r mucho más largos. El valor estimado de μ_{\min} fue 15 % más bajo que el de μf_{c+r} .

Dinophysis caudata (Fig. 6.13). Durante el muestreo de 27-28 de octubre del 94, en el que se tomaron muestras cada media hora, la frecuencia máxima (10%) de "parejas abriéndose", de células/ parejas recién divididas (20%) y de división total

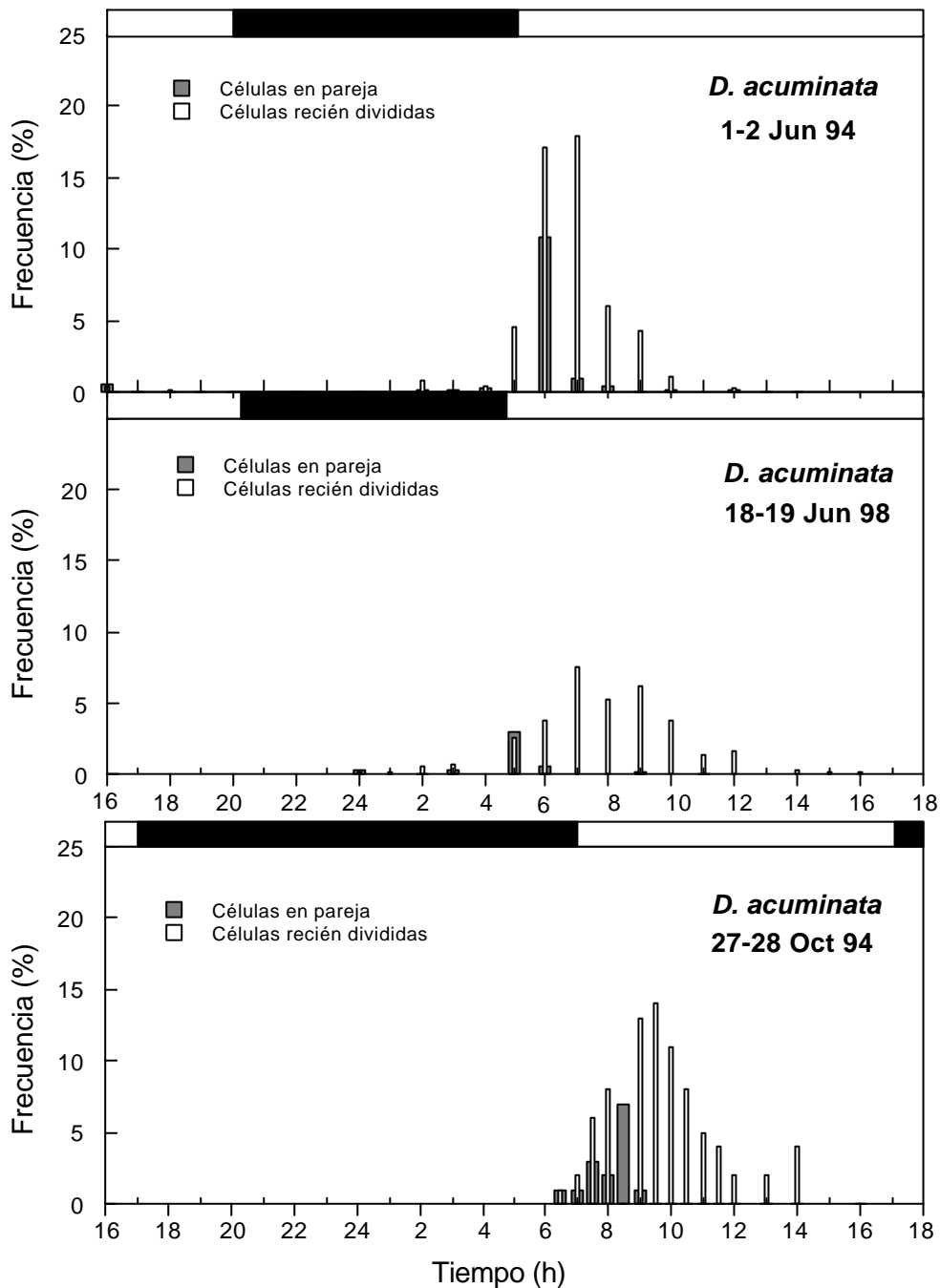


Fig. 6.11. Patrones de división de *D. acuminata* observados en los muestreos de 1-2 junio de 1994, 18-19 junio de 1998 y 27-28 octubre de 1994. Frecuencia de células en parejas y recién divididas. La barra horizontal de arriba indica los períodos de luz (barra vacía) y oscuridad (barra negra).

f_{c+r} (21%) se observaron a las 09:00, 10:30 y 10:30 respectivamente. El valor estimado de μf_{c+r} fue 25% más grande que el de μ_{min} . En el muestreo de 15-16 de octubre del 97, en el que se tomaron muestras cada hora, el máximo (28%) de f_{c+r} se observó a las 10:00, y el valor estimado de μ_{min} fue 0.25 d⁻¹. Durante el análisis de muestras se contabilizaron juntas las parejas abriéndose y las recién divididas, por lo que no fue posible estimar ni μ_{fc+r} ni la duración de T_c and T_r . La frecuencia máxima (21%)

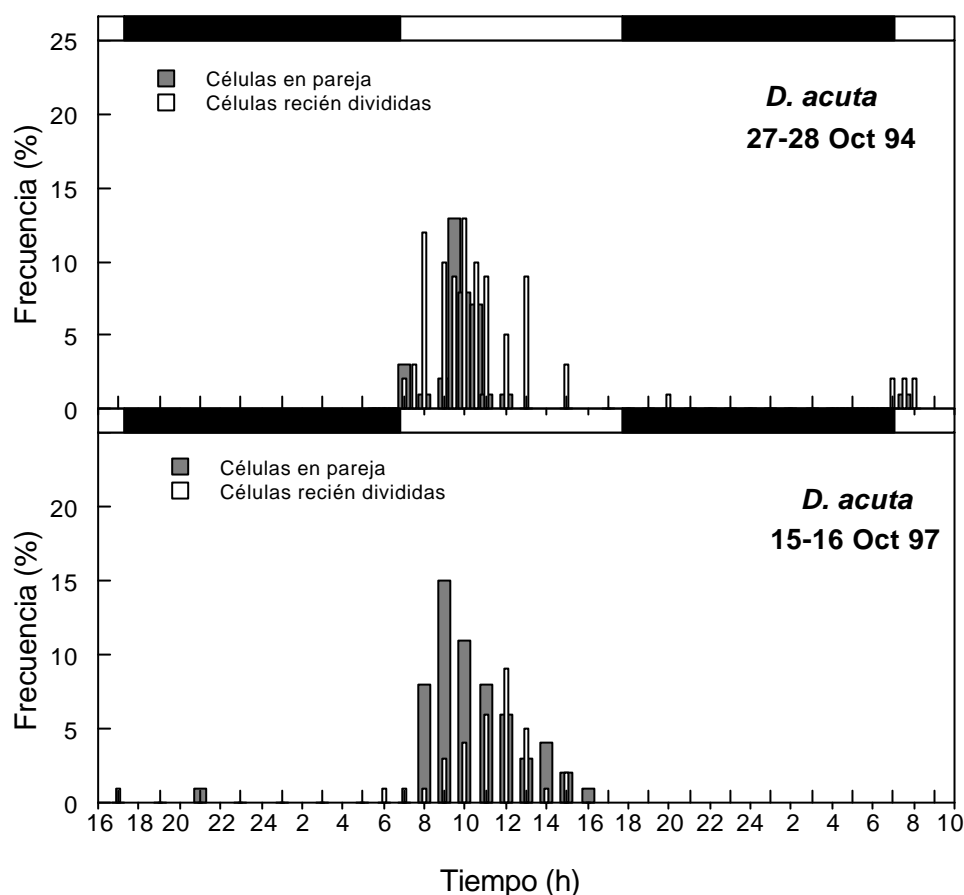


Fig. 6.12. Patrones de división de *D. acuta* observados en los muestreos de 27-28 octubre de 1994 y 15-16 octubre de 1997. Frecuencia de células en parejas y recién divididas. La barra horizontal de arriba indica los períodos de luz (barra vacía) y oscuridad (barra negra).

de f_{c+r} observada en octubre del 94 fue más baja que la de octubre del 97 (28%), pero ambos años presentaron un patrón temporal muy similar en la distribución de sus máximos.

Dinophysis tripos (Fig. 6.13). Debido a las bajas concentraciones en que suele aparecer esta especie, sólo se pudo estudiar su ciclo celular en octubre de 1994. La frecuencia máxima de "parejas abriéndose" (4%) y de células/parejas recién divididas (20%) observadas en los períodos 09:30-10:00 y 11:00-12:00 respectivamente, y la frecuencia máxima (20%) de división total (f_{c+r}) a las 11:00, pero se observaron valores elevados de frecuencia en un amplio margen de tiempo, entre las 09:30 y 12:00. El valor estimado de μ_{\min} fue prácticamente igual que el de μf_{c+r} .

DISCUSIÓN

Patrones de división nuclear en poblaciones naturales de Dinophysis

Al menos en el caso de *D. acuminata*, la enumeración de células binucleadas teñidas con DAPI constituye una labor engorrosa y que requiere mucho tiempo. Estas observaciones nos impulsaron a obviar la enumeración de células binucleadas en las

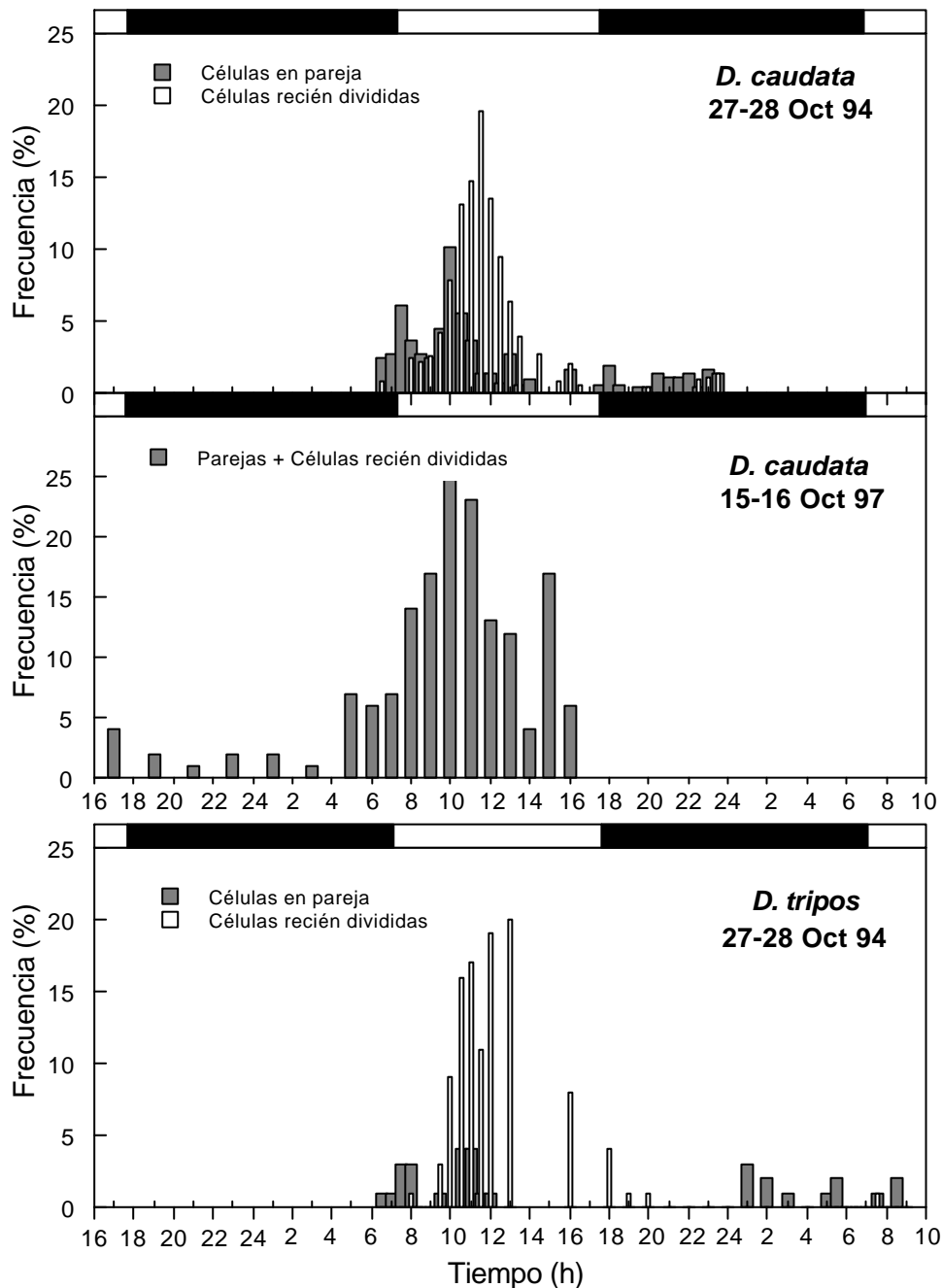


Fig. 6.13. Patrones de división de *D. caudata* y *D. tripos* en el muestreo de 27-28 de octubre de 1994, y de *D. caudata* en el de 15-16 octubre de 1997. Frecuencia de células en parejas y recién divididas. La barra horizontal de arriba indica los períodos de luz (barra vacía) y oscuridad (barra negra).

otras especies de *Dinophysis* bajo estudio, ya que todas ellas muestran una topografía similar durante la división vegetativa. Otra importante observación fue que la posición del núcleo era muy variable en las células con un sólo núcleo, variando entre posiciones cerca del antápice hasta casos en que el núcleo se encontraba cerca del área del poro flagelar y próximo al citostoma. La morfología del núcleo también fue muy variable, oscilando entre formas esféricas y trapezoidales. En algunos casos, cuando las células en división comenzaban a abrirse, los ejes de los dos núcleos no

eran paralelos sino formando un ángulo recto. En la Fig. 6.14 se ilustran algunas de estas observaciones.

En el único ciclo celular en que se contaron las células binucleadas (octubre de 1994), la distribución de frecuencias de esta fase se solapaba ligeramente con la de células en parejas. Se observó un máximo muy pronunciado entre las 06:00 y las 07:30, pero media hora más tarde la frecuencia había descendido hasta valores casi nulos.

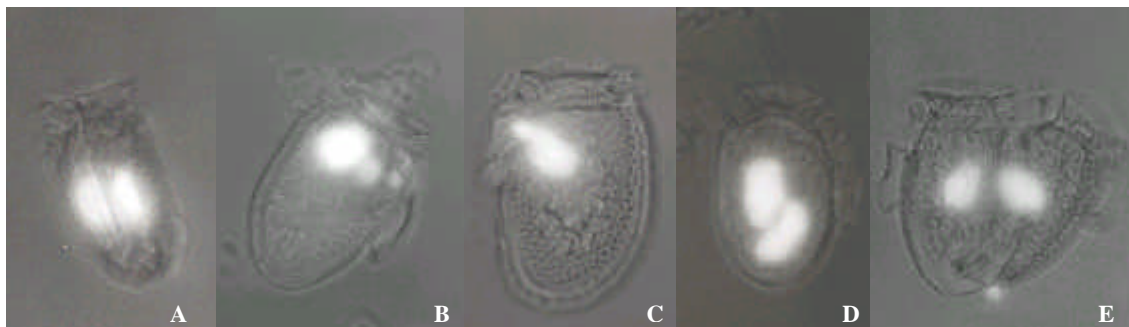


Fig. 6.14. A-D. Microfotografía (microscopía de epifluorescencia) de individuos de *D. acuminata* teñidos con DAPI. A. Vista dorsal de una célula binucleada. B-C. Células con un sólo núcleo en posición anterior. D. Célula binucleada distinta que las resultantes de división vegetativa, como la de la Fig. 14A. E. Pareja de células recién divididas.

Chang & Carpenter (1991) obtuvieron distintas estimaciones de μ aplicando el método de análisis del ciclo celular. En un caso combinaron las fases S (síntesis del ADN), G2 (contenido doble de ADN) y M (binucleadas) como eventos terminales; la frecuencia de las fases S y G2+M se determinaron mediante medidas microfluorimétricas de los núcleos teñidos con DAPI, la de células en fase M mediante conteo de células binucleadas, y las en fase G2 como la diferencia entre (G2+M) y M. Estos autores no mencionaron que encontraran ninguna dificultad en la observación de células binucleadas, pero citaron algunos valores esporádicos muy altos de f_M y asumieron que la determinación de frecuencia de células en esta fase debía incluir un elevado porcentaje de error. También afirmaron que la determinación de la frecuencia de células binucleadas durante la cuantificación del ADN no aumentaba la precisión de sus estimaciones de μ , ya que la fracción de células en fase M no mostraba un máximo claro. Por todo ello, basaron sus estimaciones en el seguimiento del contenido de ADN por célula a lo largo del ciclo celular. Los resultados de Chang & Carpenter (1991) mostraron que la fase S, en una población de *D. acuminata* con crecimiento activo ($\mu = 0.67 \text{ d}^{-1}$), era un proceso rápido (2 h) y discreto. Por el contrario Gisselson *et al.* (1999), al aplicar la misma técnica en poblaciones de otoño de *D. acuminata* del Gullmar Fjord (Skagerrak, Suecia), no observaron un patrón claro de división celular y encontraron porcentajes elevados (23-43%) cons-

tantes de células con doble contenido de ADN (células en fases G2+M) y escasa sincronía. Estos autores concluyeron que el método microfluorimétrico, aplicado a varios cientos de células, era inadecuado para detectar sincronizaciones bajas, sobre todo en lo que respecta a la fase S. Sin embargo Garcés *et al.* (1997) encontraron un máximo claro en la frecuencia de células en pareja (citocinesis) y de células recién divididas, pero no así de células binucleadas. Las observaciones de estos autores apoyan nuestra opinión sobre los inconvenientes de emplear la detección morfológica de células binucleadas y creemos que la principal fuente de problemas para estas mediciones es la topografía característica de la división nuclear en las especies de *Dinophysis*. Además, la presentación lateral de los dobles núcleos probablemente afecta a las mediciones por microfluorimetría y puede ser la fuente de los elevados coeficientes de variabilidad que se han observado al aplicar este método. Nuestros resultados mostraron un pico claro en la distribución de frecuencias de células binucleadas, pero ello requirió invertir un esfuerzo considerable en frecuencia de muestreo (cada 30 min) y en la observación "frontal" de las células.

Patrones de división celular en poblaciones naturales de *Dinophysis*.

Los resultados de cuatro muestreos intensivos del ciclo celular *in situ* aquí presentados, confirman que la división celular, en las cuatro especies de *Dinophysis* estudiadas, es en fase. Se determinó que las diferencias morfológicas -formación de parejas y desarrollo incompleto de la aleta sulcal izda.- observadas durante la citocinesis y en las células recién divididas respectivamente, constituían caracteres inequívocos y precisos de gran valor para ser empleados como marcadores de "eventos terminales" en las estimaciones de tasas de división *in situ* según el método de Carpenter & Chang (1988). Estos resultados concuerdan con observaciones previas de Reguera *et al.* (1996) en poblaciones de las mismas especies y de Garcés *et al.* (1997) en poblaciones de *D. sacculus*. La hora en la que se detectaron las frecuencias máximas de células en división total (dividiéndose + recién divididas) para cada especie era similar si el muestreo se había realizado en la misma época del año. En el caso de *D. acuminata*, especie de la que se dispone de datos de campañas desarrolladas a finales de primavera (junio) y principios de otoño (octubre), la hora de aparición del máximo era más tarde en otoño, coincidiendo con el desfase en la hora del amanecer. Esto apoya la opinión de que, al menos en esta especie, el proceso de división celular se dispara con la llegada de la luz. No obstante, los patrones de distribución de frecuencia de fases mostraron grandes diferencias entre campañas. En general, el tiempo de división era más corto y las distribuciones eran más puntiagudas en las poblaciones donde se observó una tasa de división más elevada. Así pues, las poblaciones más activas, posiblemente en fase de crecimiento exponencial, mostraban una mayor sincronía, en contraste con otras poblaciones estudiadas en fase exponencial tardía o al comienzo de su declive estacional (como

la población de *D. acuminata* de junio de 1998), en las que la sincronía era escasa y los tiempos de división eran más largos, lo que daba lugar a distribuciones de frecuencia de fases amplias y muy achatadas.

En *D. acuminata*, las frecuencias máximas de células dividiéndose (parejas) observadas eran normalmente mucho más bajas que las frecuencias de células recién divididas. Esto sugiere que la apertura y separación de las dos células hijas es una fase muy rápida, sospecha que se confirma con la proximidad de los máximos de frecuencia de esta fase y la de regeneración de las aletas sulcales. Pero otra posible interpretación es que la unión de las dos células hijas, a través del puente megacítico dorsal, es muy lábil y puede romperse fácilmente por efecto de la manipulación de la muestra -especialmente en el caso de los arrastres de red- o por el uso de fijadores fuertes como el formol. En cualquier caso, parece esencial añadir el 50% del número de células recién divididas al de las células en parejas si se quiere obtener una estimación precisa de la frecuencia total de células que han sufrido mitosis. De esta forma, las parejas separadas accidentalmente, o que no se hubieran detectado por no haberse aplicado una frecuencia de muestreo apropiada, aparecerían registradas en contaje de células recién divididas. El estrecho margen de tiempo en el que se desarrollan ciertas fases del ciclo celular en las especies de *Dinophysis* ya ha sido señalado por Chang & Carpenter (1991), quienes estimaron que la duración de la fase S (síntesis de ADN) en poblaciones naturales de *D. acuminata* en Long Island Sound era de 2 h. Estos autores también estimaron la frecuencia de células binucleadas, y concluyeron que la división nuclear en esta especie era un proceso extremadamente rápido cuya observación requería un diseño de muestreo distinto del normalmente utilizado en los estudios de división *in situ* (con una frecuencia de muestreo de 2 h). Por el contrario, los resultados de este estudio muestran que la fase de células recién divididas, es decir, de células en la etapa de regeneración de sus aletas sulcales, es mucho más larga que la de división celular (células en parejas). Por tanto, las células con desarrollo incompleto de la ASI constituyen un marcador mucho más fiable y deberían incluirse siempre en las ecuaciones para estimación de tasas potenciales de división de *Dinophysis*. Sería apropiada una frecuencia de muestreo de 1 h -y no la frecuencia habitual de 2 h- siempre y cuando se incluyan las dos fases (citocinesis y regeneración de las aletas sulcales) en los análisis del ciclo celular. Incluso si se aplicaran en el futuro técnicas más sofisticadas, basadas en marcadores bioquímicos, para el estudio del ciclo celular de *Dinophysis*, las observaciones de células dividiéndose/células recién divididas deberían emplearse siempre a modo de control.

En el caso de *D. acuta*, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de células en parejas y células recién divididas. El valor similar de los máximos de ambas frecuencias puede dar lugar a dos interpretaciones: una de ellas

sería que en *D. acuta* la duración de la apertura y separación de las dos células hijas es un episodio de mayor duración que en *D. acuminata*; otra posible explicación sería que la conexión de las dos células hijas a través del puente megacítico es más fuerte en esta especie.

También se encontraron importantes diferencias en la hora de aparición de las frecuencias máximas de los distintos estadios del ciclo celular, tal como ya había sido observado en estudios previos de Weiler & Chisholm (1976). Estos autores sugirieron que la segregación temporal de los máximos de división de distintas especies podría representar una estrategia reproductiva para mitigar la presión del pasado por el zooplancton y de la competencia interespecífica. Resulta sorprendente que Weiler & Chisholm (1976), que observaron el máximo de frecuencia de células dividiéndose de *D. fortii* a las 09.30, escribieran que habían estimado la f_{max} a partir de la frecuencia de células binucleadas porque resultaba difícil reconocer diferencias morfológicas en las células recién divididas.

Estimaciones de μ_{min} y μf_{c+r} . Comparación de resultados.

En la Tabla 1 se muestran los valores estimados de μ obtenidos por el método de la frecuencia máxima (μ_{min}) y por el modelo de Carpenter & Chang (1988) (μf_{c+r}). Los valores estimados de μ_{min} fueron similares a los de μf_{c+r} tan sólo en el caso de los ciclos de *D. acuminata* de las campañas de primavera de 1998, y en el de los ciclos de *D. caudata* y *D. tripos* de octubre de 1994. En estos tres casos, la duración de la fase de regeneración de las aletas sulcales (T_r) fue bastante larga (5.4, 2.7 y 5.3 h respectivamente) y posiblemente permitió el reconocimiento de todas las células que habían sufrido mitosis en una misma muestra. En los otros casos se observaron diferencias considerables en los valores de μ estimados según las dos aproximaciones, especialmente durante el ciclo de *D. acuta* de octubre de 1994. Así pues, cuanto más corta es la duración de las fases, más imprecisa resulta la utilización de la f_{max} sobre la base del reconocimiento de células en parejas y células recién divididas. Pero los resultados no habrían sido tan distintos en el caso de *D. acuminata* de octubre de 1994 si se hubiera añadido la frecuencia de células binucleadas a la suma de frecuencias de células en parejas y células recién divididas. En esta ocasión, la suma de frecuencias de células binucleadas más la de células en parejas y células recién divididas a las 06.30 fue 0.24, lo que habría dado un valor de μ_{min} de 0.22, bastante próximo al valor estimado de μf_{c+r} (0.26).

La aplicación del índice «post-mitótico» aquí presentado nos permitió hacer estimaciones de μ bajo distintas condiciones ambientales/características intrínsecas de distintas poblaciones de *Dinophysis*. Los resultados muestran que las elevadas densidades celulares no son siempre el resultado de buenas tasas de división, tal como se pudo comprobar durante las proliferaciones de *D. acuminata* de junio de

1998. Por el contrario, poblaciones presentes en bajas densidades ($200 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$), como el caso de *D. acuta* en octubre de 1994, podían mostrar tasas elevadas de división celular ($\mu=0.65$) sin alcanzar nunca densidades elevadas. Otros términos, tales como el tamaño de la población inóculo, pueden ser los determinantes en los estudios de dinámica de poblaciones de *Dinophysis*, para predecir las densidades celulares que se pueden alcanzar.

En general, las tasas de división estimadas reflejaron con bastante fidelidad las tendencias de expansión o declive de las poblaciones de *Dinophysis*. Pero hay que ser cautos en la interpretación de situaciones como la de *D. acuminata* de 1994, mostrando una tasa de división de 0.26 justo antes del declive anual de la población. Tras las primeras 24 h de muestreo, las células empezaron a mostrar un aspecto poco saludable y las frecuencias de división observadas durante el segundo día fueron mucho más bajas. Estos resultados sugieren que el valor relativamente alto de μ obtenido (0.30) no representaría la respuesta inmediata de la población a las condiciones ambientales coincidentes con el muestreo, sino que más bien reflejaría la historia de los días previos. Por ello, un valor único de μ no siempre será representativo de la situación de la población, y sería necesario un mínimo de dos valores consecutivos para poder predecir tendencias futuras, especialmente durante condiciones hidrodinámicas transitorias.

Comentarios sobre el uso del contenido de ADN por célula para las estimaciones de tasas de división de *Dinophysis* spp.

La tinción del ADN con DAPI, ya sea para medir frecuencia de células en fase de división nuclear al microscopio de epifluorescencia, o para cuantificar el contenido de ADN por célula mediante citometría de flujo o mediante un microfotómetro acoplado al microscopio de epifluorescencia, puede dar resultados engañosos en los estudios de tasas de división celular. Se sabe muy poco sobre procesos sexuales en especies de *Dinophysis* (Reguera & González-Gil, 2001), y no existe ninguna información sobre comportamiento nuclear de *Dinophysis* durante la reproducción vegetativa o la sexual. Si se mide tan sólo la fluorescencia del ADN teñido por microfotometría o por citometría de flujo, puede ser extremadamente difícil discriminar si las células con un contenido doble de ADN (2qADN) son el resultado de una fisión binaria vegetativa, o si por el contrario existe una considerable proporción de células binucleadas correspondientes a planozigotos que habrían resultado de la fusión de gametos. Este problema ha sido examinado y discutido durante estudios del ciclo celular en cultivos de *Gonyaulax* (= *Lingulodinium*) *polyedra* y *Gymnodinium uncatenum* (Cetta & Anderson, 1990). Tras este estudio, los autores concluyeron que la discriminación sería posible tan sólo si la síntesis de ADN (células en fase S) tenía lugar durante un período discreto de tiempo, y si se observaba una marcada división en fase tras la fase G2. Coats *et al.* (1984) concluyeron que si la síntesis del ADN tenía

lugar inmediatamente después de la mitosis -es decir, si la fase G1 era prácticamente inexistente- y si además la división celular presentaba poca sincronía, sería necesario complementar el análisis de muestras con observaciones morfológicas, o con tinciones adicionales específicas para estudios de ciclo sexual. La existencia de una proporción importante de células con un contenido 2q de ADN resultante de fusión nuclear, y no de cariocinesis, sería un escenario posible en etapas tardías de la población de *Dinophysis* en las que se ha observado un importante porcentaje de células pequeñas y de pares aparentemente conjugados de célula grande y célula pequeña, tal como la situación descrita por MacKenzie (1992) durante una proliferación excepcional de *Dinophysis* en Big Glory Bay (Nueva Zelanda). La fusión celular ha sido descrita en incubaciones de laboratorio de *D. pavillardii* (Giacobbe & Gangemi, 1997) y de *D. fortii* (Ushida *et al.*, 1999) tras la formación de pares conjugados; el hipotético planozigoto resultante tenía dos núcleos separados perfectamente distinguibles. Es posible que las células binucleadas fácilmente reconocibles de *D. fortii* descritas por Weiler & Chisholm (1976), y la baja frecuencia de células binucleadas sin sincronía observadas en poblaciones de *D. sacculus* (Garcés *et al.*, 1997) fueran planozigotos binucleados de estas especies.

Teniendo en cuenta que las observaciones de células en parejas (unidas por el margen dorsal) y de células recién divididas (con desarrollo incompleto de las aletas sulcales) son pruebas inequívocas de que las células de *Dinophysis* sufrieron división vegetativa, es decir, si las fácilmente reconocibles células recién divididas son los indicadores clave del comienzo de la fase G1, podemos confirmar que las especies de *Dinophysis* incluidas en nuestro estudio se dividían en fase. Lo mismo se puede afirmar sobre las poblaciones de *D. sacculus* según los resultados de Garcés *et al.* (1997) y sobre las poblaciones de *D. acuminata* estudiadas por Chang & Carpenter (1991). Los resultados de estos últimos también mostraron que en condiciones de división activa *D. acuminata* presenta un ciclo de vida haplonte. Pero en nuestro estudio, el grado de sincronía observado fue muy variable según la fase del crecimiento poblacional en que se encontrara la especie estudiada y sus interacciones con la hidrodinámica local.

Los resultados de Chang & Carpenter (1991), Garcés *et al.* (1997) y los presentados en este estudio sugieren que las poblaciones de *Dinophysis* se dividen en fase cuando están saludables y con buenas tasas de división, presumiblemente durante la fase exponencial de crecimiento. Pero la misma población puede presentar poca sincronización en las etapas finales de su desarrollo, o cuando el incremento repentino de células resulta de la acumulación -forzada por procesos físicos que constituyen a menudo episodios transitorios estresantes para las células- más que de la división celular activa. Irónicamente, las exiguas poblaciones de especies de *Dinophysis* se encuentran posiblemente en su mejor momento (en términos de tasas de división)

cuando son más difíciles de muestrear, es decir, cuando se encuentran a bajas concentraciones mezcladas con densas comunidades fitoplanctónicas, o agregadas en capas finas en aguas estratificadas. Pero los estudios *in situ* del ciclo celular son motivados a menudo por los repentinos incrementos de concentración celular -frecuentemente asociados con advección de poblaciones de la plataforma al interior de rías, fiordos y estuarios- ya que la aplicación de las técnicas al uso requiere el análisis de un considerable número de células por muestra.

En el caso de especies de *Dinophysis*, los planozigotos que resultan de la fusión celular son morfológicamente indistinguibles de las células vegetativas normales en tamaño y forma (Ushida *et al.*, 1999), excepto por el detalle de que llevan dos flagelos longitudinales. Pero estos dos flagelos sólo se pueden observar en material vivo y con contraste de fases, ya que se desprenden fácilmente con los fijadores habituales. La otra posibilidad sería examinar la morfología nuclear, pero tal como se mencionó antes, el fuerte aplastamiento dorso-ventral de las células de *Dinophysis* dificulta sobremanera esta tarea. Se podría esperar una situación similar si tuvieran lugar otros procesos asexuales -tales como poliploidía, amitosis, etc.- como los observados por Silva & Faust (1995) en cultivos de dinoflageladas. Estos procesos asexuales darían lugar a un incremento del contenido de ADN por célula no relacionado con procesos de división.

Otra fuente de error habitual durante las mediciones de tasas de división, es el asumir que la mitosis es un proceso irreversible, es decir, que una vez que las células entran en la fase S (síntesis del ADN), continuará la mitosis hasta que resulten dos células hijas de cada célula dividiéndose. Pero puede que este no sea el caso en células bajo condiciones de estrés que podrían afectar de distinta forma a las distintas fases del ciclo celular. Estudios previos revelaron que la turbulencia inhibía la división celular en cultivos de dinoflageladas (Berdalet, 1992; Berdalet & Estrada, 1993), pero la división del ADN continuaba, llegando a detectarse células con un contenido 10q de ADN. Una vez que las células eran expuestas a condiciones normales, la división celular procedía con rapidez hasta alcanzarse un contenido normal de ADN por célula. Así pues, puede que efectivamente la mitosis sea un proceso de no retorno, pero parece que el estrés puede hacer que se detenga en ciertas fases del ciclo celular que son más sensibles que otras a las perturbaciones del medio. Este fenómeno explicaría las observaciones de Gisselson *et al.* (1999) cuando aplicaron el método de Carpenter & Chang (1988) a poblaciones naturales de *D. acuminata*, tras un brusco descenso otoñal de la insolación, y encontraron un constante porcentaje elevado (23-43%) de células con doble contenido de ADN y falta de sincronía. Nuestra interpretación de los resultados de Gisselson *et al.* (1999) es que estos autores estaban tratando con poblaciones estresadas (debido a cambios en las condiciones meteorológicas, y a que se encontraban en una avanzada época del año para las dinámi-

cas aguas del Gullmarfjord), con tasas de división muy bajas y posiblemente con una acumulación de células 2qADN. Carpenter *et al.* (1995) describieron otro caso de una población natural de *Dinophysis* asincrónica. Se trataba de una población de *D. norvegica* agregada en la termoclina a baja intensidad luminosa en el Báltico. Estos autores sugirieron que la falta de sincronía podría deberse al comportamiento mixótrofo de esta especie en la oscuridad. Hay evidencias de comportamiento mixótrofo en *D. norvegica* (Jacobson & Andersen, 1994), pero si este hubiera sido el caso en las poblaciones del Báltico, las células deberían haber presentado un aspecto hinchado y cargadas de vacuolas. Una explicación alternativa es que las células se encontraban en un estado quiescente, sin división activa, correspondiente a poblaciones residuales al final de la estación de crecimiento.

En resumen, consideramos que el método de índice postmitótico aplicado en este trabajo es una forma sencilla y fiable de estimar tasas de división *in situ* de poblaciones poco densas de dinoflageladas, siempre y cuando las células en fase de división y recién divididas sean fáciles de distinguir morfológicamente. Las estimaciones sobre la base del contenido de ADN por célula, cuantificado por microfotometría, requieren un mejor conocimiento del comportamiento nuclear durante distintos procesos no-mitóticos o sexuales, y además requieren un tiempo de observación microscópica superior al necesario para el simple reconocimiento y enumeración de cambios morfológicos del contorno celular y las aletas sulcales. Entre las mejoras tecnológicas futuras se podría incluir la automatización de la identificación y contaje de estas diferencias morfológicas mediante un programa de análisis de imagen diseñado para este objetivo. Los análisis mediante citometría de flujo del contenido de ADN por célula en poblaciones naturales de *Dinophysis* tan sólo serán posibles bajo circunstancias excepcionales de abundancia de estas especies, sacando ventaja de la señal pigmentaria -presencia de ficoeritrinas y ficocianinas- exclusiva de este género entre las dinoflageladas. Pero incluso en estas circunstancias, sería aún difícil poder aplicar citometría de flujo si coinciden varias especies de *Dinophysis* con tamaño y forma similares.

CAPÍTULO 7

DISTRIBUCIÓN DE ÁCIDO OKADAICO EN LAS CUERDAS DE BATEAS DE MEJILLÓN EN LA RIA DE PONTEVEDRA: RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN CELULAR DE *DINOPHYSIS* Y SU CONTENIDO DE TOXINAS.

- Reguera, B.,** Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A. & Martínez, A. (1993b). Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). In: Smayda T.J., and Shimizu Y. (Eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 553-558. (REVI SADO)
- Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., **Reguera, B.,** Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. & Martínez, A. (1995). From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: *Harmful Marine Algal Blooms*. Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P. and Marcaillou-Le Baut C. (eds.). Lavoisier, París, pp. 777-782. (REVI SADO)

DISTRIBUCIÓN DE ÁCIDO OKADAICO EN LAS CUERDAS DE BATEAS DE MEJILLÓN EN LA RÍA DE PONTEVEDRA: RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN CELULAR DE *DINOPHYSIS* Y SU CONTENIDO DE TOXINAS.

RESUMEN

Entre junio de 1990 y enero de 1991 se tomaron muestras semanales de mejillón a tres profundidades (2, 7 y 15 m) de las cuerdas de una batea fija de la Ría de Pontevedra (Rías Bajas, Galicia) y arrastres de red de plancton (fracción de talla 20-100 μm) para análisis de contenido de ácido okadaico (AO) por cromatografía líquida (CLAE), así como muestras de agua para análisis de fitoplancton, clorofila a y nutrientes. Se tomaron también datos físicos y meteorológicos. El objetivo del estudio era describir la relación entre la distribución espacio-temporal del contenido de AO en los mejillones y la presencia de distintas concentraciones de varias especies de *Dinophysis*. Desde octubre de 1991, los análisis de toxinas en poblaciones planctónicas se hicieron a partir de filtraciones de muestras integradas de manguera (0-15 m). En 1990, la prohibición de extracción de bivalvos por detección de niveles de enterotoxinas superiores al nivel de regulación (determinado por bioensayo de ratón), duró desde el 9 de julio hasta el 17 de noviembre en algunas zonas de la Ría de Pontevedra. Los valores máximos de AO (10.8 $\mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) se registraron a 2 m de profundidad el 31 de julio, unos días después de que se observara un marcado pico de *Dinophysis cf. acuminata* (8320 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) a 0-5 m, con dominancia de diatomeas y valores medios (6-7 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) de clorofila a, y el 2 de octubre a 15 m (4.4 $\mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) coincidiendo con un máximo de *D. acuta* (13760 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) a 10-15 m, dominancia de dinoflagelados y valores bajos (1-2 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) de clor a. Las proliferaciones de *D. cf. acuminata* asociadas con los cierres de junio-julio representaron una mayor amenaza de intoxicación por AO, a pesar de tener lugar con densidades celulares inferiores, que las proliferaciones de *D. acuta*, asociadas con las toxicidades de finales de verano-otoño. Esto se explica por el hecho de que en este estudio sólo se investigó la presencia de AO en los bivalvos por creerse que era la única toxina lipofílica presente en los mejillones gallegos. La distribución vertical de AO en las cuerdas de batea, excepto en el caso de los dos máximos mencionados, fue bastante homogénea a pesar de la segregación vertical de las células de *Dinophysis acuta*, debido posiblemente a la migración vertical de éstas tal como ya ha sido descrita para otras especies del género en Galicia. La detoxificación de niveles bajos de AO (4 $\mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) requirió entre 2 y 3 semanas a partir de la observación de concentraciones muy bajas de *Dinophysis*, en condiciones de otoño. Por primera vez se cita la aparición, como toxina dominante a veces, de un segundo compuesto tóxico, presumiblemente *Dinofisistoxina-2* (DTX2), en los cromatogramas resultantes de análisis por CLAE de poblaciones planctónicas con elevado contenido de *Dinophysis spp.* Se discuten nuevas estrategias para el seguimiento de DST.

DISTRIBUTION OF OKADAIC ACID IN THE MUSSEL RAFT ROPES IN RÍA DE PONTEVEDRA: RELATION WITH CELLULAR CONCENTRATION AND TOXIN CONTENT OF *DINOPHYSIS* SPP.

SUMMARY

Between June 1990 and January 1991 weekly samples were collected of mussels from three depths (2, 7, 15m) at a fixed raft in Ría de Pontevedra (Galicia, Spain) and phytoplankton net-hauls (20-100 μm) for HPLC analysis of okadaic acid (OA), and water samples for phytoplankton, chlorophyll *a* and nutrient analyses. Physical and meteorological data were also recorded. The objective of the study was to describe the relation between the distribution of OA content in mussels and the presence of different concentrations of several species of *Dinophysis*. From October 1991 onwards, the analysis of toxins in phytoplankton populations was performed on filtered integrated water samples (0-15 m) collected with a hose. In 1990, marketing of mussels was banned, in some areas of Ría de Pontevedra, between 9 July and 17 November due to the presence of enterotoxins (detected by mouse bioassay) above regulatory levels. Maximum values of OA ($10.8 \mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1}$ of HP) were registered at 2 m on 31 July, a few days after the occurrence of a sharp peak of *Dinophysis* cf. *acuminata* ($8320 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) at 0-5 m, when diatoms predominated and chlor *a* values were moderate ($6-7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), and on 2 October at 15 m ($4.4 \mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1}$ of HP) when a maximum of *D. acuta* ($13760 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) was found at 10-15 m. Dinoflagellate populations were dominant then and chlor *a* values low ($1-2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). *D. cf acuminata* proliferations associated with June-July toxicity represented a higher risk of OA intoxication, at lower cell concentrations, than *D. acuta* proliferations, which were related to late summer and early autumn DST outbreaks. This can be partially explained by the fact that only OA was searched on shellfish in those days because this toxin was believed to be the only lipophylic toxin present in Galician mussels. Vertical distribution of OA on the mussel ropes, with the exception of the two maxima mentioned, was quite homogeneous despite the vertical segregation of *Dinophysis* cells, probably due to their vertical migration, as described for several species of this genus. Detoxification of low levels of OA ($4 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) took between 2 and 3 weeks after very low concentrations of *Dinophysis* spp were detected under autumn conditions. This work includes the first report for Galicia of the occurrence, sometimes as the dominant toxin component, of a second toxin, presumably *Dinophysistoxin-2* (DTX2), as revealed by the HPLC analysis of phytoplankton net-hauls. New strategies for the monitoring of DST are discussed.

INTRODUCCION

En las Rías Bajas Gallegas se dan episodios crónicos de detección de toxinas diarreogénicas (episodios DST) asociadas a la ocurrencia de proliferaciones de dinoflageladas del género *Dinophysis* (Reguera *et al.*, 1991,1993a; Blanco *et al.*, 1995, 1998). En 1981, en la costa Mediterránea española, tuvo lugar un brote de gastroenteritis por consumo de mejillón gallego que afectó a 5000 personas (Campos *et al.*, 1982). A partir de esta fecha se incorporó el análisis de toxinas diarreogénicas por bioensayo a los controles rutinarios de salubridad de los bivalvos. Los datos de 10 años del programa de seguimiento de episodios tóxicos y ficotoxinas (1981-1991) mostraron que los episodios DST tenían lugar sobre todo en agosto y septiembre, asociados a concentraciones superiores a $10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de *D. acuminata*, y que *D. acuta* presentaba sus máximos anuales a finales de verano-principios de otoño. Sin embargo, desde 1991 hasta la fecha, ha habido años en los que se ha detectado presencia de enterotoxinas en los bivalvos a lo largo de casi todo el año. El año récord fue 1994, cuando se registraron prohibiciones de extracción de mejillones que duraron hasta 48 semanas en algunas áreas de la Ría de Pontevedra (Arévalo *et al.*, 1995). Esta intensificación aparente de los episodios de DST pudiera estar relacionada con la intensificación del programa de seguimiento de biotoxinas en los bivalvos y la aplicación más estricta de las directivas europeas llevada a cabo por la Xunta de Galicia. De lo que no cabe duda es que en los últimos años, los episodios de DST se han convertido en la principal amenaza para las explotaciones de bivalvos en la región.

Se ha mencionado con frecuencia la mala relación que se observa entre la concentración de toxinas diarreogénicas en los bivalvos y las concentraciones de *Dinophysis* en la misma localidad. Esto puede deberse en parte a que las concentraciones de *Dinophysis* pueden subestimarse cuando se realizan muestreos superficiales (entre 0 y 5 m) que ignoran posibles agregaciones de estas dinoflageladas en zonas próximas a la picnoclina subsuperficial. Entre junio de 1990 y enero de 1991 se llevó a cabo un trabajo de campo, en el que se visitó una estación fija («Catedral II») en una batea de mejillones situada en la Ensenada de Bueu de la Ría de Pontevedra, una de las zonas de las Rías Bajas más castigadas por los episodios DST. De acuerdo con estudios previos (Lee *et al.*, 1989; Kumagai *et al.*, 1986; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1989) que manifestaron que el AO era la única toxina liposoluble presente en los mejillones durante los brotes de DST en las rías gallegas, los análisis se centraron en este compuesto.

Los objetivos inmediatos del estudio fueron:

- Determinar los niveles de AO y su distribución vertical en las cuerdas de mejillón de batea, de aproximadamente 15 m de largo;

- Relacionar la distribución de contenido de toxinas en los mejillones de las cuerdas con la distribución de *Dinophysis* spp. y parámetros ambientales;
- Conocer el tiempo de detoxificación de los mejillones *in situ*.
- Estimar el contenido de toxinas (pg DST·cel⁻¹) de los concentrados de poblaciones fitoplanctónicas ricas en *Dinophysis* spp.

El objetivo a más largo plazo era adquirir capacidad de predicción y modelar los episodios de intoxicación y detoxificación de los bivalvos al filtrar distintas especies tóxicas bajo distintas condiciones ambientales. Para ello es esencial identificar las especies tóxicas, conocer su perfil de toxinas y el rango de variación de su contenido en toxinas. Estos objetivos son difíciles de alcanzar al no disponerse de cultivos de las especies potencialmente tóxicas de *Dinophysis*, por lo que los estudios se basaron en observaciones de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los datos que se presentan corresponden a un trabajo realizado en tres etapas. La primera etapa, de la que se adjuntan datos ambientales y de toxicidad en el fitoplancton y los mejillones, se desarrolló entre junio y diciembre de 1990 en cooperación con expertos en análisis químico de toxinas del centro de Nantes del I FREMER (Reguera *et al.*, 1993a). En la segunda etapa, entre enero y agosto de 1991, continuaron los muestreos de fitoplancton mediante arrastres de red, y los análisis de toxinas se hicieron en cooperación con el Laboratorio Comunitario de Referencia en Biotoxinas Marinas (Sanidad Exterior, Vigo). De la tercera etapa, octubre de 1991 a diciembre de 1993, se presentan tan sólo resultados globales de contenido de toxinas en los concentrados de muestras integradas de fitoplancton, tomadas de forma oportunista durante los muestreos rutinarios del programa de seguimiento de la Xunta de Galicia. Todos los análisis cromatográficos de toxinas en mejillón fueron realizados por los expertos franceses del I FREMER, y todos los análisis de toxinas en poblaciones planctónicas fueron realizados en el laboratorio de Sanidad Exterior de Vigo.

Muestras de agua y fitoplancton.

En la primera parte del trabajo, de junio de 1990 a julio de 1991, se tomaron muestras semanales de agua (integradas y a profundidades fijas), arrastres de red de fitoplancton y mejillones en una estación fija en la Ensenada de Bueu (Ría de Pontevedra). Las muestras integradas de la columna de agua (0-5, 5-10, 10-15 m) se tomaron mediante manguera con tramos acoplados (Lindahl, 1986). Una vez desmontados los tres tramos y vaciados en distintos recipientes, se tomaba una alícuota de 100 ml que se fijaba inmediatamente con lugol ácido, para posterior identificación y

contaje de fitoplancton; se tomaba otra alícuota para análisis de clor *a*. Las muestras a profundidades fijas (0, 5, 10 y 15 m) se tomaron con botellas Niskin; para los análisis de nutrientes, se introducía agua de las muestras de manguera en pequeños tubos después de 3 aclarados consecutivos, y se congelaba inmediatamente hasta el momento de análisis.

Las muestras de fitoplancton para análisis de toxinas se recogían, con el barco en marcha a baja velocidad, mediante arrastres oblicuos con una red troncocónica compuesta: la red interna, de 100 μm de apertura de malla y sin colector, tenía superpuesta otra red de 20 μm de apertura de malla dotada de un colector cilíndrico ciego de PVC, con fondo desenroscable, de aproximadamente 1 l de volumen. Este diseño de red permitía seleccionar la fracción de fitoplancton cuya talla oscilaba entre 20 y 100 μm , que es el rango de tallas en el que se encuentran las especies de *Dinophysis* objeto de estudio, a partir de grandes volúmenes de agua. Además, el colector ciego permitía mantener el arrastre suspendido en agua de mar, con lo que disminuía sobremanera la fricción a que se veían sometidas las células cuando se concentraban sobre un colector con fondo de malla. Una vez vertido el arrastre del colector con fondo desmontable en una jarra, se tomaba una alícuota y se fijaba con lugol ácido, para posterior identificación y contaje de células potencialmente tóxicas. Se medía en una probeta el volumen del resto del arrastre antes de ser filtrado. El volumen determinado de arrastre se filtraba con bomba «Millipore» a baja presión de succión (5-10 in Hg), a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 1.2 μm , previamente tratados en una estufa a 400 °C durante 6 h para eliminar materia orgánica que pudiera interferir en los análisis. Los filtros con el material retenido se guardaban en placas de Petri, debidamente etiquetadas, se congelaban inmediatamente a bordo y se mantenían después en el laboratorio a -30 °C hasta el momento del análisis. Si bien en los primeros muestreos se transportaban los arrastres y se filtraban en el laboratorio, se observó que muchas células de *Dinophysis* aparecían dañadas o incluso abiertas, por lo que se decidió en lo sucesivo hacer los filtrados a bordo inmediatamente después de efectuado el arrastre.

Tras el contaje de células potencialmente tóxicas (*Dinophysis* spp.) por unidad de volumen del arrastre (estimado a a partir de la alícuota fijada con lugol), se estimaba el número total de células de las distintas especies de *Dinophysis* contenidas en el volumen total de arrastre filtrado.

En la segunda parte del trabajo, desde octubre de 1991 hasta finales de 1993, se realizaron muestreos oportunistas de fitoplancton en coordinación con los muestreos rutinarios del programa de seguimiento de la Xunta de Galicia. Se sustituyeron los arrastres de red de fitoplancton compuesta por muestras integradas de la columna de agua (0-15 m), que se filtraban a través de filtros de fibra de vidrio para posterior análisis de toxinas en el material planctónico retenido. Al igual que en los

muestreos previos, se tomaba una alícuota de cada muestra integrada de manguera y se fijaba con lugol, para posterior identificación y contaje de células potencialmente tóxicas. Se medía el volumen del resto de agua de la muestra de manguera y se filtraba, etiquetaba y conservaba de igual manera que en el caso de las muestras de arrastre.

Muestreos de mejillón.

Para los análisis de toxinas en los bivalvos se tomaron, mediante escafandra autónoma, muestras semanales de mejillón (entre 3 y 5 kg) a 2, 7 y 15 m de profundidad. De cada muestra de mejillones se tomaba una submuestra de 10 individuos al azar, de los que se medía el peso de:

- a) los mejillones completos escurridos (tras separar las valvas con un cuchillo a la altura del músculo aductor);
- b) la vianda o carne del mejillón sin concha;
- c) las glándulas digestivas o hepatopáncreas (HP)

y se calculó el cociente «peso vianda/peso escurrido» que se utilizó como un «índice de condición». Las glándulas digestivas, pesadas y etiquetadas, se congelaban inmediatamente a -30 °C hasta el momento de análisis.

Extracción y análisis cromatográfico de toxinas liposolubles en los bivalvos y en las poblaciones fitoplanctónicas.

Las toxinas de los arrastres de fitoplancton o de las muestras integradas retenidas en los filtros de fibra de vidrio se extrajeron con metanol al 80% mediante sonicación (15 min, dos veces) de los filtros. El tratamiento del extracto de los arrastres y de los hepatopáncreas de mejillón, y su posterior análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) se hicieron, excepto pequeñas modificaciones, de acuerdo con el método de Lee *et al.* (1987). La derivatización se hizo con reactivo ADAM (SERVA), utilizándose ácido okadaico (AO) (Boehringer) como estándar. El sistema empleado constaba de un cromatógrafo líquido de alta eficacia HEWLETT-PACKARD 1050, con una columna Merck Superspher 100-RP18 de 4 µm (250 x 4 mm). Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron: fase móvil: elución isocrática con CN:H₂O (80:20, flujo 1.1 ml min⁻¹); temperatura de la columna: 35 °C; detector de fluorescencia HEWLETT PACKARD 1046A, con longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 412 nm respectivamente.

En los análisis de toxinas de los bivalvos tan sólo se exploró la presencia de AO. En los análisis posteriores de toxinas en los concentrados de fitoplancton se exploró también la presencia de dinofisistoxina 2 (DTX2). No habiendo patrones de DTX2 disponibles en el mercado, la estimación de contenido de esta toxina en las muestras

de plancton se hizo sobre la base de la comparación de los cromatogramas con los obtenidos, en las mismas condiciones, de muestras de hepatopáncreas de mejillón irlandés, cuyo contenido de DTX2 había sido probado mediante un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas (CL-EM).

Estimación del contenido de toxina por célula de *Dinophysis* a partir de los arrastres multiespecíficos.

Se estimó el número de células de *Dinophysis* contenidas en el filtro multiplicando el volumen de arrastre filtrado por la concentración de células de *Dinophysis* estimada en la alícuota fijada con lugol. Con este sistema se asumía que tan sólo las células de *Dinophysis* eran potenciales portadoras de enterotoxinas. Se ignoraba, pues, el posible contenido de enterotoxinas en otras dinoflageladas heterótrofas y organismos microzooplanctónicos comprendidos en el mismo rango de tallas y que podrían haber ingerido células de *Dinophysis*. Prácticamente a lo largo de todo el período de muestreo de arrastres (agosto 90-julio 91) la fracción de 20-100 μm de los arrastres fitoplanctónicos concentrada en los filtros contenía una mezcla de dos o más especies de *Dinophysis*, por lo que fue imposible dividir la concentración total de toxinas en el filtro entre el número de células filtradas de una especie concreta de *Dinophysis*. Lo mismo se ocurrió en el caso de las muestras integradas de manguera y filtradas en filtros Whatman a partir de 1992. Por ello, para la estimación del contenido de toxinas por célula de cada especie de *Dinophysis* se aplicaron varias aproximaciones:

- Estimación del contenido de toxina por cada célula del género *Dinophysis* (ignorando diferencias interespecíficas);
- División de la cantidad total de toxina entre el número de células de *Dinophysis* de la especie dominante (generalmente *D. acuminata* o *D. acuta*) si esta representaba más del 90% del total de células de *Dinophysis*;
- Estimación del contenido de AO por célula e cada especie de *Dinophysis*, mediante un análisis de regresión múltiple con retroalimentación, a partir de los datos obtenidos en cinco muestreos semanales consecutivos si se observaba la presencia continua de las mismas especies de *Dinophysis* a lo largo de las 5 semanas;
- Obtención de valores promedio (anuales) del contenido de toxina por célula de cada especie de *Dinophysis*, a partir de los resultados a lo largo del año, estimados mediante un análisis de regresión múltiple con retroeliminación.

Las regresiones parciales aplicadas a los resultados de 5 muestreos semanales consecutivos de fitoplancton permitieron estimar a *grosso modo* la variabilidad temporal intraespecífica del contenido de toxina por célula-especie de *Dinophysis*. El análisis de regresión múltiple con retroalimentación se aplicó con una probabilidad para la eliminación de los valores $p < 0.05$.

Tiempos de detoxificación de los mejillones.

Se estimó como «tiempo de detoxificación» de los mejillones *in situ* el tiempo transcurrido entre la detección de niveles bajos de *Dinophysis* spp y la no detección de AO en los análisis de mejillón por CLAE. No obstante, estos tiempos se deben interpretar con precaución, ya que no se disponía de información para determinar el umbral de células de *Dinophysis* por debajo del cual los mejillones no adquirirían niveles detectables de toxina.

RESULTADOS

Contenido de toxinas de los mejillones

En la Fig. 7.1A se muestran las concentraciones de ácido okadaico ($\mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) a 2 m, 7 m y 15 m en los mejillones de cuerdas de una batea de la Ría de Pontevedra entre junio y diciembre de 1990 y en la Fig. 7.1B la concentración promedio de AO en los mejillones de las tres profundidades muestreadas. Al comienzo del estudio, en junio de 1990, se detectaron niveles traza de AO en los mejillones de 7 y 15 m. Durante junio y hasta el 17 de julio, los niveles de AO se incrementaron ligeramente a 2 m y 7 m alcanzando valores de $3 \mu\text{g AO} \cdot \text{g HP}^{-1}$, y manteniéndose relativamente constantes a 15 m. Entre el 17 y el 31 de julio se observó un fuerte incremento en los mejillones de 2 m, que alcanzaron concentraciones de $10.8 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP, el valor máximo registrado en 1990. Durante agosto y septiembre, a excepción de un pequeño máximo registrado a 2 m ($4.4 \mu\text{g AO} \cdot \text{g HP}^{-1}$) el 13 de agosto, la distribución vertical de AO no mostró grandes diferencias. Los valores de agosto ($1.9\text{-}4.4 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}$ HP) fueron superiores a los de septiembre ($1.5\text{-}1.8 \mu\text{g AO} \cdot \text{g HP}^{-1}$) y se observó un ligero gradiente negativo de superficie hacia el fondo. El 2 de octubre, se registró un nuevo incremento de AO en los mejillones de 15 m ($4.7 \mu\text{g AO} \cdot \text{g HP}^{-1}$), y en menor grado en los de 2 y 7 m. Los niveles de AO descendieron de nuevo en octubre, haciéndose indetectables por CLAE a partir del 29 de octubre a 15 m, y del 5 de Noviembre a 2 y 7 m, hasta el final de este estudio. En la Fig. 7.1C se muestra la variación del índice de condición de los mejillones a 2, 7 y 15 m entre junio y diciembre de 1990.

Distribución vertical de las condiciones oceanográficas y de *Dinophysis* spp entre junio y diciembre de 1990.

La distribución vertical, entre junio y diciembre de 1990, de la temperatura, clor *a*, nitratos y concentraciones de *Dinophysis acuminata* y *D. acuta*, las dos especies de *Dinophysis* predominantes a lo largo del estudio, se muestran en la Fig. 7.2. Durante julio y agosto la columna de agua de 0-15 m presentó una estratificación térmica moderada, con ligeros ascensos y descensos de las isotermas, pero la distribución de nutrientes era prácticamente homogénea. La estratificación y las temperaturas superficiales alcanzaron los valores máximos a finales de julio. A principios de sep-

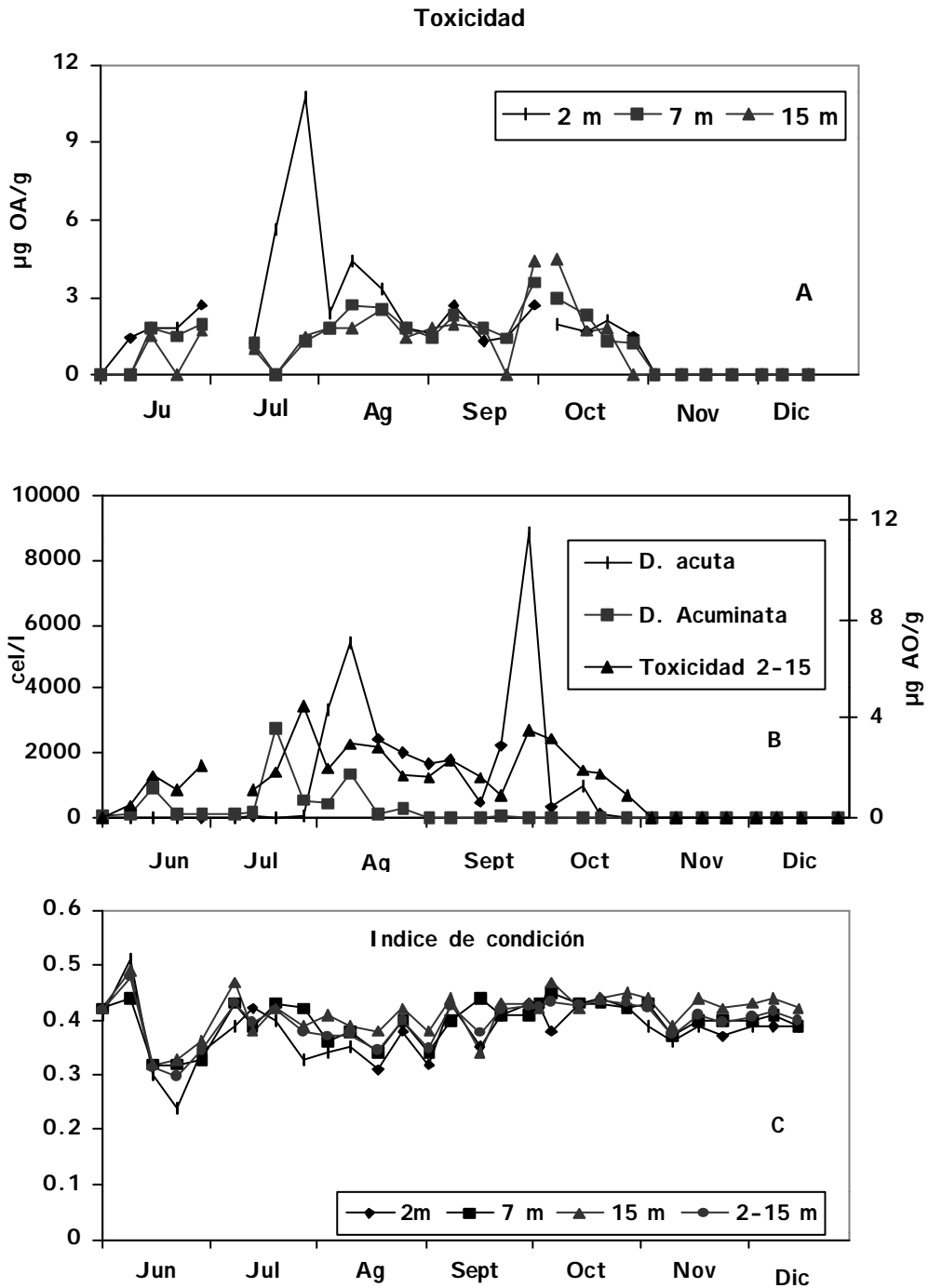


Figura 7.1. A. Concentraciones de ácido okadaico ($\mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1} \text{HP}$) a 2 m, 7 m y 15 m en los mejillones de cuerdas de una batea de la Ría de Pontevedra entre junio y diciembre de 1990. B. Concentración promedio de AO ($\mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1} \text{HP}$) en los mejillones de las tres profundidades muestreadas y concentración ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *D. acuminata* y *D. acuta* (promedio de tres muestras integradas a 0-5, 5-10, 10-15 m). C. Índices de condición en los mejillones de 2, 7 y 15 m.

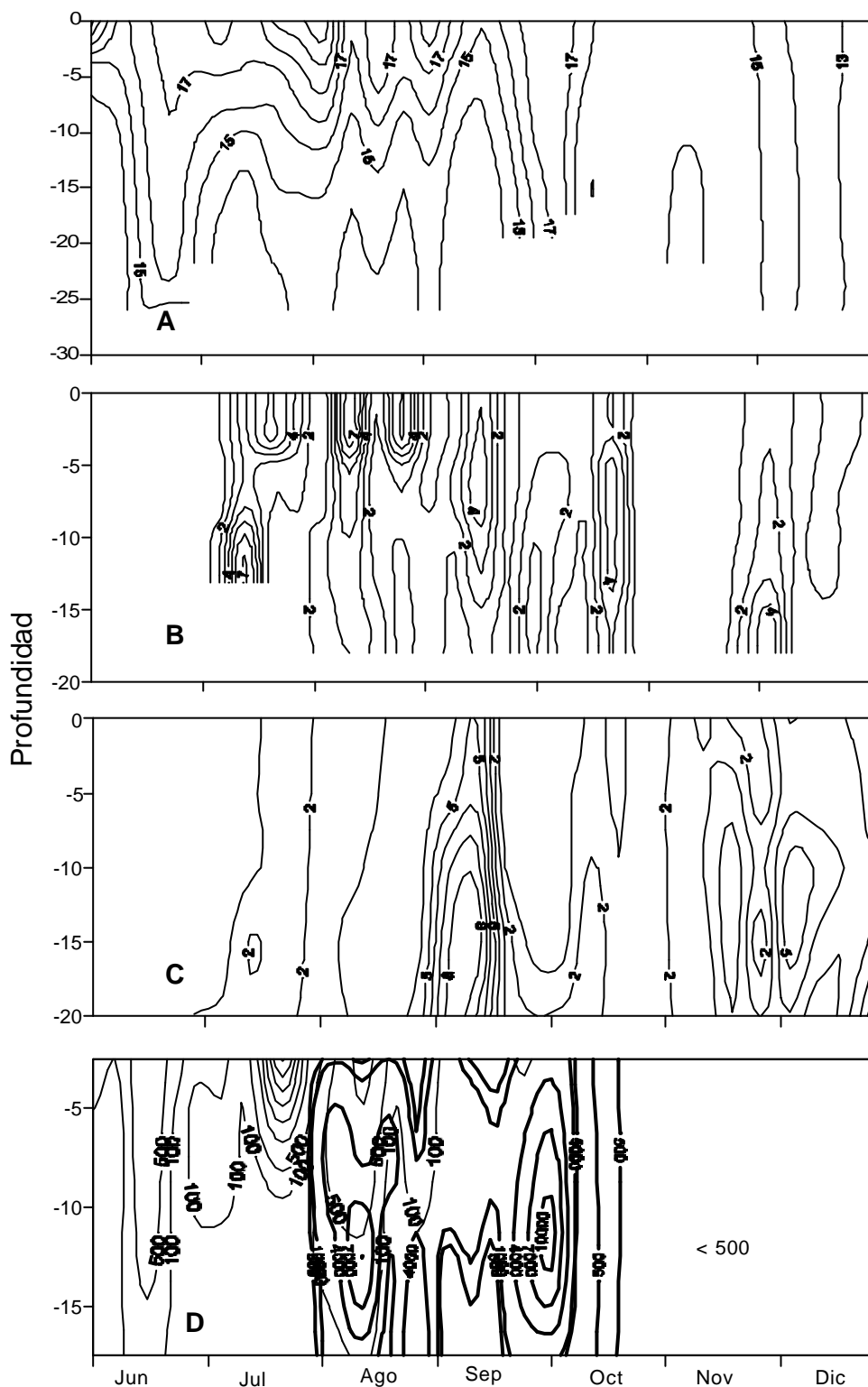


Figura 7.3. Distribución vertical de condiciones físicas y biológicas en la estación fija de Bueu (Ría de Pontevedra) entre junio y diciembre de 1990. A. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$). B. Concentración de clorofila *a* ($\mu\text{g chlor } a \cdot \text{l}^{-1}$). C. Nitratos ($\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$). D. Concentración ($\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de *D. acuminata* (línea fina) y *D. acuta* (línea gruesa).

Tabla 7.1A. Contenido de AO y DTX2 estimado por CLAE en los arrastres fitoplanctónicos realizados en 1990, relación AO:DTX2 y estimación de contenido de toxina por célula de *Dinophysis*. La zona sombreada superior marca el período de fuerte dominancia de *D. acuta* durante la proliferación de esta especie. La zona sombreada inferior marca los valores máximos anuales de contenido de toxina por célula

Fecha	<i>D. acuminata</i>	<i>D. acuta</i>	<i>D. caudata</i>	<i>D. retundata</i>	<i>Dinophysis</i> total	AO Total (ng)	DTX2 Total (ng)	AO:DTX2 Total	AO+DTX2 Total (ng)	Contenido de Toxina por célula (pg · cel ⁻¹)
13/08/90	7171	1022	2929	0	11122	21,5	0	21,5	1,9	
21/08/90	18512	564616	7832	1424	592384	21,9	19,2	1,1	41,1	0,1
28/08/90	75044	507934	5300	0	592788	971	599,5	1,6	1570,5	2,6
24/09/90	1086	556332	34040	9796	622566	80,4	41,2	2,0	121,6	0,2
2/10/90	0	26928	528	0	27456	65,9	43,1	1,5	109,0	4,0
8/10/90	900	618300	12600	2700	634500	704,3	523,2	1,3	1227,5	1,9
17/10/90	680	491640	11220	8500	512040	13,8	24,2	0,6	38,0	0,1
22/10/90	0	45425	7820	115	53475	19,3	13,3	1,5	32,6	0,6
29/10/90	0	31510	19320	1610	52670	24,2	12,5	1,9	36,7	0,7
5/11/90	85	6035	3995	6885	17000	78,2	50,3	1,6	128,5	7,6
12/11/90	113	1469	1356	791	3955	36,8	43,5	0,8	80,3	20,3
19/11/90	0	2990	520	130	3640	17,5	64,6	0,3	82,1	22,6
26/11/90	0	2800	700	2700	6200	73,8	69,5	1,1	143,3	23,1
4/12/90	0	558	124	0	682	11,5	24,9	0,5	36,4	53,4
10/12/90	67	670	536	536	1809	30,2	54,1	0,6	84,3	46,6
17/12/90	123	861	123	984	2091	0	21,9	0,0	21,9	10,5
27/12/90	0	770	0	308	1078	0	13,6	0,0	13,6	12,6

Tabla 7.1B. Contenido de AO y DTX2 estimado por CLAE en los arrastres fitoplanctónicos realizados en 1991, relación AO:DTX2 y estimación de contenido de toxina por célula de *Dinophysis*. Las tres zonas sombreadas de arriba indican resultados donde el contenido de células era muy escaso y quizás por debajo del umbral de detección del método. La zona sombreada inferior marca los arrastres que presentaron el máximo de contenido tóxico por célula.

Fecha	<i>D. acuminata</i>	<i>D. acuta</i>	<i>D. caudata</i>	<i>D. rotundata</i>	<i>Dinophysis</i> totales	AO Total (ng)	DTX2 Total (ng)	AO/DTX2	AO+DTX2 Total (ng)	Contenido de Toxina por célula (pg · cel ⁻¹)
21/01/91	0	216	Nd	216	432	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
31/01/91	0	64	Nd	32	96	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
11/02/91	0	0	124	0	124	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
21/02/91	0	616	616	440	1672	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5/03/91	3800	Nd	800	800	5400	189,5	Nd	189,5	189,5	35,1
20/03/91	29032	2204	800	Nd	33136	1100	Nd	1100,0	1100,0	33,2
2/04/91	1800	Nd	Nd	Nd	1800	0	Nd	Nd	Nd	Nd
11/04/91	5300	636	Nd	Nd	5936	45,7	Nd	45,7	45,7	7,7
22/04/91	28244	Nd	Nd	14112	42336	4724,7	683,1	6,9	5407,8	127,7
10/05/91	294	Nd	Nd	294	294	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
5/06/91	30940	65	Nd	3965	34970	143,4	Nd	143,4	143,4	4,1
18/06/91	263750	Nd	Nd	8250	279000	2343,6	224,5	10,4	2568,1	9,2
25/06/91	3515000	3800	Nd	11400	3530200	19769,1	1790,1	11,0	21559,2	6,1
1/07/91	1495000	Nd	Nd	2500	1497500	13777	1307,7	10,5	15084,7	10,1
17/07/91	162666	2033	Nd	6100	170799	1912,9	90,3	21,2	2003,2	11,7

tiembre se dio un fuerte pulso de afloramiento, la temperatura del agua superficial descendió a 15 °C y los nitratos alcanzaron valores de casi 10 μM a 20 m. A finales de septiembre se registraron las condiciones habituales de fin de la estación de afloramiento o período de relajación: valores mínimos de nitratos, advección de agua superficial más cálida de la plataforma, y registro de perfiles *quasi* verticales de temperatura.

A principios de junio se observaron niveles muy moderados de *D. acuminata*, sobre todo en la capa de 0-5 m. Los valores máximos se registraron el 23 de julio (8320 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) y el 13 de agosto (2240 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$); las concentraciones bajaron hasta los límites de detección (40 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$) en septiembre y no se detectaron en octubre. *D. acuta* se detectó por primera vez el 10 de julio, mes en el que llegó a alcanzar niveles de 160 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$. A principios de agosto tuvo lugar un fuerte incremento de esta población, que el 13 de agosto llegó a 14120 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$ a 10-15 m. La profundidad de este máximo varió en paralelo con los ascensos y descensos de las isoterms promovidos

Tabla 7.2. Contenido de toxina por célula (pg AO) determinado por CLAE y estimado por análisis de regresión múltiple con retroalimentación ($p < 0.05$) a partir del contenido total de toxina en poblaciones multiespecíficas. Cada columna corresponde a poblaciones de *D. acuminata* y *D. acuta* desarrolladas en el curso de distintas proliferaciones entre 1991 y 1993.

Especie	Contenido de Toxina por Célula (pg AO \cdot cel^{-1})				
<i>Dinophysis acuminata</i>	17	37	7-9	5-6	1-2
<i>Dinophysis acuta</i>	0.6	1.1-1.5	1.4-6	58	94

por los pulsos intermitentes de afloramiento. El 2 de octubre se registró un segundo pico (13760 $\text{cel} \cdot \text{l}^{-1}$), que coincidió con el fin de la temporada de afloramiento y el cambio del régimen de vientos, con predominio de vientos de componente sur que provocan una inversión de la circulación estuárica positiva. En estas circunstancias, la advección de aguas de la plataforma al interior de las rías y los episodios de hundimiento provocan un desplazamiento hacia abajo y hacia fuera de las poblaciones de diatomeas y favorecen la acumulación de grandes dinoflagelados nadadores capaces de resistir este desplazamiento (ver capítulo 5). *D. acuta* se dejó de detectar a partir del 22 de octubre. Así pues, cuando *D. acuminata* y *D. acuta* coincidieron en el tiempo la distribución vertical de sus máximos era bien diferenciable.

Contenido de toxinas de los arrastres fitoplanctónicos multiespecíficos

Las Tablas 7.1A y 7.1B muestran los resultados de los análisis cromatográficos de los extractos de arrastres fitoplanctónicos tomados entre agosto de 1990 y

Tabla 7.3. Contenido en AO y DTX2 ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) en cinco especies de *Dinophysis* determinado por CLAE y estimado por análisis de regresión múltiple con retroalimentación ($p < 0.05$) a partir del contenido total de toxinas en las poblaciones multiespecíficas (NI = no incluido en el análisis).

Especie	Período de Estudio					
	1990-93		1990-1991		1992-1993	
	Toxinas Diarreicas ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$)					
	AO	DTX2	AO	DTX2	AO	DTX2
<i>D. acuminata</i>	5.8	0.3	5.8	0.57	5	NI
<i>D. acuta</i>	NI	0.5	NI	0.4	261	169
<i>D. rotundata</i>	124	0.14	123	NI	NI	NI
<i>D. caudata</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>D. sacculus</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI

julio de 1991. En 1990, la ocurrencia de densas poblaciones de *D. acuta* a partir de agosto aparecen relacionadas con una proporción importante de DTX2 en el complejo de toxinas. Si consideramos el arrastre del 2 de octubre, constituido por un 98% de *D. acuta* y un 2% de *D. caudata* (especie considerada como débilmente tóxica), se deduce un contenido de 4 pg de AO+DTX2 por célula de *D. acuta*, y la proporción entre ambas toxinas, AO:DTX2 es de 3:2 (1.5). No obstante este cociente varía entre 0.3 y 2.0 en una serie de 13 muestreos. Además, en la primera muestra analizada (13.08.90) sólo se detectó AO a pesar de que *D. acuta* constituía aproximadamente un 10% del total de *Dinophysis* spp, y en las dos últimas muestras del año, correspondientes a poblaciones residuales en la segunda quincena de diciembre, sólo se detectó DTX2. En ningún caso se detectó DTX1. El contenido tóxico por célula entre agosto y finales de octubre, el período en el que se registró la proliferación de *D. acuta*, fue bajo, oscilando entre 0.1 y 4.0 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$. Los valores máximos de toxina por célula (53.4 y 46.6 $\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) se registraron la primera quincena de diciembre en poblaciones cuya concentración escapaba al nivel de detección ($< 40 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de los contajes rutinarios. El valor máximo (53.4 pg) corresponde a un arrastre constituido por *D. acuta* (82%) y *D. caudata* (18%).

Durante 1991, las concentraciones de *Dinophysis* en muestras de campo fueron casi indetectables hasta mediados de abril, y los arrastres obtenidos presentaron en muchos casos contenidos de toxina que escapaban a los niveles de detección del método. Se observó un predominio del AO en todas las muestras en las que se detectó toxina. Hubo tres muestras que sólo presentaron AO a pesar de que en dos de ellas *D. acuta*, especie que suele presentar una elevada proporción de DTX2 en su contenido de toxinas, constituía el 10% de las *Dinophysis* spp. Los principales eventos tóxicos de este año aparecieron asociados a densas proliferaciones de *D. acuminata*. La banda sombreada inferior de la Tabla 7.1B corresponde al período de los primeros máximos de esta especie y con una fuerte dominancia de *D. acuminata*

en los arrastres. El contenido de toxina por célula en este período osciló entre 6.1 y 11.7 pg · cel⁻¹, y el cociente AO:DTX2, entre 10.4 y 21.2. Hay que resaltar el elevado contenido celular de toxina en la muestra del 11 de abril (127.7 pg · cel⁻¹) constituida por *D. acuminata* (67%) y *D. rotundata* (33%).

En la Tabla 7.2 se muestran las estimaciones de contenido tóxico celular medio obtenidas por regresiones múltiples de observaciones de grupos de 5 muestreos sucesivos en los que la especie de interés se mantenía presente. El contenido de toxina por célula en *D. acuminata* varió entre 1 y 37 pg · cel⁻¹, y el de *D. acuta* entre 0.6 y 94 pg · cel⁻¹. Este último valor, inusualmente alto, se registró en una población también inusual, por su época de ocurrencia, detectada en diciembre de 1992.

En la Tabla 7.3 se muestran las estimaciones de contenido tóxico medio por célula y por especie para los dos períodos de muestreo y para el conjunto global de los datos obtenidas por regresiones múltiples. Según estas estimaciones, *D. acuminata* fue el principal agente de DST entre agosto de 1990 y julio de 1991, mientras que *D. acuta* tuvo un papel mucho más importante entre agosto de 1992 y mayo de 1993. Se estimaron valores especialmente altos (124 pg · cel⁻¹) de contenido de AO en la especie heterótrofa *D. rotundata*.

Considerando el conjunto de muestras de fitoplancton analizadas entre 1990 y 1993, la DTX2 (segundo pico cromatográfico) apareció en el 57% de los casos, el cociente promedio AO:DTX2 fue de 7.7, y *D. acuminata* y/o *D. acuta* se encontraron siempre presentes en las muestras donde aparecía DTX2. No obstante, hay que recordar la presencia de otras especies «contaminantes», como *D. rotundata* y *D. caudata*, que se hallaban en concentraciones mucho más bajas que las dos anteriores en buena parte de los arrastres. En un caso en el que *D. acuminata* era la única *Dinophysis* presente en el filtro, y el AO la única toxina diarreica reflejada en el cromatograma, se obtuvo un valor promedio de 7.2 pg AO · cel⁻¹.

Una importante observación durante este estudio fue que las estimaciones de contenido de toxina por célula eran siempre superiores cuando se realizaban los análisis de CLAE con diluciones progresivas de los extractos de filtros que contenían un elevado número de células de *Dinophysis* (> 10⁶ cel) y quizás demasiado material acompañante que dificultaba la resolución de los análisis cromatográficos.

DISCUSIÓN

Contenido de toxinas de las células de *Dinophysis*

Los datos fiables de contenido de toxinas por célula de *Dinophysis* spp son muy escasos, debido sobre todo a la necesidad de usar micromanipulación capilar para separar las células una a una antes de su análisis por CLAE. Lee *et al.* (1989) obtuvie-

ron valores de $1.6 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$ en individuos de *D. acuminata* aislados en Le Havre (Francia), y valores de $9.4 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$ en individuos de *D. acuta* aislados de la Ría de Vigo en octubre de 1997. Durante un episodio de DST en el Gullmarfjord (Suecia) en el que coincidieron *D. acuminata* y *D. acuta* (Edler & Hageltorn, 1990), se señaló a la última especie como el principal productor de toxinas. En este mismo estudio se calculó en $20 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$ el contenido de toxina de *D. acuta*, pero los autores asumieron que *D. acuta* era el único productor de AO a pesar de que había individuos de *D. acuminata* y *D. norvegica* que coincidían en las mismas muestras. En el Sognefjord (Noruega), se señaló a *D. acuminata* como el responsable de los episodios de DST de primavera, y a *D. acuta* como el agente de los altos niveles de toxina en otoño. Los resultados de los autores escandinavos sugerían, en cierto modo, que las células de *D. acuminata*, de menor tamaño y menos abundantes en otoño, tenían una importancia secundaria desde el punto de vista toxigénico en relación con las células de *D. acuta*, mucho más voluminosas y que alcanzaban densidades 2 ó 3 veces mayores. No obstante, hay que tener en cuenta la gran variabilidad estacional y anual del contenido tóxico por célula, de la misma especie y en la misma localidad.

El contenido de toxina por célula encontrados en *D. fortii* en Japón oscilaron entre 13 y $192 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$. Los datos disponibles de toxicidad (AO) por célula de *D. acuta* de la Ría de Vigo corresponden a células aisladas en octubre (Lee *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 1999, 2001), que podrían ser más tóxicas que las de los períodos de proliferación en los meses de verano. Es obvio que las células de *D. acuta* en el verano-otoño de 1990 no debían tener un contenido muy alto de AO dadas las moderadas concentraciones de esta toxina estimadas en los mejillones a pesar de las concentraciones relativamente altas ($> 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) de células de *D. acuta* alcanzadas a mediados de agosto y finales de septiembre. No obstante, a la luz de los conocimientos actuales, debemos aplicar un factor de corrección variable a los valores de toxicidad de mejillón obtenidos durante este episodio, cuando aún no había sido identificada la DTX2, toxina que puede representar un porcentaje muy variable del contenido total de AO+DTX2 en los mejillones durante las proliferaciones de *D. acuta* (ver Tablas 7.1A y 7.1B), o en casos extremos ser la única toxina presente en las células de *D. acuta*. Un nuevo factor de incertidumbre lo constituye el hecho de que durante este trabajo tan sólo se investigó la presencia de AO y derivados. No se sospechaba la presencia de otro grupo de toxinas lipofílicas, las pectenotoxinas, que se han detectado recientemente en *Dinophysis* spp. de las rías gallegas (Fernández *et al.*, 2002).

Los datos de contenido promedio de toxina por célula de la Tabla 7.1A sugieren que estos valores son bajos en etapas de crecimiento activo de la población y aumentan considerablemente en etapas tardías del crecimiento poblacional, siendo máximos en células residuales observadas en invierno. Estos resultados concuerdan con

las observaciones experimentales en cultivos de *Prorocentrum lima*, dinoflagelada bentónica que también produce toxinas diarreogénicas (AO y derivados), en donde los valores máximos de toxina por célula se observaron en la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria (Bauder *et al.*, 1996). Así pues, el AO y sus derivados se comportarían como metabolitos secundarios, cuya producción continúa cuando el crecimiento global de la célula se encuentra en declive, lo cual explica el incremento lineal de toxina por célula a partir de la fase exponencial tardía en los cultivos de *P. lima* (Quilliam *et al.*, 1996). Sin embargo debemos ser cuidadosos de no caer en el error común de confundir mayor contenido de toxina por célula con mayor tasa de producción de toxina. El primer caso, mayor contenido de toxina por célula, se trata más bien de una acumulación, al mantenerse quizás una misma tasa de producción de toxinas en células con una tasa de división muy baja o nula. Ello explicaría los elevados valores observados en poblaciones de invierno, posiblemente quiescentes y con comportamiento heterótrofo, ya que con frecuencia se ha observado en estas situaciones un alto porcentaje de células hinchadas, repletas de vacuolas.

El comportamiento heterótrofo de las especies mixótrofas de *Dinophysis* es otro factor, difícil de evaluar, que podría afectar sobremedida al contenido celular de toxinas. Hay que destacar en los datos aquí presentados los valores sumamente altos ($> 100 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) de contenido de toxina en *D. rotundata* obtenidos de: a) las estimaciones por regresión múltiple, y b) las estimaciones promedio (por célula de *Dinophysis*) en los arrastres en los que había un porcentaje importante de *D. rotundata* (10.02.90 y 22.04.91). Estos resultados son comparables a los de Lee *et al.* (1989) para la misma especie. Asimismo, durante un episodio de DST en la Ría de Pontevedra, asociado principalmente con *D. acuminata*, observamos que el contenido promedio de toxina por célula de *Dinophysis* aumentaba considerablemente a medida que aumentaba la proporción de *D. rotundata* en los arrastres (Maneiro *et al.*, 2000). *D. rotundata* es un heterótrofo estricto, y se ha demostrado que se alimenta, por mizocitosis (perforación de la cubierta de la presa con un pedúnculo alimenticio, y succión del contenido), de ciliados tintínidos, tales como *Tiarina fusus* (Hansen, 1991). Los tintínidos del género *Favella* parecen predear activamente las células de *D. acuminata* (Maneiro *et al.*, 1998) y la fracción en la que están comprendidos estos ciliados fue la que presentó la mayor concentración de toxinas diarreogénicas en la cadena trófica planctónica después de la fracción en la que predominaban las *Dinophysis* spp (Maneiro *et al.*, 1998, 2000). Quizás una vez desarrollada una proliferación de *Dinophysis* spp, los tintínidos, succionados por individuos heterótrofos de *D. rotundata*, podrían actuar como transvectores de las toxinas diarreogénicas entre especies fotosintéticas (ej., *D. acuminata*), y especies heterótrofas, como *D. rotundata*, de *Dinophysis*. En este caso, *D. rotundata* ocuparía al menos un tercer eslabón en la cadena trófica transvectora de toxinas, con lo cual se justificarían los elevados contenidos de toxina estimados/observados en esta especie. No hay que

descartar que el heterótrofo *D. rotundata* sea capaz de biosintetizar AO y derivados *de novo* (P.J. Hansen, com. pers.), pero esta posibilidad no ha sido aún demostrada en condiciones controladas de laboratorio, a pesar de que *D. rotundata* es la única especie del género, heterótrofa estricta, que se ha conseguido mantener en cultivo (Hansen, 1991) alimentada con ciliados.

Las estimaciones promedio de toxina por célula y por especie obtenidas por regresión múltiple en una serie de cinco muestreos consecutivos (Tabla 7.2), arrojaron unos valores que parecen realistas si se comparan con los valores promedio obtenidos de los análisis individuales de cada filtro (Tablas 7.1A y 7.1B) y otros datos publicados que incluyen análisis de células de *Dinophysis* aisladas individualmente (ver capítulo 8). Sin embargo, las regresiones múltiples aplicadas a grandes series de datos y largos períodos de tiempo (Tabla 7.3) pueden dar lugar a resultados muy artificiales o incluso a artefactos. Ello se debe a que se asume que cada especie presenta un perfil cualitativo de toxinas constante, se mezclan distintos episodios desarrollados bajo condiciones ambientales muy diversas que podrían provocar grandes variaciones de contenido de toxina por célula, y se asume que determinadas especies, tales como *D. caudata*, son siempre débilmente tóxicas.

Masselin *et al.* (1992) encontraron que los valores de contenido tóxico de células de *Dinophysis* calculados a partir de extractos de arrastres de poblaciones fitoplanctónicas eran normalmente inferiores a los obtenidos de células aisladas individualmente. Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones de mayor toxicidad por célula cuando se diluían los extractos de arrastres. Ambas observaciones sugieren que podría haber interferencias analíticas por el «ruido químico» causado por el material acompañante. Otra posible explicación es que en los arrastres densos, una cantidad significativa de células podría dañarse durante el proceso de filtrado, con resultado de apertura de la teca y pérdida del contenido celular (toxinas incluidas) en el filtrado. Este último efecto sería mucho mayor si el filtrado y congelado de los arrastres no se hace a bordo, inmediatamente después de realizado el muestreo.

Toxicidad de los mejillones en relación con la distribución de *Dinophysis* spp

Desde principios de junio hasta finales de octubre, los mejillones mostraron siempre presencia de AO en las tres profundidades muestreadas, y una serie de máximos y mínimos de concentración de esta toxina que se intentan justificar por los altibajos de las poblaciones de las dos especies de *Dinophysis* dominantes: *D. acuminata* y *D. acuta*. Los bajos niveles de AO detectados al principio del estudio posiblemente fueran restos de la intoxicación asociada con poblaciones moderadas anteriores de *Dinophysis acuminata*, que son comunes en abril y mayo y que presentan sus máximos

celulares por debajo de los 5 m. El incremento de AO en los mejillones de 2 m la tercera semana de julio se corresponde claramente con el máximo superficial de *Dinophysis acuminata* a 0-5 m, si bien el valor máximo de toxicidad apareció en la cuarta semana, es decir, hay un desfase de una semana entre el máximo de células y el máximo de toxicidad. La gran diferencia entre la concentración de AO en superficie en relación con las capas inferiores sugiere que en estos estadios finales de la proliferación de *D. acuminata*, las células se congregaban en las capas superficiales, y no parecen haber desarrollado migraciones significativas, pues de lo contrario la distribución vertical de AO habría sido más homogénea. El incremento de contenido de AO en la capa superficial del 13 de agosto también se asocia con claridad con un nuevo máximo, muy inferior al anterior, en la segunda semana de agosto de la misma especie. A partir del 13 de agosto, desaparece la población de *D. acuminata* y se mantiene en escena *D. acuta*. Se observa a partir de esta fecha un descenso general de toxicidad en los tres niveles de las cuerdas de batea; la relación entre los niveles de AO a 2 m y la concentración de células de *Dinophysis acuta* a 0-5 m no es muy clara a no ser que asumamos que las células de las capas inferiores migran hacia superficie a otras horas del día. En los mejillones de 7 m la situación es más compleja. Los niveles moderados de AO en la primera quincena de julio podrían deberse a las células de *D. acuminata* procedentes del máximo de 0-5 m que migraran hacia abajo. Este comportamiento de oscilación del máximo de *Dinophysis*, entre los 10 y 5 m de la columna de agua, ha sido descrito previamente en poblaciones de *D. acuminata* entre en las Rías Bajas (Villarino *et al.*, 1995; Reguera *et al.*, 1996). Los valores de AO en mejillón de agosto y septiembre se correlacionan mejor con el contenido tóxico promedio de las células de *D. acuta* entre 0 y 15 m, excepto los valores de AO de los mejillones del 2 de octubre a 15 m que se corresponden con un marcado pico de *D. acuta* a 10-15 m. Por todo lo expuesto, resulta más sencillo relacionar la toxicidad asociada a *D. acuta* con la abundancia promedio de células en la columna de agua de 0 a 15 m.

La concentración de AO en mejillón asociada a proliferaciones de *D. acuminata* en la Ría de Pontevedra durante el período de estudio en el año 1990, alcanzó niveles de más del doble que los máximos alcanzados durante las proliferaciones de *D. acuta*, a pesar de que esta segunda especie alcanzó concentraciones celulares más elevadas, y el material fitoplanctónico acompañante (clor *a*) era más bajo. No obstante, si revisamos las tablas 7.1A y 7.1B se puede observar que: a) la concentración de toxinas por célula alcanzó valores más elevados en las poblaciones dominadas por *D. acuta* que en las dominadas por *D. acuminata*, y b) en los análisis de hepatopáncreas de mejillón de este estudio tan sólo se determinó el contenido de AO. Por el contrario, los estudios de contenido de toxinas de los arrastres fitoplanctónicos (hechos posteriormente y con nuevos medios) mostraron la aparición de un segundo pico, que se interpretó que correspondía a la DTX2. Esta otra toxina puede llegar a ser tan

importante o más que el AO, por lo que al no ser analizada en los mejillones, se subestimó el contenido de toxinas de los bivalvos.

Los resultados más recientes, aplicando las técnicas más avanzadas de espectrometría de masas acoplada al cromatógrafo líquido, han mostrado la presencia de pectenotoxinas (a veces como grupo de toxinas dominante) en poblaciones de otoño con dominancia de *D. acuta* y *D. caudata* (Fernández *et al.*, 2002). Estos resultados añaden más imprecisión a las estimaciones previas y ponen de manifiesto que será imprescindible tener en cuenta este otro grupo de toxinas en estudios sucesivos.

Tiempos de intoxicación/desintoxicación *in situ*

Los tiempos de detoxificación *in situ*, 1 semana a 15 m y 2 semanas a 2 m y 7 m -o tiempo transcurrido entre la última detección de niveles bajos de *D. acuta* (120 cel·l⁻¹) y la desaparición de AO en niveles detectables por CLAE- son bastante cortos si consideramos los bajos niveles de clorofila observados a principios de noviembre. No obstante, si consideráramos que se requiere una concentración umbral más elevada de *D. acuta* a partir de la cual los mejillones adquirirían valores detectables de AO, por ej. 10³ cel·l⁻¹, en este caso el tiempo de desintoxicación habría sido aproximadamente 3 semanas para los mejillones de 15 m y 4 semanas para los de 2 y 7 m. Hay que señalar que los niveles de toxicidad a eliminar no eran muy altos (máx. aprox. 4 µg AO·g HP⁻¹). No obstante los análisis de mejillón sólo estimaron contenido en AO, y estudios posteriores han mostrado la ocurrencia de DTX2 durante proliferaciones de *D. acuta*. Así pues, si la proporción AO/DTX2 en mejillones fuera similar a la observada en las células (3:2, o incluso 1:1), los valores reales de toxina diarreica total estarían infravalorados y podrían ser al menos entre un 66% y un 100% superiores (es decir, hasta un máx de 8 µg AO+DTX2·g HP⁻¹. En apoyo de esta observación están los datos de Arévalo *et al.* (1994), quienes en datos obtenidos en el programa de monitoreo comenzado en 1992 encontraron que existía una buena correlación entre los niveles de AO determinada por CLAE y los tiempos de muerte de los ratones; sin embargo cuando aparecía un segundo pico (de identidad desconocida) después del AO, los ratones morían en tiempos mucho menores a los que cabía esperar por la cantidad de AO inyectado en el extracto de mejillón.

Una vez desaparecido *D. acuminata*, y asociado a la ocurrencia de *D. acuta*, la distribución *quasi* uniforme de concentraciones de AO en los mejillones de las cuerdas de batea sugiere un activo desplazamiento vertical de las células de *Dinophysis* en la capa superficial de 15 m. Esto estaría de acuerdo con las observaciones de distribución vertical diurna de *D. acuta* en Nueva Zelanda (MacKenzie, 1992), y con la distribución de *D. acuta*, a mayor profundidad en la columna de agua, observada en nuestros estudios. Así pues, es de suponer que *D. acuta* asciende y desciende en la

columna de agua, debido a sus ritmos circadianos, una distancia muy superior a la de las relativamente pequeñas células de *D. acuminata*. Las intoxicaciones de mejillón asociadas a la ocurrencia de *D. acuminata* lo fueron en un rango de profundidad menor, lo cual coincide con resultados de experimentos franceses de intoxicación *in situ* (Lassus & Berthomé, 1987), y de estudios de migración vertical de esta especie (Lassus *et al.*, 1990). En general, los intentos de correlacionar toxicidad DSP con las concentraciones celulares de *Dinophysis* spp da lugar a resultados divergentes. Las migraciones verticales de las células, sus fluctuaciones microescalares asociadas a las corrientes de marea, los forzados del viento, y diversas interacciones físico-biológicas sugieren que los estudios convencionales de correlación células/toxicidad no son los más apropiados, y que se requieren nuevas estrategias de muestreo (por ej., sistemas de muestreo continuo colocados en boyas fijas).

Los mejillones de 15 m se detoxificaron antes que los de niveles superiores. Con frecuencia, el índice de condición a 15 m fue superior al de 2 y 7 m. Estos datos apoyarían el punto de vista de que en determinados momentos, las bacterias y detritus del seston pueden constituir una importante fracción de la dieta del mejillón (Fraga & Vives, 1960), y que las elevadas intensidades luminosas pueden inhibir el desarrollo de los bivalvos.

Importancia del conocimiento de la concentración de células y del contenido celular de toxinas para la mejor gestión de los episodios de DST.

Una pregunta común de los gestores a los expertos de los programas de seguimiento suele ser: ¿Cuántas células por litro de microalgas tóxicas son necesarias para que el mejillón se vuelva tóxico?

Cuando el agente de la toxicidad son células del género *Dinophysis*, los resultados presentados en este capítulo y el siguiente, en los que se observan variaciones intraespecíficas de contenido celular de toxina por célula de más de dos órdenes de magnitud, demuestran que esta pregunta no tiene una respuesta simple. Los estudios preliminares de Sampayo *et al.* (1990) mostraron que existía una relación inversa entre los niveles de toxina alcanzados por los mejillones y la cantidad de fitoplancton acompañante, es decir, dependía de la proporción de microalgas tóxicas respecto a la población fitoplanctónica global. Blanco *et al.* (1995, 1998, 2000) profundizaron sobre estas ideas iniciales, incidieron en la importancia de factores intrínsecos ligados al estado fisiológico del mejillón y desarrollaron modelos en los que se tienen en cuenta las condiciones oceanográficas físicas (temperatura, salinidad, estabilidad), y la cantidad y calidad del alimento disponible (clorofilas, seston). La concentración de células tóxicas y el contenido de toxina por célula son parámetros importantes a introducir en estos modelos y permiten determinar la «calidad de tóxico», nuevo parámetro introducido por Blanco *et al.* (1997) por analogía con el término

«calidad de alimento» comúnmente empleado en modelo de asimilación de bivalvos. La «calidad del tóxico» es un parámetro muy útil en los modelos de intoxicación-detoxicación de bivalvos, pues informa sobre la relación entre las células tóxicas y el total de alimento disponible para los bivalvos.

Nuestros resultados también muestran que los mejillones pueden presentar un desfase de varios días entre la aparición de un máximo de la especie tóxica y la del máximo de toxina. La magnitud del desfase se verá muy influenciada por la cantidad de material fitoplanctónico acompañante, que tendrá un efecto de «dilución del tóxico» o de descenso de la «calidad de tóxico» (*sensu* Blanco). Además, el proceso de intoxicación se verá afectado por la variación de contenido de toxina por célula de *Dinophysis* que tenga lugar a lo largo de cada episodio. Dada la variabilidad temporal del contenido de toxina por célula, no parece aconsejable utilizar valores determinados en muestras aisladas, sino que sería más prudente emplear promedios de series temporales cortas de valores, como la mostrada en la Tabla 7.2. Es obvia también la importancia de realizar muestreos de bivalvo a distintas profundidades si el sistema de cultivo se basa en bateas, boyas con cuerdas colgantes y similares.

Los resultados de este trabajo permiten dilucidar mejores estrategias de seguimiento con vistas a una mejor gestión de los efectos negativos de las proliferaciones de *Dinophysis* spp. en el sector maricultor y la salud pública. Así pues, para la mejora de la predicción de la aparición y declive de episodios de DST en los bivalvos, el conocimiento de la concentración absoluta de células de *Dinophysis* (cuyas poblaciones se distribuyen de forma muy heterogénea en la columna de agua) no parece un parámetro excesivamente útil si no se relaciona con otros datos oceanográficos. Además, hay que recordar que los muestreos de fitoplancton raras veces tienen la suficiente resolución espacio-temporal como para detectar episodios de corta escala temporal (horas-días) que permiten la agregación de elevadas concentraciones de *Dinophysis* spp en capas finas de la columna de agua, o la advección de densas poblaciones de la plataforma al interior de rías y fiordos. Por ello, los contajes celulares deben complementar, pero nunca sustituir, a los análisis de toxinas en los bivalvos.

Podría ser más efectivo hacer un seguimiento de la concentración de toxinas lipofílicas (AO y derivados, y pectenotoxinas) en las poblaciones planctónicas como una variable más a añadir a los parámetros habitualmente estimados (clorofila, nutrientes, concentración de células potencialmente tóxicas y de células acompañantes) en las muestras integradas tomadas con manguera de 0 a 15 m. De esta forma se podría estimar el contenido de toxinas por litro de agua de mar. Mejor aún si la concentración de toxina por unidad de volumen se «normaliza» en relación con la concentración de clorofila obtenida, tal como aparece en el trabajo de Dahl & Johannessen (2001), o en relación con la concentración de seston (Blanco *et al.*,

1997). De esta forma se podría estimar la cantidad de toxina que pueden ingerir los bivalvos por unidad de clorofila (alimento vivo) o de densidad de partículas (seston) filtradas, lo cual constituye una información más aplicable en los modelos de predicción que la mera concentración de células de *Dinophysis* spp. Los arrastres deberán ser verticales, para muestrear representativamente toda la población planctónica, o alternativamente se pueden filtrar muestras integradas de agua tomadas con manguera, pero siempre eliminando la fracción superior a 100-150 μm , y obteniendo un filtro final no excesivamente denso que se deberá congelar lo más rápido posible para evitar transformaciones enzimáticas de las toxinas.

Con los avances actuales de los modernos sistemas analíticos de LC-MS, que permiten obtener excelentes resultados a partir de unas pocas decenas de células, no cabe duda de que el dato más preciso e inequívoco será el análisis del contenido de toxinas en células aisladas por micromanipulación, de las distintas especies, en distintos momentos de un episodio tóxico.

CAPÍTULO 8

TOXINOLOGÍA Y CONTENIDO TÓXICO DE *DINOPHYSIS ACUMINATA*, *D. ACUTA* Y *D. CAUDATA* DE LAS RÍAS BAJAS GALLEGAS

- Fernández, M.L., **Reguera, B.**, Ramilo, I. & Martínez, A. (2000). Toxinología y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Bajas Gallegas. VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Actas de la Reunión (Sevilla, 5-7 Mayo 1999). Junta de Andalucía. Congresos y Jornadas N° 55/00, pp. 127-137. (REVI SADO).
- Fernández, M.L., **Reguera, B.**, Ramilo, I. & Martínez, A. (2001). Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: Harmful Algal Blooms. Hallegraeff, G., Blackburn, S., Lewis, R., and Bolch, C. (eds.) Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 360-363. (REVI SADO).

TOXINOLOGÍA Y CONTENIDO TÓXICO DE *DINOPHYSIS ACUMINATA*, *D. ACUTA* Y *D. CAUDATA* DE LAS RÍAS BAJAS GALLEGAS

RESUMEN

Dinophysis acuminata, *D. acuta* y *D. caudata* coinciden durante episodios recurrentes de intoxicación diarreica por bivalvo (DSP) en las Rías Bajas gallegas a principios de otoño, por lo que la contribución de cada una de estas especies a la toxicidad de los moluscos debe ser evaluada. Los análisis obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia (CLAE-DF), de células aisladas una a una por micromanipulación confirmaron, por primera vez en Galicia, que *D. acuta*, que contiene una proporción AO:DTX2 de 3:2, es la principal fuente de la DTX2 detectada en los mejillones gallegos, y que tanto *D. acuta* como *D. acuminata* pueden ser los principales responsables de los episodios de aparición de toxinas diarreicas en otoño. Resultados preliminares sugieren la presencia de cantidades traza ($< 1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) de AO en *D. caudata* y confirman la gran variabilidad del contenido tóxico en células de la misma especie de *Dinophysis* durante distintos episodios anuales, e incluso durante el mismo episodio en células, obtenidas mediante arrastres de red, mantenidas en el laboratorio entre 5 y 9 días. Estos resultados advierten del riesgo de emplear métodos alternativos de análisis de toxinas (enzimáticos, sondas moleculares) que sólo sean efectivos para la detección de AO. Asimismo corroboran el riesgo para la salud pública que supone el empleo del "índice de *Dinophysis*" como dato sustitutorio de los bioensayos de ratón en la detección precoz de toxinas diarreicas en los bivalvos.

TOXIN CONTENT OF *DINOPHYSIS ACUMINATA*, *D. ACUTA* AND *D. CAUDATA* FROM THE GALICIAN RÍAS BAJAS

SUMMARY

Dinophysis acuminata, *D. acuta*, and *D. caudata* co-occur during recurrent early autumn DSP outbreaks in the Galician Rías Bajas, and their contribution to shellfish toxicity needs to be established. Analyses by high performance liquid chromatography with fluorimetric detector (HPLC-FD) of cells isolated by micromanipulation during different events, searching for OA and its derivatives, confirmed for the first time in Galicia that *D. acuta*, with an OA:DTX2 ratio of 3:2, is the main source of DTX2 toxin detected in Galician mussels, and that either *D. acuta* or *D. acuminata* can be the main contributors to autumn toxic outbreaks. OA was the main toxic compound found in *D. acuminata* but the possible presence of pectenotoxins was not investigated and the potential presence of DTX2 or conjugated forms of OA in any *Dinophysis* spp can not be discarded. Our results suggest that *D. caudata* had trace amounts of OA ($<1 \text{ pg} \cdot \text{cell}^{-1}$) and confirm the large variability in toxin content in *D. acuta* and *D. acuminata* during different seasonal outbreaks, or even during the same outbreak after natural populations were maintained in the laboratory for 5-9 days. These results warn about the risk of using alternative methods to the mouse bioassay, i.e., enzymatic assays, antibodies or molecular probes, that have been designed to detect only okadaic acid. The risk to human health of using a "Dinophysis index" as substitute information for the standard mouse bioassay in the early detection of diarrhetic shellfish toxicity is also discussed.

INTRODUCCION

Las especies del género *Dinophysis* aparecen asociadas a episodios crónicos de detección de toxina diarreogénica (DST) en los bivalvos, lo que acarrea prolongadas prohibiciones de la extracción de mejillones y otras especies de interés comercial en las áreas de producción de las Rías Bajas gallegas (Reguera *et al.*, 1993a). *D. acuminata* es la especie más persistente del género, presente durante todo el año, y responsable de episodios DST entre primavera y otoño; se han registrado densidades máximas de hasta $3 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ de esta especie en Galicia (Reguera, datos no publ.) y en años excepcionales se ha asociado con episodios DST de invierno con concentraciones inferiores a $2 \times 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Blanco *et al.*, 1998). Las apariciones de *D. acuta* son de carácter más estacional, y los brotes de DST asociados a esta especie, excepto años excepcionales, suelen ser episodios puntuales y de corta duración que se dan sobre todo en septiembre-octubre (Reguera *et al.*, 1995). La densidad máxima de *D. acuta* registrada en Galicia fue de aproximadamente $5 \times 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ (Reguera, datos no publ.). *D. caudata* es un componente minoritario del grupo *Dinophysis* en las rías que aparece siempre acompañando a otras especies del género y constituyendo un 5-20% del total de *Dinophysis* spp; las concentraciones máximas anuales registradas oscilan entre $2-7 \times 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ en muestras integradas de 5 m de la columna de agua (Reguera *et al.*, 1990, 1993a, 1993b; Blanco *et al.*, 1995, 1998). Otras especies acompañantes que no suelen superar niveles de $1-2 \cdot 10^2 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$ son *Dinophysis rotundata* y *D. tripos*. Es importante insistir en que, excepto durante situaciones transitorias breves (de varios días) a principios de otoño, la presencia de toxinas diarreogénicas en los moluscos tiene lugar en asociación con poblaciones de *Dinophysis* (una o varias especies mezcladas) que representan un pequeño porcentaje (1-5%) de la comunidad fitoplanctónica global, y que hasta la fecha, nadie ha conseguido producir cultivos estables de ninguna especie de *Dinophysis*, si se exceptúa el mantenimiento temporal de la especie heterótrofa *Dinophysis rotundata* alimentada con cilidos tintínidos (Hansen, 1991).

Las principales preguntas que deben responder los expertos son:

1. ¿A partir de qué concentración de células de *Dinophysis* se detectan toxinas en los moluscos?
2. ¿Cuáles son las especies tóxicas de *Dinophysis* responsables de los niveles de toxinas diarreogénicas que se detectan en los bivalvos?
3. ¿Qué toxinas polietéreas se encuentran presentes en las especies tóxicas de *Dinophysis* y cómo varía su contenido por célula?

Estas sencillas preguntas son difíciles de responder cuando se trabaja con dinoflageladas no cultivables, y que constituyen un componente minoritario del fito-

Tabla 8.1. Concentración de toxinas DSP (OA Y DTXs) en poblaciones naturales de *D. acuminata*, *D. sacculus*, y *D. acuta* de distintas partes del mundo.

Especie	Origen	Contenido de toxina (pg · cel ⁻¹)	Tipo de muestra	Referencia
<i>D. acuminata</i>	Le Havre, Francia. (Junio 1984)	1.6 OA	Células aisladas por micromanipulación	Lee <i>et al.</i> , 1989
	Bahía de Tokio, Japón (Junio 1984)	Trazas OA		
	Gulf St. Lawrence, Canadá	25.5 OA	Células aisladas de arrastres multiespecíficos mantenidos en laboratorio	Cembella, 1989
	Gulmar Fjord, Suecia	1.1 - 23.2 OA: 1.1 - 23 DTX1: nd - 0.2		Johanson <i>et al.</i> , 1996
	Galicia, España	1 - 37 OA	Contenido de toxina global de arrastres de red (serie temporal)	Blanco <i>et al.</i> , 1995
Dinamarca	nd - 40 OA	Andersen <i>et al.</i> , 1996		
<i>D. sacculus</i>	Bretaña, Franca	12.9 - 29.6 OA	Células aisladas (micromanipulación)	Masselin <i>et al.</i> , 1992
	Delta del Ebro, España	1.2 - 5.7 OA	Arrastre <i>quasi</i> mono específico mantenido en laboratorio.	Delgado <i>et al.</i> , 1996
<i>D. acuta</i>	Galicia, España (Octubre 87)	9.4 OA	Células aisladas (micromanipulación)	Lee <i>et al.</i> , 1989
	Cork, Irlanda (Agosto, 96)	136 58 OA+78 DTX2		James <i>et al.</i> , 1999
	Gulmar Fjord, Suecia	4 - 21	Células aisladas de arrastres multiespecíficos mantenidos en laboratorio	Johanson <i>et al.</i> , 1996
	Galicia, España	0.6 - 94	Contenido tóxico global de arrastres de red (serie temporal)	Blanco <i>et al.</i> , 1995

plancton. La pregunta 1 es ingenua y su respuesta se discutió en el capítulo 7. Para contestarla hay que tener en cuenta la relación de la concentración de células tóxicas con el total del alimento disponible para los moluscos, el estado fisiológico de éstos, y las condiciones ambientales que afectan a los procesos de intoxicación y detoxificación de los moluscos de forma específica. Pero las grandes variaciones observadas en la relación «Concentración de *Dinophysis* spp / Concentración de DST en los bivalvos» se justifican en parte por la variabilidad del contenido de

toxina por célula observado en poblaciones naturales de *Dinophysis* spp. Además, algunas especies de *Dinophysis* presentan cepas tóxicas en una localidad y cepas aparentemente no tóxicas en otra. El mejor ejemplo de esto último lo constituye *Dinophysis norvegica*, uno de los principales agentes de episodios DST en los países escandinavos, mientras que repetidos análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de arrastres fitoplanctónicos ricos en esta especie en la costa este de Canadá han dado resultados negativos sobre la presencia de AO y derivados (Lawrence *et al.*, 1998).

Existen abundantes referencias en la literatura sobre estimaciones de contenido de toxinas diarreogénicas en células de *Dinophysis* spp. (Tabla 8.1). Al no existir cultivos establecidos de estas especies, las estimaciones se han hecho a partir de: a) análisis del contenido de toxinas en poblaciones plactónicas naturales multiespecíficas obtenidas mediante arrastres de red; b) análisis del contenido de toxinas en las poblaciones anteriores mantenidas en laboratorio un corto período de tiempo, y c) en contadas ocasiones, análisis del contenido de toxinas en células aisladas una a una, al microscopio invertido, mediante laboriosas técnicas de micromanipulación y lavados sucesivos, a partir de poblaciones multiespecíficas tomadas con arrastres de red.

Los resultados obtenidos aplicando los distintos métodos de estimación a las mismas muestras han mostrado grandes discrepancias. Así, Masselin *et al.* (1992), al comparar el contenido de toxina por célula de *D. sacculus* estimado a partir de arrastres multiespecíficos y a partir de aislamientos de células individuales, observaron que los datos obtenidos de los arrastres eran hasta un orden de magnitud inferiores a los obtenidos de células aisladas por micromanipulación. Blanco *et al.* (1995) tuvieron que hacer frente a una situación aún más compleja al coexistir distintas especies de *Dinophysis* en las mismas muestras multiespecíficas de arrastres de red. Para ello, estimaron el contenido de toxina por célula y especie de *Dinophysis* mediante regresiones múltiples de los resultados, en sucesivos arrastres fitoplanctónicos de red, del contenido de toxina total en los arrastres filtrados y el conteo de células de las distintas especies de *Dinophysis* que coincidían en las muestras (ver capítulo 7). Estos autores señalaron que el contenido de toxina estimado por célula era tanto mayor cuanto más se diluían los arrastres fitoplanctónicos excesivamente densos antes del análisis por CLAE. Tanto Masselin *et al.* (1992) como Blanco *et al.* (1995) interpretaron que las diferencias entre el contenido de toxina por célula estimado de los arrastres y el contenido estimado en arrastres diluidos o en células aisladas individualmente, eran consecuencia del «efecto matriz», es decir, interferencias que causan en los análisis cromatográficos la presencia de matrices biológicas complejas en las muestras; en este caso, organismos planctónicos acompañantes y detritus.

De los resultados anteriores se puede deducir que las estimaciones de contenido de toxina por célula de *Dinophysis* a partir de arrastres de red presentan los siguientes problemas:

- El mencionado «efecto matriz», o perturbaciones causadas por el material acompañante, que dan lugar a cromatogramas con mucho «ruido químico» que dificulta la cuantificación;
- Posible pérdida de material tóxico, si en los densos arrastres fitoplanctónicos hay roturas de células y su contenido pasa al agua de filtrado. En este caso obtendríamos una subestimación del contenido real de toxina por célula;
- Al dividirse el contenido de toxina del filtro o *pellet* entre el número de células de *Dinophysis* en él contenidas, se asume que sólo las células de *Dinophysis* presentes en la muestra contienen toxinas diarreicas;
- Presencia muy probable de especies acompañantes microzooplanctónicas (ciliados, tintínidos) y de otras dinoflageladas heterótrofas de tamaño próximo a las *Dinophysis* spp, que pueden predear sobre éstas, y contribuyen por tanto al contenido de toxina global del filtro. En este caso, el cálculo obtenido al dividir el contenido de toxina total entre el número de células de *Dinophysis* spp en el filtro puede dar lugar a importantes sobreestimaciones del contenido de toxina por célula;
- Se asume que el contenido de toxina por célula de cada especie de *Dinophysis* es constante durante los rangos de tiempo (1-2 semanas) acotados para el tratamiento estadístico de cada “pico” de toxinas revelado por los controles rutinarios de DSP en los bivalvos.

No obstante, las estimaciones de contenido de toxina por célula de *Dinophysis* a partir de muestras de arrastres de red pueden ser bastante precisas en ciertas circunstancias óptimas y considerando una serie de detalles:

- Cuando hay una sola especie de *Dinophysis* en la muestra, y el resto de la comunidad planctónica está constituida fundamentalmente por diatomeas (situación probable en las Rías Gallegas en algunas proliferaciones primaverales de *Dinophysis acuminata*);
- Las células del arrastre presentan buen aspecto (bien pigmentadas, sin roturas), pues si se trata de células envejecidas en la etapa final de la floración, o que se han manipulado inadecuadamente, gran parte de las toxinas y otros compuestos intracelulares pueden haberse escapado al medio circundante a través de cubiertas celulares porosas o incluso rotas;

- Si se diluye el arrastre, o mejor aún, si se separan fracciones de tallas, de forma que obtengamos una muestra en la que los *Dinophysis* objeto de estudio sean la especie dominante.

Otro punto importante a tener en cuenta es que los trabajos realizados hasta la fecha sobre el perfil de toxinas de las distintas especies de *Dinophysis* se han centrado en la investigación de la presencia de AO, DTX1 y DTX2, todas ellas toxinas de efecto realmente diarreogénico. Esto se ha debido, en la mayor parte de los casos, a la falta de patrones de referencia esenciales para los análisis cromatográficos, y a que se suponía que el AO y derivados eran los componentes mayoritarios del complejo de toxinas de las *Dinophysis*. No obstante, resultados de los últimos años aplicando espectrómetro de masas (EM) acoplado al sistema de cromatografía líquida (CL-EM), han revelado que otras toxinas polietéreas no diarreogénicas, como las pectenotoxinas, pueden constituir una parte importante del complejo de toxinas de *Dinophysis fortii* (Draisci *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998), *Dinophysis acuta* (Daiguji *et al.*, 1998) y *Dinophysis acuminata* (Yasumoto, 2002).

En la sección sobre naturaleza química de las toxinas diarreicas del capítulo 1 se habló de los diol-ésteres y las DTX4, compuestos derivados del AO que se han identificado en cultivos de *Prorocentrum lima* y *P. maculosum* (Yasumoto *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1992b). Los diol-ésteres y la DTX4 no se pueden estimar con los protocolos de extracción habituales, los cuales favorecen la hidrólisis enzimática de estos compuestos, antes de su análisis, con estererasas de las propias células del dinoflagelado, dando lugar a AO y DTX1 (Quilliam *et al.*, 1996). Otros derivados del AO, los acil-derivados, globalmente denominados DTX3, han sido encontrados tan sólo en los extractos de bivalvos, por lo que se cree que son el resultado de transformaciones enzimáticas del AO, DTX1 y DTX2 en el propio bivalvo.

Tras esta extensa discusión se puede comprender que la estimación precisa e inequívoca de toxinas en células de *Dinophysis* debe hacerse a partir de muestras de células aisladas por micromanipulación, y congeladas inmediatamente. Por ello, el perfil de toxinas y el contenido de toxina por célula, en las tres especies de *Dinophysis* más abundantes en las Rías Bajas, se hizo a partir de aislamientos célula a célula, por micromanipulación, de poblaciones naturales muestreadas durante episodios de DST durante la primavera y otoño de 1997 y 1998. Adicionalmente, en las muestras de *D. acuminata* de junio del 98 se hicieron estudios preliminares sobre estimación indirecta de diol-ésteres y DTX4 en células aisladas individualmente, calculando la diferencia de niveles de AO entre células sometidas a un proceso de inactivación enzimática, y células de la misma población en las que sí se permitió la hidrólisis. Dada la baja concentración de *D. rotundata* y *D. tripos*, incluso en muestras concentradas de red, y su mínimo porcentaje de presencia (< 0.1 %) en relación con otras especies, no fue posible analizar estas dos especies.

Los objetivos globales del estudio fueron:

1. Determinar el perfil de toxinas diarreicas (AO y derivados) y el contenido de toxina por célula de las distintas especies de *Dinophysis* asociadas a los episodios de DST en Galicia;
2. Realizar investigaciones preliminares sobre la posible presencia de formas conjugadas del AO (diol-ésteres y DTX4) en especies de *Dinophysis*;
3. Estimar la contribución de cada especie de *Dinophysis* en los distintos episodios de detección de toxinas diarreicas;
4. Estudiar la relación de la variabilidad de contenido de toxina por célula con los distintos morfotipos (tamaño, forma) presentes en distintas estaciones del año, y distintas condiciones ambientales y etapas del crecimiento poblacional.

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento de células de Dinophysis spp

Las células de *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* se aislaron a partir de arrastres tomados durante episodios de DST acaecidos en las Rías Bajas en septiembre de 1997, y en junio y septiembre de 1998. Los arrastres fueron verticales, con redes planctónicas troncocónicas (10-20 μm de luz de malla), dotadas de un colector de PVC ciego, cilíndrico, de aproximadamente 1 l de capacidad, de forma que las células recogidas se mantenían en suspensión de agua de mar y no sufrían fuertes fricciones contra fondos de malla como ocurría con otros colectores de distinto diseño. Los arrastres se pasaban a continuación por malla de 100-150 μm para eliminar organismos microzooplanctónicos que interfieren en los aislamientos y que pastan sobre las *Dinophysis* spp haciendo disminuir su número.

Los aislamientos se hicieron por micromanipulación, con micropipetas capilares, de alícuotas del arrastre depositadas en cámaras de sedimentación. Para la operación se utilizó un microscopio invertido Zeiss, con aumentos de 25X y 100X. Las células aisladas se transfirieron dos o tres veces más a sendas cámaras con agua de mar filtrada por 0.22 μm para asegurar la ausencia de cualquier célula acompañante, y por último fueron tomadas y depositadas en un pequeño tubo, cuyo contenido (y posterior aclarado con agua de mar estéril) se filtró muy suavemente, mediante una trompa de vacío, a través de filtros Whatman GF/C de 2 cm de diámetro, previamente tratados a 400 °C durante 6 h para evitar interferencias de materia orgánica contaminante en los análisis cromatográficos. Los filtros marcados se congelaron inmediatamente a -30°C hasta el momento de la extracción. En la Tabla 8.2 se rela-

ciona el número de células aisladas de cada especie en cada episodio, o del contenido de células de *Dinophysis* en los arrastres de red filtrados y analizados. En el caso de *Dinophysis acuta* se hicieron aislamientos de células el mismo día que se tomaron del campo, y dos aislamientos posteriores, 5 y 9 días después de la recogida respectivamente; durante ese tiempo el arrastre se mantuvo en un contenedor de plástico en cámara isoterma con fotoperíodo L:O 14:10, a 15 °C. Estos arrastres de poblaciones de otoño, en períodos de relajación del afloramiento, o aún mejor durante pulsos de hundimiento, están dominados por grandes dinoflageladas con práctica ausencia de diatomeas, y se mantienen sin turbidez y putrefacciones durante varios días, a diferencia de los arrastres densos y dominados por diatomeas de primavera y de los períodos de afloramiento. En cualquier caso, la presencia inevitable de células muertas o dañadas y tecas vacías no afectaba a los resultados de los análisis, ya que tan sólo se aislaban con la micropipeta las células de *Dinophysis* con buen aspecto, pigmentadas y sin roturas.

Durante el episodio de *D. acuminata* de junio de 1998 se obtuvieron dos muestras de células aisladas por micromanipulación de esta especie a partir del mismo arrastre: una destinada a la determinación de AO libre y diol-ésteres (impidiendo la hidrólisis de formas conjugadas de las toxinas DSP mediante inactivación de las enzimas, según Quilliam *et al.*, 1996), y otra destinada a la investigación indirecta de la presencia de formas conjugadas provocando la hidrólisis enzimática de las mismas a AO y calculando la diferencia con la determinación anterior.

Extracción y Análisis de Toxinas por CLAE

El sistema empleado constaba de un cromatógrafo líquido de alta eficacia HEWLETT-PACKARD 1050, con una columna Merck Superspher 100-RP18 de 4 µm (250 x 4 mm). Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron:

- fase móvil: elución isocrática con CN:H₂O (80:20, flujo 1.1 ml min⁻¹)
- temperatura de la columna: 35 °C
- detector de fluorescencia HEWLETT PACKARD 1046A, con longitudes de onda de excitación y emisión de 365 nm y 412 nm respectivamente.

Se aplicaron dos métodos distintos para la extracción de las muestras:

Método 1: La mayor parte de los extractos se hicieron aplicando el método de Lee *et al.* (1987) con ligeras modificaciones: Se hace una doble extracción de cada filtro mediante sonificación con 2 ml de metanol (80%) durante 15 min, centrifugación y decantación del sobrenadante. Los extractos combinados se llevan a un volumen final de 5 ml. Una alícuota de esta muestra de volumen n (n ml), a la que se añade la mitad de volumen de H₂O (0.5 n ml), se extrae dos veces con un volumen y medio (1.5

n ml) de cloroformo. El extracto clorofórmico se lleva a un volumen preciso y posteriormente se seca con sulfato sódico. Se evapora una alícuota del extracto clorofórmico y se derivatiza con el reactivo fluoróforo 9-Antrildiazometano (ADAM).

Método 2: La DTX4 y los diol-ésteres, a diferencia del AO, no tienen un grupo carboxilo libre, y no pueden ser identificados mediante técnicas habituales de derivatización con fluoróforos como el ADAM. Su estudio requiere la aplicación de espectrometría de masas acoplada a CLAE. No obstante, se puede hacer una estimación indirecta de estos compuestos calculando la diferencia de niveles de AO entre células sometidas a un proceso de inactivación enzimática, y células de la misma población en las que sí se ha permitido la hidrólisis enzimática de estos compuestos. La diferencia de AO entre ambas extracciones se puede considerar una estimación de la cantidad de toxina que se encontraba en forma de DTX4 y/o de diol-ésteres. Por ello, para la detección de diol-ésteres y DTX4 en las muestras de *D. acuminata* de junio del 98 se precisó un protocolo de extracción distinto, similar al de Quilliam *et al.* (1996): Se suspendió un primer filtro en 0.5 ml de Tris-HCL (50 mM, pH 7.4) y se introdujo en agua hirviendo 3 min. Con este procedimiento se destruyen las enzimas antes de la extracción y se previene la hidrólisis de las formas conjugadas. Posteriormente se añadieron 2 ml de metanol y se sonicó la muestra durante 1 min. Después de 10 min de centrifugación se decantó el sobrenadante en tubo de vidrio. El filtro se sometió dos veces más a una extracción con 1 ml de metanol 80%. Un segundo filtro se suspendió en 0.5 ml de Tris-HCL (50 mM, pH 7.4) y se sumergió en nitrógeno líquido. Posteriormente se procedió a descongelar la muestra a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 horas. Con esto se estimula la hidrólisis enzimática de las formas conjugadas del AO. Seguidamente se añadieron 2 ml de metanol al 80% y se realizó el mismo tratamiento que con el primer filtro. Los extractos metanólicos obtenidos por ambos procedimientos se sometieron al procedimiento general de extracción, purificación y derivatización. La derivatización se realizó con reactivo ADAM (SERVA). Como estándares se utilizaron AO adquirido al National Research Council (NRC, Canadá), y DTX2 cedida por K. James (Cork, Irlanda).

RESULTADOS

La Fig. 8.1 muestra ejemplos de algunos de los cromatogramas obtenidos de especies de *Dinophysis* y de los estándares inyectados. En la Tabla 8.2 se relacionan las fechas de aislamientos de células, número de células aisladas y número de células correspondiente a la alícuota inyectada en el cromatógrafo, y contenido promedio de toxinas por célula. La Tabla 8.3 muestra la estimación de contenido medio de toxina por célula de *Dinophysis* en extractos de arrastres de red en los que había una fuerte dominancia de *D. acuta* sobre otras especies de *Dinophysis*.

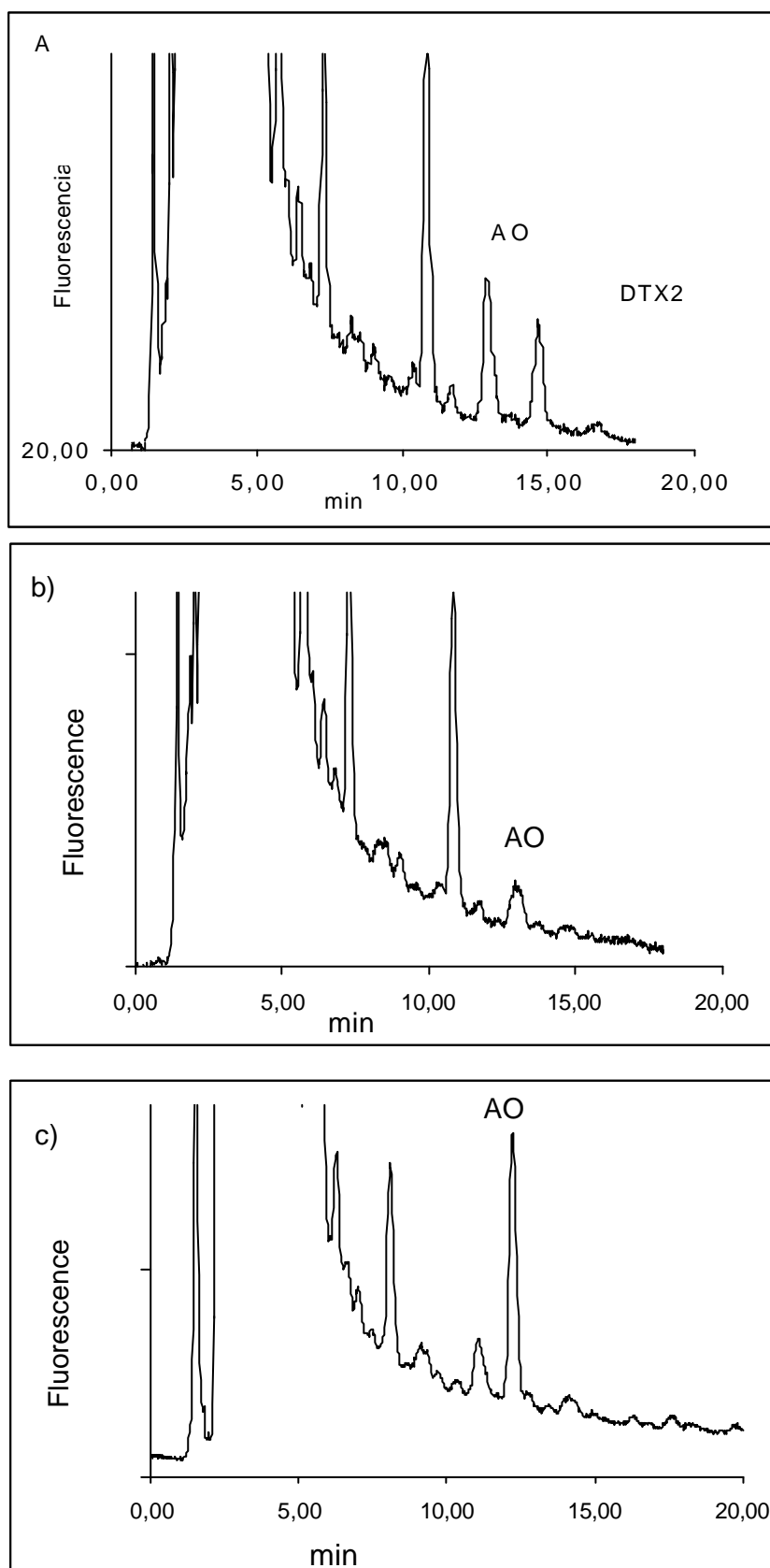


Figura 8.1. Cromatogramas obtenidos por cromatografía líquida de alta eficiencia de: a) *Dinophysis acuta*; b) *Dinophysis acuminata*; c) Estándar de ácido okadaico (AO).

Tabla 8.2. Contenido de toxinas ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) en células de distintas especies de *Dinophysis* de las Rías Bajas aisladas por micromanipulación a partir de poblaciones naturales. Las tallas de las células de *D. acuminata* (L=longitud; H= ancho dorso-ventral de la hipoteca) son la media de 45-50 individuos.

Especie	Fecha de arrastre	Fecha de Aislamiento	Nº células aisladas	Nº células inyectadas	Contenido Tóxico ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$)
<i>D. acuminata</i>	06.98 (L:48 μm , H:34 μm)	06.98	461 491	201 199	9.9 OA 7.9 OA
	8.09.98 (L:52 μm , H:36 μm)	9.09.98	857	246	21.7 OA
<i>D. acuta</i>	9.10.97	10.1.97	1250	308	10.7 6.3 OA 1. DTX2 OA: DTX2 = 3:2
	9.10.97	14.10.97	1214	412	55.1 33.1 OA 22.0 DTX2 OA: DTX2 = 3:2
	9.10.97	16.10.97	534	175	24.1 18.4 OA 5.7 DTX2 OA:DTX2 = 3:1
<i>D. caudata</i>	9.10.97	10.10.97	1388	342	0.73 OA

Tabla 8.3. Estimación del contenido de toxina ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) por célula de *Dinophysis* en extractos de arrastres de red en los que había una fuerte dominancia de *D. acuta*.

Células de <i>Dinophysis</i> filtradas	Fecha de Muestreo	Contenido de Toxina ($\text{pg} \cdot \text{cel}^{-1}$)
<i>D. acuta</i> (507934) <i>D. acuminata</i> (75044) <i>D. caudata</i> (5300)	28.08.90	2.6 OA:DTX = 1.6
<i>D. acuta</i> (26928) <i>D. caudata</i> (528)	2.10.90	4.0 OA: DTX2 = 1.5
<i>D. acuta</i> (45425) <i>D. caudata</i> (7820) <i>D. rotundata</i> (115)	22.10.90	0.6 OA: DTX2 = 1.5

Dinophysis acuminata: Se detectó AO en todas las muestras. En las muestras de Junio del 98, sometidas a dos tipos de extracción, las muestras en las que se evitaron transformaciones enzimáticas dieron un contenido de AO por célula ($7.9 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) inferior en un 20% al de las mismas células extraídas por el método de Lee *et al.* (1987), que presentaron $9.9 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$. Se observó un minúsculo pico con un tiempo de retención similar al de la DTX2. Las muestras de septiembre del 98 presentaron un contenido de toxina por célula 2-3 veces superior ($21.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) a las de junio. Hay que señalar que las células de *D. acuminata* de este episodio presentaban una talla muy elevada para los valores normalmente observados de esta especie en Galicia.

Dinophysis acuta: en las tres muestras analizadas se detectó AO y DTX2. En las dos primeras muestras la proporción AO:DTX2 fue aproximadamente 3:2. Se observaron importantes diferencias cuantitativas entre las muestras resultantes de aislamientos el mismo día del arrastre ($10.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) y las de arrastres mantenidos en el laboratorio 5 y 9 días (55.1 y $24.1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$ respectivamente).

Dinophysis caudata: aparece en el cromatograma un pico muy pequeño con el mismo tiempo de retención que el AO que podría interpretarse como trazas de AO ($\sim 0.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$).

DISCUSION

Resultados previos sobre la estimación de contenido tóxico de células de *Dinophysis* spp han puesto de manifiesto que existe una gran variabilidad en los valores obtenidos para cada especie en distintas zonas del mundo o incluso en la misma localidad (ver Tabla 8.1). Al no disponerse de cultivos de estas especies, resulta difícil determinar si esta variabilidad se debe a que estamos trabajando con cepas distintas de contenido tóxico muy diverso, o si por el contrario se trata de las mismas cepas respondiendo a distintas condiciones ambientales, o a poblaciones con distinta tasa de crecimiento y biovolumen. En el caso del complejo *D. acuminata*, el problema se complica por la gran variabilidad morfológica, o plasticidad que presenta esta especie. Es necesario, pues, obtener repetidas estimaciones de contenido de toxina por célula en series temporales durante distintas estaciones del año, y relacionar estos valores con el tamaño/forma de las células, y aún mejor, acompañar estos estudios de otros que determinen la variabilidad genética de las células procedentes de distintos episodios. En escalas de tiempo menores, hay que considerar que incluso a lo largo del ciclo celular puede haber una diferencia de $\pm 100\%$ en el contenido de toxina de una célula antes y después de la fisión celular; no obstante estas diferencias se suavizan si tenemos en cuenta el alto número de individuos utilizados por muestra, y las frecuencias de división generalmente moderadas que se observan en estas especies.

En estos resultados preliminares se establece por primera vez la presencia de DTX2 en *D. acuta* de las Rías Bajas gallegas. Cuando aún no había sido descrita la DTX2, Lee *et al.* (1989) establecieron que el AO ($9.4 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) era la única toxina presente en las células de *D. acuta* de las costas gallegas. La DTX2 fue identificada por primera vez a partir de mejillones irlandeses (Hu *et al.*, 1992a). Blanco *et al.* (1995) detectaron picos con comportamiento cromatográfico idéntico a la DTX2 en los análisis de muestras de arrastres fitoplanctónicos de las rías gallegas y sugirieron que la aparición de este compuesto pudiera estar asociada con la ocurrencia de *D. acuta*. Gago *et al.* (1996) y Vale & Sampayo (1996) confirmaron la presencia de DTX2 en mejillón de Galicia y Portugal respectivamente. Vale *et al.* (1998) mostraron que la aparición de DTX2 en bivalvos portugueses va asociada a la ocurrencia de *D. acuta*, mientras que James *et al.* (1999) demostraron mediante cromatografía microcapilar (μCLAE) y espectrometría de masas que la DTX2, que aparece con un cociente o proporción molar AO:DTX2 de 3:4 respecto al AO, es la toxina predominante en *D. acuta* en Irlanda. La razón AO : DTX2 obtenida para *D. acuta* en Galicia es de aproximadamente 3:2. Curiosamente, esta misma razón se observa en los datos obtenidos a partir de análisis de arrastres de poblaciones naturales multiespecíficas en las que *D. acuta* era la única especie de *Dinophysis* presente. Por ello, es importante señalar que en estudios previos, en los que no se consideraba más que la presencia de AO en el perfil tóxico de *D. acuta*, se pudo incurrir en subvaloraciones del contenido de toxina de hasta un 40% (suponiendo que la razón de AO : DTX2 fuera similar).

Resulta sorprendente el gran incremento de contenido de toxina observado en las células de *D. acuta* que se aislaron del arrastre tras 5 días de mantenimiento en el laboratorio. Una posible explicación sería que la tasa de división celular fue muy reducida (quizás por las manipulaciones del arrastre, o condiciones subóptimas en las cámaras de cultivo), mientras que la síntesis de toxinas DST podría haber continuado; es decir, que podría ser el resultado de un desequilibrio entre la tasa de división celular y la tasa de producción de toxina. Si asumiéramos una tasa de división celular nula, ello arrojaría una tasa de producción de toxina por célula (toxina- μ) de 0.33 d^{-1} . El descenso de toxina por célula obtenido tras 7 días de mantenimiento en la cámara de cultivo revelaría el principio del decaimiento del arrastre, y envejecimiento de las células, que se volverían más porosas y podrían "gotear" toxina al exterior. Los resultados obtenidos en este análisis y en estimaciones previas de Blanco *et al.* (1995) nos muestran que la DTX2 puede constituir hasta un 40% del total de toxinas. Ello no supone un problema en los análisis rutinarios mediante bioensayo de ratón, que estiman el efecto biológico del conjunto de toxinas diarreicas, pero si podría serlo en el caso de métodos alternativos (ensayos enzimáticos, sondas moleculares, etc.) que estiman el contenido de AO y son poco sensibles a la detección de DTX2.

Se confirma la variabilidad de contenido de toxina en *D. acuminata*. Los valores de otoño ($21.7 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$), dos veces más altos que los observados en verano (promedio: $9 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$), unidos a las altas concentraciones celulares alcanzadas ($26 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$, Maneiro *et al.*, 2000), explican la intensidad (la más alta registrada en la zona) de los episodios de DST en las Rías Bajas en 1998 (Bermúdez de la Puente *et al.*, 2000) en los que la especie de *Dinophysis* dominante fue *D. acuminata*, si bien no podemos olvidar la presencia de *D. rotundata*, que a pesar de sus bajas concentraciones debe tenerse en cuenta por los elevados valores observados en Japón ($101 \text{ pg AO} \cdot \text{cel}^{-1}$, Lee *et al.*, 1989) y los estimados a partir de arrastres con mezcla de especies de *Dinophysis* en Galicia (Blanco *et al.*, 2000).

En la única muestra estudiada de *D. acuminata* se detectó una diferencia de un 20% en el contenido de AO de muestras que habían sufrido o no hidrólisis de potenciales formas conjugadas. No obstante, los datos disponibles son muy escasos para poder confirmar o descartar la presencia, quizás minoritaria, de estas toxinas. Sin embargo, recientemente Moroño *et al.* (2000b) encontraron ésteres del AO en arrastres de red en los que *D. acuminata* era el dinoflagelado dominante. Tampoco podemos descartar la posible presencia de DTX2 en *D. acuminata* (de la que existen algunos indicios en el trabajo de Blanco *et al.*, 1995) de igual manera que la DTX1 acompaña al AO en *D. acuta* y *D. acuminata* de los fiordos noruegos (Johansson *et al.*, 1996).

La presencia de acil-derivados ha sido demostrada en bivalvos gallegos (Fernández *et al.*, 1996) y portugueses (Vale & Sampayo, 1999), pero hasta la fecha nadie ha demostrado la presencia de diol-ésteres o DTX4 en bivalvos expuestos a proliferaciones de especies de este género. Yasumoto *et al.* (1985) hipotetizaron que los acil-derivados podrían resultar de transformaciones metabólicas en las glándulas digestivas de los bivalvos. Suzuki *et al.* (1999) han aportado nuevas pruebas mostrando transformaciones de DTX1 a DTX3 en vieiras japonesas (*Patinopecten yessoensis*). Con respecto a la posible ocurrencia de diol-ésteres o DTX4 en bivalvos, Quilliam *et al.* (1996) sugirieron que en el caso de que los bivalvos ingirieran fitoplancton conteniendo estos compuestos, las esterases presentes en las glándulas digestivas de los moluscos los hidrolizarían a AO, DTX1 o DTX2.

La presencia de cantidades traza de AO en *D. caudata*, en una única muestra analizada, de septiembre de 1997, requiere confirmación en futuros análisis. No obstante, Blanco *et al.* (2000), aplicando análisis de regresión múltiple a los resultados de contenido de toxina total en arrastres fitoplanctónicos en 1994 (año en que *D. caudata* fue más abundante que lo normal) concluyeron que esta especie, en el período estudiado, debía contribuir poco o nada al contenido global obtenido de AO y derivados. Okaichi (1967) reportaron muertes de peces asociadas a mareas rojas de esta especie en el Golfo de Tailandia y en el Mar Interior de Seto, pero no se

investigaron las posibles causas (anoxia, elevado nivel de toxinas...) de esta mortalidad. Karunasagar *et al.* (1989) y Tahri-Joutei (1998) señalaron a *D. caudata* como el potencial agente de intoxicaciones diarreogénicas en el estado de Karnataka (India) y la costa Mediterránea de Marruecos respectivamente. Los datos presentados en este trabajo constituyen los primeros resultados sobre determinación de toxinas DST por CLAE en células de *D. caudata* aisladas por micromanipulación.

En este trabajo no se investigó (por falta de patrones y espectrómetro de masas) la posible presencia de pectenotoxinas en las especies de *Dinophysis* estudiadas. Pero dados los resultados obtenidos por algunos grupos de química analítica (Draisci *et al.*, 1996; Daiguji *et al.*, 1998; Suzuki *et al.* 1998) en Italia y Japón, era de esperar que estas toxinas liposolubles, tradicionalmente incluidas en el grupo DSP a pesar de no tener efecto diarreogénico, pudieran estar presentes en las células de *Dinophysis* de aguas gallegas. Trabajos muy recientes (Fernández *et al.*, 2002a, 2002b) aplicando estas avanzadas técnicas revelan que los arrastres planctónicos y las células de algunas especies de *Dinophysis* de las Rías Gallegas pueden tener elevados niveles de pectenotoxinas, y que algunos años el contenido de pectenotoxinas puede ser muy superior al contenido de AO + DTXs.

IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS PARA LOS PROGRAMAS DE SEGUIMIENTO DE TOXINAS DSP

Algunos programas de seguimiento, en países europeos, utilizan lo que denominan «Índice *Dinophysis*» para la gestión de episodios de presencia de toxinas DSP asociadas a las proliferaciones de especies del género *Dinophysis*. La aplicación de este índice consiste en utilizar las concentraciones detectadas de células de *Dinophysis* como criterio para emitir las órdenes de apertura y cierre de extracción de bivalvos. El argumento empleado es que, tras años de experiencia, los expertos dicen conocer a partir de qué umbral de concentración celular de *Dinophysis* (por ejemplo, a partir de $10^3 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) se detectan niveles de toxinas diarreicas superiores al nivel de regulación. La aplicación del índice *Dinophysis* presenta dos claras ventajas:

Evita el desarrollo de bioensayos de ratón, considerado como un método cruel hacia los animales;

Es más barato que los ensayos

No obstante este sistema es inaceptable como método fiable para proteger la salud pública por distintas razones. Así, durante muestreos intensivos de 24 h de *D. acuminata* en las rías gallegas se han encontrado diferencias de hasta un orden de magnitud en la concentración de células en muestras tomadas en la misma estación (Reguera *et al.*, 1996). Diferencias similares se pueden encontrar en bahías y estuarios según que el muestreo se haga durante la pleamar o la bajamar. Además, ya se comentó que la cantidad de toxina acumulada por los bivalvos viene determinada en

gran parte por la proporción que la biomasa de microalgas tóxicas representa respecto al total de seston disponible para los moluscos filtradores, y por el contenido de toxina por célula («calidad tóxica del alimento» *sensu* Blanco *et al.*, 1997). Los nuevos datos que se presentan aquí sobre variabilidad del contenido de toxina por célula de *Dinophysis*, junto con los problemas ya conocidos asociados al desarrollo de muestreos representativos de especies planctónicas poco abundantes y que presentan una gran heterogeneidad en su distribución espacial, contribuyen a debilitar aún más la validez del «Índice *Dinophysis*». Los defensores del uso de este índice deberían al menos estimar algún tipo de razón o cociente entre la población de *Dinophysis* y la población fitoplanctónica acompañante. Quizás «normalizar» las concentraciones de *Dinophysis* dividiéndolas entre la concentración de clorofila, tal como se llevó a cabo en el trabajo de Dahl & Johannessen (2001) en Noruega. En cualquier caso, es de esperar que la aplicación de este índice, sin considerar otros factores que afectan a la cinética de intoxicación de los bivalvos, dará lugar a numerosos falsos positivos y falsos negativos. Los falsos positivos son inadmisibles en zonas de intensa producción marisquera, como es el caso en las Rías Bajas gallegas. Los falsos negativos pueden acarrear problemas sanitarios que afectarían a los grupos de riesgo (niños, adultos sometidos a tratamientos que debilitan las defensas, etc.) entre los consumidores

Sin embargo, los contajes de células de *Dinophysis* pueden constituir una valiosa herramienta complementaria de los ensayos de detección de toxinas, que se puede utilizar como alerta temprana de la aparición de especies diarreogénicas. En Galicia, la detección de densas poblaciones de *Dinophysis* en muestreos oportunistas de plancton de red (muestras tomadas a veces por los propios mejilloneros) entre dos muestreos sucesivos de bivalvos para análisis de toxinas, desencadena una orden de «cierre cautelar» de extracción de bivalvos en las rías. En estas circunstancias, la aparición repentina en las rías de poblaciones de *Dinophysis* a principios de otoño, asociada a cambios del régimen de vientos, es interpretada por los expertos como una advección, forzada por el viento, de poblaciones de dinoflageladas nocivas previamente establecidos en la plataforma adyacente. Estas repentinas advecciones pueden provocar la rápida aparición de toxinas en el mejillón, por encima del nivel de regulación, en 1 ó 2 días. Si esto ocurriera a finales de semana, podría haber recolección de bivalvo tóxico que debería ser posteriormente decomisado en las depuradoras, o peor aún, en los camiones que transportan el producto a otros países europeos. Así pues, en estos casos excepcionales, la detección de abundantes células de *Dinophysis* promueve la prohibición de extracción de bivalvos, sin esperar al resultado de análisis de toxinas, como medida precautoria para evitar trastornos posteriores, altamente probables, que se confirmarán a las 24-48 h. Algunos países, presionados por el rechazo social al empleo de animales para experimentación, y buscando alternativas al bioensayo de ratón (que es un método lento en el caso de

determinación de toxinas lipofílicas), han optado por aplicar ensayos enzimáticos, tales como el ensayo de fosfatasa (Tubaro *et al.*, 1998; Vieytes *et al.*, 1998), como único método de detección de toxinas diarreicas en programas de control sanitario. Con esta práctica, se asume que el AO y derivados son las únicas toxinas lipofílicas presentes en las muestras en cantidades significativas.

Los resultados recientes, que muestran la presencia e incluso dominancia de pectenotoxinas (toxinas lipofílicas de efecto no diarreico, pero tradicionalmente incluidas en el complejo DSP), en arrastres de red planctónicos, células de *Dinophysis*, y extractos de bivalvos desaconsejan la opción del análisis enzimático de fosfatasa si no va acompañado de otros ensayos, ya que tan sólo se detectarían el AO y sus derivados. Tampoco se detectarían otras toxinas lipofílicas, como los azaspirácidos y las yesotoxinas, asociadas con las proliferaciones de otras especies de dinoflageladas que no incluyen a las *Dinophysis* spp. Todo ello ha provocado la publicación reciente de una decisión de la Comisión Europea (Anonymous, 2002) que modifica la antigua Directiva 91/492 (Anonymous, 1991), muy ambigua en lo que a control de toxinas lipofílicas se refiere. A partir de ahora, los programas de seguimiento de toxinas habrán de controlar la presencia no sólo de AO y derivados, sino también de yesotoxinas, pectenotoxinas y azaspirácidos. Para ello tendrán que aplicar ensayos de ratón modificados (Fernández *et al.*, 2002c), que detectan globalmente todas las toxinas lipofílicas, o alternativamente, aplicar análisis de CLAE o ensayos que consideren cada uno de estos grupos de toxinas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Variabilidad morfológica y ciclo vital de especies del género *Dinophysis*

- La gran variabilidad morfológica intraespecífica observada en especies de *Dinophysis* de una misma localidad se explica por la aparición de: a) distintos estadios de un ciclo vital polimórfico y del ciclo celular (células mitóticas y post-mitóticas); b) distintas etapas del crecimiento poblacional sometidas a distintas tasas de crecimiento, y c) distintos modos nutricionales, incluyendo procesos de mixotrofia que dan lugar a células hinchadas y muy vacuoladas.
- Las especies de *Dinophysis* estudiadas presentaron un patrón común de ciclo vital haplonte y polimórfico, si bien quedan algunos pasos por demostrar *in vitro* sobre las fases de hipozigoto y las primeras divisiones meióticas. La reproducción sexual es anisógama y los gametos se conjugan a través de un tubo de fertilización por el que se transfiere el material nuclear. La plasmogamia tiene lugar tras "engullimiento" de la célula pequeña por la grande.
- La capacidad de "desdiferenciación" de las células pequeñas (gametos) de *Dinophysis*, que pueden reconvertirse en células vegetativas, pudiera constituir una valiosa estrategia adaptativa para especies, como *Dinophysis acuminata*, con presencia permanente en el plancton bajo condiciones muy cambiantes.

Ecología y Dinámica de Poblaciones de especies de *Dinophysis*

- *Dinophysis acuminata* es la especie de *Dinophysis* más abundante en las rías gallegas, presenta períodos de crecimiento muy prolongados (marzo-octubre), y se observa bajo rangos muy amplios de salinidad (30 – 35.5 psu) y temperatura (13 – 22 °C). Su presencia se puede detectar a lo largo de todo el año.
- *Dinophysis acuta* es de carácter más nerítico y estacional, y prolifera en pulsos muy breves de otoño; se observó bajo rangos muy estrechos de temperatura (15.5 – 17 °C) y salinidad (< 35 psu).
- Se observaron máximos anuales de ambas especies en dos escenarios bien distintos: a) condiciones de estratificación termohalina (*D. acuminata*) o térmica (*D. acuta*) durante las cuales el máximo celular se sitúa en la picnoclina y los máximos y mínimos se ven fundamentalmente afectados por el régimen de afloramiento y b) condiciones de otoño, al final de la temporada de afloramiento, en las que se da una acumulación por interacciones físicas (pulsos de hundimiento) y biológicas (mantenimiento de grandes dinoflagelados nadadores en la capa superficial).

- Las proliferaciones excepcionales de *D. acuta* en el verano de 1988 y sobre todo en 1989, años de inusual sequía y elevada temperatura, se asociaron con el establecimiento de piconclinas más profundas y persistentes que favorecieron el crecimiento *in situ* de esta especie y acortaron el período de crecimiento de *D. acuminata*.
- Se observaron importantes diferencias biogeográficas al norte (Rías Altas) y al sur (Rías Bajas) de Cabo Finisterre : *Dinophysis sacculus* (descripción de Stein) proliferó tan sólo en las Rías Altas y *Dinophysis acuta*, al sur de Finisterre.

Toxinas lipofílicas y *Dinophysis spp*

- *Dinophysis acuminata* es el principal agente de episodios crónicos y persistentes (primavera-otoño) de presencia de toxinas diarreas (DST) en los bivalvos de la costa gallega. *D. acuta* y en menor grado *Dinophysis caudata* son causantes de episodios estacionales (otoño) de corta duración.
- La heterogeneidad espacio-temporal de las poblaciones de *Dinophysis* se correlaciona con la distribución vertical de toxinas diarreas en los mejillones de las cuerdas de batea.
- Las toxinas predominantes observadas en las células de *Dinophysis* son: ácido okadaico (AO) durante las proliferaciones de *D. acuminata* y AO, dinofisistoxina-2 (DTX2) y pectenotoxina-2 (PTX2) durante proliferaciones de *D. acuta* y *D. caudata*.
- Se observó una gran variabilidad intraespecífica en el contenido de toxina por célula de *Dinophysis*. Los escasos datos disponibles hasta la fecha no permiten establecer una relación entre la variabilidad de contenido de toxinas y las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, factores nutricionales) o factores intrínsecos de la población (variabilidad genética entre cepas, distintos estadios del crecimiento poblacional).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abé, T.H. (1967). The armoured Dinoflagellata: II. Prorocentridae and Dinophysidae (B): *Dinophysis* and its allied genera. Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 15 (1):37-78.
- Adachi, M., Sako, Y. & Ishida, Y. (1996). Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8 ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J. Phycol. 32: 424-432.
- Alvito, P., Sousa, I., Franca, S. & Sampayo, M.A. de M. (1990). Diarrhetic shellfish toxins in bivalve molluscs along the coast of Portugal. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 443-448.
- Andersen, P., Hald, B. & Emsholm, H. (1996). Toxicity of *Dinophysis* in Danish coastal waters. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 281-284.
- Anderson, D.M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. In: Okaichi, T., Anderson, D.M. & Nemoto, T. (Eds.), Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Elsevier, New York, pp.11-16.
- Anderson, D.M. (1995). Identification of harmful algal species using molecular probes: An emerging perspective. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing, Paris, pp. 3-13
- Anderson, D.M., Sullivan, J.J. & Reguera, B. (1989). Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Toxicon 27(6): 665-674
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Keafer, B.A. & Berdalet, E. (1999). Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labelling intensity with physiological condition. J. Phycol. 35: 870-883.
- Anónimo (1992). Panel Intergubernamental COI-FAO sobre Floraciones de Algas Nocivas (IOC-FAO/IPHAB-I/3), París, 23-25 de junio de 1992. Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO. Informes de los Órganos Rectores y de los Órganos Subsidiarios Principales, 62 pp.
- Anonymous (1991). Council Directive 91/492/EEC of 15 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. Off. J. Eur. Communities L268: 1-14.
- Anonymous (1993). Report of the ICES-IOC Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics. National Reports. International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1993/ENV:7 Ref. L, 153 pp.
- Anonymous (1996). Report of the ICES-IOC Working Group on Harmful Algal Bloom Dynamics. National Reports. International Council for the Exploration of the Sea C.M. 1996/L:4 Ref. C, 142 pp.
- Anonymous (1997). Council Directive 97/61/EEC of 20 October 1997 that modifies the Annex of Directive 91/492/EEC that lays down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. Off. J. Eur. Communities L295: 35-36.
- Anonymous (2002). Decisión de la Comisión 2002/225/CE de 15 de marzo de 2002, por la que se establecen normas detalladas para la aplicación de la Directiva 91/492/CEE del Consejo. Off. J. Eur. Communities L75: 62-64
- Arévalo, F., Valcárcel, J.A., Domonte, M. & Vázquez, M.J. (1994). Estudio comparativo de los resultados obtenidos por bioensayo y HPLC e la determinación de biotoxinas DSP. Datos preliminares. In: Mariño, J. & Maneiro, J. (Eds.), Actas de la III Reunión Ibérica sobre fitoplancton tóxico y biotoxinas. Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, pp. 89-93.
- Arévalo, F., Bermúdez de la Puente, M., Domonte, M., Pérez, M., Salgado, C., Vázquez, M.J. & Valcárcel, J.A. (1995). Biotoxinas PSP y DSP en las Rías Gallegas: Control y evolución durante los años 1993 y 1994. In: Matamoros E. & Delgado, M. (Eds.), IV Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Actas de la Reunión. Generalitat de Catalunya, Barcelona, pp. 39-51.
- Bagoien, E., Miranda, A., Reguera, B. & Franco, J.M. (1996). Effects of two PSP-producing

- dinoflagellates on the harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons* Norman. Mar. Biol. 126: 361-369.
- Bakun, A. (1973). Coastal upwelling indices, west coast of North America 1946-71. NOAA technical report NMFS SSRF- 671, U.S. Department of Commerce.
- Balech, E. (1976). Some Norwegian *Dinophysis* species (Dinoflagellata). Sarsia 61: 75-94.
- Balech, E. (1988). Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr. 1: 310 pp.
- Balech, E. (2002). Dinoflagelados tecados tóxicos del Cono Sur Americano. In: Sar, E.A., Ferrario, M.E. & Reguera, B. (Eds.), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Inst. Esp. Oceanogr., pp. 123-144.
- Bardouil, M., Berland, B., Grzebyk, D. & Lassus, P. (1991). L'existence de kystes chez les Dinophysiales. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. III 312: 663-669.
- Bates, S.S., Bird, C.J., De Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., Mcculloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A. & Wright, J.L.C. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1203-1215.
- Bauder, A.G., Cembella, A.D. & Quilliam, M.A. (1996). Dynamics of diarrhetic shellfish toxins from the dinoflagellate, *Prorocentrum lima*, in the bay scallop *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 433-436.
- Bell, G.R. (1961). Penetration of spines from a marine diatom into the gill tissue of lingcod (*Ophion elongatus*). Nature 192: 279-280.
- Benavides, H.R., Prado, L., Díaz, S. & Carreto, J.I. (1995). An excepcional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing, París, pp. 113-119.
- Berdalet, E. (1992). Effect of turbulence on the marine dinoflagellate *Gymnodinium nelsonii*. J. Phycol. 28: 267-272.
- Berdalet, E. & Estrada, M. (1993). Effects of turbulence on several dinoflagellate species. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 737 - 740.
- Berenguer, J.A., González, L., Jimenez, I., Legarda, M.T., Olmedo, J.B. & Burdaspal, P.A. (1993). The effect of commercial processing on the paralytic shellfish poison (PSP) content of naturally-contaminated *Acanthocardia tuberculatum* L. Food Addit. Contam.10: 217-230.
- Bermúdez de la Puente, M., Salgado, C. & Arévalo, F. (2000). Episodios tóxicos detectados en las Rías Gallegas durante los años 1997 y 1998: resultados y evolución. In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 73-74.
- Bhattacharya, D. (1997). An introduction to algal phylogeny and phylogenetic methods. In: Bhattacharya, D. (Ed.), Origin of algae and their plastids. Springer-Verlag/Wien, Austria, pp. 1-12.
- Bhaud, Y., Soyer-Gobillard, M.O. & Salmon, J.M. (1988). Transmission of gametic nuclei through a fertilization tube during mating in a primitive dinoflagellate, *Prorocentrum micans* Ehr. J. Cell Science 89: 197-206.
- Bialojan, C. & Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. Biochem. J. 256: 2283-290.
- Blanco, J. (1988). Quistes de dinoflagelados de las costas de Galicia. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 343 pp y 75 lam.
- Blanco, J. & Campos, M.J. (1988). The effect of water conditioned by a PSP producing dinoflagellate on the growth of four algal species used as food for invertebrates. Aquaculture 68: 289-298.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. & Martínez, A. (1995). From *Dinophysis* spp toxicity to DSP outbreaks: A preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Publishing, París, pp. 777-782.

- Blanco, J., Moroño, M.A., Franco, J.M. & Reyero, M.I. (1997). PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one and two compartment models and the effect of some environmental parameters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158: 165-175.
- Blanco, J., Moroño, A., Pazos, Y., Maneiro, J. & Mariño, J. (1998). Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: environmental and biological influences. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 204-207.
- Blanco, J., Pazos, Y., Arévalo, F., Salgado, C., Bermúdez de la Puente, M., Maneiro, J. & Moroño, A. (2000). Contenido de ácido okadaico de las células de *Dinophysis* responsables de varios episodios tóxicos en las Rías Gallegas. In: Márquez, I. (Ed.), *Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas*. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 127-138.
- Blanton, J.O., Atkinson, L.P., Fernández de Castillejo, F. & Lavín, A. (1982). Coastal upwelling off the Rías Bajas, Galicia, NW Spain. I. Hydrographic studies. I CES Symposium on Biological productivity of continental shelves in temperate zones of the North Atlantic, Kiel, 2-5 March 1982.
- Bolch, C.J. (2001). PCR protocol for genetic identification of dinoflagellates directly from single cysts and plankton cells. *Phycologia* 40 (2): 162-167.
- Bockstahler, K.R. & Coats, D.W. (1993). Spatial and temporal aspects of mixotrophy in Chesapeake Bay dinoflagellates. *J. Eur. Microbiol.* 40: 49-60
- Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R. & Pompei, M. (2001). Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridinales, Dinophyta) in the north-western Adriatic Sea (Italy). In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. & Lewis, R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 137-140.
- Bravo, I., Reguera, B. & Fraga, S. (1995a). Description of different morphotypes of *Dinophysis acuminata* complex in the Galician Rias Bajas in 1991. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publishing, París, pp. 21-26.
- Bravo, I., Delgado, M., Fraga, S., Honsell, G., Montesor, M. & Sampayo, M.A. de M. (1995b). The *Dinophysis* genus: toxicity and species definition in Europe. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publishing, París, pp. 843-845.
- Bricelj, V.M. & Shumway, S.E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6(4): 315-383.
- Brockmann, U.H., Eberlein, K., Hentzschel, G., Schöne, H.K., Siebers, K., Wandschneider, K. & Weber, A. (1977). Parallel plastic tank experiments with cultures of marine diatoms. *Helgol. Wiss. Meer.* 30: 201-216.
- Burgess, V., Seawright, A., Shaw, G. & Moore, M.R. (in press). The acute oral toxicity of pectenotoxin-2-seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2-seco acid in mice. In: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J. & Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2003, Santiago de Compostela, 2003.
- Burkholder, J.M., Noga, E. J., Hobbs, C.W. & Glasgow Jr., H.B. (1992a). New "phantom" dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature* 358: 407-410.
- Burkholder, J.M., Noga, E.J., Hobbs, C.W., Glasgow Jr., H.B. & Smith, S.A. (1992b). New "phantom" dinoflagellate is the the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature* 360:768.
- Burkholder, J.M., Glasgow Jr., H.B. & Lewitus, A.J. (1998). Physiological ecology of *Pfiesteria piscicida*. General comments on "ambush-predator" dinoflagellates. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series. Series G, Ecological Sciences, Vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 175-192.
- Campos, M.J., Fraga, S., Mariño, J. & Sánchez, F.J. (1982). Red tide monitoring programme in NW Spain. Report of 1977-1981. International Council for the Exploration of the Sea, C.M.1982/L:27, 8 pp.
- Carlsson, P., Granéli, E., Finenko, G., Maestrini, S. (1995). Copepod grazing on a phytoplankton

- community containing the toxic dinoflagellate *Dinophysis*. J. Plankton Res. 17: 1925-1938
- Carpenter, E.J. & Chang, J. (1988). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. Mar. Ecol. Prog. Ser. 89: 83-93.
- Carpenter, E.J., Janson, S., Boje, R., Pollehne, F. & Chang, J. (1995). *Dinophysis norvegica*: biological and ecological observations in the Baltic Sea. Eur. J. Phycol. 30: 1-9.
- Carreto, J.I., Benavides, H.R., Negri, R.M. & Glorioso, P.D. (1986). Toxic red tide in the Argentine Sea: phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. J. Plankton Res. 8 (1): 15-28.
- Cembella, A.D. (1989). Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis* spp from the Eastern coast of North America. J. Appl. Phycol. 1: 307-310.
- Cembella, A.D., Quilliam, M.A., Lewis, N.I., Bauder, A.G. & Wright, J.L.C. (1998). Identifying the planktonic origin and distribution of spirolides in coastal Nova Scotian waters. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 481-484.
- Cetta, C.M. & Anderson, D.M. (1990). Cell cycle studies of the dinoflagellates *Gonyaulax polyedra* Stein and *Gyrodinium uncatenum* Hulbert during asexual and sexual reproduction. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 135: 69-84.
- Chang, J. & Carpenter, E. J. (1988). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. II. DNA quantification and model verification in the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44: 287-296.
- Chang, J. & Carpenter, E.J. (1991). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. V. Application to natural populations in Long Island Sound. Mar. Ecol. Prog. Ser. 78: 115-122.
- Clarke, K.R. & R.M. Warwick (1994). Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. National Environmental Research Council, Bornemouth, U.K., 144 pp.
- Claparède, E. & Lachmann, J. (1858-1859). Etude sur les infusoires et les rhizopodes. Mém. Inst. Genev. 5-6: 1-489.
- Clément, A., Lembeye, G., Lassus, P. & Le Baut, C. (1994). Bloom superficial no tóxico de *Dinophysis* cf. *acuminata* en el estero de Reloncaví. XIV Jornadas de Ciencias del Mar y I Jornada chilena de Salmonicultura, 23-25 de mayo de 1994. Resúmenes, p. 83.
- Coats, D.W., Tyler, M.A. & Anderson, D.M. (1984). Sexual processes in the life cycle of *Gyrodinium uncatenum* (Dinophyceae): a morphogenetic overview. J. Phycol. 20: 151-156.
- Cohen, P., Holmes, C.F.B. & Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem. Sci. 15: 98-102.
- Dahl, E. & Yndestad, M. (1985). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway in the autumn 1984 related to the occurrence of *Dinophysis* spp. In: Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 495-500.
- Dahl, E., Lindahl, O., Paasche, E. & Thronsen, J. (1989). The *Chrysochomulina polylepis* bloom in Scandinavian waters during spring 1988. In Coper, E.M., Bricelj, M. & Carpenter, E.J. (Eds.), Novel Phytoplankton Blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms. Springer-Verlag, Berlin: 383-405.
- Dahl, E., Aune, T. & Aase, B. (1996). Reddish water due to mass occurrence of *Dinophysis* spp. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 265-267.
- Dahl, E. & Johannessen, T. (2001). Relationship between occurrence of *Dinophysis* species (Dinophyceae) and shellfish toxicity. Phycologia 40: 223-227.
- Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishop, A., MacKenzie, L., Naoki, H. & Yasumoto, T. (1998). Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. Chemistry Lett. 653-654.
- Delgado, M., Garcés, E. & Camp, J. (1996). Growth and behaviour of *Dinophysis sacculus* from NW Mediterranean Sea. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 261-264.

- Delgado, M., Santmartí, M., Vila, M., Garcés, E. & Camp, J. (2000a). Seguimiento del fitoplancton tóxico en las bahías del Delta del Ebro en los años 1997-1998. In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 51-58.
- Delgado, M., Vila, M., Garcés, E. & Camp, J. (2000b). Variabilidad morfológica en *Dinophysis caudata* y su delimitación con *Dinophysis diegensis*. In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 241-248.
- Delmas, D., Herbland, A. & Maestrini, S.Y. (1992). Environmental conditions which lead to increase in cell density of the toxic dinoflagellates *Dinophysis* spp in nutrient-rich and nutrient-poor waters of the French Atlantic coast. Mar. Ecol. Prog. Ser. 89: 53-61.
- Delwiche, C.F. & Palmer, J.D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In: Origin of algae and their plastids. Bhattacharya, D. (Ed.). Springer-Verlag/Wien, Austria, pp. 53-86.
- Dodge, J.D. (1982). Marine dinoflagellates of the British Isles. HMSO, London, 303 pp.
- Dodson, A.N. & Thomas, W.H. (1978). Reverse filtration. In: Sournia, A.(Ed.), Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology 6, UNESCO, Paris, pp. 104-107.
- Draisci R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P. & Poletti, R. (1996). First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. Toxicon 34 (8): 923-935.
- Draisci, R., Lucentini, L. & Mascioni, A. (2000). Pectenotoxins and Yessotoxins: Chemistry, Toxicology, Pharmacology, and Analysis. In: Botana, L.M. (Ed.), Seafood Toxicity: Mode of Action, Pharmacology, and Physiology of Phycotoxins. Marcel Dekker, New York, pp. 289-324.
- Edvardsen, B. (2002). Application of ploidy analysis and DNA sequencing to examine life cycles in harmful microalgal species. In: Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B. & Dale, B. (Eds.), LIFEHAB: Life history of microalgal species causing harmful blooms. Research in Enclosed Seas Series - 12, European Commission EUR 20361, Luxembourg, pp. 95-98.
- Edvardsen, B. & Paasche, E. (1998). Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M. (Eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO ASI series, Series G, Ecological Sciences n° 41, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 193-208.
- Edvardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Brubak, S., Dahl, E., Jakobsen, K. S. & Paasche, E. (2000). Genetic analysis of *Dinophysis* spp isolated from Norwegian waters. Abstracts of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, p.14.
- Edvardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Jakobsen, K.S., Medlin, L.K., Dahl, E., Brubak, S. & Paasche, E. (2003). Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. J. Phycol. 39: 395-408.
- Faust, M.A. (1993). Sexuality in a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 121-126.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E. & Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. Toxicon 34 (3): 381-387.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Cacho, E., Martínez, A. & Blanco, J. (1998). Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 449-452.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I. & Martínez, A. (1999). Toxinología y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Bajas Gallegas. In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 127-138.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I. & Martínez, A. (2001). Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from the Galician Rías Bajas. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. & Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 360-363.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco,

- J., González-Gil, S. & Reguera, B. (2002a). First report of pectenotoxin-2 and its seco-acid derivatives in phytoplankton from the Galician Rías Bajas (NW Spain) during autumn proliferations of *Dinophysis* spp. In: Abstracts of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela, 4-8 June 2002, p. 52.
- Fernández, M.L., Reguera, B., Lourés, P. & Míguez, A. (2002b). First report of pectenotoxins in isolated *Dinophysis caudata* cells determined by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, USA, October 2002, p. 91.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogéne, J. & Yasumoto, Y. (2002c). Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. In: Sar, E.A., Ferrario, M.E. & Reguera, B. (Eds.), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Inst. Esp. Oceanogr., Madrid, pp. 77-120.
- Figueiras, F.G. & Niell, F.X. (1987). Composición del fitoplancton de la Ría de Pontevedra (NO España). *Inv. Pesq.* 51: 371-409.
- Figueiras, F.G. & Fraga, F. (1990). Vertical nutrient transport during proliferation of *Gymnodinium catenatum* Graham in Ría de Vigo, northwest Spain. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 144-148.
- Figueiras, F.G. & Ríos, A.F. (1993). Phytoplankton succession, red tides and the hydrographic regime in the Rías Bajas of Galicia. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 239-244.
- Figueiras, F.G., Jones, K.J., Mosquera, A.M., Álvarez-Salgado, X.A., Edwards, A. & MacDougall, N. (1994). Red tide assemblage formation in an estuarine upwelling ecosystem: Ría de Vigo. *J. Plankton Res.* 16(7): 857-878.
- Figueiras, F.G., Gómez, E., Nogueira, E. & Villarino, M.L. (1996). Selection of *Gymnodinium catenatum* under downwelling conditions in the Ría de Vigo. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 215-218.
- Figueiras, F.G., Álvarez-Salgado, X.A., Castro, C.G. & Villarino, M.L. (1998). Accumulation of *Gymnodinium catenatum* in western Iberian shelf waters in response to poleward flowing slope currents. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 114 - 117.
- Flynn, K.J. (1998). Physiology of toxic microalgae with special emphasis on toxin production: construction of dynamic models. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 315-320.
- Fraga, F. (1981). Upwelling off the Galician coast, Northwest Spain. In: Richards F.A. (Ed.), Coastal Upwelling. American Geophysical Union, Washington D.C., pp. 176-182.
- Fraga, F. & Vives, F. (1960). Retención de partículas orgánicas por el mejillón en los viveros flotantes. *Reun. Prod. Mon. Expl. Pesq.* 4: 71-73.
- Fraga, F., Mouriño, C. & Manríquez, M. (1982). Las masas de agua en la costa de Galicia: junio-octubre. *Res. Exp. Cien. B/O "Cornide de Saavedra"* 10: 51-77.
- Fraga, F., Pérez, F.F., Figueiras, F.G. & Ríos, A.F. (1992). Stoichiometric variations on N, P, C, and O₂ during a *Gymnodinium catenatum* red tide and their interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 87: 123-134.
- Fraga, S., Mariño, J., Bravo, I., Miranda, A., Campos, M.J., Sánchez, J., Costa, E., Cabanas, J.M. & Blanco, J. (1984). Red tides and shellfish poisoning in Galicia (NW Spain). Special meeting on the "Causes, dynamics and effects of exceptional marine blooms and related events", Copenhagen, 4-5 October, 1984. International Council for the Exploration of the Sea C.M.1984/C:5, 10 pp.
- Fraga, S., Anderson, D.M., Bravo, I., Reguera, B., Steidinger, K. & Yentsch, C.M. (1988). Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ría de Vigo, Spain. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 27: 349-361.
- Fraga, S., Gallagher, S. & Anderson, D.M. (1989) Chain forming dinoflagellates: an adaptation to red tides. In: Okaichi, T., Anderson, D.M. & Nemoto, T. (Eds.), Red Tides. Biology, Environmental Science and Toxicology. Elsevier, New York, pp. 281-284.

- Fraga, S., Reguera, B. & Bravo, I. (1990). *Gymnodinium catenatum* bloom formation in the Spanish rías. In Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 149-154.
- Fraga, S., Bravo, I. & Reguera, B. (1993). Poleward surface slope current at the shelf break and blooms of *Gymnodinium catenatum* in Ría de Vigo (NW Spain). In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 245-249.
- Fukuyo, Y., Toyoda, Y. & Miyazaki, S. (1981). Dinoflagellates found in Sanriku coast. I. Genus *Dinophysis*. Otsuchi Mar. Res. Cent. Rep. 7: 3-23.
- Furnas, M.J. (1982). An evaluation of two diffusion culture techniques for estimating phytoplankton growth *in situ*. Mar. Biol. 70: 63-72.
- Gago, A., Rodríguez-Vázquez, J.A., Thibault, P. & Quilliam, M.A. (1996). Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. Nat. Toxins, 4 (2), 72-79.
- Galgani, F., Vincent, F. & Minier, C. (1994). Direct polymerase chain reaction from live algae. J. Mar. Biotechnol. 2: 1-5.
- Garcés, E., Delgado, M. & Camp, J. (1997). Phased cell division in natural population of *Dinophysis sacculus* and the *in situ* measurement of potential growth rate. J. Plankton Res. 19: 2067-2077.
- Garcés, E., Delgado, M., Massó, M. & Camp, J. (1998). Life history and *in situ* growth rate of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae, Pyrrophyta). J. Phycol. 34: 880-887.
- Garcés, E., Masó, M., Delgado, M., Vila, M. & Camp, J. (2000). Actualización de los resultados de las proliferaciones del dinoflagelado *Alexandrium taylorii* (Balech). In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 215-218.
- Garcés, E. & Massó, M. (2001). Phytoplankton potential growth rate *versus* increase in cell numbers: estimation of cell lysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 212: 297-300.
- Gentien, P. & Arzul, G. (1990). Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). J. Mar. Biol. Ass. U.K. 70: 571-581.
- Gentien, P., Lunven, M., Lehaître, M. & Duvent, J.L. (1995). *In situ* depth profiling of particle sizes. Deep Sea Res. 42: 1297-1312.
- Gestal, J.J., Hernández, J.M., Bao, O. & Martínez-Risco, Y.L. (1980). Brote de mitilotoxismo en la provincia de Coruña. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 4 (4): 3-29
- Giacobbe, M.G. & Gangemi, E. (1997). Vegetative and sexual aspects of *Dinophysis pavillardii* (Dinophyceae). J. Phycol. 33: 73-80.
- Giacobbe, M.G., Penna, A., Ceredi, A., Milandri, A., Poletti, R. & Yang, X. (2000). Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). Phycologia 39(3): 177-182.
- Gisselson, L.A., Granéli, E. & Carlsson, P. (1999). Using cell cycle analysis to estimate *in situ* growth rate of the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*: drawbacks of the DNA quantification method. Mar. Ecol. Prog. Ser. 184: 55-62.
- Godhe, A., Rehnstam-Holm, A.S., Karunasagar, I. & Karunasagar, I. (2002). PCR detection of dinoflagellate cysts in field samples from tropic and temperate environments. Harmful Algae 1: 361-374.
- Granéli, E., Anderson, D.M., Maestrini, S.Y. & Paasche, E. (1992). Light and dark carbon fixation by the marine dinoflagellate genera *Dinophysis* and *Ceratium*. International Council for the Exploration of the Sea. Marine Science Symposia 197, p. 274.
- Granéli, E., Codd, G.A., Dale, B., Lipiatou, E., Maestrini, S. & Rosenthal, H. (1999). EUROHAB: Harmful algal blooms in European marine and brackish waters. Research in Enclosed Seas Series - 5, European Commission EUR 18592, Luxembourg, 93 pp.
- Guillou, L. & Biegala, I.C. (2002). Different techniques to examine life cycles of phytoplankton or HAB species. In: Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B. & Dale, B. (Eds.), LIFEHAB: Life history of microalgal species causing harmful blooms. Research in Enclosed Seas Series - 12, European Commission EUR 20361, Luxembourg, pp. 99-101.
- Guillou, L., Nézan, E., Cueff, V., Erard-Le Denn, E., Cambon-Bonavita, M.A., Gentien, P. & Barbier, G. (2002). Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts. Protist 153: 223-238.

- Guzmán, L. & Campodonico, I. (1975). Marea roja en la Región de Magallanes. Publ. Inst. Pat. Ser. Mon. 9, 44 pp.
- Hackett, J.D., Maranda, L., Yoon, H.S. & Bhattacharya, D. (2003). Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of Dinophysis (Dinophysiales, Dinophyceae). J. Phycol. 39: 440-448.
- Hageltorn, M. (1989). Algal toxins contaminating shellfish and shellfish monitoring in Sweden. In: Natori, S., Hashimoto, K. & Ueno, Y. (Eds.), Mycotoxins and Phycotoxins '88. Elsevier, Amsterdam, pp. 289-294.
- Halim, Y. & Labib, W. (1996). First recorded toxic *Alexandrium minutum* Halim bloom. Harmful Algae News 14, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, p. 2.
- Hall, S. (1982). Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the northeast Pacific. Ph.D. thesis. University of Alaska Fairbanks, 196 pp.
- Hallegraeff, G.M. & Lucas, I.A.N. (1988). The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. Phycologia, 27: 25-42.
- Hallegraeff, G.M. & Hara, Y. (1995). Taxonomy of harmful marine raphidophytes. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides N° 33, UNESCO, Paris, pp. 365-371.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y. & Yasumoto, T. (1985). Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins. In: Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 383-388.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y. & Yasumoto, T. (1986). Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 27: 375-379.
- Hansen, G. (1993). Dimorphic individuals of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis norvegica* (Dinophyceae) from Danish waters. Phycologia, 32: 73-75.
- Hansen, P.J. (1991). *Dinophysis*: a planktonic dinoflagellate genus which can act both as a prey and as a predator of a ciliate. Mar. Ecol. Progr. Ser., 69: 201-204.
- Hernández-Becerril, D.U. (1992). *Dinophysis taylorii*, sp. nov. y otros *Dinophysis* de Baja California, México (Dinophyceae). Rev. Biol. Trop. 40 (1): 101-109.
- Herndl, G.J. (1992). Marine snow in the northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem. Mar. Microb. Food Webs 6: 149-172.
- Hewes, C.D., Mitchell, B.G., Moisan, T.A., Vernet, M. & Reid, F.M.H. (1998). The phycobillin signatures of chloroplasts from three dinoflagellate species: a microanalytical study of *D. caudata*, *D. fortii* and *D. acuminata* (Dinophysiales, Dinophyceae). J. Phycol. 34: 945-951.
- Hoek, C. van den, Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995). Algae. An introduction to Phycology. Cambridge University Press, 623 pp.
- Hu, T., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M.A., Walter, J.A. & Wright, J.L.C. (1992a). Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 54: 39-41.
- Hu, T., Marr, J., Defreitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A. & Wright, J.L.C. (1992b). New diol esters (of okadaic acid) isolated from cultures of *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. J. Nat. Prod. 55: 1631-1637
- Ishige, M., Satoh, N. & Yasumoto, T. (1988). Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2). Report from the Hokkaido Institute of Health 38: 15-19.
- Jacobson, D.M. & Andersen, R.A. (1994). The discovery of mixotrophy in photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophyceae): light and electron microscopical observations of food vacuoles in *Dinophysis acuminata*, *D. norvegica* and two heterotrophic dinophysoid dinoflagellates. Phycologia 33(2): 97-110.
- Jacobson, D.M. & Anderson, D.M. (1996). Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. J. Phycol. 32: 279-285.
- James, K.J., Bishop, A.G., Healy, B.M., Roden, C., Sherlock, I.R., Twohig, M., Draisci, R., Giannetti, L. & Lucentini, L. (1999). Efficient isolation of the rare diarrhetic shellfish toxin, Dinophysistoxin-2, from marine phytoplankton. Toxicon 37(2): 343-357.
- James K.J., Furey A., Lehane M., Ramstad H., Aune T., Hovgaard P., Morris S., Higman W., Satake M. & Yasumoto, T. (2002). First evidence of an extensive northern European

- distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon*. 40(7): 909-915.
- Jiménez, C., Niell, F.X., Figueiras, F.G., Clavero, V., Algarra, P. & Buela, J. (1992). Green mass aggregations of *Gyrodinium cf. aureolum* in the Ría de Pontevedra (NW Spain). *J. Plankton Res.* 14: 705-720.
- Johansson, N., Granéli, E., Yasumoto, T., Carlsson, P. & Legrand, C. (1996). Toxin production by *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* cells grown under nutrient sufficient and deficient conditions. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 277-280.
- Jones, P.D. (1991). In: Kawasaki, T., Tanaka, S., Toba, Y. & Taniguchi, A. (Eds.), *Long term variability of pelagic fish populations and their environment*. Pergamon Press, pp. 1-118
- Jorgensen, E. (1923). Mediterranean Dinophysiaceae. *Rep. Dan. Oceanogr. Exped.*, 2 (J2): 1-48.
- Karunasagar, I., Segar, K. & Karunasagar, I. (1989). Potentially toxic dinoflagellates in shellfish harvesting areas along the coast of Karnataka state (India). In: Okaichi, T., Anderson, D.M. & Nemoto, T. (Eds.), *Red Tides. Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 65-68.
- Kat, M. (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastroenteritis illness of mussel consumers. In: Taylor, D.L. & Seliger, H.H. (Eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, New York, pp. 215-220.
- Kat, M. (1984). Special meeting on causes, dynamics and effects of exceptional marine blooms and related events. *International Council for the Exploration of the Sea C:3*, 10 pp.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W. & Guillard, R.R.L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 11: 80-86.
- Kimmel, B.L. & Holt, J.R. (1988). Nutrient availability and patterns of polymorphism in the freshwater dinoflagellate *Ceratium hirundella*. *Arch. Hydrobiol.* 113: 577-592.
- Kofoid, C.A. (1907). Dinoflagellata of the San Diego Region. III. Description of new species. *Univ. Cal. Publ. Zool.* 3: 299-340.
- Kofoid, C.A. & Skogsberg, T. (1928). The Dinophysoideae. *Mem. Mus. comp. Zool. Har.* 51: 1-766 + 31 pl.
- Koike, K., Koike, K., Takagi, M., Ogata, T. & Ishimaru, T. (2000). Evidence of phagotrophy in *Dinophysis fortii* (Dinophysiales, Dinophyceae), a dinoflagellate that causes diarrhetic Korringa, P. & Roskam, R.T. (1961). An unusual case of mussel poisoning. *International Council for the Exploration of the Sea. C.M./Shellfish Committee* 49, 2pp.
- Korringa, P. & Roskam, R.T. (1961). An unusual case of mussel poisoning. *International Council for the Exploration of the Sea. C.M./Shellfish Committee* 49, 2pp.
- Kotaki, Y. (1989). Screening of bacteria which convert gonyautoxin 2,3 to saxitoxin. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 55: 1293.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C.V., Huyen, N.T.M., Hoc, N.C., Fukuyo, Y. & Kodama, M. (2000). Domoic acid production in *Nitzschia* isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *J. Phycol.* 36: 1057-1060.
- Koukaras, K. & Nikolaidis, G. (2002). Intense DSP associated with a *Dinophysis* bloom in Thermaikos Gulf (NW Aegean Sea, Greece). *Harmful Algae News* 23, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, p. 8.
- Kumagai, M., Yanagi, T., Murata, M., Yasumoto, T., Kat, M., Lassus, P. & Rodríguez-Vázquez, J.A. (1986). Okadaic acid as the causative toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.* 50(11): 2853-2857.
- Lancelot, C. (1995). The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of the North Sea. *The Science of the Total Environment* 165: 83-102.
- Lancelot, C., Billen, G., Sournia, A., Weisse, T., Colijn, F., Veldhuis, M., Davies, A. & Wassman, P. (1987). *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the continental coastal zones of the North Sea. *Ambio* 16: 38-46.
- Larsen, J. & Moestrup, q. (1992). Potentially toxic phytoplankton. 2. Genus *Dinophysis* (Dinophyceae). In: Lindley, J.A. (Ed.), *ICES Identification Leaflets for Plankton* 180: 1-12.
- Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, I., Truquet, P., Le Baut, C. & Pierre, M.J. (1985). *Dinophysis acuminata* distribution and toxicity along the Southern Brittany coast (France): correlation with hydrological parameters. In: Anderson, D.M., White, A.W. & Baden, D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, pp. 159-164.

- Lassus, P. & Berthomé, J.P. (1987). Toxicite des moules: etude de la decontamination PSP et DSP *in vitro* et *in situ*. I FREMER Dero-86.13-Mr Drv-86.01-Sr., 36 pp.
- Lassus, P., Bardouil, M., Berthome, J.P., Maggi, P., Truquet, P. & Le Dean, L. (1988). Seasonal occurrence of *Dinophysis* sp along the French coast between 1983 and 1987. *Aquat. Living Resour.* 1: 155-164.
- Lassus, P., Proniewski, F., Pigeon, C., Veret, L., Le Dean, L., Maggi, P., Bardouil, M. & Truquet, P. (1990). The diurnal vertical migrations of *Dinophysis* in an outdoor tank at Antifer (Normandy, France). *Aquat. Living Res.* 3: 143-145.
- Lassus, P. & Bardouil, M. (1991). Le complexe *Dinophysis acuminata*. I identification des espèces le long des côtes Françaises. *Cryptogamie Algal.* 12(1): 1-9.
- Lavín, A., Díaz del Rio, G., Cabanas, J.M. & Casas, G. (1991) Afloramiento en el NO de la Peninsula Iberica: I ndices de Afloramiento para el punto 43° N - 11° W en el período 1966-1989. I nf. Tec. I nst. Esp. Oceanogr. 91, 40 pp.
- Lawrence, J.E., Bauder, A.G., Quilliam, M.A. & Cembella, A.D. (1998). *Prorocentrum lima*, a putative link to diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 78-79.
- Lawrence, J.E., Grant, J., Quilliam, M.A., Bauder, A.G. & Cembella, A.D. (2000). Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 147-154.
- Lee, J.-S., Yanagi, T., Kenma, R. & Yasumoto, T. (1987). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51: 877-881.
- Lee, J.-S., Tangen, K., Dahl, E., Hovgaard, P. & Yasumoto, T. (1988). Diarrhetic shellfish toxins in Norwegian mussels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(11): 1953-1957.
- Lee, J.-S., Igarashi, T.T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P. & Yasumoto, T. (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1: 147-152.
- Lembeye, G., Campodonico, I., Guzmán, L. & Kiguel, C. (1981). Intoxicaciones por consumo de mariscos del estero de Reloncavi (X Región), Chile (1970-1980). *Jornadas Ciencias del Mar, Montemar 12-14/08/81. Resumen*, p.42.
- Lembeye, G., Yasumoto, T., Zhao, J. & Fernández, R. (1993). DSP outbreak in Chilean fiords. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 525-529.
- Lindahl, O. (1986). A dividable hose for phytoplankton sampling. In: Report of the Working Group on phytoplankton and management of their effects. International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1986/L:26, Annex 3.
- Loeblich, A.R. III (1982). Dinophyceae. In: Parker, E.S. (Ed.), *Sinopsis and classification of living organisms*, Vol. I. McGraw-Hill, New York, pp. 101-115.
- López, J. (1955). Variación alométrica en *Ceratium tripos*. *Inv. Pesq.* 2: 131-159.
- Lush, G.J. & Hallegraeff, G.M. (1996). High toxic potential of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* to *Artemia* larvae. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 389-392.
- Lush, G.J., Hallegraeff, G.M. & Munday, B.L. (1998). Histopathological effects in juvenile greenback flounder, *Rhombosolea taparina* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum*. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 609-610.
- MacDonald, E. (1994). *Dinophysis* bloom in West Scotland. *Harmful Algae News* 9, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, p. 3.
- MacKenzie, L. (1989). Observations on the ecology of *Dinophysis* spp. in New Zealand 1986-1989. Abstracts of the IV International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Lund (Sweden) 26-30 June 1989, p. 99.
- MacKenzie, L. (1992). Does *Dinophysis* (Dinophyceae) have a sexual life cycle? *J. Phycol.* 28: 399-406.
- MacKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mountfort, D. & White, D. (1998). Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In:

- Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 74-77.
- Maestrini, S.Y. (1998). Bloom dynamics and ecophysiology of *Dinophysis* spp. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M. (Eds.), Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO ASI series, Series G, Ecological Sciences n° 41, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 243-266.
- Maestrini, S.Y., Berland, B.R., Grzebyk, D., Spano, A.M. (1995). *Dinophysis* spp cells concentrated from nature for experimental purposes, using size fractioned and reverse migration. *Aquat. Microb. Ecol.* 9: 177-182.
- Maneiro, I., D'Aleo, O., Guisande, C. & Reguera, B. (1998). Interactions between the DSP agent *Dinophysis acuminata* and the microzooplankton community. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 386-389.
- Maneiro, I., Frangópulos, M., Guisande, C., Fernández, M.L., Reguera, B. & Riveiro, I. (2000). Zooplankton as a potential transmission vector of Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins through the food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201:155-163.
- Maneiro, I., Guisande, C., Frangópulos, M. & Riveiro, I. (2002). Importance of copepod faecal pellets to the fate of the DSP toxins produced by *Dinophysis* spp. *Harmful Algae* 1(4): 333-342.
- Marín, I., Aguilera, A., Reguera, B. & Abad, J.P. (2001a). A method for preparation of DNA suitable for molecular biology applications from single cell of dinoflagelates. *Biotechniques* 30(1): 88-93.
- Marín, I., Aguilera, A., González-Gil, S., Reguera, B. & Abad, J.P. (2001b). Genetic analysis of several species of *Dinophysis* causing diarrhetic shellfish outbreaks in Galicia (NW Spain). In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. & Lewis, R.J. (Eds.), Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 222-225.
- Mariño, J., Campos, M.J., Nunes, M.T., & Iglesias, M.L. (1985). Variación estacional de los factores ambientales y del fitoplancton en la zona de Lorbé (Ría de Ares y Betanzos) en 1978. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 2(1): 88-99.
- Marr, J., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M.A. & Wright, J.L.C. (1992). Detection of a new 7-O -acyl derivative of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 30: 1621-1630.
- Martin, J.L. & Richard, D. (1995). Shellfish toxicity from the Bay of Fundy, Eastern Canada: 50 years in retrospect. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 3-6.
- Masselin, P., Lassus, P. & Bardouil, M. (1992). High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycol.* 4: 385-389.
- McCall, H., Bravo, I., Lindley, J.A. & Reguera, B. (1996). Phytoplankton recognition using parametric discriminants. *J. Plankton Res.* 18(3): 393-410.
- McDuff, R.E. & Chisholm, S.W. (1982). The calculation of *in situ* growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: A clarification. *Limnol. Oceanogr.* 27(4): 783-788.
- McLachlan, J.L. (1993). Evidence for sexuality in a species of *Dinophysis*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 143 -146.
- McMahon, T. & Silke, J. (1998). Algal blooms and shellfish toxicity in Irish Coastal Waters. In Wilson, J.G. (Ed.), Eutrophication in Irish Coastal Waters. Royal Irish Academy, Dublin, pp. 106 -114.
- Miles, C.O., Aasen, J., Dahl, E., Samdal, I., Aune, T., Briggs, L.R., Olseng, C.D., Edvardsen, B. & Naustvoll, L.J. (2002). Yessotoxin in Norwegian blue mussels caused by *Protoceratium reticulatum*. In: Abstracts of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela, 4-8 June 2002, p. 99.
- Moestrup, q. (2002).
- Moita, M.T. & Sampayo, M.A. de M. (1993). Are there cysts in the genus *Dinophysis*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp.

- 153-158.
- Moroño, A., Pazos, Y. & Maneiro, J. (2000a). Evolución de fitoplancton tóxico y condiciones oceanográficas asociadas en los años 97-98 en las Rías Gallegas. In: Márquez, I. (Ed.), *Actas del Aula Ibérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas*. Junta de Andalucía, Sevilla, *Congresos y Jornadas 55/00*, pp. 59-66.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C. & Blanco, J. (2000b). Following the intoxication and detoxification processes caused by a *Dinophysis acuminata* bloom in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. In: Abstracts from the 3rd International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Long Island, USA, 19-23 June, 2000, p. 58.
- Morton, S.L. (2000). Detection of Dinophysistoxin-1 along the coast of Maine. In: Abstracts of the IX International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, Australia, 7-11 February 2000, p. 182.
- Morton, S.L., Moeller, P.D.R., Young, K.A. & Lanoue, B. (1998). Okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum* (Faust) isolated from the Belizean coral reef ecosystem. *Toxicon* 36(1): 201-206.
- Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y. & Yasumoto, T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.* 48: 549-552.
- Murata, M., Kumagai, M., Lee J.-S. & Yasumoto, T. (1987). Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett* 28: 5869-5872.
- Nagai, S. & Imai, I. (1998). Killing of a giant diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran by a marine bacterium *Alteromonas* sp. isolated from the Seto Inland Sea of Japan. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 402-405.
- Norte, M., Padilla, A., Fernández, J.J. & Souto, M.L. (1994). Structural determination and biosynthetic origin of two ester derivatives of okadaic acid isolated from *Prorocentrum lima*. *Tetrahedron* 50: 9175-9180.
- Okaichi, T. (1967). Red tides found in and around the Seto Inland Sea in 1965. *Tech. Bull. Fac. Agricul. Kagawa Univ.* 15: 181-185.
- Okaichi, T. & Nishio, Y. (1976). Identification of ammonia as the toxic principle of red tide of *Noctiluca miliaris*. *Bull. Plank. Soc. Japan* 23: 25-30.
- Oshima, Y., Sugino, H., Itakura, M., Hirota, M. & Yasumoto, T. (1990). Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 391-396.
- Palma, A.S., Vilarinho, M.G. & Moita, M.T. (1998). Interannual trends in the longshore distribution of *Dinophysis* off the Portuguese coast. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 124-127.
- Partensky, F. & Vaultot, D. (1989). Cell size differentiation in the bloom-forming *Gymnodinium* cf. *nagasakiense*. *J. Phycol.* 25: 741-750.
- Partensky, F., Gentien, P. & Sournia, A. (1991). *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* = *Gymnodinium* cf. *aureolum* (Dinophycées). In: Sournia, A., Belin, C., Berland, B., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Grzebyk, D., Marcaillou-Le Baut, C., Lassus, P. & Partensky, F. (Eds.), *Le Phytoplankton nuisible des côtes de France: de la biologie à la prévention*. IFREMER Publications, Brest, pp. 63-82.
- Paulsen, O. (1949). Observations on dinoflagellates. *K. danske Vidensk. Selsk. Biol. Skr.* 6(4):1-67.
- Pavillard, J. (1916). Recherches sur les péridiniens du Golfe du Lion. *Trav. Inst. Bot. Univ. Montpellier. Sér. Mixte, Mem.* 4: 9-70, pls. 1-3.
- Pazos, Y., Figueiras, F., Álvarez-Salgado, X.A. & Rosón, G. (1995). Hydrographic situations and species associated with the appearance of *Dinophysis acuta* and their probable cysts in the Ría de Arousa. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publishing, Paris, pp. 651-656.
- Peperzak, L., Snoeijer, G.J., Dijkema, R., Gieskes, W.W.C., Joordens, J., Peeters, J.C.H., Schol,

- C., Vrieling, E.G. & Zevenboom, W. (1996). Development of a *Dinophysis acuminata* bloom in the River Rhine plume (North Sea). In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 273-276.
- Pereira, P., Tavares, M.J., Vasconcelos, V. & Franca, S. (2000). Ocorrência de cianobactérias e microcistinas em águas doces superficiais, nos anos de 1996-98, nas regiões do centro e sul de Portugal. In: Márquez, I. (Ed.), Actas del Aula I bérica de Fitoplancton Tóxico y Fitotoxinas. Junta de Andalucía, Sevilla, Congresos y Jornadas 55/00, pp. 109-118.
- Pfiester, L.A. & Popovsky, J. (1979). Parasitic, amoeboid dinoflagellates. *Nature* 279: 421-424.
- Pfiester, L.A. & Anderson, D.M. (1987). Dinoflagellate reproduction. In Taylor, F.J.R. (Ed.), *The Biology of Dinoflagellates*. Bot. Monogr. 21. Blackwell & Univ. Calif. Press, pp. 611-48.
- Pinto, J.S. & Silva, E.S. (1956). The toxicity of *Cardium edule* L. and its possible relation to the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. *Notas Estud. Inst. Biol. Mar.* 12: 1-20.
- Prakash, A., Medcof, J.C. & Tennant, A.D. (1971). Paralytic shellfish poisoning in Eastern Canada. *Bull. Fish. Res. Board Can.* 117: 1-88.
- Prego, R. (1992). Flows and budgets of nutrient salts and organic carbon in relation to a red tide in the Ría of Vigo (NW Spain). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 289-302.
- Puel, O., Galgani, F., Dalet, C. & Lassus, P. (1998). Partial sequence of the 24S rRNA and PCR assay of the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 597-604.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W. & Windust, A.J. (1996). Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 289-292.
- Rampi, L. & Bernhard, M. (1980). Chiave per la determinazione delle peridinee pelagiche Mediterranee. Comitato Nazionale Energia Nucleare RT/BI O, Roma, 187 pp.
- Reguera, B. (1987). Variación estacional del fitoplancton de red en la Bahía de Santander. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 4(1): 1-12.
- Reguera, B. (2002a). Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. In Sar E., M. Ferrario & B. Reguera (Eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Inst. Esp. Oceanogr., Vigo (España), pp. 19-55.
- Reguera, B. (2002b). Small cells in *Dinophysis* spp: a life cycle strategy for phytoplankters with a holoplanktonic way of living?. In: Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B. & Dale, B. (Eds.), *LI FEHAB: Life history of microalgal species causing harmful blooms. Research in Enclosed Seas - 12*, European Commission EUR 20361, Luxembourg, pp. 60-63.
- Reguera, B., Bravo, I. & Fraga, S. (1990). Distribution of *Dinophysis acuta* at the time of a DSP outbreak in the rías of Pontevedra and Vigo (Galicia, NW Spain). *International Council for the Exploration of the Sea, C.M.* 1990/L:14, 8 pp.
- Reguera, B., Campos, M.J., Fraga, S., Mariño, J. & Bravo, I. (1991). The monitoring of Harmful Algal Blooms in Galicia (NW Spain). In: Frey, J.M. (Ed.), *Actes du Colloque sur les Biotoxines Marines*. C.N.E.V.A., París, 30-31 Janvier 1991, pp. 217-224.
- Reguera, B., Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A. & Martínez, A. (1993a). Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 553-558.
- Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S. & Carbonell, A. (1993b). Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp in Galician coastal waters. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 559-564.
- Reguera, B., Bravo, I. & Fraga, S. (1995). Autoecology and some life history stages of *Dinophysis acuta* Ehrenberg. *J. Plankton Res.* 17: 999-1015.
- Reguera, B., Bravo, I., MacCall, H. & Reyero, M.I. (1996). Phased cell division and other biological observations on *Dinophysis* spp populations during *in situ* cell cycle studies. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 257-260.
- Reguera, B. & González-Gil, S. (2001). Small cell and intermediate cell formation in species of

- Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 37: 318-333.
- Reguera, B., González-Gil, S. & Delgado, M. (2002). Formation of *Dinophysis dens* and *Dinophysis diegensis* from laboratory incubations of *Dinophysis acuta* and *D. caudata*. Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, USA, 21-25 October 2002, p. 241.
- Reguera, B., Garcés, E., Bravo, I., Pazos, Y. & Ramilo, I. (2003). *In situ* division rates of several species of *Dinophysis* estimated by a postmitotic index. *Mar.Ecol. Prog. Ser.* 249: 117-131.
- Rensel, J.E. (1993). Severe blood hypoxia of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) exposed to the marine diatom *Chaetoceros concavicornis*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 625-630.
- Riobó, P., Paz, B., Fernández, M.L., Fraga, S. & Franco, J.M. (2002). Lipophylic toxins from different strains of Ostreopocidaceae and Gonyaulacaceae. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, USA, 21-25 October 2002, p.244.
- Ríos, A.F., Fraga, F., Pérez, F.F. & Figueiras, F.G. (1996). Nutrient budget and production during a red tide of *Gymnodinium catenatum* in Ría de Vigo, NW of Spain. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 301-304.
- Rivkin, R.B. & Seliger, H.H. (1981). Liquid scintillation counting for ¹⁴C uptake of single algal cells isolated from natural populations. *Limnol. Oceanogr.* 26: 780-784.
- Rodríguez-Vázquez, J.A., Gago, A., Oshima, Y., Sugino, K., Lee, J.S. & Yasumoto, T. (1989). Analyses of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: Natori, S., Hashimoto, K. & Ueno, Y. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins'88*. Elsevier, Amsterdam, pp. 367-375.
- Sampayo, M.A. de M., Alvito, P., Franca, S. & Sousa, I. (1990). *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 215-220.
- Sampayo, M.A. de M. & Moita, M.T. (1993). Trying to cultivate *Dinophysis* spp. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 807-810.
- Santhanam, R. & Srinivasan, A. (1996). Impact of dinoflagellate *Dinophysis caudata* bloom on the hydrography and fishery potentials of Tuticorin Bay, South India. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 41-44.
- Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.-S. & Yasumoto, T. (1997a). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat Toxins* 5: 107-110.
- Satake, M., MacKenzie, A.L. & Yasumoto, T. (1997b). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat.Toxins* 5: 164-167.
- Satake, M., Ofuji, K., James, K.J., Furey, A. & Yasumoto, T. (1998a). New toxic event caused by Irish mussels. In Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Microalgae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 468-469.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., Mc Mahon, T., Silke, J. & Yasumoto, T. (1998b). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.
- Satake M., Tubaro, A., Lee, J.S. & Yasumoto, T. (1999). Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat. Toxins* 5: 107-110.
- Saunders, G.W., Hill, D.R.A., Sexton, J.P. & Andersen, R.A. (1997). Small-subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypothesis with molecular systematic methods. In: Bhattacharya, D. (Ed.), *Origin of algae and their plastids*. Springer-Verlag/Wien, Austria, pp. 237-259.
- Schnepf, E. & Deichgräber, G. (1984). "Myzocytosis", a kind of endocytosis with implications to compartmentation in endosymbiosis. Observations in *Paulsenella* (Dinophyta). *Naturwissenschaften* 71: 218-219.
- Schnepf, E. & Elbrächter, M. (1988). Cryptophycean-like double membrane bound chloroplast in

- the dinoflagellate *Dinophysis* Ehrenberg: evolutionary, phylogenetic and toxicological implication. *Botanica Acta* 101: 196-203.
- Schnepf, E. & Elbrächter, M. (1999). Dinophyte chloroplasts and phylogeny – a review. *Grana* 38: 81-97.
- Scholin, C.A. & Anderson, D.M. (1994). Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes. *J. Phycol.* 30: 744-754.
- Scholin, C.A. (1998). Development of nucleic acid probe-based diagnostics for identifying and enumerating harmful algal bloom species. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D. & Hellegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI series, Series G, Ecological Sciences n° 41, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 337-350.
- Scholin, C.A. & Anderson, D.M. (1998). Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 253-257.
- Scholin, C.A., Marin, R., Miller, P., Doucette, G., Powell, C., Howard, J., Haydock, P. & Ray, J. (1999). Application of DNA probes and a receptor binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.* 35: 1356-1367.
- Shumway, S.E. (1995). Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.* 3 (1): 1-31.
- Silva, E.S. (1971). The "small form" in the life cycle of dinoflagellates and its cytological interpretation. In: Farinacci, A. (Ed.), *Proceedings of the 2nd Planktonic Conference*, Roma 1970. Tecnosciencia, Roma, pp. 1157-1167.
- Silva, E.S. & Faust, M.A. (1995). Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia* 34 (5): 396-408.
- Slobodkin, L.B. (1953). A possible initial condition for red tides on the coast of Florida. *J. Mar. Res.* 12: 148-155.
- Smayda, T.J. (1990). Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L. & Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 29- 40.
- Solum, I. (1962). The taxonomy of *Dinophysis* populations in Norwegian waters in view of biometric observations. *Nytt. Mag. Bot.* 10: 5-32.
- Sournia, A. (1986). *Atlas du phytoplancton marin*. Vol. I. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 216 pp.
- Steidinger, K & Cox, E.R. (1980). Free-living dinoflagellates. In: Cox, E.R (Ed.), *Phytoflagellates*. Elsevier, North Holland, pp. 407-432.
- Steidinger, K.A. & Tangen, K. (1996). Dinoflagellates. In: Tomas, C.R. (Ed.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, San Diego, pp. 387-598.
- Stein, F.R. (1883). *Der organismus der Arthrodelen Flagellaten, nach eigene Forschungen in systematischer Reihenfolge bearbeitet*. Leipzig, pp. 1-30.
- Stosch, H.A. von (1964). Zum Problem der sexuellen Fortpflanzung in der Peridineengattung *Ceratium*. *Helgol. Wiss. Meer.* 10: 140-152.
- Stosch, H.A. von (1965). Sexualität bei *Ceratium cornutum* (Dinophyta). *Naturwiss.* 52: 112-113.
- Stosch, H.A. von (1973). Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *Br. Phycol. J.* 8: 105-134.
- Subba Rao, D.V., Pan, Y., Zitko, V., Bugden, G. & Mackelgan, K. (1993). Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 117-126.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H. & Yamasaki, M. (1998). Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallop. *J. Chromatog. A*, 815 155-160.
- Suzuki, T., Ota, H. & Yamasaki, M. (1999). Direct evidence of transformation of Dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-Dinophysistoxin-1 (Dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*.

- Toxicon 37 (1): 187-198.
- Suzuki, T., Mackenzie, L., Stirling, D. & Adamson, J. (2001). Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussels, *Perna canaliculus*. Toxicon 39: 507-514.
- Swift, E. & Durbin, E.G. (1972). The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* spp. can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. Deep Sea Res. 22: 151-165.
- Tahri-Joutei, L. (1998). *Gymnodinium catenatum* blooms on Moroccan waters. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 66-67.
- Tai, L.S. & Skogsberg, T. (1934). Studies on the Dinophysioidae, marine armoured dinoflagellates, of Monterey Bay, California. Arch. Protistenk., 82: 380-482.
- Taylor, F.J.R. (1973). Topography of cell division in the structurally complex dinoflagellate genus *Ornithocercus*. J. Phycol. 9: 1-10.
- Taylor, F.J.R. (1976). Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report of material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963-1964. Bibliotheca Botanica, Stuttgart, 234 pp. + 46 pl.
- Taylor, F.J.R. (1987a). Appendix: Taxonomy and classification. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), The Biology of Dinoflagellates. Bot. Monogr. 21. Blackwell & University of California Press, pp. 723-731.
- Taylor, F.J.R. (1987b). General group characteristics, special features of interest and short history of dinoflagellate study. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), The Biology of Dinoflagellates. Bot. Monogr. 21. Blackwell & University of California Press, pp. 1-23.
- Taylor, F.J.R. (1987c). Dinoflagellate morphology. In: Taylor, F.J.R. (Ed.), The Biology of Dinoflagellates. Bot. Monogr. 21. Blackwell & University of California Press, pp. 24-91.
- Taylor, F.J.R. (1993). The species problem and its impact on harmful phytoplankton studies, with emphasis on dinoflagellate morphology. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 81-86.
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T. & Yasumoto, T. (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. Toxicon 24: 1141-1151.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R. & Yasumoto, T. (1998). Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 470-472.
- Underdahl, B., Skulberg, O.M., Dahl, E. & Aune, T. (1989). Disastrous bloom of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae) in Norwegian coastal waters 1988 - Mortality in marine biota. Ambio 18: 265-270.
- Ushida, T., Matsuyama, Y. & Kamiyama, T. (1999). Cell fusion in *Dinophysis fortii* Pavillard. Bull. Fish. Environ. Inland Sea 1: 163-165.
- Utermöhl, H. (1931). Neue wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 5(2): 567-596.
- Vale, P. & Sampayo, M.A. de M. (1996). DTX-2 in Portuguese bivalves. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, Japan, pp. 539-542.
- Vale, P., Sampayo, M.A. de M. & Quilliam, M. (1998). DSP complex toxin profiles relation with *Dinophysis* spp occurrence and domoic acid confirmation by LC-MS in Portuguese bivalves. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 503-506.
- Vale P. & Sampayo M.A. de M. (1999). Esters of okadaic acid and Dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. Toxicon 37: 1109-1121.
- Vale, P. & M. A. De M. Sampayo (2002). First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in

- phytoplankton. *Toxicon* 40(7):989-996.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. (1995). *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, 623 pp.
- Varela, M. (1982). Composición y distribución del fitoplancton de las rías de Muros, Arosa y plataforma continental próxima en septiembre de 1978. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 7(2): 191-122.
- Varela, M., Campos, M.J., Penas, E., Sánchez, J., Larrañaga, A., Fernández de Castillejo, F., & Díaz del Río, G. (1987a). Composición y distribución del fitoplancton en la plataforma de Galicia durante la campaña BREGAN-684 (junio 1984). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 4: 75-94.
- Varela, M., Campos, M.J., Cabanas, J.M., Fernández de Castillejo, F. & Díaz del Río, G. (1987b). Composición y distribución del fitoplancton en la plataforma de Galicia durante la campaña BREGAN-984 (septiembre-octubre 1984). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 4: 95-106.
- Varela, M., Díaz del Río, G., Álvarez-Osorio, M.T. & Costas, E. (1991). Factors controlling phytoplankton size-class distribution in the upwelling area of the Galician continental shelf (NW Spain). *Sci. Mar.* 55: 505-518.
- Vaulot, D. (1992). Estimate of phytoplankton division rates by the mitotic index method: The f_{max} approach revisited. *Limnol. Oceanogr.* 37(3): 644-649.
- Vieytes, M.R., Fontal, O., Leira, F., Vieites, J.M. & Botana, L. (1997). A fluorescent microplate assay for Diarrhetic Shellfish Toxins. *Analytical Biochemistry* 248: 258-264.
- Villarino, M.L., Figueiras, F.G., Jones, K.J., Álvarez-Salgado, X.A., Richard, J. & Edwards, A. (1995). Evidence of *in situ* diel vertical migration of a red-tide microplankton species in Ría de Vigo (NW Spain). *Mar. Biol.* 123: 607-617.
- Weiler, C. S. & Chisholm, S.W. (1976). Phased cell division in natural populations of marine dinoflagellates from shipboard cultures. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 25: 239-247.
- Wood, E.F.J. (1954). Dinoflagellates in the Australian region. *Austral. J. Mar. Fresh. Res.*, 5(2): 171-351.
- Wooster, W.S., Bakun, A. & McLain, D.R. (1976). The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *J.Mar.Res.* 34: 131-141.
- Wyatt, T. (1995). Global spreading, time-series, models and monitoring. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le-Den, E., Gentien, P. & Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publishing, Paris, pp. 755-764.
- Yanagi, T., Murata, M., Torigoe, K. & Yasumoto, T. (1989). Biological activities of semisynthetic analogs of Dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agric. Biol. Chem.* 53: 525-529.
- Yasumoto, T. (2002). Latest findings on marine phycotoxins. In: Abstracts of the IV International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela, 4-8 June 2002, p. 153.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. & Yamaguchi, M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44: 1249-1255.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T. & Fujita, N. (1980). Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 1405-1411.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. & Clardy, J. (1985). Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron* 41: 1019-1025.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J.S. & Torigoe, K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In Natori, S., Hashimoto, K. & Ueno, Y. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 375-382.
- Yasumoto, T. & Murata, M. (1990). Polyether toxins involved in seafood poisoning. In: Hall, S. & Strichartz, G.R. (Eds.), *Marine Toxins*, American Chemical Society, Washington DC. , ACS Symposium Series 418: 120-132.
- Yasumoto, T., Igarashi, T., Furey, A., James, K.J. & Koike, K. (2002). Discovery of the origin of azaspiracids. In: Abstracts of the X International Conference on Harmful Algal Blooms, St. Petersburg, Florida, USA, 21-25 October 2002, p. 309.
- Zingone, A., Montresor, M. & Marino, D. (1998). Morphological variability of the potentially toxic dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyceae) and its taxonomic relationship with *D. pavillardii* & *D. acuminata*. *Eur. J. Phycol.* 33: 259-273.

ANEXO I

ANEXO I

AISLAMIENTO DE CÉLULAS PLANCTÓNICAS POR MICROMANIPULACIÓN PARA ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS MONOALGALES

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

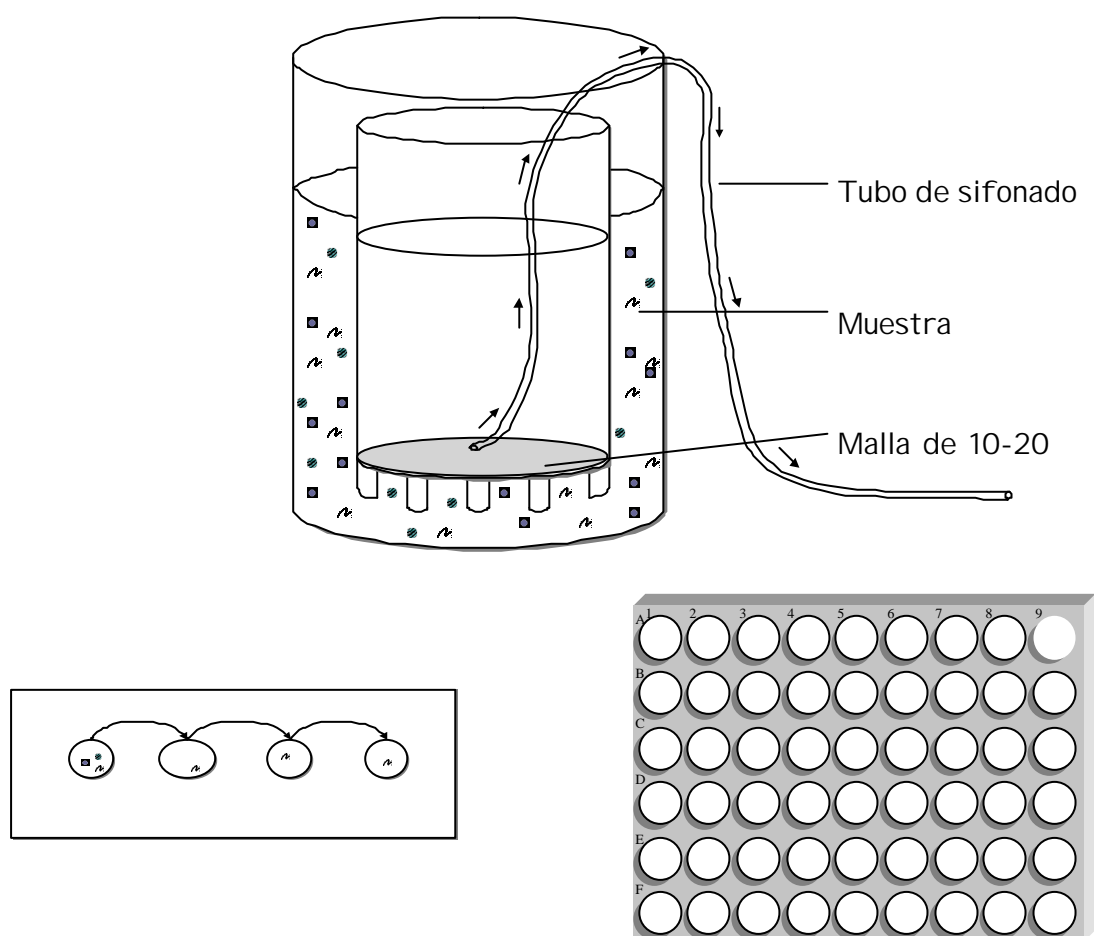


Fig. A.1. Ilustraciones de: la filtración inversa; el aislamiento de células de una gota de muestra de agua de mar (concentrada o no) y posteriores transferencias a nuevas gotas de agua de mar filtrada y estéril; cámara de cultivo celular.

Material y Métodos

El material requerido es:

- Pipetas Pasteur o pipetas microcapilares estériles que se han afinado previamente al fuego hasta conseguir un orificio de entrada de tamaño ligeramente superior al de las células que se pretenden aislar. Al cortar la punta estirada al fuego, evitar que queden aristas cortantes. Si las hubiera, cortar la boca del capilar con un cortador de diamante similar al empleado por los relojeros; alternativamente, cortar con un movimiento rápido sujetando con ambas manos el extremo a partir, y "sellar" las aristas mediante una rápida pasada por la llama (procurando que no se cierre la punta)
- Portaobjetos de vidrio, o varias cámaras de sedimentación, o cámaras de contaje tipo Sedgewick-Rafter.
- Agua de mar filtrada (0.22 μm) y esterilizada.
- Microplacas de cultivos celulares, con pocillos de 0.2 ml (96 pocillos distribuidos en rectángulos de 8 filas por 12 columnas), rellenos con medio de cultivo.
- Cilindro de PVC con fondo cubierto de red (10-20 μm), otro cilindro de PVC de mayor diámetro y fondo cerrado y un tubo flexible de plástico o de silicona de 50 cm (o más) de largo y varios mm de diámetro para sifonar el agua de mar hacia fuera de los dos cilindros superpuestos durante el proceso de filtración inversa.

El procedimiento a seguir es:

1. Se concentra, por filtración inversa, la muestra de agua de mar tomada con botella oceanográfica, manguera u otro contenedor (este paso puede evitarse si la especie a aislar se encontrara en concentración elevada ($> 10^4 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) (Fig.A.1).
2. Se depositan 1-2 gotas de la muestra concentrada en un portaobjetos de vidrio, y dos o tres gotas, separadas, de agua de mar filtrada y esterilizada. Alternativamente, se puede trabajar con varias cámaras de sedimentación o varias cámaras Sedgewick-Rafter: una en la que se deposita la muestra de agua de mar concentrada con los organismos a aislar, y las otras en las que se vierte agua de mar filtrada y esterilizada para los lavados sucesivos.
3. Se aíslan las células o cadenas de la especie de interés, una por una, al microscopio invertido mediante pipeta microcapilar; se transfieren a la gota de agua (o cámara) contigua de agua de mar estéril para ser lavadas de material acompañante. Se repite esta operación 2-3 veces para asegurar que las células o cadenas aisladas estén libres de otros organismos contaminantes que coincidían con la especie de interés en la muestra.

4. Se colocan las células o cadenas aisladas, en pocillos de cámaras de cultivo de tejidos con medio de enriquecimiento preparado con agua de mar filtrada y esterilizada de la zona de muestreo. Cada pocillo tiene sus coordenadas (letra de la fila y número de la columna), por lo que resulta sencillo hacer un seguimiento diario, anotado en un cuaderno, de la evolución de la célula/cadena inoculada en cada pocillo. Se incuban las cámaras bajo condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo lo más próximo posible a las condiciones ambientales. Algunas especies no comienzan a dividirse (y no puede por tanto establecerse el cultivo) si no se inocula un grupo de células (no una sola) en cada pocillo.
5. En un determinado número de pocillos (según la habilidad del aislador y la delicadeza del organismo a aislar) se observará división celular y aumento del número de células del alga de interés sin que se observen contaminantes. Cuando se alcance un número de 25-100 células (depende del tamaño de la microalga), se transferirá el contenido de un pocillo a un pequeño tubo de ensayo o matraz con 5-10 ml de medio de cultivo. El paso siguiente será transferir el cultivo monoalgal conseguido del pequeño tubo a otro de tamaño medio (30-50 ml) como los que normalmente se emplean en las colecciones de cultivo.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MICROALGALES PARA ANÁLISIS DE TOXINAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

- Para los análisis de contenido de toxinas en células de microalgas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) no es imprescindible manipular las células con tanta delicadeza como si el objetivo fuera establecer cultivos. Se puede partir de arrastres de red o concentrados celulares de laboratorio menos cuidadosos siempre y cuando nos aseguremos de que las células que se aíslan estén enteras y sanas, es decir, que no hayan sufrido roturas de la pared celular, o que no se trate de células viejas o mal mantenidas, con aspecto pálido y que podrían haber goteado al exterior buena parte de su contenido citoplasmático. Se siguen los mismos pasos que en los puntos 1-2-3 de la sección anterior.
- Tras aislar y «lavar» las células 2-3 veces, se pasan finalmente a un pequeño tubo con agua de mar filtrada y esterilizada, antes de ser finalmente filtradas por filtro de fibra de vidrio de pequeño tamaño (1-2 cm), previamente tratado a 400 °C durante 6 h para eliminar contaminantes orgánicos que interfieren con la posterior extracción y análisis cromatográfico. El pequeño filtro con las células retenidas se dobla cuidadosamente con ayuda de unas pinzas y se introduce en un tubo eppendorf de 1.5-2 ml, se etiqueta y se congela a -30 °C hasta el momento de análisis.
- Alternativamente, algunos expertos prefieren centrifugar las células aisladas y resuspender la «pellet» en un tubillo con el solvente empleado para la extracción.

- En el caso de aislamientos para análisis de toxinas mediante un tandem de cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas, dado que se requiere un número reducido de células (10-50 células), se introducen directamente las células en pequeños (0.2 ml) eppendorfs, de los utilizados para trabajos de sondas en biología molecular diseñados especialmente para los análisis de HPLC-MS. Incluso el último lavado de las células se puede hacer en una gota del TRI S amonio. De esta forma, no se arrastra con las células agua de mar u otros líquidos que podrían causar interferencias en el proceso de extracción. Las células aisladas en los tubillos se congelan inmediatamente. Alternativamente, se pueden tratar las células con calor (baño maría) antes del congelado para conseguir inactivar las enzimas endocelulares. De lo contrario, durante los períodos de congelación y descongelación, estas enzimas podrían catalizar transformaciones enzimáticas de las toxinas más inestables (ver material y métodos en el capítulo 8).

Mangueras

Este sencillo método de muestreo, basado en una manguera desmontable en varios tramos (Fig. A.2) fue descrito por Lindahl (1986) y su aplicación fue recomendada por el «Grupo de Trabajo sobre Fitoplancton y Gestión de sus Efectos» del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES), para los muestreos rutinarios en programas de seguimiento de especies de fitoplancton nocivo. El muestreador se prepara con tramos de manguera de PVC de jardinería, de 1.5-3 cm de diámetro, del largo deseado (1-5 m), unidos con válvulas de acoplamiento y llaves o grifos. El largo total de la manguera no debería superar los 15-20 m. Es preciso colocar un lastre, cerca de la boca inferior del sistema, cuidando que no obstruya la libre circulación de agua por la manguera, y asegurarse de que ésta se sumerja en el agua lentamente y en posición vertical. De lo contrario, los tramos de manguera muestreados no coincidirán con la profundidad esperada. El tramo superior de la manguera tendrá un largo igual al intervalo superior de la columna de agua muestreado, más la distancia comprendida entre la superficie del mar y la cubierta del barco. Se hará una marca en la parte de la manguera que debe coincidir con la superficie del mar al descenderla. Cuando se ha dejado bajar la manguera, verticalmente, hasta llegar a la marca de superficie, se cierra el grifo superior, y se sube toda la manguera a bordo. El muestreo con manguera es sencillo, económico, y presenta interesantes ventajas para los programas de seguimiento:

- a) Se obtiene una muestra integrada de la columna de agua, que permite análisis cuantitativos de los organismos fitoplanctónicos.
- b) Reduce considerablemente el número de muestras a analizar, pudiéndose muestrear un mayor número de estaciones con el mismo esfuerzo;

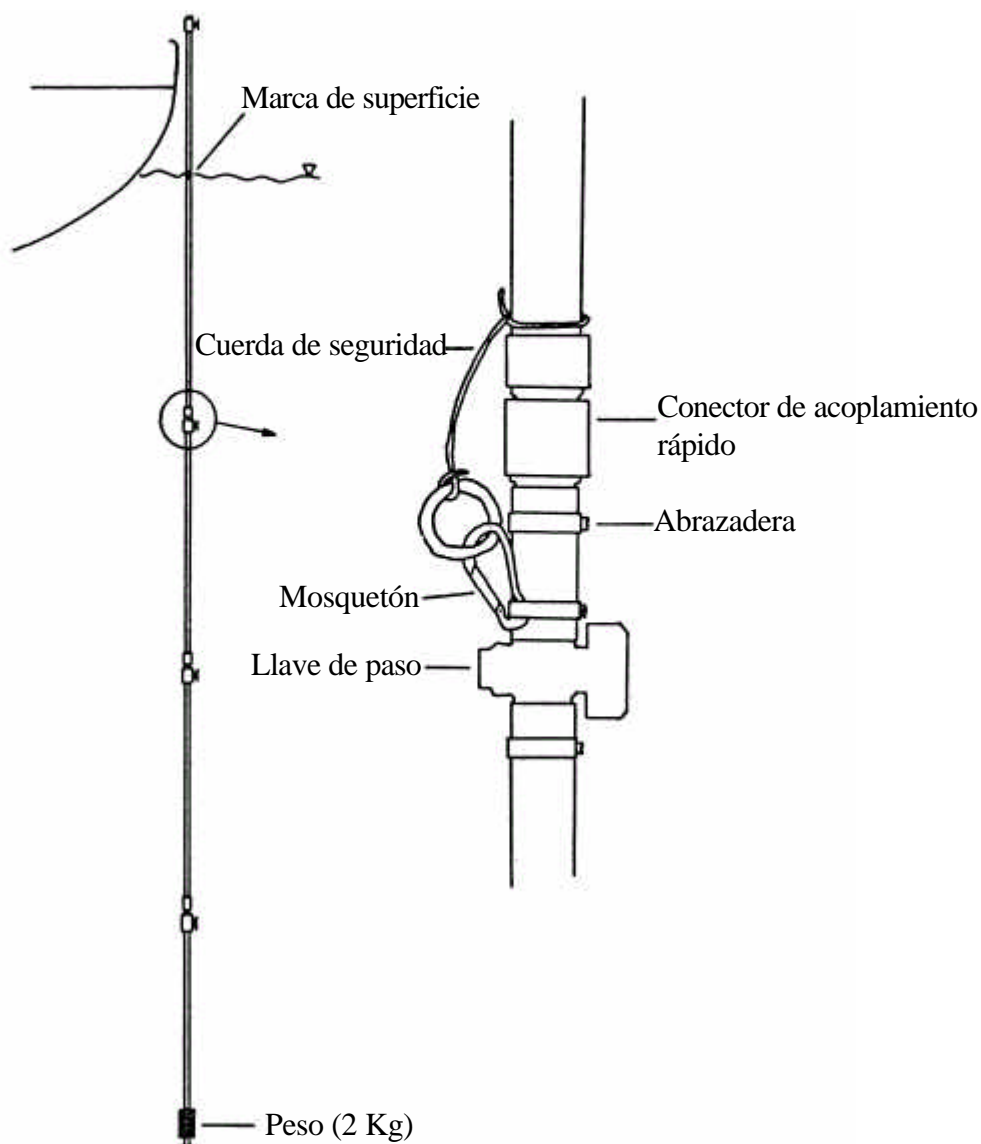


Fig. A.2. Manguera de PVC compuesta por tres tramos acoplados (y desmontables), de 5 m cada uno, con llaves de paso que permiten obtener una muestra integrada (0-15 m), o tres muestras integradas (0-5, 5-10, 10-15 m) (Lindahl, 1986).

- c) Proporciona una información aceptable, desde el punto de vista de la población, en el intervalo muestreado, que puede ser filtrada por los bivalvos; c) Si la manguera se divide en varios tramos (por ej., tramos de 5 m de longitud) fáciles de desacoplar, se puede obtener información adicional sobre distribución vertical del fitoplancton en los intervalos de la columna de agua correspondientes a la longitud de los tramos de manguera (0-5m; 5-10m; 10-15m en el caso del ejemplo anterior) lo cual es esencial si se muestrean dinoflagelados tóxicos con tendencia a agregarse en capas finas. La principal desventaja estriba en que no se obtiene una buena resolución de la distribución vertical de los organismos y que, en condiciones de mar agitada, es difícil conseguir que la manguera descienda perfectamente vertical.

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

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

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Floraciones Algas Nocivas es una expresión de carácter más socio-económico que científico con la que se designa cualquier acontecimiento o episodio de proliferación de microorganismos planctónicos, o incluso de microalgas bentónicas, que conlleve un efecto percibido como dañino por el hombre. Las *mareas rojas* son discoloraciones del agua de mar causadas por elevadas concentraciones ($\geq 10^6$ cel · l⁻¹) de microplancton. Muchas mareas rojas son totalmente inocuas si se producen en zonas con buen intercambio de aguas. Por el contrario, existen microalgas planctónicas productoras de toxinas o venenos tan potentes, que bastan unos pocos cientos o miles de células por litro para que conviertan en "no aptos para el consumo humano" a los bivalvos filtradores que se alimentan de ellas. A las proliferaciones de este último tipo de microalgas, que no causan discoloraciones aparentes, las denominaremos *episodios de algas tóxicas*. Una vez filtradas por los bivalvos y transmitidas a los consumidores, pueden dar lugar a episodios de *intoxicación por bivalvos*. Los episodios de intoxicación por bivalvo más conocidos y con mayor impacto en Europa son el PSP (Paralytic Shellfish Poisoning = Intoxicación Paralizante por Bivalvo), el DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning = Intoxicación Diarreica por Bivalvo) y el ASP (Amnesic Shellfish Poisoning = Intoxicación Amnésica por Bivalvo). En las Rías Gallegas, que constituyen el segundo productor (después de la R. P. China) y primer exportador mundial de mejillón ($25 \cdot 10^4$ t anuales), la ocurrencia crónica de episodios DSP y ASP obliga a establecer prolongados cierres en la extracción de mejillones de batea y otros bivalvos, causando considerables pérdidas al sector maricultor.

El síndrome de intoxicación diarreica por bivalvo (DSP), cuyos síntomas se confunden fácilmente con los de una gastroenteritis de origen bacteriano, fue descrito en Japón en 1978. En 1980 se identificó a la dinoflagelada *Dinophysis fortii* como el agente de estas intoxicaciones. A partir de esta fecha, las dinoflageladas del género *Dinophysis*, que son componentes frecuentes pero muy escasos de las comunidades de fitoplancton de todo el mundo, pasaron a ocupar un lugar preferente en las observaciones de los fitoplanctólogos, en especial de aquéllos responsables de programas de investigación y control de episodios de algas nocivas. Hasta hoy, nadie ha sido capaz de obtener cultivos estables de *Dinophysis* lo cual ha supuesto un importante freno a los avances en el conocimiento de la fisiología, ciclo de vida, ecología y toxicología de las especies de este género. Afortunadamente en los últimos años se han conseguido enormes avances tecnológicos en los campos de la biología molecular y de la química analítica que permiten purificar el DNA y analizar el contenido de toxinas en muestras cada vez más pequeñas. Así pues, la carencia de cultivos se ha

podido subsanar mediante el aislamiento, por micromanipulación, de muestras de varias unidades o decenas de células de *Dinophysis* a partir de concentrados de poblaciones naturales y también mediante incubaciones de individuos o grupos de células de *Dinophysis* en pequeños pocillos de placas de cultivo celular.

Dado el enorme impacto de las proliferaciones de *Dinophysis* en Galicia, urgía promover las investigaciones que contribuyeran a mejorar el conocimiento de la biología de las especies de este género. Los estudios presentados en esta tesis se desarrollaron en torno a tres grandes temas relacionados con las *Dinophysis* spp: a) Variabilidad morfológica y ciclos de vida de *Dinophysis* spp (Capítulos 2 y 3); b) Distribución espacio-temporal y dinámica de poblaciones de las principales especies de *Dinophysis* en la costa gallega (Capítulos 4, 5 y 6) y c) Identificación de las especies responsables de los episodios de intoxicación diarreica por bivalvo y determinación de su perfil de toxinas (Capítulos 7 y 8).

RESULTADOS

Variabilidad morfológica de las principales especies de Dinophysis en Galicia.

Dinophysis acuminata y *Dinophysis acuta* (Rías Bajas) son las dos especies de *Dinophysis* más abundantes en las costas de Galicia y las principales responsables de la presencia de toxinas diarreicas en los bivalvos. Otras especies habituales y menos abundantes en las costas gallegas son *D. caudata*, *D. tripos*, *D. sacculus* (Rías Altas), *D. rotundata* y *D. fortii*. Las especies de *Dinophysis* muestran una amplia variación morfológica dentro de la misma morfoespecie desarrollada en distintas regiones geográficas. Dentro de una misma localidad, se han observado también importantes variaciones intraespecíficas del tamaño y forma celular que se corresponden con transiciones morfológicas durante el proceso de división vegetativa o mitosis, distintos estadios del ciclo vital, o estados transitorios tras la ingestión de una presa. Las variaciones de tamaño y forma se han confirmado en incubaciones de laboratorio de individuos aislados por micromanipulación y en muestreos intensivos de campo en ciclos de 24 h. La existencia de formas pequeñas y formas intermedias en todas las especies estudiadas crea a veces incertidumbre en la clasificación taxonómica. En cuanto a las diferencias interespecíficas, la principal fuente de incertidumbre en aguas gallegas la constituye el par de especies muy allegadas *D. acuminata* - *D. sacculus*, cuando coexisten en una localidad con sus respectivas formas pequeñas e intermedias. En numerosos casos, los expertos se han cuestionado si estaban tratando con distintas formas de una misma especie o con distintas cepas. Sin embargo la respuesta definitiva a estas interrogantes sólo podrá obtenerse con estudios, frenados hasta tiempos recientes por la falta de cultivos, sobre la variabilidad genética (secuenciación de DNA) de estos organismos.

Formación de células pequeñas y células intermedias en el ciclo vital de especies de *Dinophysis* (*Dinophyceae*, *Dinophysiales*)

Las primeras observaciones de dos clases de tallas, con similar forma, en poblaciones naturales de *Dinophysis* Ehrenberg fueron citadas por Jorgensen (1923). Wood (1954) describió formas intermedias que constituían un continuum entre la típica célula vegetativa y la hipotética célula pequeña de la misma especie. La gran atención centrada en las especies del género *Dinophysis* agentes de DSP en la última década, ha dado como resultado la observación de nuevos casos de células pequeñas en especies del género - a veces con forma distinta que la de la correspondiente célula vegetativa -, individuos dimórficos, y parejas acopladas célula grande/célula pequeña. Este trabajo, basándose en observaciones *in situ* durante muestreos intensivos para estudios del ciclo celular de *Dinophysis acuminata* Claparède et Lachmann, *Dinophysis acuta* Ehrenberg, *Dinophysis caudata* Saville-Kent, y *Dinophysis tripos* Gourret; en incubaciones en laboratorio de *D. acuminata*; y en una amplia revisión de la información documentada disponible sobre variabilidad morfológica de *Dinophysis* spp, muestra que: a) Durante la división *in situ*, la mayor parte de las células en división presentan una fisión longitudinal normal, pero algunas (1-10%) sufren una fisión "depauperante" que da lugar a pares de células dimórficas con mitades distintas; b) Después de la separación y regeneración de las listas sulcales, estas células dimórficas se convierten en células similares a las descritas como *D. skagii* Paulsen, *D. dens* Pavillard, *D. diegensis* Kofoid y *D. diegensis* Kofoid var. *curvata*, que también pueden observarse formando parejas *D. acuminata*/*D. skagii*, *D. acuta*/*D. dens*, *D. caudata*/*D. diegensis* unidas por sus márgenes ventrales; c) las células pequeñas pueden crecer de nuevo alcanzando la talla normal, tal como se ha demostrado en incubaciones de laboratorio de *D. acuminata*, explicando en parte los casos de individuos con bandas intercalares, y las formas intermedias.

Si bien es cierto que el carácter sexual de las células pequeñas no quedará demostrado inequívocamente hasta que se pruebe la germinación de los potenciales quistes de resistencia, y que algunas formas intermedias podrían corresponder a estadios no descritos posteriores a la germinación de quistes, las observaciones aquí presentadas sugieren un patrón común de ciclo vital de las especies de *Dinophysis*. La variabilidad morfológica intraespecífica de *Dinophysis* spp. en una región geográfica concreta se puede atribuir en gran parte al proceso de formación de células pequeñas - que son parte del ciclo sexual de estas especies- como respuesta a condiciones ambientales cambiantes. Las células pequeñas parecen ser capaces de aumentar de tamaño dando lugar a formas intermedias y posteriormente a células vegetativas en el curso de un hipotético ciclo vital que sigue un patrón de tres bucles, común para las especies de *Dinophysis* estudiadas.

Tendencias en las poblaciones de Dinophysis spp en aguas gallegas.

Dinophysis cf *acuminata* y *D. acuta* son agentes de episodios de presencia de toxinas diarreicas (DST) en aguas gallegas. Entre 1985 y 1990, *D. cf acuminata* proliferó entre abril y septiembre en las Rías Bajas y hasta noviembre en las Rías Altas, y *D. acuta* a finales de verano o principios de otoño tan sólo en las Rías Bajas. Las etapas tempranas de incremento de la concentración de *D. acuminata* se asociaron con el calentamiento primaveral de la temperatura superficial del mar y establecimiento de marcados gradientes de temperatura y salinidad durante la época de afloramiento, y las de incremento de *D. acuta*, con marcados gradientes térmicos (termoclinas/picnoclinas) a mayor profundidad en agosto. Las proliferaciones de *D. cf acuminata* aparecieron bajo rangos más amplios de temperatura (12.5-22 °C) y salinidad que las de *D. acuta*, que mostraron preferencia por rangos más estrechos de temperatura (15-17.5 °C) y salinidades superiores a 35.0 psu. Cuando ambas especies coincidieron en el tiempo, ocuparon capas diferenciadas de la columna de agua. Las concentraciones de *D. cf acuminata* aumentaban hacia el norte, y dentro de cada ría, los valores máximos se detectaron en las zonas medias. Las concentraciones de *D. acuta* aumentaban hacia el sur y mostraron un gradiente positivo desde la parte interna de las rías hacia las bocas durante las proliferaciones de verano. En 1988, 1989 y 1990 *D. acuta* proliferó a principios de agosto, en la época en que se habían detectado concentraciones elevadas de *D. cf acuminata* en los años anteriores. Se sugiere que las apariciones habituales de *D. acuta* a principios de otoño eran poblaciones de la plataforma adyacente introducidas en las rías; por el contrario en 1988, 1989 y 1990, las poblaciones se desarrollaron *in situ* dentro de las rías. Se cree que los veranos extremadamente secos y cálidos de esos tres años, combinados con episodios de afloramiento moderados - que permitieron el establecimiento de termoclinas persistentes a la profundidad adecuada en el interior de las rías- crearon las condiciones óptimas para las inusuales proliferaciones de agosto de *D. acuta* y el declive temprano de las poblaciones de *D. acuminata* entre 1988 y 1990. Se presenta un modelo conceptual simplificado sobre los mecanismos de proliferación y mantenimiento de poblaciones de *Dinophysis* spp en las rías.

Autoecología y algunos estadios del ciclo vital de Dinophysis acuta Ehrenberg.

En el verano-otoño de 1989, hubo una floración persistente e inusual de *Dinophysis acuta* Ehrenberg en las Rías Bajas gallegas asociada a episodios de presencia de toxina diarreica en los bivalvos (DST), en concentraciones no aptas para el consumo, que afectaron a la comercialización de mejillón entre agosto y mediados de diciembre. Se tomaron muestras integradas (0-5, 5-10 y 10-15 m) de agua semanalmente en seis estaciones de las rías de Vigo (V1, V2, V3) y Pontevedra. (P1, P2, P3), y dos veces por semana en las estaciones V1 y P2. Los valores máximos de concentración de *D.*

acuta (hasta $2.3 \cdot 10^4$ cel·l⁻¹), localizados en la picnoclina, y de porcentaje de células en fase de división (hasta 31%), se registraron en agosto. Las concentraciones celulares mínimas se observaron tras pulsos de afloramiento que rompieron la estratificación. Se registraron de nuevo valores elevados de *D. acuta* (hasta $1.8 \cdot 10^4$ cel·l⁻¹), en la capa superficial de agua, a finales de octubre, cuando vientos persistentes de componente sur provocaron una inversión de la circulación estuárica positiva. Así pues, los dos máximos celulares se registraron durante condiciones oceanográficas muy distintas, pero en ambos casos en un rango de temperatura de 15.5-17°C. Se sugiere que los máximos observados durante períodos de estratificación y durante episodios de hundimiento se corresponden con una predominancia de crecimiento *in situ* y de acumulación física respectivamente, y que las condiciones meteorológicas excepcionales de temperatura y sequía durante 1989 crearon el escenario óptimo para una inusual presencia (en intensidad y época del año) de *D. acuta* en las partes externas de las Rías Bajas gallegas. Durante esta floración, se observaron numerosas células dimórficas, con una placa hipotecal correspondiente a *D. acuta* y otra distinta y de menor tamaño similar a las de *Dinophysis dens* Pavillard, así como células de *Dinophysis dens*, que se cree constituyen un estadio del ciclo vital de *D. acuta*. Otras observaciones inéditas fueron las de formas con doble pared y carentes de listas cingulares o sulcales que pudieran constituir un tipo de quiste; y un hipotético "tubo fertilizante" que emergía de la célula grande en pares acoplados *D. acuta/D. dens*.

Patrones del ciclo celular y estimación de tasas de división *in situ* de dinoflagelados del género *Dinophysis* mediante un índice postmitótico.

Se utilizó un método de análisis del ciclo celular, basado en el reconocimiento morfológico de las células en fase de citocinesis y de regeneración de las aletas sulcales, para estimar las tasas de división *in situ* de cuatro especies de dinoflagelados del género *Dinophysis*, productoras de toxinas diarreicas de bivalvos (DST), aplicando dos modelos distintos. Se llevaron a cabo muestreos intensivos de 24 h durante cuatro mini-campañas en las Rías Bajas gallegas durante proliferaciones de primavera y de otoño de estas especies. Se estimó la frecuencia de células en parejas y recién divididas en muestras integradas (0-20 m) de agua a intervalos de 30, 60, ó 120 min. Se observó que *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* y *D. tripos* presentaban división en fase, pero la forma de las curvas de distribución de frecuencia de las distintas fases así como los valores estimados de tasas de división variaban considerablemente para una misma especie durante distintas estaciones del año y/o campañas. Las frecuencias de células en parejas + células recién divididas fueron máximas al amanecer en el caso de *D. acuminata*, y 2-3 horas más tarde en las otras especies. Estos resultados confirman que la fase de citoquinesis (células en parejas) puede ser muy rápida en las especies de *Dinophysis* (0.3 – 2.2. h), mientras que la fase de regenera-

ción de las aletas sulcales es un proceso más lento que constituye un marcador inequívoco de la división celular. El "índice postmitótico" empleado permitió estimaciones de μ a bajas concentraciones de campo (10^2 - 10^3 cel · l⁻¹) de las especies diana invirtiendo un tiempo razonable en el análisis de muestras (1-2 h por muestra). Se observaron valores entre moderados (0.24) y altos (0.65) de μ bajo condiciones oceanográficas consideradas desfavorables para el crecimiento de *Dinophysis* spp., y la fase de crecimiento en que se encontraba la población mostró ser un factor clave para este valor. Se presenta una revisión crítica de citas de resultados previos de división asíncrona obtenidos en estudios del ciclo celular de *Dinophysis*. Se sugiere que el seguimiento del contenido de DNA por célula durante el ciclo celular de *Dinophysis* no constituye un método fiable mientras no se disponga de un conocimiento razonable de su comportamiento nuclear durante procesos sexuales y otros procesos no mitóticos, y que, incluso aceptando que la mitosis es un proceso de no retorno, la división celular podría detenerse en una de sus fases, lo que añadiría aún más imprecisiones a las mediciones de tasas de división basadas en la cuantificación de DNA por célula.

Distribución de ácido okadaico en las cuerdas de bateas de mejillón en la Ría de Pontevedra: relación con la concentración celular de Dinophysis y su contenido de toxinas.

Entre junio de 1990 y enero de 1991 se tomaron muestras semanales de mejillón a tres profundidades (2, 7 y 15 m) de las cuerdas de una batea fija de la Ría de Pontevedra (Rías Bajas, Galicia) y arrastres de red de plancton (fracción de talla 20-100 μ m) para análisis de contenido de ácido okadaico (AO) por cromatografía líquida (CLAE), así como muestras de agua para análisis de fitoplancton, clorofila a y nutrientes. Se tomaron también datos físicos y meteorológicos. El objetivo del estudio era describir la relación entre la distribución espacio-temporal del contenido de AO en los mejillones y la presencia de distintas concentraciones de varias especies de *Dinophysis*. Desde octubre de 1991, los análisis de toxinas en poblaciones planctónicas se hicieron a partir de filtraciones de muestras integradas de manguera (0-15 m). En 1990, la prohibición de extracción de bivalvos por detección de niveles de enterotoxinas superiores al nivel de regulación (determinado por bioensayo de ratón), duró desde el 9 de julio hasta el 17 de noviembre. Los valores máximos de AO ($10.8 \mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1} \text{HP}$) se registraron a 2 m de profundidad el 31 de julio, unos días después de que se observara un marcado pico de *Dinophysis acuminata* ($8320 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) a 0-5 m, con dominancia de diatomeas y valores medios ($6-7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) de clorofila a, y el 2 de octubre a 15 m ($4.4 \mu\text{g OA} \cdot \text{g}^{-1} \text{HP}$) coincidiendo con un máximo de *D. acuta* ($13760 \text{ cel} \cdot \text{l}^{-1}$) a 10-15 m, dominancia de dinoflagelados y valores bajos ($1-2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) de clorofila a. Las proliferaciones de *D. acuminata* asociadas con los cierres de junio-julio representaron una mayor amenaza de intoxicación por AO, a pesar de te-

ner lugar con densidades celulares inferiores, que las proliferaciones de *D. acuta*, asociadas con las toxicidades de finales de verano-otoño. Esto se explica por el hecho de que en este estudio sólo se investigó la presencia de AO en los bivalvos por creerse que era la única toxina lipofílica presente en los mejillones gallegos. La distribución vertical de AO en las cuerdas de batea, excepto en el caso de los dos máximos mencionados, fue bastante homogénea a pesar de la segregación vertical de las células de *Dinophysis acuta*, debido posiblemente a la migración vertical de éstas tal como ya ha sido descrita para otras especies del género en Galicia. La detoxificación de niveles bajos de AO ($4 \mu\text{g AO} \cdot \text{g}^{-1}\text{HP}$) requirió entre 2 y 3 semanas a partir de la observación de concentraciones muy bajas de *Dinophysis*, en condiciones de otoño. Por primera vez se cita la aparición, como toxina dominante a veces, de un segundo compuesto tóxico, presumiblemente DTX2, en los cromatogramas resultantes de análisis por CLAE de poblaciones planctónicas con elevado contenido de *Dinophysis* spp. Se discuten nuevas estrategias para el seguimiento de episodios DSP.

Toxinología y contenido tóxico de *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* y *D. caudata* de las Rías Bajas Gallegas.

Dinophysis acuminata, *D. acuta* y *D. caudata* co-aparecen durante episodios recurrentes de intoxicación diarreica por bivalvo (DSP) en las Rías Bajas gallegas a principios de otoño, por lo que la contribución de cada una de estas especies a la toxicidad de los moluscos debe ser evaluada. Los análisis obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector de fluorescencia (CLAE-DF), de células aisladas una a una por micromanipulación confirmaron, por primera vez en Galicia, que *D. acuta*, que contiene una proporción AO:DTX2 de 3:2, es la principal fuente de la DTX2 detectada en los mejillones gallegos, y que tanto *D. acuta* como *D. acuminata* pueden ser los principales responsables de los episodios de aparición de toxinas diarreicas en otoño. Resultados preliminares sugieren la presencia de cantidades traza ($< 1 \text{ pg} \cdot \text{cel}^{-1}$) de AO en *D. caudata* y confirman la gran variabilidad del contenido tóxico en células de la misma especie de *Dinophysis* durante distintos episodios anuales, e incluso durante el mismo episodio en células, obtenidas mediante arrastres de red, mantenidas en el laboratorio entre 5 y 9 días. Estos resultados advierten del riesgo de emplear métodos alternativos de análisis de toxinas (enzimáticos, sondas moleculares) que sólo sean efectivos para la detección de AO y derivados. Asimismo corroboran el riesgo para la salud pública que supone el empleo del "índice de *Dinophysis*" como dato sustitutorio de los bioensayos de ratón en la detección precoz de toxinas diarreicas en los bivalvos.

CONCLUSIONES

En las costas de Galicia tienen lugar episodios crónicos de presencia de toxinas diarreicas en los bivalvos (DSP) asociados a proliferaciones de dinoflageladas del género *Dinophysis*.

Las especies estudiadas de *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. tripos*) presentaron una gran variabilidad morfológica intraespecífica que se justifica por la aparición de: a) distintos estadios de un ciclo vital polimórfico y del ciclo celular (células mitóticas y post-mitóticas); b) distintas etapas del crecimiento poblacional sometidas a distintas tasas de crecimiento, y c) distintos modos nutricionales, incluyendo procesos de mixotrofia que dan lugar a células hinchadas y muy vacuoladas. Todas las especies mostraron un patrón común en su ciclo vital, haplonte y polimórfico, si bien quedan algunos pasos por demostrar *in vitro* sobre las fases de hipnozigoto y las primeras divisiones meióticas. La reproducción sexual es anisógama, los gametos se conjugan a través de un tubo de fertilización por el que se transfiere el material nuclear. La plasmogamia tiene lugar tras "engullimiento" de la célula pequeña por la grande. La capacidad de "desdiferenciación" de las células pequeñas (gametos) de *Dinophysis*, que pueden reconvertirse en células vegetativas, pudiera constituir una valiosa estrategia adaptativa para especies, como *Dinophysis acuminata*, con presencia permanente en el plancton bajo condiciones muy cambiantes.

Dinophysis acuminata es la especie de *Dinophysis* más abundante en las rías gallegas, presenta períodos de crecimiento muy prolongados (marzo-octubre), y se observa bajo rangos muy amplios de salinidad (30 – 35.5 psu) y temperatura (13 – 22 °C). Su presencia se puede detectar a lo largo de todo el año. *Dinophysis acuta* es de carácter más nerítico y estacional, y prolifera en pulsos muy breves de otoño; se observó bajo rangos muy estrechos de temperatura (15.5 – 17 °C) y salinidad (< 35 psu). Se observaron importantes diferencias biogeográficas al norte (Rías Altas) y al sur de Cabo Finisterre (Rías Bajas): *Dinophysis sacculus* (descripción de Stein) prolifera tan sólo en las Rías Altas y *Dinophysis acuta*, al sur de Finisterre. Los máximos anuales de *D. acuminata* y *D. acuta* se desarrollaron bajo dos escenarios bien distintos: a) condiciones de estratificación termohalina (*D. acuminata*) o térmica (*D. acuta*) durante las cuales el máximo celular se sitúa en la picnoclina y los máximos y mínimos se ven fundamentalmente afectados por el régimen de afloramiento y b) condiciones de otoño, al final de la temporada de afloramiento, en las que se da una acumulación por interacciones físicas (pulsos de hundimiento) y biológicas (mantenimiento de grandes dinoflagelados nadadores en la capa superficial). Las proliferaciones excepcionales de *D. acuta* en el verano de 1988 y sobre todo en 1989, años de inusual sequía y elevada temperatura, se asociaron con el establecimiento de

picnoclinas más profundas y persistentes que favorecieron el crecimiento *in situ* de esta especie y acortaron el período de crecimiento de *D. acuminata*.

Dinophysis acuminata es el principal agente de episodios crónicos y persistentes (primavera-otoño) de presencia de toxinas diarreicas (DST) en los bivalvos de la costa gallega. *D. acuta* y en menor grado *Dinophysis caudata* son causantes de episodios estacionales (otoño) de corta duración. La heterogeneidad espacio-temporal de las poblaciones de *Dinophysis* se correlaciona con la distribución tridimensional de toxinas diarreicas en los mejillones de las cuerdas de batea. Las toxinas predominantes observadas en las células de *Dinophysis* son: ácido okadaico (AO) durante las proliferaciones de *D. acuminata* y AO, dinofisistoxina-2 (DTX2) y pectenotoxina-2 (PTX2) durante proliferaciones de *D. acuta* y *D. caudata*. Se observó una gran variabilidad intraespecífica en el contenido de toxina por célula de *Dinophysis*. Los escasos datos disponibles hasta la fecha no permiten establecer una relación entre la variabilidad de contenido de toxinas y las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, factores nutricionales) o factores intrínsecos de la población (variabilidad genética entre cepas, distintos estadios del crecimiento poblacional).

ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS EMPLEADOS

μ	Mu. Tasa de división específica de una población. Se expresa en días ⁻¹
μ CLAE	CLAE (cromatografía líquida de alta eficacia) que emplea columna microcapilar
μ_{\max}	Estimación máxima de μ
μ_{\min}	Estimación mínima de μ
ACNA	Agua Central Noratlántica
AD	Ácido Domoico (= DA domoic acid)
ADAM	9-antryl diazometano
ADN	Ácido Desoxi-ribonucleico (=DNA)
AO	Ácido Okadaico (= OA okadaic acid)
ARN	Ácido Ribonucleico (=RNA)
ASD	Aleta sulcal derecha de las células de <i>Dinophysis</i>
ASI	Aleta sulcal izquierda de las células de <i>Dinophysis</i>
ASP	Intoxicación amnésica por bivalvos (=Amnesic Shellfish Poisoning)
AZAs	Azaspirácidos
AZP	Intoxicación por azaspirácidos en bivalvos (=Azaspiracid Shellfish Poisoning)
CFP	Intoxicación ciguatérica de pescado (= Ciguatera Fish Poisoning)
CIEM	Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES, International Council for the Exploration of the Sea)
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (= HPLC, High Performance Liquid Chromatography)
CL-EM	Sistema acoplado de Cromatógrafo Líquido y Espectrómetro de Masas (= LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
clor. <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
COI	Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO (= IOC, Intergovernmental Oceanographic Commission)

CTD	Instrumento sonda que mide conductividad, temperatura y profundidad (Conductivity, Temperature, Depth)
DAPI	2'4-diamidino-2-fenilindol
DIC	Sistema óptico de contraste de interfase diferencial (=Differential Interfase Contrast)
DSP	Intoxicación diarreogénica por bivalvos (=Diarrhetic Shellfish Poisoning).
DST	Toxinas diarreogénicas por bivalvos (=Diarrhetic Shellfish Toxins)
DT/DZ	Gradiente térmico
DTXs	Dinofisistoxinas
DTX1	Dinofisistoxina-1
DTX2	Dinofisistoxina-2
DTX3	Dinofisistoxina-3
DTX4	Dinofisistoxina-4
EM	Espectrometría de masas
FAN	Floraciones Algales Nocivas (HAB, Harmful Algal Blooms)
FDA	Organismo Oficial de Control Sanitario en EE UU (Food & Drug Administration)
G1	Fase G1 (crecimiento) del ciclo celular que precede a la fase S
G2+M	Fase G2 (doble contenido de ADN) del ciclo celular que sigue a la S
GF/C	Filtros Whatmann de fibra de vidrio con orificio tamaño C (1.2 μ)
GMT	Hora solar (=Greenwich Meridian Time)
GTXs	Goniotoxinas
H	Ancho dorso-ventral de la hipoteca en células de <i>Dinophysis</i>
HAB	Véase FAN
HAEDAT	Base de datos de episodios tóxico-nocivos de los países pertenecientes al CIEM (=Harmful Algae Events Database)
HP	Hepatopáncreas
ICES	Véase CIEM

IFREMER	Instituto Francés de Investigación para la Explotación del Mar (= Institute Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer)
IPHAB	Panel Intergubernamental sobre Floraciones Algales Nocivas (Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms)
ITS	espaciador intergénico del operón del rRNA
L	Longitud de la hipoteca
L:O	Luz:oscuridad (razón entre horas de luz y oscuridad para describir el fotoperíodo)
M	Fase mitótica del ciclo celular.
MCSS	Máximo de clorofila subsuperficial
MDS	Análisis estadístico de escalado multidimensional (=Multi Dimensional Scaling)
NSP	Intoxicación neurotóxica por bivalvos (=Neurotoxic Shellfish Poisoning)
PBS	Solución de tampón fosfato (=phosphate buffer solution)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (=Polymerase Chain Reaction)
PMD	puente megacítico dorsal entre dos células hijas.
PSP	Intoxicación paralizante por bivalvos (=Paralytic Shellfish Poisoning)
PTX2SA	Seco-ácido de la pectenotoxina-2
PTXs	Pectenotoxinas
PVC	Policlorovinilo
qADN	<i>Quota</i> de ADN. Dotación de DNA contenida en las células vegetativas haploides.
R (R1, R2, R3)	Costillas o radios (ribs) que arman las aletas de <i>Dinophysis</i>
rADN	Ácido Desoxiribonucleico ribosomal
S	Fase S (síntesis del ADN) del ciclo celular
SCB	Bloqueadores del canal de sodio (=sodium channel blockers)
STX	Saxitoxina
TAM	Toxina amnésica de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para definir el ASP

TDM	Toxina diarreogénica de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para designar el DSP
TPM	Toxina paralizante de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para definir el ASP
Tris-HCL	Hidroximetil aminometano-clorhídrico
TSM	Temperatura superficial del mar
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
UV	Ultravioleta
VAM	Veneno amnésico de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para definir el ASP
VDM	Veneno diarreogénico de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para designar el DSP
VPM	Veneno paralizante de molusco/marisco. Empleado en Sudamérica para definir el ASP
YTXs	Yesotoxinas
Z _m	Zona megacítica de crecimiento celular.

