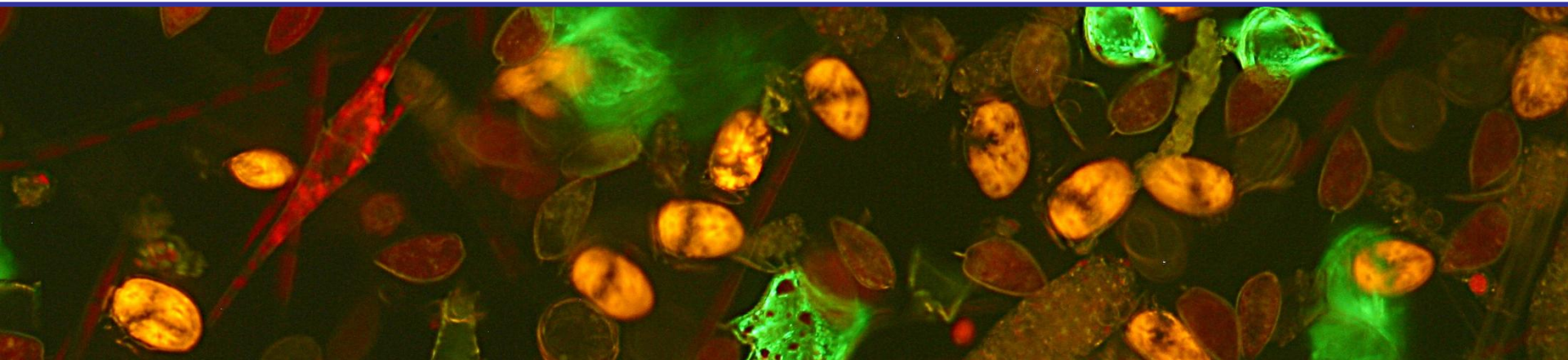


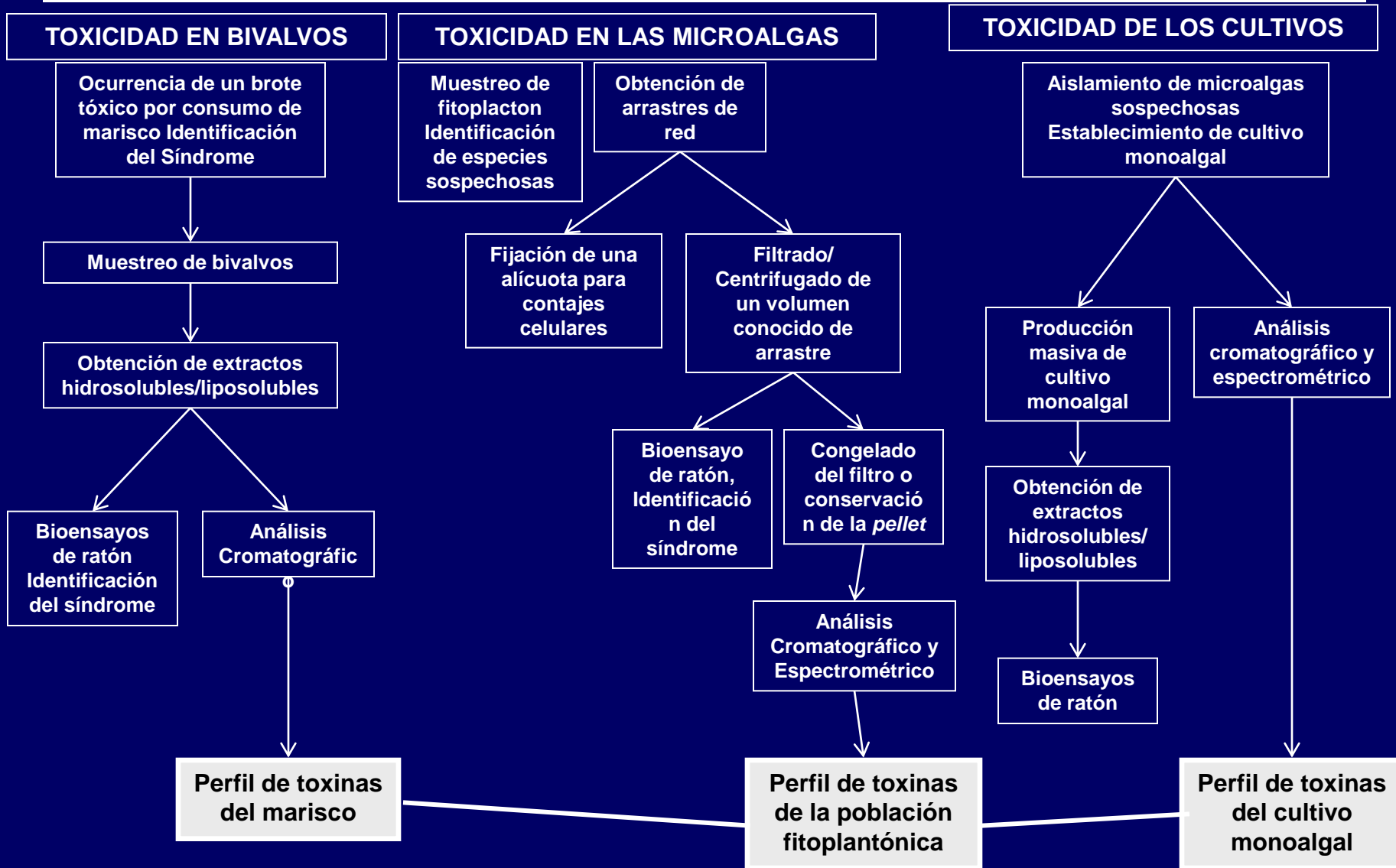


# Identificación fidedigna de los agentes de episodios tóxicos de los mariscos

Beatriz Reguera  
Instituto Español de Oceanografía (IEO). Vigo.



# IDENTIFICACIÓN INEQUÍVOCA DEL AGENTE DE UN EPISODIO TÓXICO



# TOXICIDAD EN BIVALVOS

Ocurrencia de un brote tóxico por consumo de marisco. Identificación del Síndrome

Muestreo de bivalvos

Obtención de extractos hidrosolubles/liposolubles

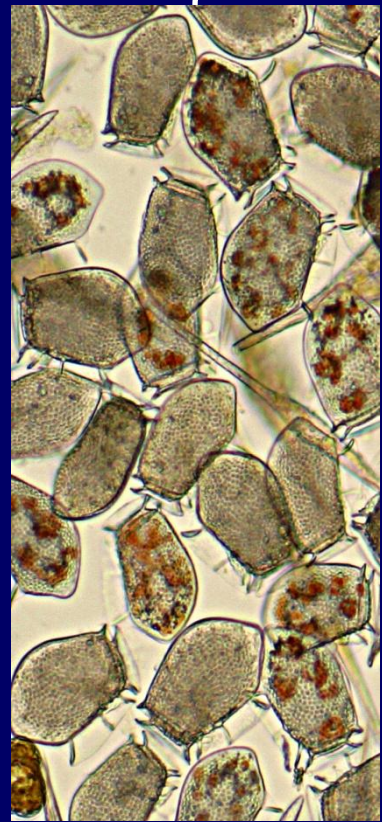
Bioensayos de ratón  
Identificación del síndrome

Análisis Cromatográfico

Perfil de toxinas del marisco



# TOXICIDAD EN LAS MICROALGAS



Obtención de  
arrastres de red

Muestreo de  
fitoplancton  
Identificación  
de especies  
sospechosas

Fijación de una alícuota  
para contajes celulares

Bioensayo de  
ratón  
Identificación del  
síndrome

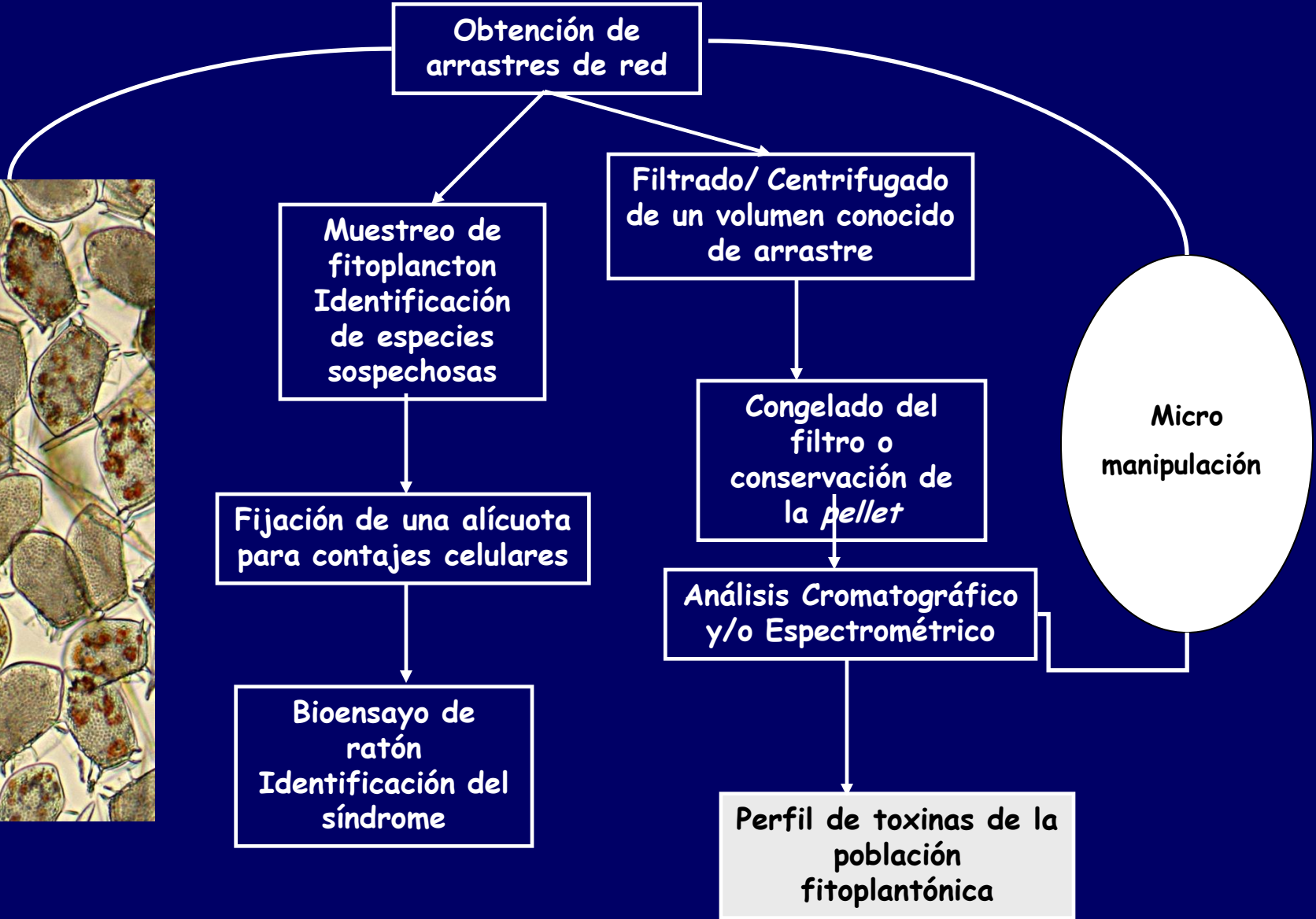
Filtrado/ Centrifugado  
de un volumen conocido  
de arrastre

Congelado del  
filtro o  
conservación de  
la *pellet*

Análisis Cromatográfico  
y/o Espectrométrico

Perfil de toxinas de la  
población  
fitoplanctónica

Micro  
manipulación



# TOXICIDAD DE LOS CULTIVOS



Aislamiento de microalgas  
sospechosas y  
establecimiento de cultivo  
monoalgal

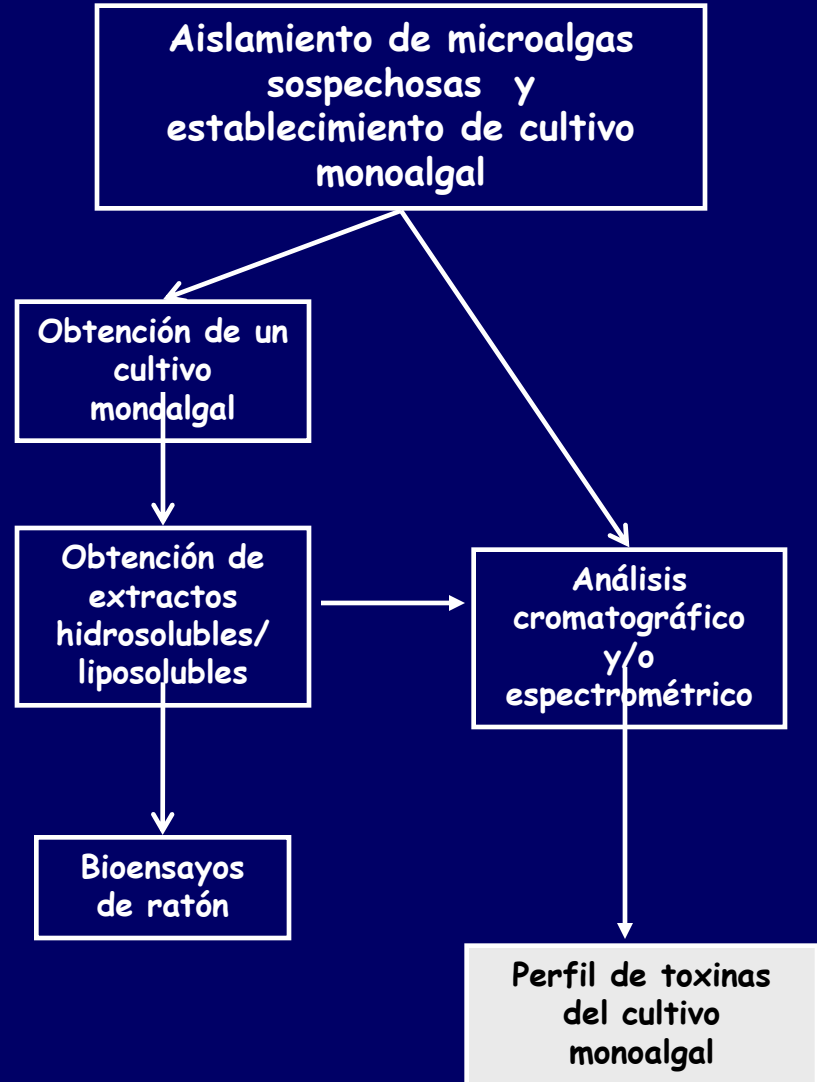
Obtención de un  
cultivo  
monoalgal

Obtención de  
extractos  
hidrosolubles/  
liposolubles

Bioensayos  
de ratón

Análisis  
cromatográfico  
y/o  
espectrométrico

Perfil de toxinas  
del cultivo  
monoalgal

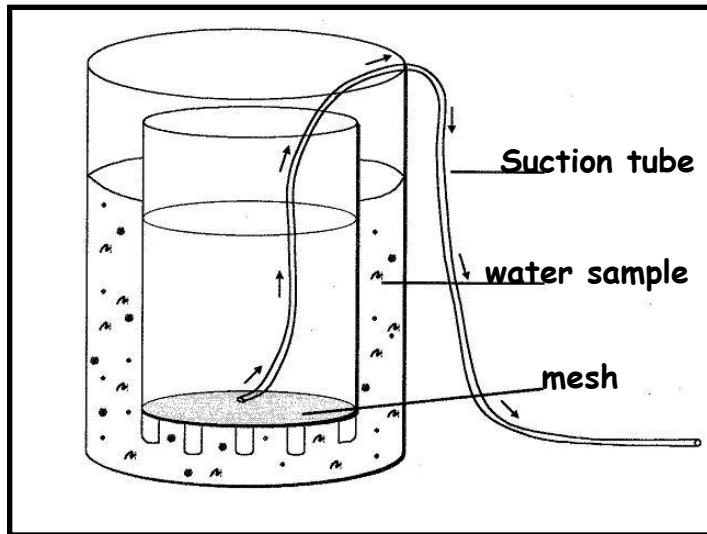




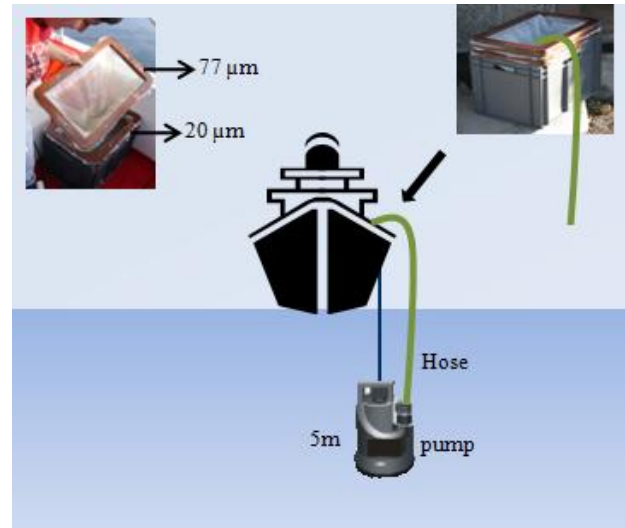
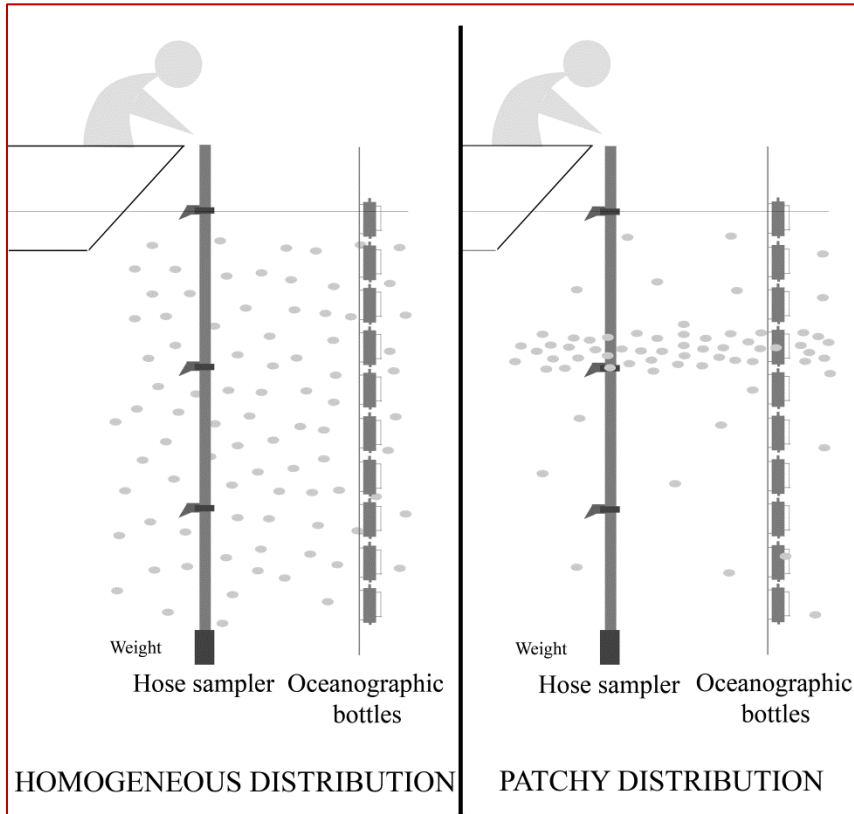
Mantenimiento de cepas en colecciones de cultivos de microalgas:  
Materia prima para caracterización toxinológica, taxonómica y genética  
y para desarrollo de experimentos controlados de laboratorio.



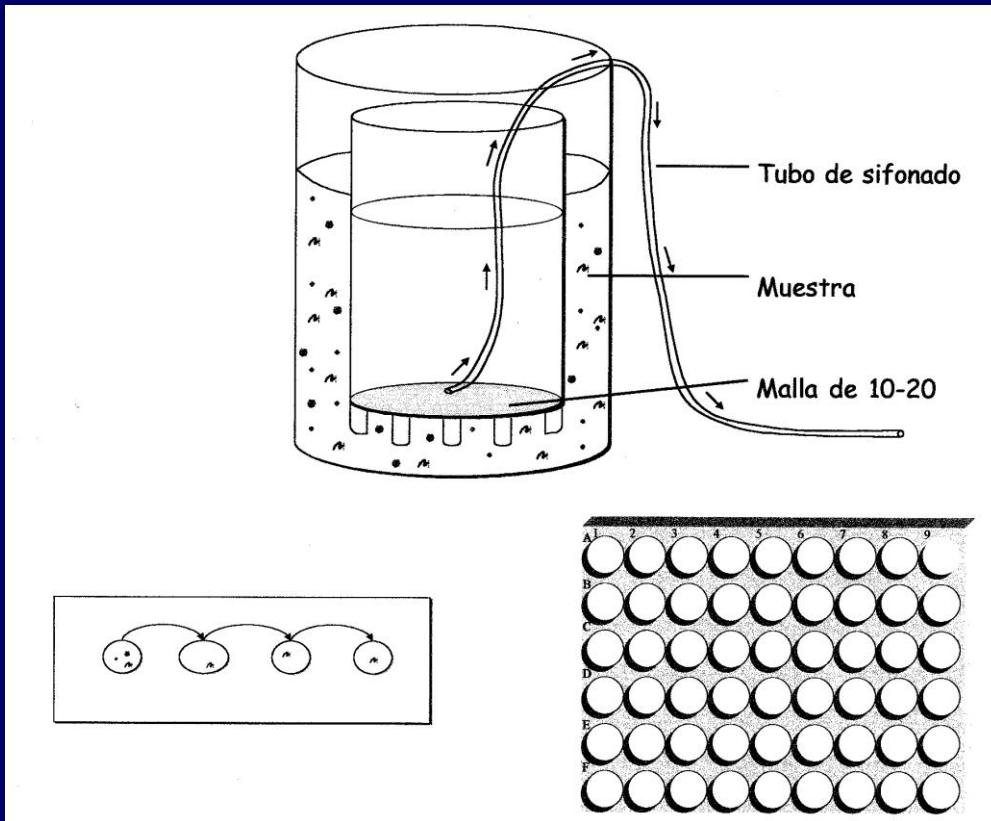
# "Pesca" de células en concentrados de plancton











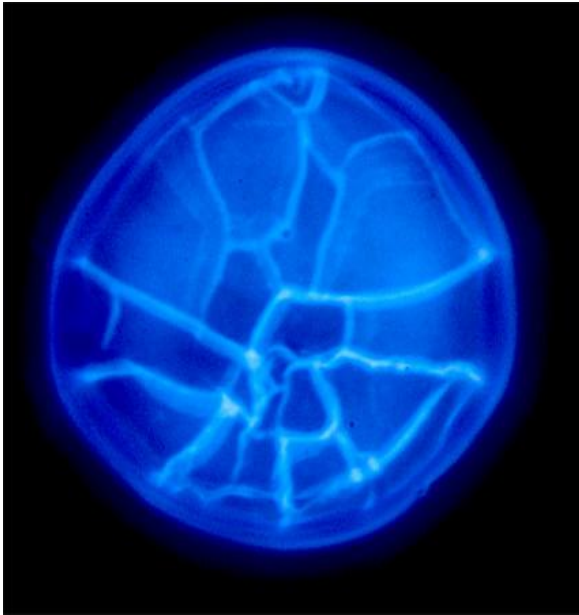
Ilustraciones de: a) la filtración inversa; b) el aislamiento de células de una gota de muestra de agua de mar (concentrada o no) y posteriores transferencias a nuevas gotas de agua de mar filtrada y estéril; c) cámara de cultivo celular.

¿ Qué se puede hacer para determinar el contenido de toxinas en especies no cultivables?

(Ej.: *Dinophysis* spp; *Prorocentrum* spp)

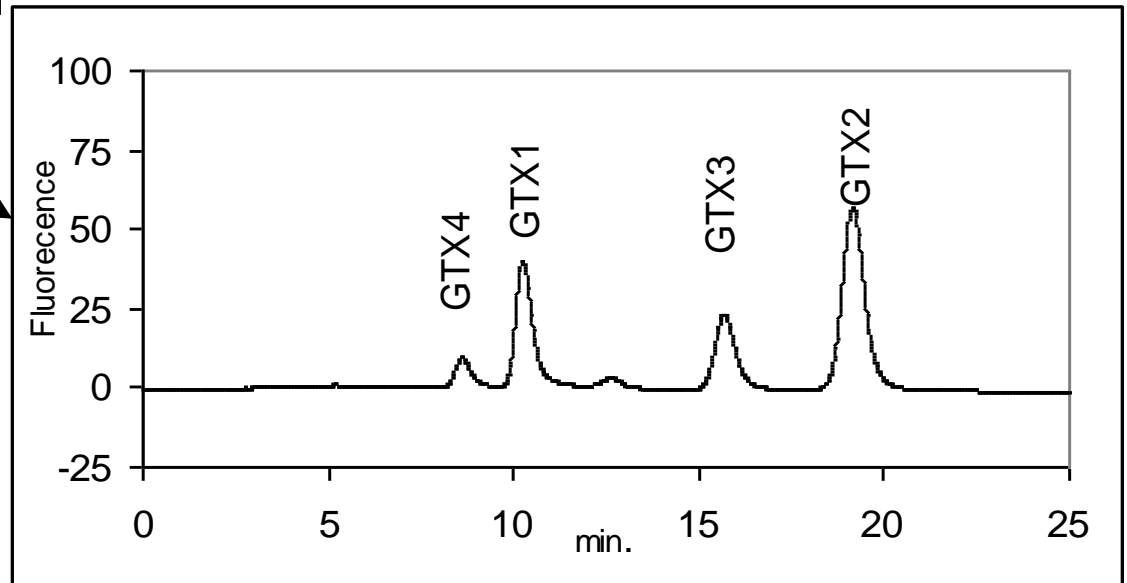


1. Aislamiento de células por micromanipulación a partir de muestras de campo.
2. Análisis por HPLC (1 ó varios cientos de células)
3. Análisis por LC-MS (1 ó varias decenas de células)



La identificación precisa de *Alexandrium minutum*, el productor más común de PSP en Europa, requiere teñir las células (calcofluor) y observarlas al microscopio de epifluorescencia para describir las placas de celulosa que forman su teca o armadura.

Cromatograma (HPLC-FD analysis) que muestra el perfil (*fingerprint*) de toxinas de *A. minutum*

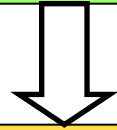


# Aciertos y desaciertos de algunos casos históricos relevantes

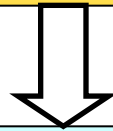


En busca del causante de DSP .....

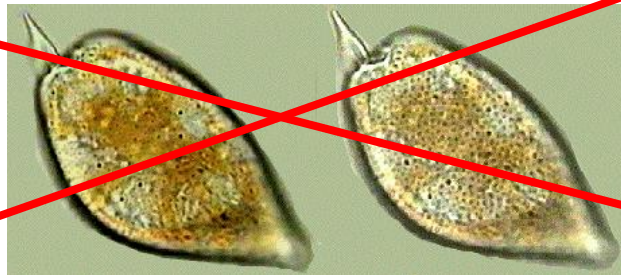
Brotos gastrointestinales en Holanda tras consumo  
De mejillones (Korringa and Roskam 1961)



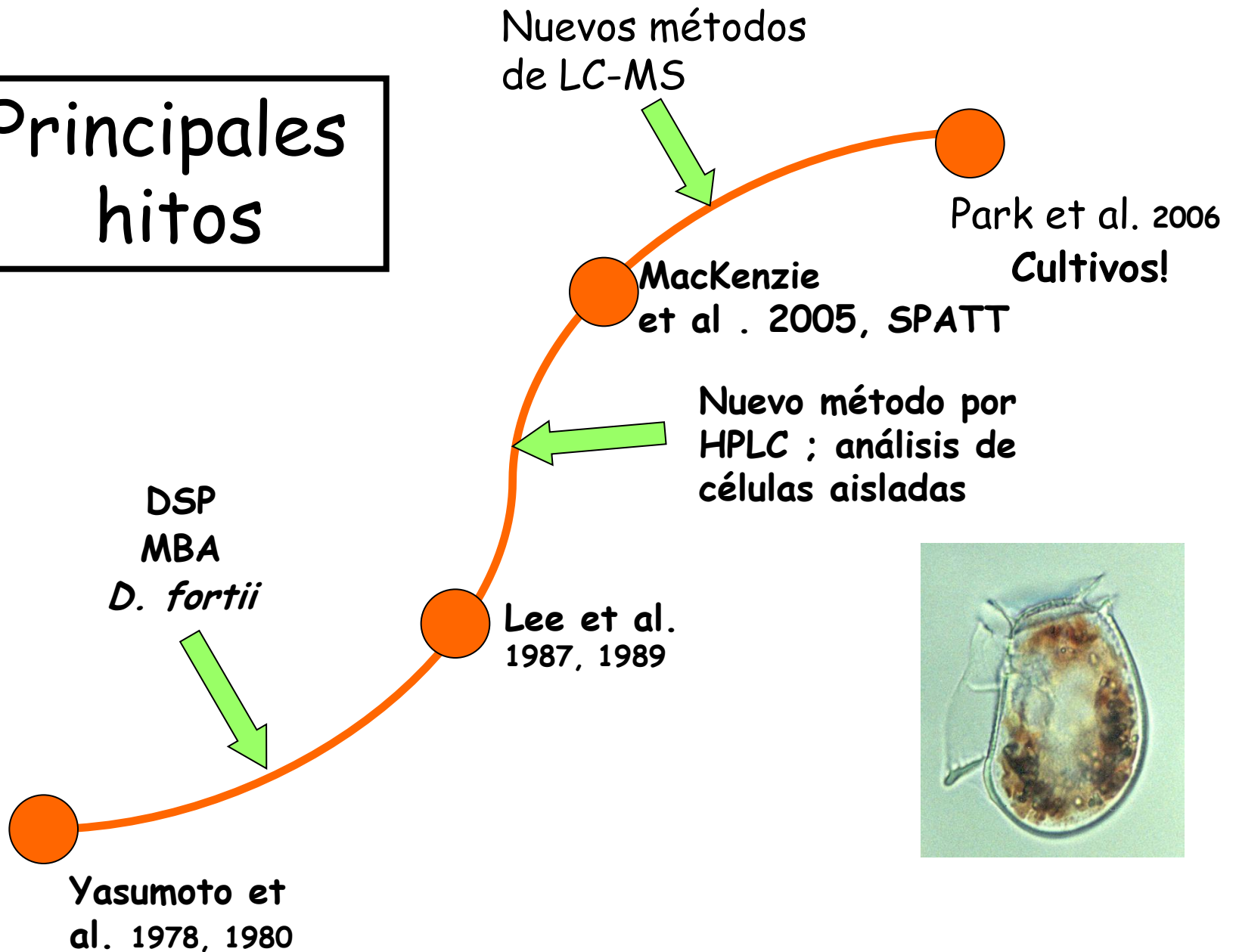
100 personas afectadas tras consumo de mejillón del estero de  
Reloncaví (Chile) Asociado con una densa floración de *Dinophysis*  
*acuta* (Guzmán & Campodonico 1975; Lembeye et al. 1991)



El error histórico de Mary Kat: señalar a *Prorocentrum*  
*micans* como el causante de los brotes tóxico en Holanda  
(Kat 1972, 1974, 1979..)



# Principales hitos



*Dinophysis*  
*ovum*

1. Rías gallegas:  $7 \text{ pg} \cdot \text{cell}^{-1} \text{ OA}$  (Raho et al. 2008)
2. Thermaikos Bay (Greece). DSP Koukaras & Nikolaidis 2004)
3. El excepcional bloom de Texas, 2008,  $470 \text{ } \mu\text{g OA} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Deeds et al. 2010);  $73 \text{ pg OA eq.} \cdot \text{cell}^{-1}$  (Swanson et al. 2010; Campbell et al.\* 2010)

más de  $10^5 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$

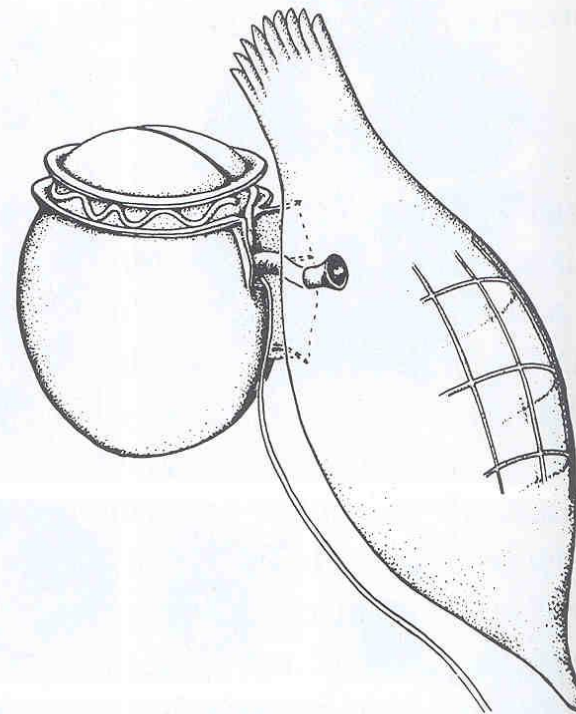
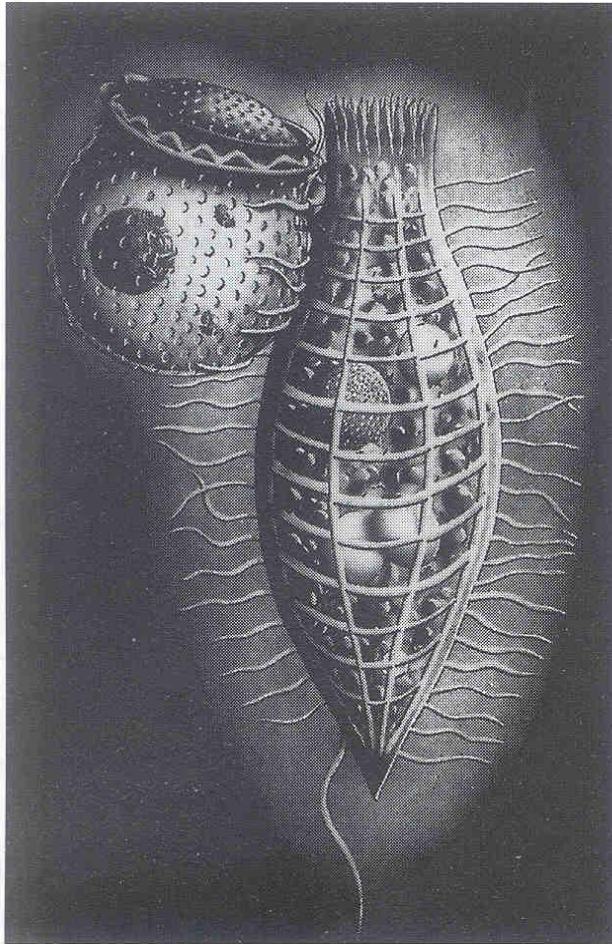
pero el bivalvo explotado eran OSTRAS!



## Grazing

Tíntinido (*Favella* sp)  
con varias células de  
*Dinophysis*  
(productores de  
toxinas diarreicas) en  
el interior de su lorica



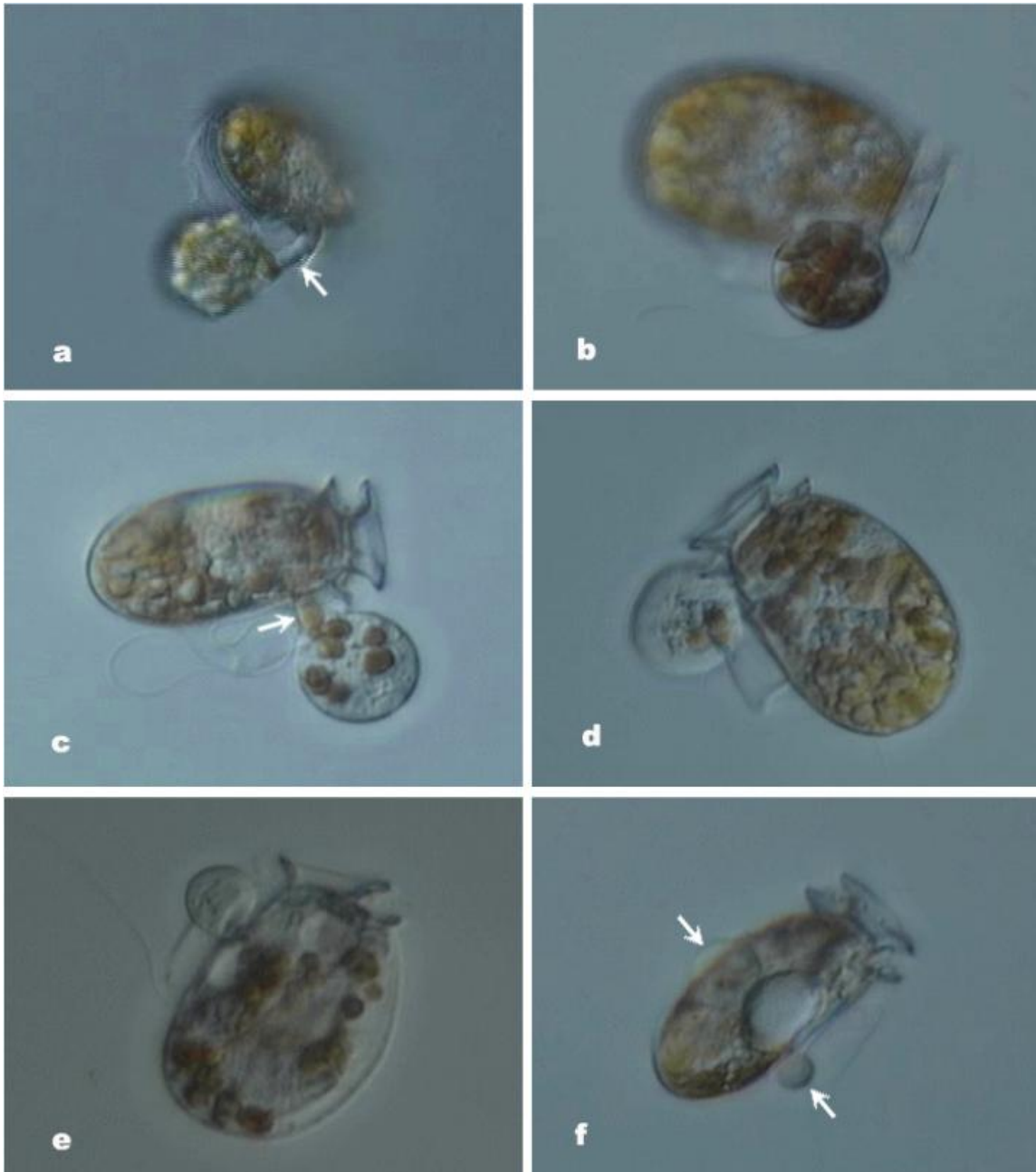


El cazador cazado: *Dinophysis rotundata* (heterótrofo estricto) perforando la lorica del tintínido *Tiarina fusus* y succionando su contenido (Hansen 1991). Mecanismo alimenticio conocido como *mizocitosis*

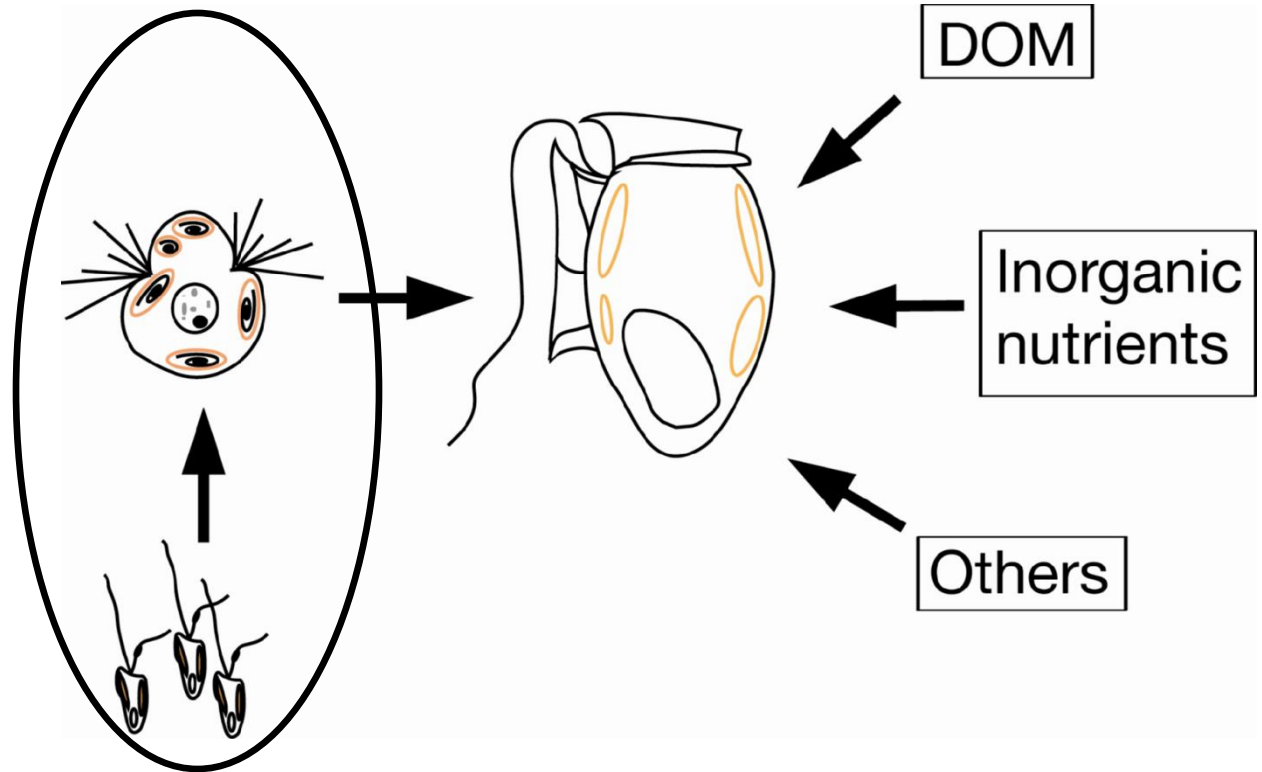
*Dinophysis cf.  
acuminata*  
feeding on  
*Myrionecta  
rubra*

Phagotrophy  
by Myzocytosis

Park et al., AME 2006



*Dinophysis* spp.: Fago-mixótrofos obligados: requieren presas vivas (el ciliado *Myrionecta rubra*), luz y nutrientes para sobrevivir en cultivo.



Fuente nutricional  
óptima

## Toxin content per cell (pg cell<sup>-1</sup>) estimates in picked cells of *P. rotundatum*

Sampling date	Isolation date	N° cells	OA (pg cell <sup>-1</sup> )	DTX2 (pg cell <sup>-1</sup> )	PTX2 (pg cell <sup>-1</sup> )	Total toxin (pg cell <sup>-1</sup> )	<i>Dinophysis/ Phalacrocoma</i> spp. (%)	Cell appearance	
25/08/2003	01/09/2003	38	nd	nd	0.8	0.8	<i>D. caudata</i> (66%) <i>D. acuminata</i> (18%) <i>P. rotundatum</i> (18%)	Normal appearance of vegetative cells	
		40	0.3	nd	0.7	1.0		Normal appearance of vegetative cells	
26/08/2003	28/08/2003	70	nd	nd	nd	nd		Small and pale non-vacuolated cells	
		50	nd	nd	nd	nd		Small and pale non-vacuolated cells	
26/07/2005	27/07/2005	66	0.5	nd	0.1	0.6		<i>D. acuminata</i> (82%) <i>P. rotundatum</i> (18%)	Small and pale non-vacuolated cells
		48	nd	nd	nd	nd		<i>D. acuminata</i> (82%) <i>P. rotundatum</i> (18%)	Normal appearance of vegetative cells
26/09/2005	26/09/2005	51	0.7	0.9	nd	1.6		<i>D. acuminata</i> (60%) <i>P. rotundatum</i> (40%)	Normal appearance of vegetative cells
17/04/2007	17/04/2007	142						<i>P. rotundatum</i> (100%)	100% vacuolated cells, some showing orange autofluorescence
29/10/2007	29/10/2007	58	nd	nd	nd	nd		<i>D. acuminata</i> <i>D. acuta</i>	vacuolated cells, some showing orange autofluorescence
29/10/2007	29/10/2007	52							vacuolated cells, some showing orange autofluorescence
03/12/2007	03/12/2007	50					<i>P. rotundatum</i> (100%)	Normal appearance of vegetative cells	

***P. rotundatum* cells had no toxins (nd) or had traces of toxins equal to those of accompanying *Dinophysis* spp. (González-Gil et al., 2008)**



# AZASPIRACIDOS

## Historic Background

Since 1995 new DSP-like poisoning events became public

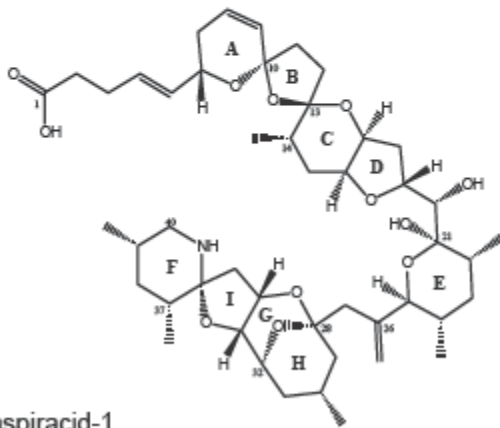
MacMahon & Silke, 1996: Harmful Algae News, 14, 2

In 1998 Satake et al. identified azaspiracid-1 (AZA-1) as the causative compound in shellfish

J. Am. Chem. Soc., 120, 9967-9968

In 2003 James et al. suggested the heterotroph dinoflagellate *Prorocentrum crassipes* as the AZP causing organism

Toxicon, 41, 277-283



Azaspiracid-1





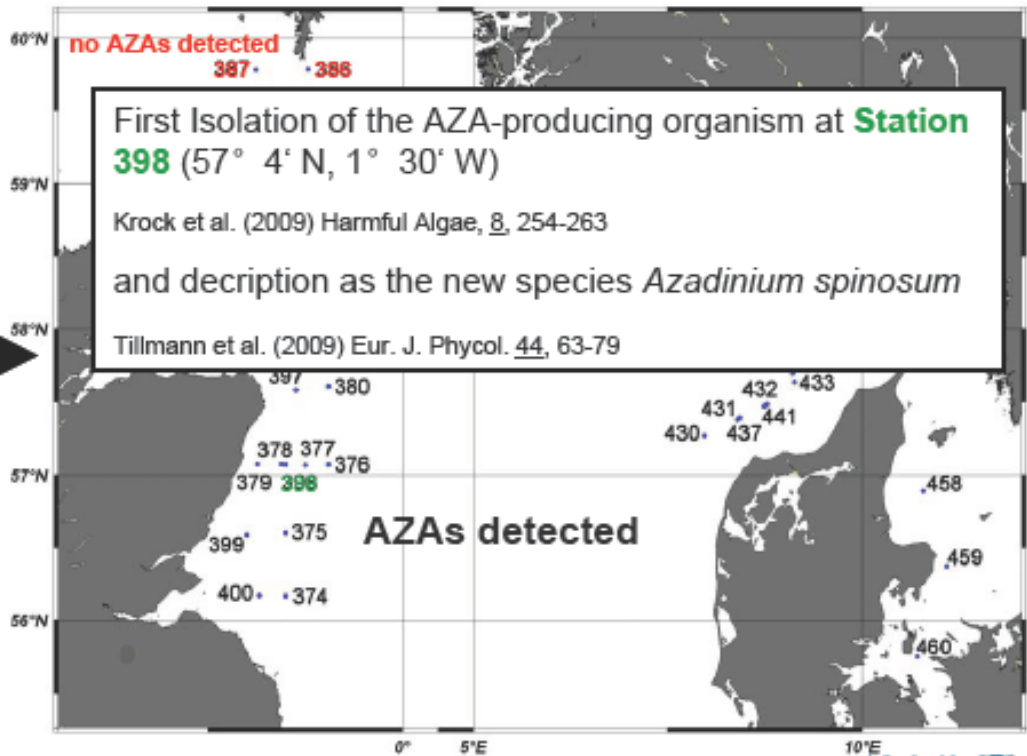
## Historic Background

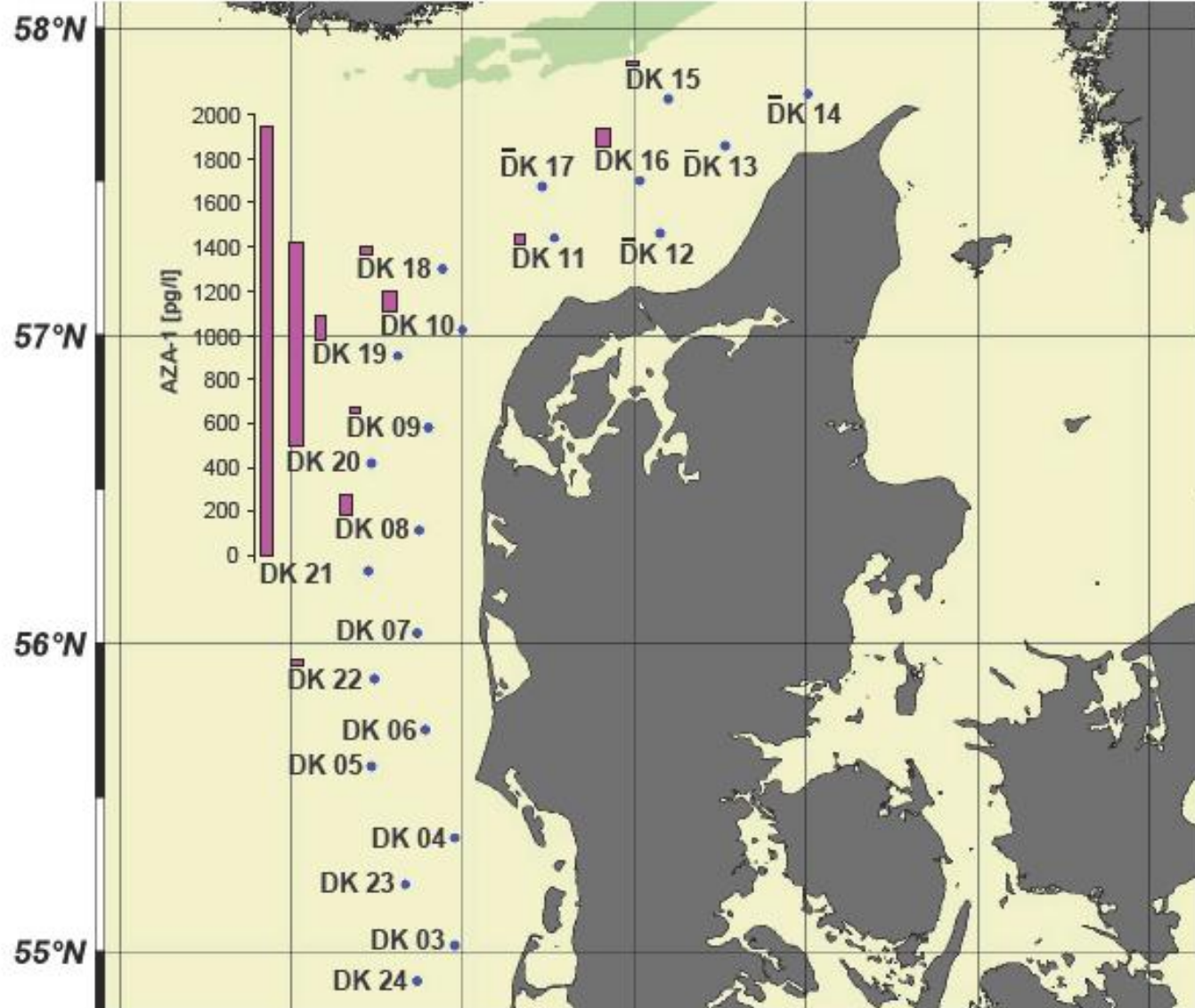
Moran et al. report that there was no correlation between the occurrence of *Protoperidinium* spp. in plankton and azaspiracids in shellfish in Irish waters over a four year period (2002 – 2006).

The authors exclude *Protoperidinium* as the source of azaspiracids



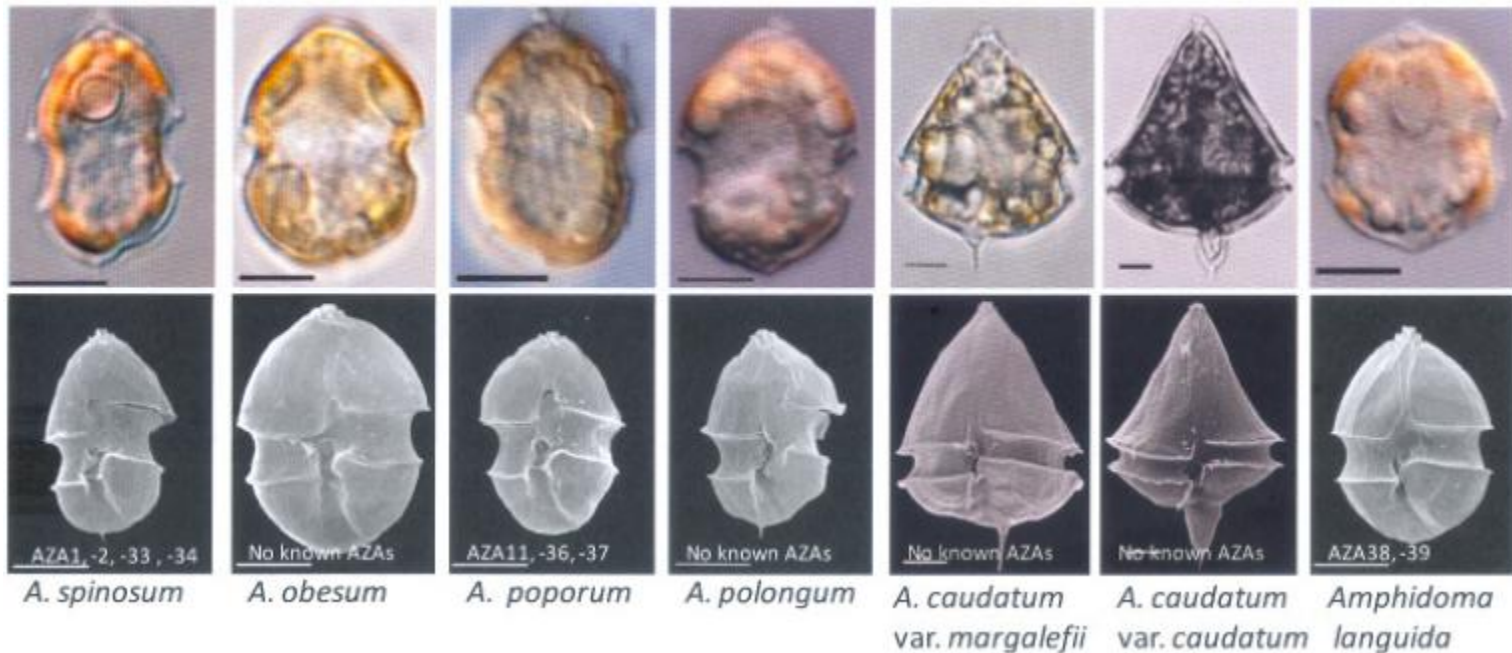
June/July 2007 +







*Azadinium spinosum* y otras especies relacionadas con los AZAs



Akselman, R., Negri, R.M., 2010. *Azadinium spinosum* Elbrächter et Tillmann (Dinophyceae) is present and also caused blooms at the southwestern Atlantic. Abstract book, 14th ICHA, Creta 2010..



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

## Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



# Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*

Thierry Jauffrais<sup>a,\*</sup>, Claire Marcaillou<sup>a</sup>, Christine Herrenknecht<sup>b</sup>, Philippe Truquet<sup>a</sup>,  
Véronique Séchet<sup>a</sup>, Elodie Nicolau<sup>a</sup>, Urban Tillmann<sup>c</sup>, Philipp Hess<sup>a,\*</sup>

## ***Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française**

*Elisabeth NÉZAN\* & Nicolas CHOMÉRAT*

*IFREMER, Laboratoire Environnement et Ressources – Finistère Bretagne-Nord,  
13 rue de Kérose, 29187 Concarneau Cedex, France*

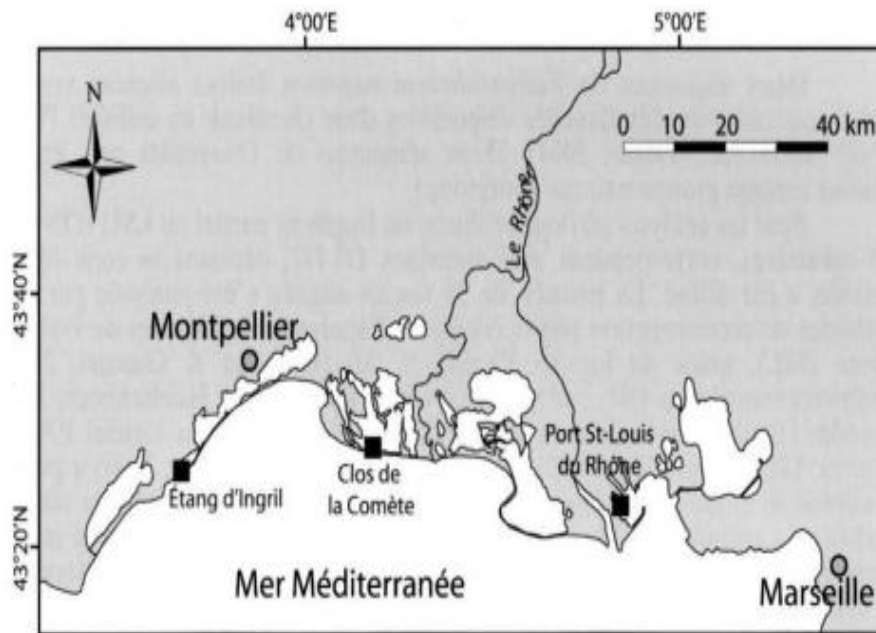
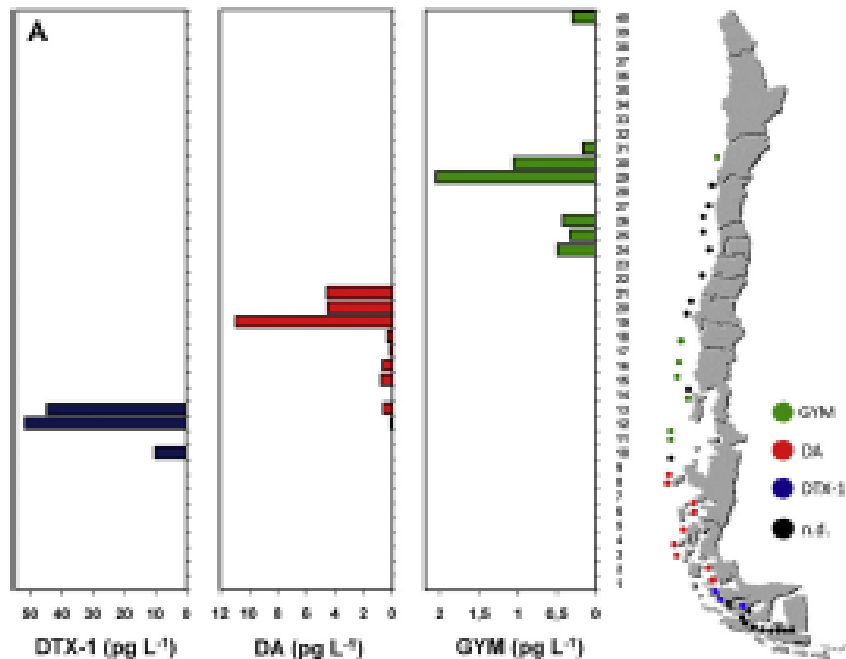


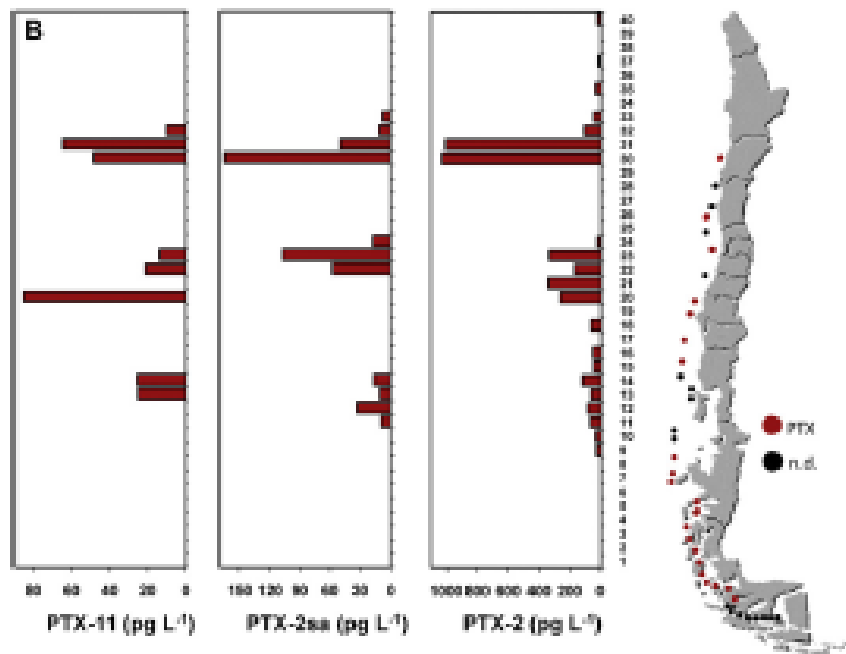
Fig. 1. Localisation des trois sites d'échantillonnage.



*Vulcanodinium rugosum*



Distribución latitudinal de toxinas en Chile en el mes de marzo



Trefault et al.  
*Toxicon* 2011

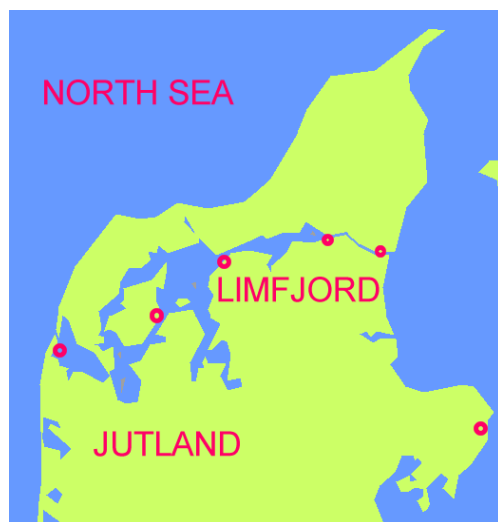


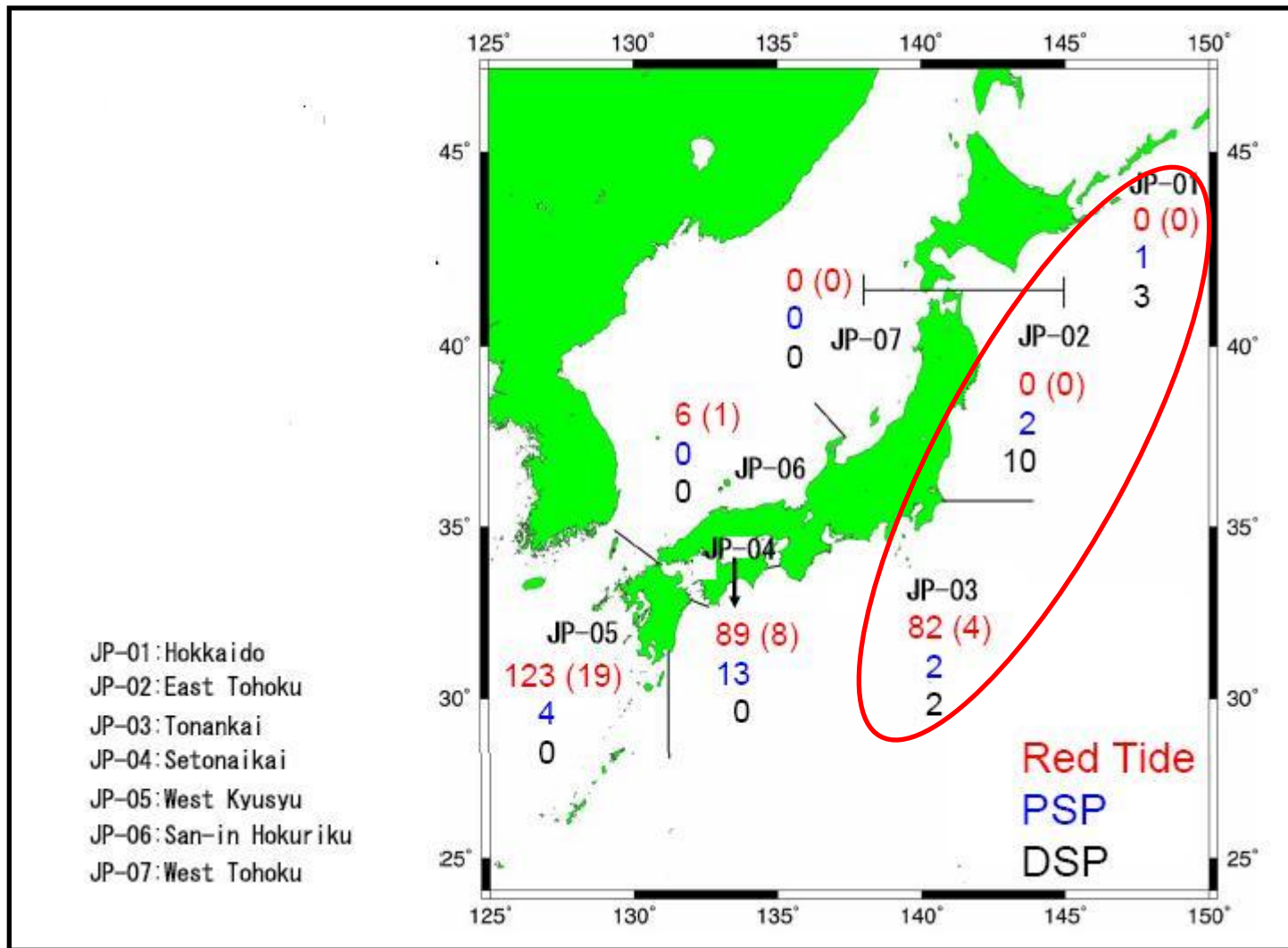
TABLE 1.

Okadaic acid content per cell and *D. acuminata* concentration in water samples taken in different production areas in the Limfjord October 9, 2006.

Production Area	No. of Filters	Total Volume (l)	Volume/ Filter (l)	<i>D. acuminata</i> (Cells l <sup>-1</sup> )	OA Content (pg cell <sup>-1</sup> )
9	5	1	0.2	400	19
15	5	1	0.2	360	26
25	5	1	0.2	0	-
37	5	1	0.2	1,000	35
38	5	1	0.2	1,300	30
39	5	1	0.2	650	72
31	5	1	0.2	7,400	33
31	2	1	0.5	7,400	30
31	2	2	1.0	7,400	27
31	1	10	10	7,400	10

LC-MS analyses, Jorgensen & Andersen (2007)





## Harmful Algae Events in Japan reported to PICES 2006

Different *Dinophysis* toxin profiles (dominated by PTXs and different shellfish resources (bioconversion) on the west (Suzuki et al. 2001, 2003, 2009.....))

Mar. Drugs 2013, 11, 1-x manuscripts; doi:10.3390/md110x000x

OPEN ACCESS

*marine drugs*

ISSN 1660-3397

[www.mdpi.com/journal/marinedrugs](http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs)

Article

## Evaluation of Passive Samplers as a Monitoring Tool for Early Warning of *Dinophysis* Toxins in Shellfish

Gemita Pizarro <sup>1,†</sup>, Ángeles Moroño <sup>2</sup>, Beatriz Paz <sup>1</sup>, José M. Franco <sup>3</sup>, Yolanda Pazos <sup>2</sup> and Beatriz Reguera <sup>1,\*</sup>