

Floraciones Algales Nocivas: Perspectivas y Estrategias Biotecnológicas Para Su Detección

Angélica Herrera Sepúlveda, Arturo Sierra-Beltrán, Norma Hernández-Saavedra*.
*Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo 195. Col Playa Palo de Santa Rita. La Paz 23090, BCS. México. Tel:(52) (612) 123-8484
Fax:(52) (612) 125-3625. email: nhernan04@cibnor.mx*

Palabras clave: Floraciones algales nocivas, detección, técnicas moleculares.

potencial al ambiente, a la salud y a las actividades humanas.

RESUMEN

Las floraciones algales nocivas (FAN) pueden definirse como eventos naturales en los que las concentraciones de una o varias especies de microalgas alcanzan niveles que causan daño a otros organismos del medio acuático. En las últimas décadas, se ha registrado un incremento en la incidencia de las FAN a nivel mundial. Los impactos de estos fenómenos incluyen: mortalidades masivas de organismos silvestres y cultivados (mamíferos y aves marinas, peces, mariscos, etc.), afectaciones en el humano que van desde una leve intoxicación hasta la muerte por la ingesta de alimentos contaminados o simplemente por contacto o inhalación. En general, las FAN provocan la alteración del hábitat marino y consecuentemente alteraciones en la estructura de las cadenas tróficas. El método clásico para la detección y enumeración de especies formadoras de FAN, es la observación directa de material vivo o fijado, mediante microscopía de luz. Sin embargo, este proceso es tedioso y lento, y requiere de taxónomos expertos. Para resolver estos problemas, en los últimos años se ha incrementado la atención de la comunidad científica en el uso y desarrollo de técnicas moleculares basadas principalmente en el ADN ribosomal, para la identificación y enumeración de especies formadoras de FAN. En esta contribución se presenta un análisis de los fenómenos FAN, haciendo énfasis en aquellas que afectan las costas Mexicanas así como una revisión de las metodologías, basadas en herramientas de biología molecular, propuestas para resolver la problemática de la detección oportuna y la identificación de las especies involucradas para determinar el riesgo

Key words: Harmful algal blooms, detection, molecular techniques

ABSTRACT

Harmful algal blooms (HAB's) can be defined as events where the concentration of one or several harmful algae reaches levels which can cause harm to other organism in the sea. For example by killing fish and shellfish, our cause accumulation of algal toxins in marine organism which eventually harm other organism who will eat the toxic species. Over the last several decades coastal regions throughout the world have experienced what appears to be an escalation in the incidence of blooms. Impacts of these phenomena include mass mortalities of wild and farmed fish and shellfish; human illness and death from toxic seafood or from toxin exposure through inhalation or water contact; illness and death of marine mammals, seabirds, and other animals; and alteration of marine habitats and the trophic structure. For the purpose or reducing the damage caused by HABs it is necessary the development of techniques for precise identification and monitoring of the HAB species. The classical approach for detecting and enumerating phytoplankton species is the direct observation by light microscopy of live or preserved material, however, it is considered to be tedious, time-consuming and requiring an appropriate level of experience/expertise in phytoplankton identification. To solve these problems, attention has increasingly focused on molecular techniques that use genetic markers like ribosomal DNA.

FLORACIONES ALGALES NOCIVAS

De las 5,000 especies de algas marinas descritas (Andersen, 1996), aproximadamente 300 pueden presentarse en cantidades tan elevadas (floraciones) que cambian el color de la superficie del mar, en las denominadas mareas rojas (Hallegraeff, 1995; Lindahl, 1998).

Las mareas rojas ó los florecimientos algales nocivos (FAN ó HABs, por sus siglas e ingles), son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural como resultado de la combinación de mecanismos físicos, químicos y biológicos, por ejemplo, a consecuencia de procesos hidrográficos como las surgencias, los frentes de contacto entre dos masas de agua de diferente densidad, salinidad o temperatura, ó por alteraciones de origen antropogénico (Alonso & Ochoa, 2004).

Este tipo de eventos es causado por diversos microorganismos y algunas especies pueden ser nocivas incluso a bajas densidades, es decir, sin llegar a formar "blooms" ó cambios de coloración aparente en las masas de agua (Anderson, 2003; Van Egmond *et al.*, 2005) que pueden presentarse como rojo, verde, ocre o amarillo, haciendo evidente su presencia (Van Egmond *et al.*, 2005). En general, las FAN son percibidas como dañinas por el hombre debido a sus efectos adversos en el ambiente; repercutiendo directamente en la salud humana, en las actividades de acuicultura, recreación, turismo y en las poblaciones naturales de organismos marinos de zonas costeras; por lo que el estudio de la problemática vinculada a estos fenómenos ha adquirido gran relevancia.

Algunas especies de microalgas que producen cambios en la coloración en las masas de agua son básicamente inocuas. Sin embargo, otras pueden florecer tan densamente (del orden de 10^6 cel/L) que matan indiscriminadamente peces e invertebrados (especialmente en sistemas de cultivo intensivo), al agotar el oxígeno y/o bloquear y dañar sus branquias. Por otra parte, están descritas alrededor de 75 especies de microalgas capaces de producir poderosas toxinas que se

transfieren a través de la cadena alimenticia (moluscos, crustáceos y peces de escama) para ser consumidas finalmente por el hombre, provocando diversas enfermedades gastrointestinales y neurológicas (Hallegraeff, 1995; Sar *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Algunas especies producen toxinas en baja concentración debiendo contar con millones de células por litro para ser tóxicas, mientras que otras, con unos cuantos cientos de células por litro, resultan ser altamente perjudiciales (Hallegraeff, 1995; Van Egmond *et al.*, 2005).

Los eventos de mareas rojas tóxicas y florecimientos de fitoplancton son producidos por varias especies de microalgas entre las que destacan, por la diversidad de especies involucradas, los dinoflagelados (Cortés, 1998). Los dinoflagelados son una basta división de microalgas, que conforman una fracción importante dentro de los productores primarios de la cadena trófica; son organismos unicelulares eucarióticos, que pueden desarrollarse en forma simbiótica, parasitaria, béntica y/ó de vida libre. Estos organismos, presentan una serie de características morfológicas y fisiológicas que les ha permitido adaptarse a distintos hábitats (Cortés, 1998). Dentro de estas características destacan fundamentalmente dos: 1) su capacidad de formar parte de los eventos FAN y 2) su capacidad de producir compuestos bioactivos (toxinas) que pueden alterar los procesos celulares de otros organismos.

TOXINAS

Las toxinas producidas por organismos formadores de FAN son responsables de una serie de enfermedades humanas asociadas con el consumo de organismos marinos y, en algunos casos, por su exposición a las mismas en forma de aerosoles. A nivel mundial, las toxinas producidas por microalgas marinas son responsables de mas de 60,000 incidentes de intoxicación por año, con un 1.5% de mortalidad. Además de los efectos en la salud humana, estas toxinas son responsables de

la muerte de cientos de toneladas de peces y moluscos, y se les ha implicado con la muerte de mamíferos, aves y otros animales marinos a través de su transferencia por la cadena trófica (Hallegraeff, 1995).

Las toxinas producidas por organismos formadores de FAN son inodoras, incoloras, termoestables y estables bajo condiciones ácidas, generalmente se acumulan en las vísceras y otros tejidos de los peces y moluscos, haciendo estas partes especialmente peligrosas para su consumo

(Van Egmond *et al.*, 2005). Su actividad se basa en su solubilidad; algunas son hidrosolubles (tetrodoxinas, saxitoxinas y ácido domóico) y otras son liposolubles (ácido okadáico, brevetoxinas y ciguatoxinas); sin embargo, esta característica no se usa para su clasificación. En general, la clasificación de estas toxinas se basa en los signos y síntomas del tipo de síndrome o envenenamiento que provocan (Tabla 1), algunas veces acompañado por el nombre de la toxina o del animal que las contiene (Poletti *et al.*, 2003). Por

Tabla 1. Enfermedades humanas asociadas a FAN.

Síndrome	Organismos causante	Toxina	Ruta de adquisición	Manifestación clínica
Intoxicación por ciguatera	<i>Gambierdiscus toxicus</i> (béntico) <i>Ostreopsis siamensis, etc.</i>	Ciguatoxina	Transferencia a través de la cadena trófica; consumo de peces carnívoros	Gastroenteritis aguda, síntomas neurológicos como parestesias
Intoxicación paralítica	<i>Alexandrium catenella, A. minutum, A. tamarensis, A. ostenfeldii, Gymnodinium catenatum, Pyrodinium bahamense var compressum, etc.</i>	Saxitoxinas	Consumo de mariscos cultivados, o de vida libre, en las áreas afectadas	Parestesia y otras manifestaciones neurológicas, parálisis muscular, problemas respiratorios y muerte
Intoxicación neurotóxica	<i>Karenia brevis, K. brevisulcatum, etc.</i>	Brevetoxinas	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas; aerosoles de las toxinas por efecto de las olas	Síntomas neurológicos y gastrointestinales, dificultad para en la respiración e irritación de ojos
Intoxicación diarreica	<i>Dinophysis acuta, D. acuminata, D. fortii, Prorocentrum lima</i>	Ácido okadáico y dinofisistoxinas	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Gastroenteritis aguda
Intoxicación por Azaspirácidos	<i>Protoperdinium crassipes</i>	Azaspirácidos	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Efectos neurotóxicos con severo daño en intestino e hígado
Intoxicación amnésica	<i>Pseudo-nitzschia multiseriata, P. pseudodelicatissima, P. australis, etc.</i>	Ácido domóico y sus isómeros	Consumo de mariscos cultivados en áreas afectadas	Manifestaciones gastrointestinales, neurológicas, generando amnesia en casos severos, coma, muerte

Adaptado de Anderson *et al.*, (2001).

lo anterior, se les conoce como intoxicación parálitica por mariscos (paralytic shellfish poisoning, PSP, por sus siglas en ingles), intoxicación diarreica por mariscos (diarrhetic shellfish poisoning, DSP), intoxicación amnésica por mariscos (amnesic shellfish poisoning, ASP), intoxicación neurotóxica por mariscos (neurotoxic shellfish poisoning, NSP) y ciguatera (ciguatera fish poisoning, CFP) (Cortés *et al.*, 1998; Dawson & Holmes, 1999).

SITUACIÓN DEL LITORAL MUNDIAL

A nivel mundial, en las últimas décadas se ha observado un incremento en la frecuencia, duración, distribución geográfica, intensidad y toxicidad de los episodios de FAN que han impactado la salud y la economía humana, así como la vida marina (Hallegraeff, 1993).

Antes de 1980, se tenían reportes de eventos FAN únicamente en países como Argentina, Brasil, Canadá, Chile, Inglaterra, Japón, Nueva Guinea, Perú, Escocia, España, Estados Unidos, Venezuela y Noruega. Sin embargo, a partir de 1980, los reportes se han incrementado e incluyen nuevos países como Irlanda, Francia, Suiza, Dinamarca, Rumania, Italia y Rusia, en Europa; Tailandia, Hong Kong, India y Filipinas, en Asia; Australia y Nueva Zelanda, en Oceanía; y Guatemala, en América. Del mismo modo, se han identificado nuevas causas probables de la ampliación de la distribución de fenómenos FAN en el mundo: a) el transporte de esporas y quistes de reposo en las sentinas de los barcos que descargan agua de lastre y colonizan áreas no contaminadas; b) el transporte de mariscos portadores de células de resistencia de una región a otra en las actividades de acuicultura; c) mayor disponibilidad de nutrientes como resultado de las actividades humanas que aceleran la eutrofización; d) mayor interés por parte de la comunidad científica por el estudio de estos fenómenos; e) desarrollo de nuevas metodologías con mayor sensibilidad y especificidad de detección e identificación; f) modificación de la línea costera en los sistemas de agua por la lluvia ácida,

deforestación o contaminación, y finalmente, g) fenómenos naturales como “El Niño”, que modifican el clima mundial y la temperatura superficial de los mares (Anderson *et al.*, 2002; Sellner *et al.*, 2003).

SITUACIÓN DEL LITORAL MEXICANO

En México, en la mayoría de los casos, los organismos causantes de FAN han sido escasamente estudiados (Cortés *et al.*, 1998). En la Fig. 1, se presentan algunos de los puntos del litoral mexicano que han sido fuerte y frecuentemente afectados por FAN.

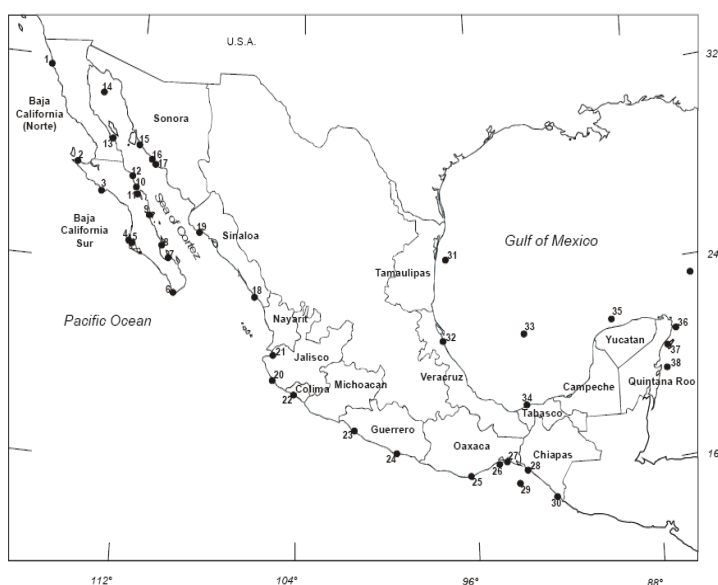


Fig. 1. Localización de Estados de la Republica Mexicana afectados por los eventos FAN (Ochoa *et al.*, 2002).

Okolodkov y Gárate (2006), presentan una lista de aproximadamente 605 especies (91 géneros) y taxones infraespecíficos de dinoflagelados (Dinophyceae), principalmente de vida libre, que han sido reportados para el Pacífico Mexicano. Entre ellos, se pueden mencionar como los géneros más importantes: *Protoperdinium* (111 especies), *Ceratium* (63), *Dinophysis* (41), *Gonyaulax* (25), *Oxytoxum* (22), *Gymnodinium* (22), *Prorocentrum* (21), *Alexandrium* (17), *Ornithocercus* (12) y *Amphidinium* (12). Gómez (1998) realizó estudios planctológicos en las costas del Pacífico Mexicano, en el Golfo de México y en el Mar Caribe durante

1980-1992. Analizó 40 mareas rojas, de las que 30 fueron observadas durante el periodo de 1987-1992.

Trece de ellas fueron tóxicas, producidas principalmente por *Pyrodinium bahamense* (2), *Gymnodinium catenatum* (3), *Scrippsiella trochoidea* (2), *Protoperdinium* sp., *Gonyaulax triacantha*, *Akashiwa sanguinea*, *Alexandrium* sp. *Gonyaulax* spp., *Karenia brevis* y *Prorocentrum minimum*. Las otras 27 FAN fueron inocuas producidas por organismos de los generos: *Myrionecta* (15), *Noctiluca* (4), *Ceratium* (6), *Prorocentrum* y *Akashiwa*.

En la región Noroeste de México, particularmente la Costa Occidental de la península de B.C.S. y Golfo de Baja California, es común que estacionalmente se presenten eventos FAN (Tabla 2), que impactan seriamente la vida marina y las actividades económicas del Estado. Entre las localidades mas afectadas se pueden mencionar las bahías de Guaymas (BG), Kino (BK), Yavaros (BY), Mazatlán (BM), Topolobampo (BT), La Paz (BP), Concepción (BC), Magdalena (BMg) y Banderas (BB), así como las Islas Cerralvo (IC) y Ángel de la Guarda (IAG); las Lagunas Ojo de Liebre (LOL), San Ignacio (LSI); las costas de Cabo San Lucas (CCSL), Loreto (CL) y Canal de San Lorenzo (CSL), entre otros (Cortés *et al.*, 1996; Gárate *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 1997). Específicamente, en la región de Baja California Sur las especies que han sido reportadas con mayor frecuencia son: *Gymnodinium catenatum*, *Akashiwa sanguinea*, *Noctiluca scintillans*, *Gonyaulax polyedra*, *Porocentrum dentatum*, *Porocentrum minimum* y *Pseudo-nitzschia australis* (Cortés *et al.*, 1996).

La relevancia del seguimiento de los FAN en la región noroeste de México, radica en que BCS, tiene como principal actividad económica la pesca y la acuicultura, presentando un desarrollo acelerado, por lo que es necesario asegurar que los productos generados cumplan con los estándares de calidad para poder competir en el mercado internacional; lo

cual tendrá como consecuencia el bienestar económico local, regional, estatal y nacional. Aunado a esto, las costas de La Paz y Cabo San Lucas, son algunos de los principales destinos turísticos, tanto para turistas nacionales como internacionales.

IMPACTOS: ECONÓMICO Y EN LA VIDA MARINA

El impacto económico de las FAN es quizá un aspecto de vital relevancia a nivel gubernamental e industrial, y presenta dificultad para su adecuado cálculo. Esto se debe a que no se reconocen o reportan adecuadamente los costos que conllevan esto fenómenos, como son: salud pública, industria de los alimentos y turismo.

Los costos económicos se encuentran asociados a: 1) pérdida de la producción de granjas acuícolas y depresión del mercado de mariscos por desconfianza del consumidor aun cuando la amenaza haya pasado (efecto halo); 2) oferta de servicios de salud pública; 3) clausura de actividades de recreación y turismo al no poderse asegurar el desarrollo sin riesgos de estas actividades y a 4) limpieza y disposición final de flora y fauna acuática percedera presente en playas y costas (Anderson *et al.*, 2000).

Anderson *et al.* (2000) estimó el impacto económico anual por FAN en Estados Unidos. Para 1987-1992, el promedio del impacto capitalizado a 15 años fue de \$449,291,987 millones de dls/año; de este impacto, el 45% se atribuye a servicio de salud pública, el 37% a pesquerías y pérdidas, el 13% a recreación y turismo y el 4% a monitoreo y mantenimiento Para tener una idea del impacto que tienen las FAN en los ecosistemas marinos, tan solo en el Estado de B.C.S. y Golfo de California, se han registrados mortandades masivas de lobos marinos, pelícanos, moluscos, langostas y peces (entre otros organismos), en los que el agente causal ha sido identificado como FAN (Tabla 2). En el caso de mamíferos y aves marinas la muerte ha sido consecuencia de cuadros de intoxicación y,

Tabla 2. Eventos asociados con FAN en el Golfo de California y Costas de B. C. Sur

Localidad	Fecha (mes/periodo)	Principales especies	Impacto
BP y GC ¹	04/1992	<i>Oscillatoria erythraea</i>	No reportado
BP y GC ¹	05/1993–06/1994	<i>Mesodinium rubrum</i>	
BP ²	04/1992	<i>Prorocentrum mexicanum</i>	Muerte de medusas, peces y aves marinas
BC ²	12/1992	<i>Noctiluca scintillans</i>	
CSL ²	03/1994	<i>N. scintillans</i>	
BP ²	04/1995	<i>M. rubrum</i>	
CCSL ¹	01/1996	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	Muerte de >150 pelícanos café
Atil, Sonora ¹	01/1996	<i>Microcystis LPPB</i>	Perdida de peces (<i>Oreochromis</i> sp.)
CL ¹	02/1996	<i>N. scintillans, Pseudo-nitzschia</i>	No reportado
CCSL ¹	03/1996	<i>Cyanobacteria LPPB, Chatonella</i> sp.	Perdida de peces bentónicos y corales
IC ²	06/1996	<i>M. rubrum</i>	Muerte de peces, medusas y aves marinas
LOL ²	09/1996	<i>Cylindrotheca closterium</i>	
LSI ²	09/1996	<i>Scrippsiella trochoidea</i>	
BP ²	05/1997	<i>M. rubrum</i>	
BMg ²	12/1998	<i>M. rubrum</i>	
BP ²	11/1998	<i>S. trochoidea</i>	
GC ³	12/1998	<i>M. rubrum</i>	No reportado
BP ²	04/1999	<i>S. trochoidea</i>	Muerte de peces, medusas y aves
CSL ⁴	06/2001	<i>Rhizosolenia debyana</i>	No reportado
BM ⁵	03/1999-2000	<i>P. mexicanum</i>	
BM ⁶	01/2000	<i>G. catenatum, N. scintillans</i>	
BP y GC ⁷	09/2000	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	180 peces
BB y GC ⁵	07-12/2000	<i>C. catenatum</i>	13 especies de peces afectadas
BP ⁷	03/2001	<i>M. rubrum</i>	No reportado
CSL ⁴	06/2001	<i>R. debyana</i>	
BP y GC ⁸	12/2001, 2003	<i>A. affine, C. furca, G. catenatum, Gonyaulax digitalis, G. spinifera, P. micans, P. rathymum, P. minimum, S. trochoidea, C. polykrikoides.</i>	Acumulación de PSP en moluscos
BP y GC ⁹	06/2003	<i>Chaetoceros debilis</i>	Mortalidad de <i>Nematoscelis</i>
BP y GC ¹⁰	04/2004–05/2005	<i>Chattonella marina</i>	No reportado
IES ¹¹	10/2004	<i>Gonyaulax polygramma</i>	

Nota: ¹Ochoa *et al.*, 1997; ²Gárate *et al.*, 2001; ³Gárate *et al.*, 2002; ⁴Gárate *et al.*, 2003; ⁵Cortés *et al.*, 2003; ⁶Alonso *et al.*, 2005; ⁷Gárate *et al.*, 2004a; ⁸Gárate *et al.*, 2004b; ⁹López *et al.*, 2006; ¹⁰Band *et al.*, 2005; ¹¹Gárate *et al.*, 2006.

en el caso de peces, ya sea por intoxicación o cianosis debida al abatimiento del oxígeno disuelto disponible debido a las altas densidades de microalgas que se han presentado (SEMARNAT & PROFEPA 1997; Sierra-Beltrán *et al.*, 1997, 1998, 2005; Gallo *et al.*, 2004).

Por ejemplo, la Marea Roja ocurrida durante agosto-septiembre de 2007 en la zona de Punta Abrejos tuvo un impacto significativo en los principales recursos pesqueros y acuícolas de importancia comercial, entre ellos: abulón, langosta, caracol, almeja pismo y ostión de cultivo, además de una gran variedad de especies de escama. Los estudios del Instituto Nacional de La Pesca a través del Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz (CRIP La Paz) realizados en septiembre de 2007 muestran una disminución del 40 % en la abundancia de abulón respecto al promedio de los últimos tres años, y 80 % en el caracol. En el caso de la langosta se observó una disminución cercana al 65% en la abundancia relativa, sugiriendo una posible disminución de más del 50% de la captura en la temporada 2007-2008. Además, se observó 95 % de mortalidad en el cultivo de ostión (comunicación personal Arturo Sierra-Beltrán).

PROGRAMAS DE MONITOREO

Con el propósito de reducir el daño ocasionado por las FAN, se requiere de estudios básicos para establecer las causas probables que las originan, así como sus efectos en los ecosistemas. Al mismo tiempo, el desarrollo de un programa de vigilancia y/o monitoreo, es un elemento operacional necesario para el manejo y disminución de los efectos de las FAN, con la finalidad de efectuar una detección temprana en los ecosistemas de las densidades poblacionales de las especies que las constituyen, ya que estos fenómenos generalmente están constituidos por más de una especie. Llevando un registro de estos fenómenos, se puede establecer su periodicidad y/o interrelación con algunos otros eventos naturales, permitiendo dar un

paso adelante en su predicción (Sellner *et al.*, 2003).

Los objetivos a los que se apegan los programas de monitoreo son los siguientes 1) protección a la salud pública; 2) protección a los recursos explotados y su mercado (de vital relevancia debido a que la acuicultura es una de las principales actividades económicas a nivel mundial); 3) aplicación de planes de contingencia y mitigación (v. gr. cosecha anticipada, salvaguarda de reproductores, traslado de jaulas, etcétera) y 4) adquirir capacidad de predicción de eventos FAN (Sar *et al.*, 2002). Sin embargo, el establecimiento real de los programas de monitoreo, presenta una fuerte problemática, relacionada con la insuficiencia de equipo y personal capacitado, aunada al inadecuado monitoreo de los parámetros ambientales. En los monitoreos se deben incluir a) observación biológicas (caracterización de especies tóxicas y otras especies de fitoplancton) y detección de toxinas; b) observación física (temperatura, velocidad y dirección del viento, atenuación/turbidez del agua) y c) observación química (clorofilas, salinidad, oxígeno y nutrientes) (Anderson *et al.*, 2001). Con la finalidad de establecer un ejercicio de monitoreo a nivel nacional, la Unidad de Educación en Ciencia y Tecnología del Mar de la Secretaría de Educación Pública (hoy Dirección General) DGECyTM-SEP, inició un Programa Nacional de Investigación en Microalgas Nocivas y Biotoxinas Marinas, en colaboración entre los planteles educativos dependientes de la UECyTM-SEP, el cual operó bajo la coordinación del CIBNOR desde 1998 hasta el 2002, en que la SEP tomó la responsabilidad de continuar con el Programa (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Sierra-Beltrán & Cortés 1999). En BCS, desde 1992 el CIBNOR inició por cuenta propia actividades de monitoreo, cubriendo algunos puntos de las costas del Golfo y del Pacífico (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Ochoa *et al.*, 1997). A los pocos años, el costo de los recorridos para la obtención de las muestras a analizar, hizo

imposible dar continuidad de esta actividad de manera permanente, sin embargo, se continua trabajando mediante muestras de oportunidad y asistiendo, en colaboración con otras dependencias oficiales (Secretarías de Salud, de Marina y de Pesca, PROFEPA, SAGARPA, etc.) a todos los eventos que ocurren en el estado.

DETECCIÓN DE FAN: PASADO Y PRESENTE

Hoy en día, el método de monitoreo más ampliamente utilizado es la microscopía de luz; esta técnica provee una confirmación visual de la presencia de especies en las muestras de agua y genera un estimado de la abundancia de células. Esta metodología ha sido probada como adecuada para la detección de algas tóxicas (Scholin & Anderson, 1998), sin embargo, frecuentemente requiere de taxónomos expertos, presenta un elevado consumo de tiempo y, desafortunadamente, no presenta suficiente resolución para la identificación a nivel especie de todos los organismos formadores de FAN, lo que dificulta un rápido análisis (Miller & Scholin, 1998). La baja resolución del método se debe a que muchas características taxonómicas son reveladas mediante microscopía electrónica, como tamaño y forma de la célula, posición de cloroplastos, arreglo de las placas y complejos de poros apicales (Hallegraeff, 1993). Un método alternativo para detectar las células de fitoplancton, basado en sus propiedades morfológicas y ópticas utilizando el principio de la citometría de flujo, es el uso del instrumento FLOWCAM

(<http://www.fluidimaging.com/default.aspx>).

En los últimos 10 años se ha observado, a nivel mundial, un incremento en el uso de técnicas moleculares para estudiar aspectos ecológicos y evolutivos del fitoplancton. Los aspectos evolutivos se han enfocado principalmente a las relaciones filogenéticas entre las especies y sus implicaciones en la taxonomía. Por otra parte, en los estudios ecológicos se han usado herramientas moleculares para investigar la biodiversidad genética, para

identificar y tamizar poblaciones de fitoplancton en presencia de fitoparásitos o su habilidad para producir toxinas (Bruin *et al.*, 1993). Hoy en día, la biología molecular provee a los ficólogos de un paquete de valiosas herramientas para el estudio de las relaciones genéticas de las cepas, poblaciones o niveles taxonómicos mayores. Sin embargo, la aplicación de herramientas moleculares para resolver preguntas científicas específicas no es directa, ya que existe un gran número de técnicas disponibles. Cada técnica molecular se basa en un número de suposiciones teóricas tales como los criterios de homología, independencia del marcador, equilibrio de Hardy-Weinberg, etc. Además, las diferentes técnicas tienen sus propias fortalezas y debilidades en aspectos metodológicos tales como la resolución, costo, instrumentación y experiencia técnica requeridas. Por otra parte, las especies difieren en su variación genética en *loci* específicos; de aquí que una técnica que revela un alto nivel de polimorfismo en una especie no necesariamente revela el mismo nivel de polimorfismo en otras.

En particular, una de las atractivas ventajas que se puede explotar de las técnicas moleculares, es que estas proveen marcadores moleculares los cuales permiten identificar con una alta sensibilidad a diferentes organismos; puesto que se basan en la secuencia única de nucleótidos propias del ADN de los organismos.

La primera técnica molecular que fue disponible para estudios de investigación genética en fitoplancton fue la electroforesis de aloenzimas (o, en su caso, isoenzimas). De ahí que los primeros estudios realizados para investigar las similitudes genéticas en fitoplancton se realizaron con las diatomeas marinas *Thalassiosira pseudonana* y *T. fluviatilis* (Murphy & Guillard, 1976). Posteriormente, Gallagher (1980) realizó estudios genéticos en poblaciones en *Skeletonema costatum* con la misma técnica. En 1997, Chinain *et al.* trataron de correlacionar, sin éxito, la producción de toxinas con la variación de isoenzimas en *Gambierdiscus*

toxicus. Desde estos primeros estudios a la fecha, se ha encontrado que la resolución de la técnica no es alta (a nivel fenotípico y genético), ya que se puede encontrar variación entre-, pero no dentro- de poblaciones, por lo que esta técnica puede desestimar seriamente el nivel de variación genética, si se compara con otras técnicas moleculares.

RFPL, RAPDS, AFLP

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en ingles) fue una de las primeras técnicas moleculares usadas en estudios de fitoplancton que, combinada con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), resulta ser mas simple y rápida en la obtención de resultados (Bruin *et al.*, 1993). La técnica PCR-RFPL ha sido usada para la identificación de marcadores genéticos específicos de grupo y/o cepa en organismos del genero *Alexandrium* aislados de todo el mundo (Judge *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1994; Scholin & Anderson, 1994), usando los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA, por sus siglas en ingles).

Mediante esta metodología se han generando marcadores taxonómicos y biogeográficos útiles para rastrear la dispersión regional o global de poblaciones particulares. Con estas técnicas (RFLP y PCR-RFLP) es posible encontrar numerosos polimorfismos entre cepas, tanto en regiones codificantes como no codificantes, pero demanda mayor experiencia técnica y tiempo para el desarrollo de un numero suficiente de marcadores polimórficos que otras técnicas basadas en la PCR como el Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar (RAPD, por sus siglas en ingles) y el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Amplificación (AFLP, por sus siglas en inglés).

Los RAPDs se basan en el uso de cebadores cortos, únicos (8-10 bases), sintetizados de manera aleatoria, para la amplificación de un promedio de 3 a 10 regiones de ADN de forma simultánea,

analizándose con base en la presencia-ausencia de bandas de tamaño específico. Esta técnica, cuyo costo y requerimientos técnicos y de infraestructura son mínimos, ha sido ampliamente usada para el estudio de poblaciones de diatomeas como *Fragilaria capuchina* (Lewis *et al.*, 1997), así como de cianobacterias de los géneros *Nodularia* y *Anabaena* (Bolch *et al.*, 1999a) y dinoflagelados tóxicos como *Gymnodinium catenatum* (Bolch *et al.*, 1999b) encontrando, en todos los casos, altos niveles de variabilidad entre las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la desventaja de este método es su baja reproducibilidad y la dominancia de los marcadores, por lo que no pueden calcularse frecuencias alélicas; debido a ello esta metodología ha sido reemplazada por otras técnicas como AFLP.

DGGE, SSCP

Las técnicas de electroforesis desnaturalizante en Gel de Gradiente (DGGE, por sus siglas en ingles) y Polimorfismo Conformacional de Hebra Simple (SSCP, por sus siglas en ingles) pueden detectar polimorfismo en pequeños fragmentos producidos mediante la digestión de ADN genómico y/o amplificación de segmentos específicos por PCR, que no es detectable mediante RFPL. Estas técnicas fueron aplicadas al estudio de la variabilidad genética (espacial y temporal) del dinoflagelado toxico *Pfiesteria piscicida* en aguas costeras y estuarinas (Coyne *et al.*, 2001).

Aunque la resolución de estas técnicas es alta, ambas presentan la desventaja de requerir de equipo especializado de alto costo y, a diferencia de los RAPDS, se requiere de información de la secuencia de nucleótidos de las regiones flanqueantes a los segmentos de interés.

SONDAS MOLECULARES

El examen detallado de la morfología celular, estudios electroforéticos de enzimas y la comparación de la composición de toxinas han sido utilizadas para establecer el parentesco entre

diversos aislamientos de *Alexandrium*, colectados de diversas localidades del mundo (Scholin *et al.*, 1993). Sin embargo, se plantean como métodos alternativos el análisis de los genes del ARN ribosomal (ADN ribosomal, ADNr) y sus productos (ARNr). Las secuencias del ADNr se han usado extensamente como indicadores taxonómicos y filogenéticos de una gran variedad de organismos (Tabla 3). Los genes del ARN restan constituidos

por dominios que pueden ser altamente variables o altamente conservados entre los organismos; los elementos conservados y variables son valiosos para estudios taxonómicos y filogenéticos a escala amplia o fina.

El análisis de secuencias de ADNr no depende del estado fisiológico del organismo ni de la expresión sincronizada de otros genes; algunos dominios del ADNr que evolucionan mas

Tabla 3. Regiones del ADNr empleadas para la identificación de organismos presentes en eventos de mareas rojas.

Región del ADNr	Especie	Localidad	Formato
LSU	<i>Peridinium</i> sp ¹ ; <i>A. tamarense</i> , <i>A. catenella</i> ^{2,6} ; <i>A. fundyense</i> ^{5,10} ; <i>P. pungens</i> , <i>P. multiseries</i> , <i>P. australis</i> , <i>P. heimii</i> , <i>P. fraudulenta</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. delicatissima</i> y <i>P. americana</i> ³	Corea , EUA, Japón y Alemania	DNA Sequence FISH, Sandwich hybridization, anticuerpos monoclonales
ITS y SSU	<i>Peridinium</i> sp ¹ ; <i>A. catenella</i> ^{4,12} ; <i>A. tamarense</i> ⁴ ; <i>A. affine</i> , <i>A. insuetum</i> , <i>Pseudogonyaulax</i> sp., <i>A. fraterculus</i> , <i>A. lusitanicum</i> ¹³ , <i>G. mikimotoi</i> , <i>P. micans</i> , <i>Am. carterae</i> , <i>H. triquetra</i> , <i>Sk. costatum</i> , <i>Ch. antique</i> , <i>Heterosigma akashiwo</i> , <i>Microcystis</i> ⁷ ; diversidad de la comunidad del plancton ^{8,9} ; <i>Dinophysis</i> ¹¹ ; <i>C. polykrikoides</i> ¹²	Corea, EUA, Japón, China España y Portugal	PCR-DGGE FISH, DNA, RFLP Sequence, PCR

Notas: ¹Ki & Han, 2005; ²Tanabe & Sako, 2006; ³Scholin *et al.*, 1996; ⁴Adachi *et al.*, 1996a, b; ⁵Anderson *et al.*, 1999; ⁶Sako *et al.*, 2004 ; ⁷Saker *et al.*, 2007; ⁸Yan *et al.*, 2007; ⁹Savin *et al.*, 2004 ; ¹⁰Anderson *et al.*, 2005 ; ¹¹Takahashi *et al.*, 2005 ; ¹²Ki *et al.*, 2005a ; ¹³Walsh *et al.*, 1998.

rápidamente, pueden ser útiles como marcadores específicos de población o de cepa. Scholin & Anderson (1993) usando la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA, por sus siglas en ingles), encontraron la presencia de dos genes diferentes con los que se pueden distinguir especies toxicas de no toxicas (Scholin *et al.*, 1993). Por otro lado,

fragmentos de la subunidad mayor del ADNr (LSU rDNA, por sus siglas en ingles) revelaron dominios hipervariables, que pueden proveer de información altamente específica y útil para la delimitación de poblaciones genéticamente similares.

En otros estudios, se han usado oligonucleótidos dirigidos a la LSU rRNA para

identificar y enumerar especies de los géneros *Alexandrium* y *Pseudo-nitzschia*, obtenidas de cultivos puros y poblaciones naturales, en formatos de células completas e hibridación en sándwich (Scholin *et al.*, 1994; Miller & Scholin, 1998). En el formato de hibridación de células completas (método basado en el procesamiento de muestras a través de filtración) la visualización se realiza a través de observaciones al microscopio (epifluorescencia) ya que las células blanco marcadas, después del proceso de hibridación, exhiben fluorescencia. Por otro lado, el formato de hibridación en sándwich, que consiste en la captura e inmovilización del LSU rRNA en un soporte sólido (con oligonucleótidos acoplados) y su hibridación con una sonda señal específica ADN, se detecta mediante colorimetría. Se encontró que la intensidad del color detectada es directamente proporcional a la abundancia de las especies blanco en las muestras originales. La hibridación en sándwich tiene posibilidades de semi-automatizarse; debido a ello, esta técnica ofrece potencialmente un medio más simple y rápido para la enumeración de especies, cuando se analizan un gran número de muestras tomadas directamente del medio natural.

Scholin *et al.* (1997; 1999), encontraron que la especificidad de los métodos de detección basados en sondas de ARN marcadas para especies del género *Pseudo-nitzschia* en muestras de campo, puede arrojar resultados imprecisos o contrastantes. Mientras el formato de células completas detecta específicamente organismos de la especie blanco, en la hibridación en sándwich pueden presentarse reacciones inespecíficas debido a la contaminación de muestras de esta naturaleza, no siendo posible complementar el uso de los dos métodos debido a que los ensayos están referenciados bajo diferentes estándares: moléculas intracelulares vs. moléculas libres en solución.

Mientras que Scholin *et al.* (1999) observaron

que el contenido de ARNr de cada especie blanco permanece relativamente estable, independientemente de los cambios en el estadio de crecimiento, Anderson *et al.* (1999), al comparar dos metodologías más finas (sondas LSU rRNA y anticuerpos monoclonales (ambas combinadas con citometría de flujo para la cuantificación de células) encontraron que el uso de sondas de ARNr para la detección de células completas de *Alexandrium* es variable, existiendo diferencias en el contenido de ARNr en las células en función de la fase y temperatura de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, ellos no observaron estas diferencias cuando usaron para la detección anticuerpos monoclonales dirigidos a proteínas de la superficie celular, sugiriendo a este último método como el más apropiado para automatización; el uso de estas técnicas con conteos manuales, no presenta mayores complicaciones.

SINGLE CELL PCR

Un método nuevo, simplificado, para la diagnosis de FANs basado en la secuenciación de ADNr (subunidad pequeña), que integra procedimientos de extracción de ADN y PCR en un solo tubo, y secuenciación directa de los productos sin purificar (Ki *et al.*, 2005a) resuelve las ambigüedades taxonómicas de especies de microalgas estrechamente relacionadas (*Cochlodinium polykrikoides* y *Alexandrium catenella*), constituyendo un parte-aguas para el análisis molecular de especies de dinoflagelados no cultivables (Ki *et al.*, 2005b).

Una de las tendencias metodológicas más recientes para el estudio de poblaciones de microalgas tóxicas es el uso de PCR en tiempo real para la rápida detección de especies de interés en cultivos y muestras de campo (Bowers *et al.*, 2000; 2001), obteniendo resultados altamente sensibles y específicos. Sin embargo, las desventajas del PCR en tiempo real radican en el costo del equipo y la

necesidad de desarrollo de sondas y cebadores especializados.

ROBOTS

Bajo la perspectiva general anterior, la tendencia actual y futura es hacia la automatización para la toma y procesamiento de muestras ambientales *in situ*, con la finalidad de detectar la presencia de las firmas moleculares de especies formadoras de FAN. Para ello, en el Instituto de Investigación del Acuario de la Bahía Monterey, CA (MBARI, por sus siglas en inglés) se ha desarrollado el Procesador de Muestras Ambientales de primera generación (1G ESP, por sus siglas en inglés), que es un sistema electromecánico/ instrumento diseñado para la colecta de muestras discretas de agua de la superficie de los océanos, la concentración de microorganismos y la aplicación automática de sondas moleculares para la identificación de microorganismos basado en el análisis de ARNr (Scholin *et al.*, 1998). Además, el 1G ESP almacena muestras discretas para análisis de ácidos nucleicos, microscopía y otros procedimientos analíticos después de que el instrumento se recupera del campo. En la actualidad ya existe una nueva generación del ESP, el 2G ESP, que básicamente tiene mejoras de diseño: sistema instrumental modular de fácil reconfiguración, para adaptarse a una variedad de condiciones o escenarios. Adicionalmente, se ha disminuido el consumo de energía (para el uso de baterías recargables durante 6-12 meses), se ha reducido el tamaño para permitir su recuperación por embarcaciones pequeñas, y se han incorporado mejoras sustantivas en mantenimiento, confiabilidad y flexibilidad del sistema mecánico y software (<http://www.mbari.org/microbial/esp/>)

IMÁGENES DE SATÉLITE

En algunos casos, se pueden usar con éxito el análisis de imágenes por satélite como parte de un programa de monitoreo pro-activo. Por ejemplo, los movimientos de la Corriente del Golfo y el aumento

de la temperatura del agua cumplen una función clave en los brotes de *K. brevis*; el monitoreo de las aguas a través de un sensor remoto de radiación infrarroja puede brindar información sobre la probabilidad de un brote (Hungerford & Wekell, 1993).

También el monitoreo del color del océano mediante imágenes satelitales se usa actualmente en el Golfo de México para detectar y dar seguimiento a los FAN de *K. brevis*. Gracias a ello, se distribuye un boletín pronóstico a los estados afectados por parte del NOAA (National Ocean Service Center for Coastal Monitoring and Assessment). Este boletín (http://coastwatch.noaa.gov/hab/bulletins_ms.htm) se basa en la integración de datos como son: análisis de imágenes del color del océano, datos sobre corrientes obtenidos de estaciones meteorológicas, observación de campo de floraciones locales de los estados de Texas y Florida y pronósticos del tiempo proporcionadas por el servicio meteorológico nacional.

La combinación de la prevención y rápida detección proporciona ayuda significativa a los estados del Golfo para responder ante estas situaciones.

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LOS IMPACTOS DE LAS FAN

Las opciones para el manejo de los impactos de las FAN incluyen: la prevención (reducción de su incidencia y alcance), el control (detener o controlar las floraciones) y la mitigación (medidas para minimizar sus impactos). La forma más efectiva de prevenir efectos adversos de las FAN en la salud humana, es la prevención de la exposición a los organismos y toxinas (Fleming *et al.*, 1995). Esto implica el establecimiento de un programa de monitoreo adecuado, que deberá involucrar pruebas de productos marinos silvestres y cultivados (producidos directamente en ambientes naturales) para realizar efectivamente un rastreo del sitio de origen de las toxinas, preferentemente,

en las áreas afectadas por la ocurrencia de microalgas tóxicas y brindar información oportuna a la población potencialmente involucrada.

Así mismo, se deben planificar programas de vigilancia en otras áreas de interés potencial, a fin de evitar la exposición humana en áreas afectadas por FAN tóxicas. Los extensos registros de datos sobre fitoplancton (tóxico y nocivo, entre otros) pueden facilitar el entendimiento de su dinámica y de la función del ecosistema.

Los florecimientos de algas son el resultado de una complicada interacción entre condiciones hidrográficas, meteorológicas, biológicas y químicas, pudiéndose controlar solo algunas de ellas. La falta de nutrientes esenciales (nitratos y fosfatos) impide que las poblaciones de microalgas alcancen las proporciones de un florecimiento (Anderson, 2002). El vertimiento de nutrientes (de origen terrestre) a los cuerpos de agua es uno de los factores promotores más influyentes en la formación de eventos FAN; simplemente, con la minimización de su disponibilidad, en un momento dado, se puede tener control del crecimiento de las microalgas. Por lo tanto, es imperante la implementación y cumplimiento de planes de monitoreo extensos e integrados, para controlar la descarga de nutrientes y de aguas de lastre, así como la introducción de especies exóticas para cultivos con fines comerciales. Una estrategia paralela es la regulación de los sitios destinados para acuicultura. El objetivo es evitar áreas en las que las especies formadoras de FAN se presentan regularmente, ya que la acuicultura favorece la disponibilidad de nutrientes y el transporte de quistes de distintas regiones, lo que incrementa la posibilidad de que los FAN se presenten con mayor frecuencia (Anderson, 2003).

El esfuerzo del hombre por controlar plagas de insectos, hongos y enfermedades ha sido un componente significativo para el manejo de la agricultura, el tratamiento del agua potable y la recreación. Sin embargo, el control de los FAN en el medio marino presenta una serie de dificultades

(técnicas y económicas), ya que los costos son elevados, la efectividad es baja, son muchas las implicaciones ambientales y hay poco conocimiento en torno a estrategias de mitigación. A pesar de esto, durante las últimas décadas, se ha intentado desarrollar métodos prácticos para controlar los FAN en el ambiente natural. Las investigaciones han considerado el uso de arcillas como agente floculante, herbicidas y agentes quelantes (como el Cu_2SO_4) y surfactantes ("Apoín" un esteroide producido por la alga verde azul *Gomphosphaeria aponina*) así como otros métodos como la turbulencia artificial, sondas ultrasónicas, ozonización, aireación y control biológico (empleando parásitos, virus, bacterias y zooplancton). Sin embargo, muchos de estos métodos no son prácticos, sus costos son elevados y pueden tener efectos colaterales sobre el ecosistema (Anderson *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

El incremento en el número de reportes de Marea Roja o eventos FAN, alrededor del mundo (incluyendo México), es cada vez más evidente lo cual exige que se preste mayor atención a estos fenómenos. En este momento, es imposible controlar o predecir cuando y donde se presentara Marea Roja. Los científicos primero deben entender mejor la biología y ecología de los eventos FAN, para poder crear soluciones con fines de control. El principal componente para el desarrollo exitoso de los programas de monitoreo es el trabajo conjunto de agencias federales y estatales con academias locales, instituciones educativas y organizaciones no gubernamentales para: 1) mitigar los efectos de los FAN, 2) desarrollar nuevas tecnologías que puedan ser empleadas en un corto plazo, 3) promover programas de educación y capacitación entre los trabajadores de las industrias de alimentos, turismo, y público en general.

Como se describió en el texto, existen diferentes estrategias y métodos que han sido empleados en el mundo como propuesta para su implementación

en los programas de monitoreo. Sin embargo, la selección de estos métodos deberá hacerse con base en: la sensibilidad requerida; la rapidez con que se esperan los resultados; la disponibilidad de espacio, equipo y personal capacitado; el costo de su implementación y manejo; así como el tipo de información que se desea obtener. Existen metodologías ideales para llevar a cabo o un programa de monitoreo como es el uso de equipo automatizado, sin embargo, es importante destacar que en México, los recursos destinados a la realización de actividades de estudio y monitoreo sistemático de los eventos FAN son insuficientes; por lo que el uso de técnicas como son sondas moleculares presentan un panorama prometedor para su implementación, ya que estas han sido utilizadas exitosamente por otros países.

Las toxinas de algas marinas pueden ser distribuidas tanto en los alimentos como en el agua y el aire, afectando la salud humana y animal, y en su conjunto la economía de las comunidades costeras.

REFERENCIAS

- Adachi M, Sako Y & Ishida Y (1994) Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Detection efficiency and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae), 1994. *J. Phycol.* 30):857-863.
- Adachi M, Sako Y & Ishida Y (1996a) Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol.* 32:424-32.
- Adachi M, Sako Y & Ishida Y (1996b) Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization. *J. Phycol.* 32:1049-52.
- Alonso RR & Ochoa JL (2004) Hydrology of winter-spring "red tides" in Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Harmful Algae* 3:163-171.
- Alonso RR, Ochoa JL & Uribe A (2005) Grazing of heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca Scintillans* (Mcartney) Kofoidon *Gymnodinium catenatum* Graham. *Rev. Lat. Microbiol.* 47(1-2):6-10.
- Andersen P (1996) Design and implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC Technical Series, UNESCO.
- Anderson D (2003) Testimony in the Committee on Science Subcommittee on Environment, Technology and Standards U.S. House of Representatives Hearing on the "Harmful Algal Bloom and Hypoxia Research Amendments Act of 2003".
<http://gop.science.house.gov/hearings/ets03/mar13/anderson.pdf>
- Anderson D, Andersen P, Bricelj V, Cullen J. & Rensel J. (2001) Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters, APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic commission Technical Series No. 59, IOC, Paris.
- Anderson D, Glibert P. & Burkholder J (2002) Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and consequences. *Estuaries* 25(4b):704-726.
- Anderson D, Hoagland K & White (2000) *Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States*. Woods Hole Oceanographic Institution Tech. Rep., WHO pp. 22 - 49.
http://www.whoi.edu/redtide/pertinentinfo/Economics_report.pdf
- Anderson D, Kulis D, Keafer B & Berdalet E (1999) Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: Variability in labeling intensity with physiological condition. *J. Phycol.* 35:870-883.
- Anderson D, Kulis D, Keafer B, Gribble K, Marin R & Scholin C (2005) Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using

- molecular probes. *Deep Sea Res. II.* 52:2467-2490
- Band SC, Martinez L & Gárate LI (2005) First record of *Chattonella marina* in Bahía de la Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News* 28: 6-7.
- Bolch CJS, Blackburn SI, Hallegraeff GM & Vaillancourt RE (1999) Genetic variations among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 35:356-367.
- Bolch CJS, Orr PT, Jones GJ & Blackburn SI (1999) Genetic, morphological, and toxicological variations among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* 35:339-355.
- Bowers HA, Tengs T, Glasgow HB, Burkholder JM, Rublee PA & Oldach DW (2000) Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4641-4648.
- Bowers HA, Tengs T, Herrmann M & Oldach DW (2001) Real-time PCR monitoring of estuarine water samples for *Pfiesteria piscicida*: rapid Cycle Real-time PCR methods and applications a dinoflagellates associated with fish kills and human illness. In Mauer S, Witter C and Nakagawara K (eds.), Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1-8.
- Bruin A, Ibelings BW & Van Dorn E (2003) Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiol.* 491:47-63.
- Chinain MM, Germain M, Sako Y, Pauillac S & Legrand AM (1997) Intraspecific variation in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). I Isozyme analysis. *J. Phycol.* 33:36-43.
- Cortés AR (1998) *Las mareas rojas*, AGT Editor, México.
- Cortés AR, Hernandez B & Luna R (1996) Red Tide in México: a Review. Proceedings of the seven International Conference on toxic Phytoplankton IOC of UNESCO, UNESCO.
- Cortés L, Cortes AR & Sierra-Beltrán A (2003) Presencia de *Cochlodinium catenatum* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) en mareas rojas de Bahía de Banderas, Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 52(1):35-49.
- Coyne KJ., Hutchins DA, Hare CE & Cary SC (2001) Assessing temporal and spatial variability in *Pfiesteria piscicida* distributions using molecular probing techniques. *Aquat Microb. Ecol.* 24:275-285.
- Dawson JF & Holmes ChFB (1999) Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Frontiers in Bioscience* 4:646-658.
- Fleming L, Bean J & Baden D (1995) Epidemiology of toxic marine phytoplankton. In: Manual on Harmful Marine Phytoplankton. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D (eds), UNESCO–IOC, 33: 475 – 488.
- Gallagher JC (1980) Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansen Bay. *J. Phycol.* 16:464-474.
- Gallo RJ, Villareal EJ, Sierra–Beltrán A, Blanco PM & Niño TC (2004) Possible causes of the stranding of long beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) in the Gulf of California. *CEDO News*, 10:28-29.
- Gárate LI, Hernández O, Band SC & Serrano C (2001) Red tides along the coasts of Baja California Sur, México (1984 to 2001). *Oceánides* 16(2):127-134.
- Gárate LI, Band SC, Cervantes R & Escobedo U (2002) Mareas rojas de *Mesodinium rubrum* (Lohmann) Humburger y Buddenbrock en el Golfo de California (invierno de 1998). *Hidrobiol.* 12(1):15-20.
- Gárate LI, Beltrones S & Maldonado L (2003) First Record of a *Rhizosolenia debyana* Bloom in the Gulf of California, Mexico. *Pacific Sci.* 57(2):141–145.
- Gárate LI, Bustillos GJ, Erler K, Muñetón G, Luckas B & Quezada T (2004b) Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam (*Megapitaria squalida*) in

- Bahía de la Paz, Gulf of California (2001-2003). *Hydrobiol.* 352:195–200.
- Gárate LI, López CD, Bustillos GJ & Hernández S (2004a) Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 52:51-58.
- Gárate LI, Muñetón G & Maldonado V (2006) Florecimiento de dinoflagelados *Gonyaulax polygramma* frente a la Isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Rev. Invest. Mar.* 27:31-39.
- Gómez A (1998) Red Tide occurrences record in Mexico from 1980 to 1992. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología* 69(1):13-22.
- Hallegraeff G M (1995) Harmful algal blooms: a global overview, *In: Manual on Harmful Marine Microalgae.* Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (eds.) IOC Manuals and Guides, No.33, UNESCO, pp. 1–22.
- Hallegraeff GM (1993) A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol.* 32:79-99.
- Heley ST, Cavender JF & Murray TE (1999) Detection of *Alexandrium tamarensis* by rapid PCR analysis. *BioTech.* 26:88–91.
- Hungerford J & Wekell M (1993) *Control measures in shellfish and finfish industries in the USA, In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water.* Falconer I (ed). Academic Press, London. pp. 117-128.
- Judge BS, Scholin CA & Anderson D. (1993) RFLP analysis of a fragment of the large-subunit ribosomal RNA gene of globally distributed populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Biol. Bull.* 185:329–30.
- Ki JS & Han M-S (2005b) Sequence-base diagnostics and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *J. Appl. Phycol.* 17(2):147-153
- Ki JS, Jang GY & Han M-S (2005a) Integrated Method for Single-Cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of Ribosomal DNA from Harmful Dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium catenella*. *Mar. Biotechnol.* 6:587-593
- Ki, JS, Jang GY & Han MS (2005). Sequence based diagnosis and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *J. Appl. Phycol.* 17: 147-153
- Lewis RJ., Jensen SI, DeNicola DM, Miller VI, Hoagland KD and Ernst SG (1997) Genetic variation in the diatom *Fragilaria capuchina* (Fragilariaceae) along a latitudinal gradient across North America. *Plant syst. Evol.* 204:99-108.
- Lindahl O (1998) Occurrence and monitoring of harmful algae in the marine environment. *In: Micotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety.* Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C. & Gilberts J. (eds). *Proceedings of the IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.* pp. 409-423.
- Miller P & Scholin CA (1998) Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. *J. Phycol.* 34:371-382.
- Murphy LS and Guillard RRL (1976) Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes I. The centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* y *T. fluviatilis*. *J. Phycol.* 12:9-13.
- Ochoa JL, Hernández B, Lluch CS, Arredondo VB, Núñez VE, Heredia TA, Pérez LJ & Alonso RR. (2002) Marine biotoxins and harmful algal blooms in Mexico's Pacific littoral. Harmful Algal Blooms in the PICES region of the North Pacific. *PICES Sci. Rep.* 23:119-128.
- Ochoa JL, Sanchez PA, Cruz VA, Nunez E & Sierra-Beltrán A (1997) Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995 origin and impact. *Hydrobiol.* 352:195-200.

- Okolodkov Y & Gárate LI (2006) An annotated checklist of dinoflagellates (dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Bot. Mex.* 74:1-154.
- Poletti R, Milandri A & Pompei M (2003) Algal biotoxinas Of Marine Origin: New Indications from the European Union. *Vet. Res. Comm.* 27:173-182.
- Saker ML, Vale M, Kramer D & Vasconcelos V (2007) Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 441-449
- Sako Y, Hosoi-Tanabe S & Uchida A (2004) Fluorescence in situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*. *J. Phycol.* 40:598-605.
- Sar EA, Ferrario ME & Reguera B (2002) *Floraciones Algales Nocivas en El Cono Sur Americano*. Inst. Esp. Oceanogr.
- Savin MC, Martin JL, LeGresley M, Giewat M & Rooney-Varga J (2004) Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microb. Ecol.* 48: 51-65
- Scholin CA & Anderson DM (1993) Population analysis of toxic and non toxic *Alexandrium* species using ribosomal RNA signature sequences. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea, Smayda TJ and Shimizu Y (eds). Elsevier Science Publishers BV. pp. 95-102.
- Scholin CA & Anderson DM (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 CA & Anderson DM (1998) Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives. *Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*. 253 - 257
- Scholin CA, Anderson DM & Sogin ML (1993) Two distinct small subunit ribosomal RNA genes in the North American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 29:209-216.
- Scholin CA, Buck K, Britschgi T, Cangelosi G & Chavez F (1996) Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-target probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycol.* 35(3):190-197.
- Scholin CA, Herzog M, Sogin M & Anderson DM (1994) Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.* 30:999-101.
- Scholin CA, Marin III R & Miller P (1999) DNA probes and receptor-binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophytaceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.* 35:1356-1367.
- Scholin CA, Massion G, Mellinger E, Brown M, Wright D & Cline D (1998) The development and application of molecular probes and novel instrumentation for detection of harmful algae. *Ocean Community Conference'98 Proceedings, Mar. Tech. Soc.* 1:367-370.
- Scholin CA, Miller P, Buck K, Chavez F, Harris P, Haydock P, Hoard J & Cangelosi G (1997) Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.* 4265:1265-1272.
- Sellner K, Doucette G & Kirkpatrick G (2003) Harmful algae bloom: Causes, impacts and detection. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 30:383-406.
- SEMARNAT Y PROFEPA (1997) Mortandad de mamíferos marinos cuyos cadáveres arribaron a las costas de Sinaloa. *Informe técnico 1997*. pp 5, 21.
- Sierra-Beltrán A & Cortés AR (1999) National HAB Training Course in Mexico. Monitoring Program Launched Early 1999. International Oceanographic Commission of UNESCO,

- Harmful Algae News* 19:9-10
- Sierra-Beltrán A, Cortes AR, Gallo RJ, Licea-Duran S & Villareal EJ (2005) Is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* toxin the principal cause of sardines, dolphins, sea lions and pelicans mortality in 2004 in Mexico? *Harmful Algae News* 29: 6-8.
- Sierra-Beltrán A, Morquecho EM, Lechuga DC & Ochoa JL (1996) Monitoring program at Baja California Sur, Mexico. *In: Harmful and Toxic Algal Blooms, Yasumoto, T., Oshima, Y and Fukuyo, Y. (eds), IOC UNESCO, Paris*, pp. 105-108.
- Sierra-Beltrán A, Palafox UM, Grajales MJ, Cruz VA, & Ochoa JL (1997) Sea bird mortality at Cabo San Lucas: evidence that domoic acid is spreading. *Toxicon* 35:447-454.
- Sierra-Beltrán A, Sanchez PJ, Cruz VA & Ochoa JL (1996) Biotoxinas marinas. *Informar*, 4(24):8-12
- Sierra-Beltrán A., Cruz NE, del Villar LM, Cerecero J & Ochoa JL (1998) An overview of the marine food poisoning in Mexico, *Toxicon*, 36:1493-1502.
- Takahashi Y, Takishita K, Koike K, Maruyama T, Nakayama T, Kobiyama A & Ogata T (2005) Development of molecular probes for *Dinophysis* (Dinophyceae) plastid: A tool to predict blooming and explore plastid origin. *Mar. Biotechnol.* 7: 95-103.
- Tanabe HS & Sako Y (2006) Development and application of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* in cultured and natural seawater. *Fish. Sci.* 72:77-82.
- Van Egmond HP, Van Apeldoorn ME & Speijers GJA (2005) Biotoxinas Marinas: Estudio FAO: alimentación y nutrición. FAO.
- Walsh D, Reeves RA, Saul DJ, Gray RD, MacKenzie L, Bergquist PR & Bergquist PL (1998) Heterogeneity of SSU and LSU rDNA sequences of *Alexandrium* species. *Biochem. Systemat. Ecol.* 26:495–509.
- Wang Q, Deeds JR, Place AR & Belas R (2005) Dinoflagellate community analysis of a fish kill using denaturing gradient gel electrophoresis. *Harmful Algae* 4:151–162.
- Yan QY, Yu YH, Feng WS, Deng WN & Song XH (2007) Genetic diversity of plankton community as depicted by PCR-DGGE fingerprinting and its relation to morphological composition and environmental factor in Lake Donghu. *Microb. Ecol.* 54: 290-297