

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y TOXICOLÓGICO DE CULTIVOS DE *PSEUDO-NITZSCHIA PUNGENS* VAR. *PUNGENS* (BACILLARIOPHYCEAE)

EUGENIA A. SAR¹, DARÍO ANDRINOLO² e INÉS SUNESEN¹

Summary: Morphological and toxicological analysis of cultures of *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* (Bacillariophyceae). In the framework of a project of monitoring of harmful diatom species carried out in the Northern area of the Golfo San Matías (Provincia de Río Negro, Argentina) we found and established cultures of *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex. P.T. Cleve) Hasle var. *pungens*. The strains isolated from net phytoplankton samples obtained in Las Grutas and Piedras Coloradas, (Golfo San Matías) were cultured in F/2 medium, with silica added, and maintained at 20 °C, under continuous light supplied by cool-white fluorescent tubes. Cultures were essayed for domoic acid (DA) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Materials from field and cultures were studied with light and scanning electron microscopy. Comparison with closely related taxa, *P. pungens* var. *cingulata* Villac and *P. multiseriata* (Hasle) Hasle, and analysis of the fine morphology of cultured material, were conducted and discussed. In spite of *P. pungens* var. *pungens* has been reported as domoic acid producer, the toxin was not detected in any of the cultures tested.

Key words: *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens*, cultures, morphology, domoic acid.

Resumen: En el marco de un proyecto de monitoreo de especies de diatomeas nocivas llevado a cabo en el área norte del Golfo San Matías (Provincia de Río Negro, Argentina) hemos encontrado a *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex. P.T. Cleve) Hasle var. *pungens* y establecido cultivos monoclonales de esta variedad. Las cepas aisladas a partir de muestras tomadas con red, provenientes de Las Grutas y Piedras Coloradas (Golfo San Matías), fueron cultivadas en medio F/2 con adición de silicatos, y mantenidas a 20 °C con luz continua, blanca, fría. Los cultivos fueron analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar si la variedad aislada era productora de ácido domoico (DA) en el área bajo estudio. Material procedente de campo y de cultivo fue estudiado con microscopios óptico y electrónico de barrido. Una comparación con los taxa más allegados, *P. pungens* var. *cingulata* Villac y *P. multiseriata* (Hasle) Hasle, y datos sobre la morfología fina del material procedente de los cultivos, son presentados y discutidos. A pesar de que *P. pungens* var. *pungens* ha sido reportada como productora de ácido domoico, los resultados del análisis para detección de las toxinas fueron negativos para las cultivos chequeados.

Palabras clave: *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens*, cultivos, morfología, ácido domoico.

INTRODUCCIÓN

Diez especies de diatomeas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in H. & M Peragallo (1897-1908) son nocivas toxígenas (Lundholm *et al.*, 2003; Fryxell & Hasle, 2004; Cerino

et al. 2004). El ácido domoico (DA) producido por estas especies es una toxina que ha provocado intoxicaciones humanas y ha sido reportada como causal de muerte de personas, mamíferos y aves marinas (ver revisión en Bates, 2000). Los moluscos filtradores tienen la capacidad de acumular esta toxina y son el vector más común; el síndrome que provoca el DA se denomina Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) (Todd, 1990).

En el área norte del Golfo San Matías, donde hay bancos naturales de moluscos y se realizan cultivos de mejillón a escala comercial, hemos detectado algunas especies de *Pseudo-nitzschia* citadas como potencialmente toxígenas, eventuales productoras de

¹ Departamento Científico Ficología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina. easar@museo.fcnym.unlp.edu.ar.

² Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET- Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 116, 1900 La Plata, Argentina.

DA (Ferrario *et al.*, 1999; 2002). Sobre la base de esta evidencia y de cara a la preservación de la salud pública, al manejo de los cultivos de moluscos y a la colocación de los productos de acuicultura en los mercados europeos, planteamos un proyecto que se focaliza en el monitoreo de especies nocivas, su aislamiento y cultivo para estudio morfológico y toxicológico así como el monitoreo de toxinas en moluscos. El objetivo de este trabajo es presentar los primeros resultados obtenidos en el marco de ese proyecto sobre *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex P. T. Cleve) Hasle (1965) var. *pungens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento de las cepas de *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* se realizaron muestreos de fitoplancton en la estación Piedras

Coloradas, en junio de 2004, en el polígono de cultivo de mejillón y en la estación Las Grutas, en la que se encuentran bancos naturales de ostra plana, en julio de 2004. Las estaciones de muestreo están ubicadas en el área norte del Golfo San Matías (Fig. 1).

Las muestras de fitoplancton para análisis cualitativo fueron tomadas con red de 30 μm de apertura de malla, en la parte superficial de la columna de agua, entre los 0 y 5 metros de profundidad. Simultáneamente fueron colectadas muestras de agua de mayor volumen, concentradas con red, para realizar el aislamiento y cultivo de especies potencialmente tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*. Los aislamientos se realizaron con pipetas capilares bajo microscopio siguiendo los criterios establecidos por Billard & Chrétiennot-Dinet (1995). Los especímenes fueron enjuagados varias veces en agua de mar filtrada y esterilizada en portaobjetos excavados y dispuestos en placas policultivo con medio nutritivo F/2 con adición de silicatos (Guillard, 1975). Las placas fueron

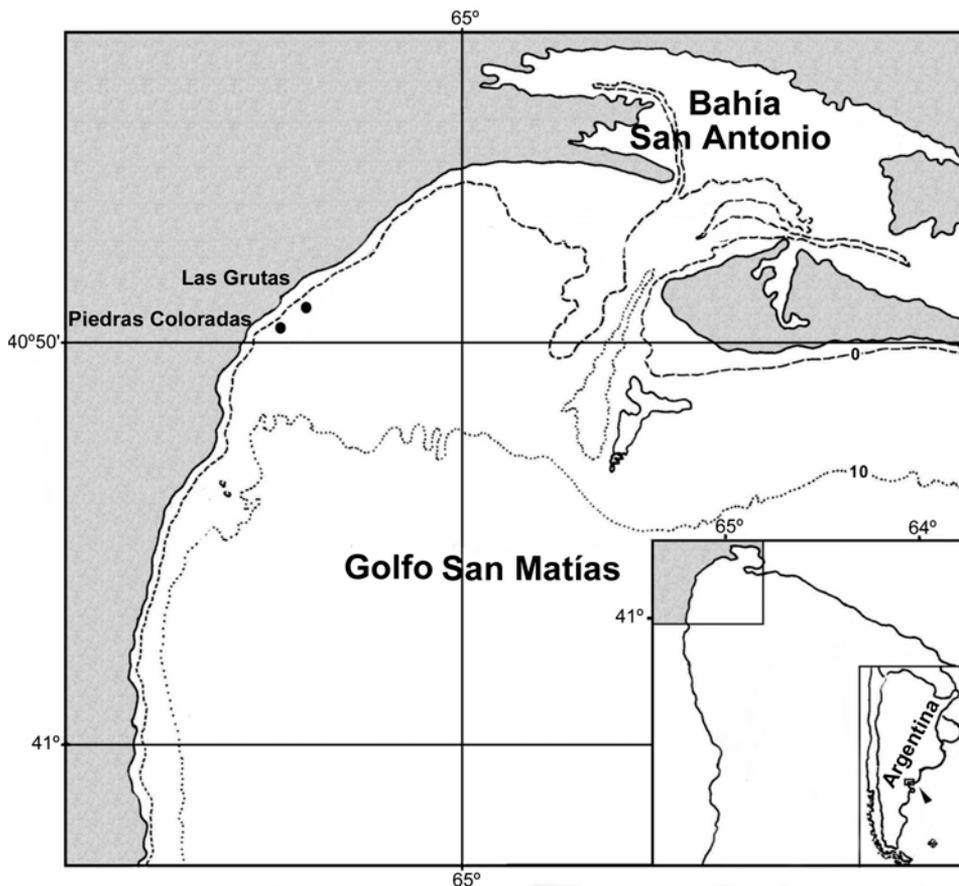


Fig. 1. Mapa de la zona norte del Golfo San Matías mostrando las estaciones de muestreo y la localización del área en Argentina.

mantenidas en sala de cultivo a 20 °C bajo condiciones de luz continua provista por tubos fluorescentes de luz blanca fría, y regularmente fueron chequeadas para observar el crecimiento algal. Cuando se detectó color el inóculo se escaló a tubo de 20 ml y luego a erlenmeyers de 250 ml (Sar *et al.*, 2002; Sar & Sunesen, 2003).

Las muestras cualitativas fueron fijadas con formol al 4% e incorporadas a la Colección de Diatomeas Argentinas, depositada en el Departamento Científico Ficología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP.

El análisis de las muestras cualitativas y de las cuatro cepas aisladas se realizó con microscopio

óptico (MO) Wild M20 con contraste de fase, y microscopios electrónicos de barrido (MEB) Jeol JSMT 100 y Jeol JSM 6360 LV. Dado que la sistemática de las diatomeas se basa principalmente en las características de los frústulos, los materiales fueron tratados para eliminación de materia orgánica por el método de Prygiel & Coste (2000) y montadas en preparados para MO y MEB de acuerdo con el procedimiento descrito en Ferrario *et al.* (1995).

Alicuotas de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento, correspondientes a cada una de las cuatro cepas aisladas, fueron analizadas desde el punto de vista morfológico para estimar la variabilidad intrapoblacional de la especie. El resto de los cultivos

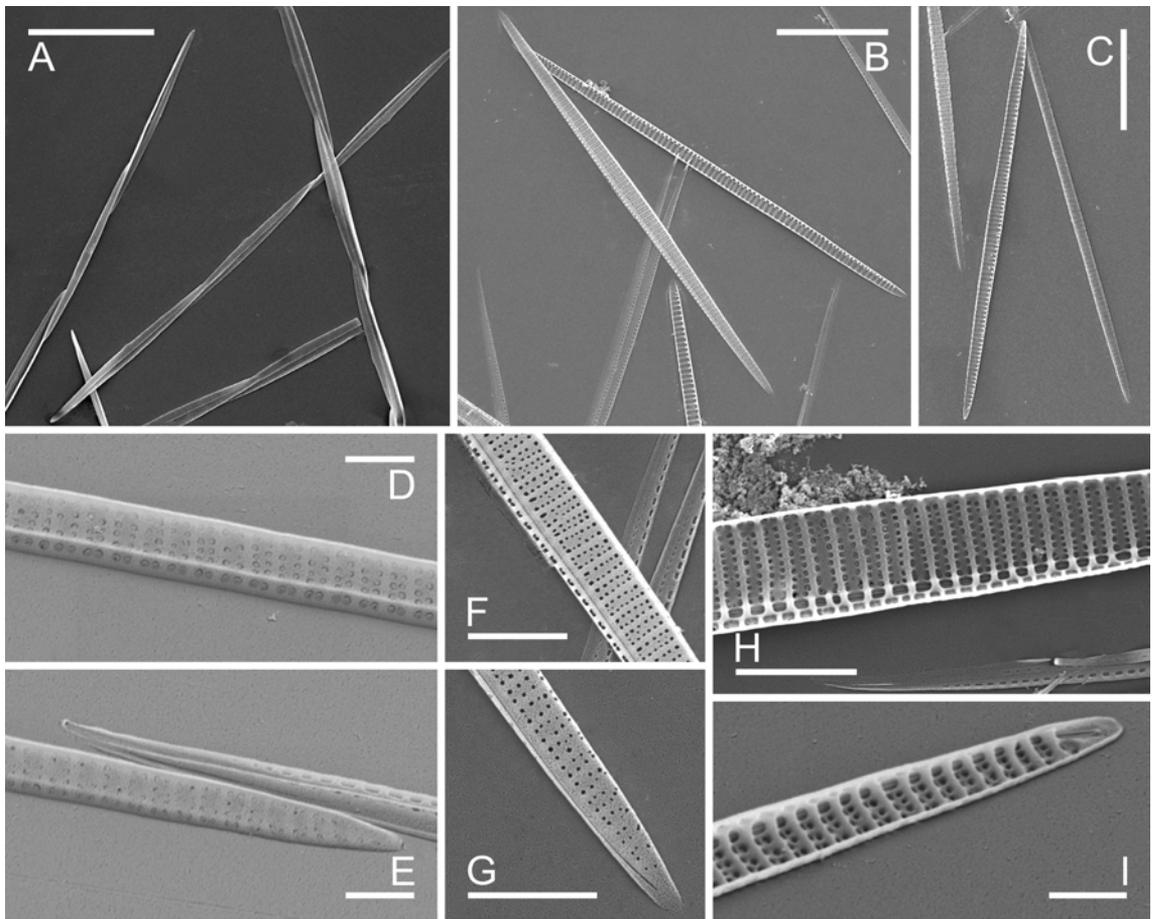


Fig. 2. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens*. MEB. **a.** Colonias. Note que varias de las células están recientemente divididas. **b-c.** Valvas mostrando contorno linear lanceolado con ápices puntiagudos. Observe bandas abiertas. **d.** Parte media de la valva en vista externa mostrando estrias biseriadas y manto distal. Observe los poroides con velos himenados. **e.** Ápice de la valva de, **d.** Observe dos bandas. **f.** Parte media de la valva en vista externa mostrando estrias biseriadas, rafe y manto proximal. Note algunos poroides aislados entre las dos hileras regulares de poroides. **g.** Ápice de la valva de **f.** Observe que las estrias tienen pocos poroides. **h.** Parte central de la valva en vista interna mostrando las fibulas alineadas con las interestrias. Note que las estrias del manto distal están alineadas con las de la superficie valvar, mientras que las del manto proximal no lo están. **i.** Ápice de la valva de **h.** Escalas: 50 μm (**a**), 20 μm (**b,c**), 5 μm (**f-h**), 2 μm (**d,e,i**).

fueron utilizados para las observaciones y los tres duplicados de cada uno de ellos, con una concentración promedio aproximada de $2 \cdot 10^5$ cél/l, fueron congelados en botellas de 2 litros para su traslado al laboratorio analítico y posterior análisis a fin de detectar la presencia y concentración de DA. Para llevar a cabo el aislamiento de las toxinas, a partir de la hipótesis de que las cepas las contuvieran, se siguió la metodología propuesta por Wang *et al.* (1993) incorporando leves modificaciones. Las muestras fueron sometidas a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento para producir lisis celular y posteriormente filtradas en filtros Wattman de $0,45 \mu\text{m}$. El pH del medio de cultivo se ajustó a 2,5 y éste fue pasado por filtros Sep-Pac C 18. El filtro fue posteriormente lavado con agua destilada y el eluido descartado, luego fue lavado con 10 ml de una solución metanol/H₂O (80:20 V/V) y el eluido concentrado por evaporación hasta 3 ml. Una alícuota de 20 μl de este extracto se inyectó en el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El Cromatógrafo utilizado fue Hewlett Packard serie 1100, con bomba binaria, sistema desgasador detector UV con arreglo de diodos e inyector Rheodyne 7725i con un loop de 20 μl . Se utilizó un régimen isocrático con flujo de 1 ml/min y una solución de corrida compuesta por acetonitrilo/agua (12:88 V/V) ajustada a un pH de 2,5 con ácido ortofosfórico (Lawrence & Menard, 1991). La columna utilizada fue Hypersil C18 (150 X 46 mm, ID 5 μm). La detección se realizó a 242 nm. Las soluciones fueron todas gradas HPLC y el estándar analítico de ácido domoico Sigma.

Resultados Taxonómicos

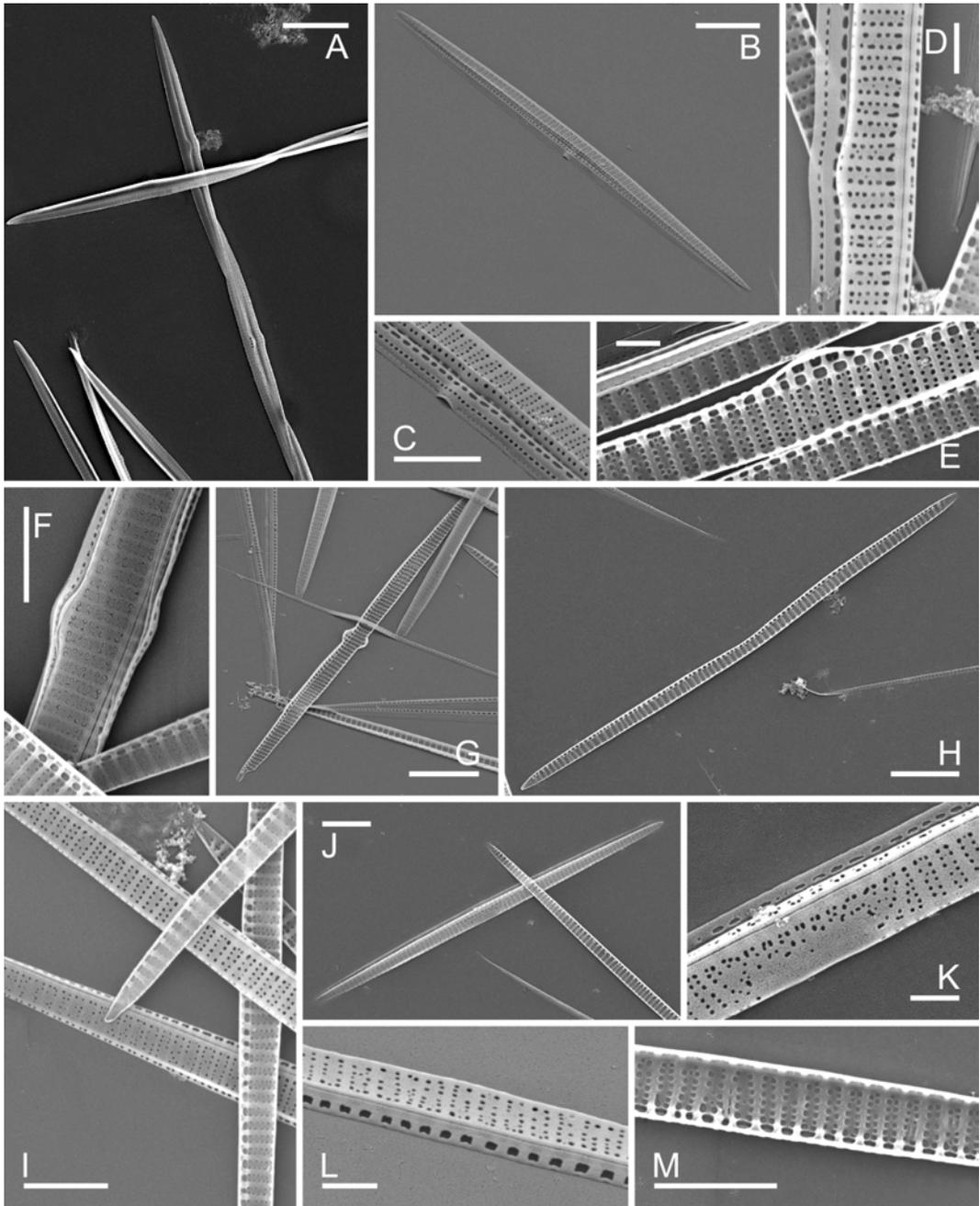
Pseudo-nitzschia pungens (Grunow ex. P.T. Cleve)
Hasle var. *pungens*

Los frústulos de las muestras obtenidas a campo tuvieron las mismas características morfológicas y parámetros morfométricos que las descritas en

Ferrario *et al.* (1999) para aguas costeras de Argentina. A su vez muchas de las células provenientes de los cuatro cultivos realizados coincidieron con las muestras de campo, excepto por presentar dimensiones más pequeñas que las descritas por Ferrario *et al.* (1999) (Fig. 2 A-I, Tabla I). Algunas de las células analizadas mostraron modificaciones morfológicas en el frústulo (Fig. 3 A-M), observándose algunos con ensanchamiento unilateral en la parte media de la valva (Fig. 3 A), con un estrechamiento en el centro de la valva y ligeramente arqueadas (Fig. 3 H), otras con un ensanchamiento unilateral de la valva del lado proximal (Fig. 3 E) o de la valva del lado distal (Figs. 3 B-D), otras con ensanchamiento central bilateral de valva y cingulum (Fig. 3 F) y con extremos afinados (Fig. 3 G). Fue bastante frecuente encontrar irregularidades en la distribución de las interestrías y poroides en la zona central de la valva o en la distribución de la doble hilera de poroides, tanto en el área central como hacia los polos (Figs. 3 I-M). Tal como sucede en el material proveniente del campo, se encontró una tercera hilera de poroides generalmente incompleta o algún poroide aislado entre dos hileras completas. En cuanto a las bandas componentes de la cintura se han observado algunas deformaciones en los poroides de la valvocópula (Fig. 3 J).

Resultados sobre análisis de toxinas

El análisis de toxinas se llevó a cabo sobre material de cultivo proveniente del escalamiento de cada una de las cuatro cepas aisladas, estos cultivos fueron analizados en fase estacionaria de crecimiento y todos ellos arrojaron resultados negativos para ácido domoico, tanto en el caso de las dos cepas de Las Grutas como en las de Piedras Coloradas. Como control positivo se utilizó una alícuota de una de las cepas analizadas a la que se le agregó ácido domoico a una concentración final de 25 $\mu\text{g/litro}$.



Figs. 3. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens*. MEB. Formas teratológicas. **a.** Colonias. Note que los frústulos presentan un abultamiento en la región media. **b.** Teca con abultamiento central. **c.** Detalle de la teca de: **b.**, mostrando las tres bandas conectivas. Bandas con una hilera de poroides que disminuyen de tamaño en sentido abvalvar. **d.** Valva con abultamiento en el manto distal, valvocópula y primera cópula. Observe poroides aislados entre las dos hileras regulares de poroides. **e.** Valva en vista interna mostrando un abultamiento en el manto proximal de la región mediana. **f.** Frústulo con abultamiento central bilateral. **g.** Valva en vista interna mostrando abultamiento bilateral y ápice deformado. Note la presencia de cíngulos constituidos por tres bandas abiertas. **h.** Valva en vista interna mostrando una constricción en la zona media. **i.** Valvas en vistas interna y externa. Note el arreglo irregular de los poroides en valva indicada con la flecha. **j.** Teca con estrías con arreglo de poroides irregular y arreglo irregular de las estrías e interestrías en el centro. **k.** Detalle de la parte central de la valva de **j.**, **l.** Parte de una valva en vista lateral externa. **m.** Parte de una valva en vista interna. Note en ambas figuras que los poroides de las estrías están irregularmente dispuestos. Escalas: 20 μm (**a**), 10 μm (**b,g,h,j**), 5 μm (**c,f,i,m**), 2 μm (**d,k,e,l**).

Tabla 1. Datos morfométricos y contorno valvar de *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* recabados en este estudio y en estudios previos. * Medición realizada por nosotros a partir de las microfotografías presentadas en los trabajos correspondientes.

Caracteres	Este estudio	Ferrario <i>et al.</i> (1999)	Takano & Kuroki (1977)	Rivera (1985)	Hallegraeff (1994)	Larsen & Nguyen (2004)	Fryxell & Hasle (2004) Hasle (1995) Hasle <i>et al.</i> (1996)
Contorno de la valva	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada
Eje apical en μm	73-110	86-145	81-151	74-142	90-130	80-116	74-174
Eje transapical en μm	2-3,8	2,8-4,5	2,6-5,3	3-4,5	2,6-4,5	2-3,8 (4)	2,4-5,3
Fibulas en 10 μm	10-14	12-18	9-16	9-15	10-15	(8) 9-12 (13)	9-16
Interestrías en 10 μm	10-13	10-18	9-16	9-15	10-15	(8) 9-12 (13)	9-16
Hileras de poroides	2, una tercera puede aparecer	2	2	2-3	2	2	2, una tercera puede aparecer
Poroides en 1 μm	(2) 3 (5)	3-4	3-4	3-4	3-4	2-3 (4)	3-3,5*
Poroides en valvocópula	15-17,5	nd	nd	nd	nd	nd	1 hilera
Poroides en 1° cópula	20-27	nd	nd	nd	nd	nd	1 hilera (más pequeños)
Poroides en 2° cópula	23-34	nd	nd	nd	nd	nd	1 hilera (más pequeños)
Región geográfica	Golfo San Matías	Aguas costeras de Argentina	Aguas costeras de Japón	Aguas costeras de Chile	Aguas de Australia	Aguas costeras de Vietnam	Varias regiones

DISCUSIÓN

Todas las cepas bajo análisis mostraron una variabilidad intrapoblacional e interpoblacional similar. Como se muestra en la Tabla I, el material cultivado durante este estudio presentó menores

³ Aún cuando estos autores se refirieron a la especie sin especificar variedad, tomando en cuenta las figuras 4 a 6 de su trabajo podemos determinar que ellos trabajaron con la variedad nominal.

dimensiones, particularmente en lo referente a los ejes transapical y apical. Sin embargo, especímenes provenientes de muestreo de campo descritos por Larsen & Nguyen (2004), presentan un límite inferior del rango de medidas del eje transapical (2 μm) semejante al que encontramos en nuestro material de cultivo. La longitud de los frústulos o valvas fue, en cambio, ligeramente inferior a todas las halladas en la literatura. Chepurnov *et al.* (2005) puntualizaron que en los clones de *P. pungens*³ en cultivo, las células

generalmente reducen su longitud en aproximadamente 5 µm por mes. El resto de los datos morfométricos de las cepas aisladas en Las Grutas y Piedras Coloradas coincidieron razonablemente con los descriptos para el mismo taxón en diferentes regiones geográficas (Tabla I). En los cultivos mantenidos en erlenmeyers alrededor de 48 días fueron encontrados numerosos especímenes deformados, semejantes a los descriptos por Villac (1996) para varias especies de *Pseudo-nitzschia*, en particular para *P. pungens* var. *cingulata* Villac, por Subba Rao & Wohlgeschaffen (1990) para *P. multiseriata* (Hasle) Hasle (1995) y por Chepurnov *et al.* (2005) para *P. pungens* var. *pungens*. Sin embargo los frústulos teratológicos presentes en nuestro material siempre evidenciaron aspecto menos aberrante que los presentados en los trabajos mencionados. Esto podría deberse a que los cultivos analizados por nosotros no estuvieron en ningún caso en etapas biológicas senescentes. Chepurnov *et al.* (2005) señalaron que los frústulos muestran apariencia ligeramente irregular, con abultamiento en el área central, previo a una reducción abrupta de tamaño.

P. pungens var. *cingulata* y *P. multiseriata*, son los taxones morfológicamente más allegados a la variedad bajo estudio, considerando contorno valvar y parámetros morfométricos, y se diferencian de *P. pungens* var. *pungens* por algunos caracteres que requieren de análisis ultraestructurales. Uno de ellos es la morfología de la valvocópula, estriada en *P. pungens* var. *cingulata*, con estrías con dos o tres hileras de poroides, mientras que en *P. pungens* var. *pungens* la valvocópula muestra sólo una hilera de poroides. Otro carácter diferencial entre ambas variedades, enunciado por Villac & Fryxell (1998), es el número de hileras de poroides que componen la estría, las autoras encuentran que una tercera hilera más o menos completa se intercala entre las dos ubicadas en la proximidad de la costilla interna (interestría externa) en *P. pungens* var. *cingulata*. Este carácter debe ser relativizado ya que es bastante frecuente encontrar uno o más poroides conformando una tercera hilera en *P. pungens* var. *pungens*. En nuestro material de campo y de cultivo suelen aparecer poroides aislados o alineados en corto número entre las dos hileras de poroides laterales, lo que también fue ilustrado y mencionado por Hasle *et al.* (1996, fig. 30, p 138) para la variedad nominal.

P. multiseriata se diferencia de ambos taxones por presentar estrías pluriseriadas (3 a 5 hileras de

poroides completas) con poroides más densamente dispuestos que en ambas variedades de *P. pungens* y una valvocópula estriada, bien diferente de la valvocópula de la variedad bajo análisis y con sutiles diferencias con la de *P. pungens* var. *cingulata*.

Los resultados del análisis para detección de ácido domoico de las cepas de *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* aisladas en Las Grutas y Piedras Coloradas en el transcurso del presente estudio fueron negativos, aún cuando éstos fueron realizados en cultivos que se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento.

Pseudo-nitzschia pungens var. *pungens* fue reportada como un taxón no tóxico para la costa este de Canadá, Estados Unidos, el Golfo de México, la Bahía de Monterrey, Europa y Nueva Zelanda por diferentes autores (ver citas para cada lugar presentadas por Bates *et al.* 1998). Sin embargo, Rhodes *et al.* (1996) aislaron cepas de aguas costeras en varias localidades de Nueva Zelanda con el propósito de determinar si esta variedad producía ácido domoico y hallaron que por lo menos una de ellas era efectivamente productora de la toxina, mientras que otras cepas no la producían. Éste fue el primer hallazgo de toxicidad para el taxón y la diferencia entre cepas de distinta procedencia les sugirió a los autores que algunos factores, tales como nutrientes específicos o variabilidad genética, estaban implicados en la producción de toxinas. Villac (1996), Bates *et al.* (1998) y Orsini *et al.* (2002) señalaron que la mayoría de las especies de *Pseudo-nitzschia* presentan clones tóxicos y no tóxicos y que la producción de ácido domoico varía entre clones con-específicos de diferentes regiones geográficas y aún dentro de la misma área geográfica a pesar de haber sido mantenidos bajo las mismas condiciones de cultivo.

Dado que en esta oportunidad hemos realizado un análisis puntual de cepas aisladas durante los meses de invierno en el área de estudio pensamos que este resultado negativo debe ser considerado provisional y que nuevas cepas de la especie deberán ser aisladas y analizadas para determinar producción de ácido domoico. Finalmente, si bien el análisis de toxinas resultó negativo en las condiciones del presente trabajo, es posible que el método con derivatización con FMOC-CL y detección fluorescente propuesto por Pocklington *et al.* (1990), que es de 50 a 100 veces más sensible que el método con detección UV utilizado, permita la detección de DA en las cepas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el permanente apoyo logístico y técnico brindado por la Dra. Marcela Pascual, Responsable del Criadero de Moluscos dependiente del Instituto de Biología Marina y Pesquera "Alte. Storni", y su equipo. Este trabajo fue financiado por el CONICET mediante el PIP 5312.

BIBLIOGRAFÍA

- BATES, S. S. 2000. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added!. *J. Phycol.* 36: 978-983.
- BATES, S. S.; D. L. GARRISON & R. A. HORNER. 1998. Blooms dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In: ANDERSON, D. M., A. D. CEMBELLA & G. M. HALLEGRAEFF (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Bloom*, pp. 267-292. Springer, Berlin.
- BILLARD, C. H. & M. J. CHRÉTIENNOT-DINET. 1995. Método para el estudio de los fitoflagelados. In: ALVEAL, K., M. E. FERRARIO, E. OLIVEIRA & E. SAR (eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, pp. 25-52. Universidad de Concepción, Concepción.
- CERINO, F., L. ORSINI, D. SARNO, C. DELL'AVERSANO, L. TARTAGLIONE & A. ZINGONE. 2004. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4: 33-48.
- CHEPURNOV, V. A., D. G. MANN, K. SABBE, K. VANNERUM, G. CASTELEYN, E. VERLEVEN, L. PEPPERZAK & W. VYVERMAN. 2005. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 40: 379-395.
- FERRARIO, M. E., E. A. SAR & S. E. SALA. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. In: ALVEAL, K., M. E. FERRARIO, E. OLIVEIRA & E. SAR (eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*, pp. 1-23. Universidad de Concepción, Concepción.
- FERRARIO, M. E., E. A. SAR, C. CASTAÑOS & F. HINZ. 1999. Potentially toxic species of the genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68: 131-147.
- FERRARIO, M. E., E. A. SAR & S. E. SALA. 2002. Diatomeas potencialmente tóxicas del Cono Sur Americano. In: SAR, E. A., M. E. FERRARIO & B. REGUERA (eds.), *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*, pp. 169-194. Instituto Español de Oceanografía.
- FRYXELL, G. A. & G. R. HASLE. 2004. Taxonomy of harmful diatoms. In: HALLEGRAEFF, G. M., D. M. ANDERSON & A. D. CEMBELLA (eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, pp. 465-510. UNESCO Publishing, Francia.
- GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L. & M. H. CHANLEY (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*, pp. 29-60. Plenum Publishing Co., New York.
- HALLEGRAEFF, G. M. 1994. Species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Australian waters. *Botanica Marina* 37: 397-411.
- HASLE, G. R. 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. *Skrifter utgitt av Det Norske Videnskaps-Akademi I Oslo I. Mat.-Naturvidensk. Klasse N.S.* 18: 1-45.
- HASLE, G. R. 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae): Nomenclatural history, morphology and distribution. *J. Phycol.* 31: 428-435.
- HASLE, G. R., C. LANGE & E. E. SYVERTSEN. 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgoländer Meeresunters* 50: 131-175.
- LARSEN, J. & N. L. NGUYEN (eds.). 2004. Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters. *Opera Botanica* 140: 5-216.
- LAWRENCE, J. F. & C. MENARD. 1991. Confirmation of domoic acid in shellfish using butyl isothiocyanate and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 550: 595-601.
- LUNDHOLM, N., Ø. MOESTRUP, G. R. HASLE & K. HOEF-EMDEN. 2003. A study of the *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* / *cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*?. *J. Phycol.* 39: 797-813.
- PERAGALLO, H. & M. PERAGALLO. 1897-1908. *Diatomées Marines de France et des Districts Maritimes Voisins*. M.J. Tempère, Grez-sur-Loing.
- ORSINI, L., D. SARNO, G. PROCACCINI, R. POLETTI, J. DAHLMANN & M. MONTRESOR. 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *Eur. J. Phycol.* 37: 247-257.
- POCKLINGTON, R., F. E. MILLEY, S. S. BATES, C. J. BIRD, A. S. W. DE FREITAS & M. A. QUILLIAM. 1990. Trace determination of domoic acid in seawater and plankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivatives. *Int. J. Environ. An. Ch.* 38: 351-368.
- PRYGIEL, J. & M. COSTE. 2000. *Guide Méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées*. Agences de l'Eau, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Direction de l'Eau & CEMAGREF, France.
- RHODES, L., D. WHITE, M. SYHRE & M. ATKINSON. 1996. *Pseudonitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production *in vitro* and links with shellfish toxicity. In: YASUMOTO, T., Y. OSHIMA & Y. FUKUYO (eds.), *Harmful and toxic algal blooms*, pp. 155-158. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

- RIVERA, P. 1985. Las especies del género *Nitzschia* Hassall, sección *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae), en las aguas marinas chilenas. *Gayana Botánica* 42: 9-38.
- SAR, E. A., D. U. HERNÁNDEZ BECERRIL & I. SUNESEN. 2002. A morphological study of *Chaetoceros tenuissimus* Meunier, a little-known planktonic diatom, with a discussion on the section *Simplicia*, subgenus *Hyalochaete*. *Diatom Research* 17: 327-335.
- SAR, E. A. & I. SUNESEN. 2003. *Nanofrustulum shiloi* (Bacillariophyceae) from Gulf of San Matías (Argentina): morphology, distribution and comments about nomenclature. *Nova Hedwigia* 77: 399-406.
- SUBBA RAO, D. V. & G. WOHLGESCHAFFEN. 1990. Morphological variants of *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseries* Hasle. *Botanica Marina* 33: 545-550.
- TAKANO, H. & K. KUROKI. 1977. Some diatoms in the section *Pseudonitzschia* found in coastal waters of Japan. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 91: 41-51.
- TODD, E. C. D. 1990. Amnesic Shellfish Poisoning- a new seafood toxin syndrome. In: GRANALI, E., B. SUNDSTRÖM, L. EDLER & D. M. ANDERSON (eds.), *Toxic marine phytoplankton*, pp. 504-508. Elsevier Scientific Publishing, New York.
- VILLAC, M. C. 1996. *Synecology of the genus Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from Monterey Bay, California, USA. PhD Thesis. Department of Oceanography. Texas A & M University, USA. 258 pp.
- VILLAC, M. C. & G. A. FRYXELL. 1998. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *cingulata* var. nov. (Bacillariophyceae) based on field and culture observation. *Phycologia* 37: 269-274.
- WANG, R., L. MARANDA, P. E. HARGRAVES & Y. SHIMIZU. 1993. Chemical variation of *Nitzschia pungens* as demonstrated by the co-occurrence of domoic acid and bacillariolides. In: SMAYDA, T. J. & Y. SHIMIZU (eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*, pp. 637-641. Elsevier Science Publishers, New York.

Recibido el 18 de Abril de 2006, aceptado el 14 de Septiembre de 2006.

