



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



TASA DE DEPURACIÓN DE TOXINAS
PARALITICAS PRODUCIDAS POR
Gymnodinium catenatum (Graham, 1943) EN LA
ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida*
(Sowerby, 1835)

TESIS

*QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
RECURSOS MARINOS*

PRESENTA

BEATRIZ PEREZ CRUZ

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2007



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 27 del mes de Noviembre del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"TASA DE DEPURACIÓN DE TOXINAS PARALÍTICAS PRODUCIDAS POR *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) EN LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835)"

Presentada por el alumno:

PÉREZ

Apellido paterno

CRUZ

materno

BEATRIZ

nombre(s)

Con registro:

A	0	4	0	2	5	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCIA

PRESIDENTE

DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

SECRETARIO

MC. ISMAEL GÁRATE LIZÁRRAGA

SEGUNDO VOCAL

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

TERCER VOCAL

DR. JOSÉ BUSTILLOS GUZMÁN

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



I. P. N.
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 27 del mes Noviembre del año 2007, el (la) que suscribe BEATRIZ PÉREZ CRUZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A040253 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ RICARDO PALOMARES GARCÍA y cede los derechos del trabajo titulado: "TASA DE ACUMULACIÓN Y DEPURACIÓN DE TOXINAS PARALÍTICAS PRODUCIDAS POR *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) EN LA ALMEJA CHOCOLATA *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835)" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: betymar2002@yahoo.com.mx rpalomar@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BEATRIZ PÉREZ CRUZ

nombre y firma

A mi hermosa hija Hanna Monserrat, te amo pequeña traviesa, eres el amor de mi vida.

A mi amada madre, por todo el amor que me ha dado y por los sabios consejos tan acertados que me hacen ser mejor cada día.

A la memoria de mí querido padre, me hubiese gustado que estuvieras conmigo y compartieras este momento tan especial en mi vida profesional.

A todos mis hermanos: Jesús, Alberto, Vice, Neme, Ángeles y al ángel guardián de nuestra familia, mi hermana Carmen. Los amo.

A Miriam más que mi sobrina, mi hermana pequeña, gracias por todo y a mi linda sobrina Luz del Carmen.

Y a ti, que en estos momentos estas leyendo esta dedicatoria, porque se que eres un buen amigo.

Gracias a Dios por dejarme concluir uno más de mis proyectos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por haberme otorgado una beca para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN). Así como a la beca otorgada por el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI). Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por haberme permitido realizar los estudios experimentales en sus instalaciones.

A mi director de tesis, el M.C. Ricardo Palomares García, por todo el apoyo brindado durante la realización de la maestría, y sobre todo por tenerme toda la paciencia del mundo. Al Dr. José Bustillos, por sus atinados comentarios y sugerencias al presente trabajo, le agradezco su motivación para concluir la tesis. Al M.C. Ismael Gárate Lizárraga, más que mi maestro, un gran amigo, que no solo compartió conmigo sus conocimientos, sino que siempre tuvo tiempo para aclarar mis dudas y darme atinados consejos. A la Dra. Cristina Band Schmidt, por sus acertadas aportaciones al presente trabajo. Así como al Dr. Federico por sus sugerencias. A todos ellos, muchas gracias por compartir su dedicación, tiempo, experiencia y conocimiento.

Al amor de mi vida, a la luz que me ilumina cada día, mi hermosa hija Hanna Monserrat. A mi querida familia, ellos han sido base de mi superación, gracias por apoyarme en cada una de las etapas de mi vida.

A Carlos Antonio, gracias por haberme dado el mejor regalo del mundo, siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.

Mis grandes amigos de toda una vida, Malú, Juanita, Rosita, Lupita, Reynita, Pablito, Dirzo, son parte de mi familia. A Diana, Carmen, Jaz, Claus, Susy, Margarita, Deivis Alfredo, Vladi, Erick, Norma, Pablo, José, por compartir una etapa de nuestra vida inolvidable y que siempre recordaremos con mucho cariño. Como no mencionar a los cuates del CIB, Pacorro, no se que hubiese hecho sin ti, Mine, Trini y Marte.

Al C.P. Humberto Ceseña Amador, por todo el apoyo incondicional que me brindo y por facilitarme todos los trámites para la realización de la tesis. Gracias por tu amistad

Gracias al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Acapulco, Gro., por darme la oportunidad de seguirme superando y poder alcanzar uno más de los objetivos de mi vida profesional, así como también agradezco al Dr. Saúl López Silva, por todo el apoyo y las facilidades que me brindo para poder concluir el presente trabajo.

Mil gracias a todos.

Bety

INDICE GENERAL		Página
INDICE DE FIGURAS.		IV
INDICE DE TABLAS.		VI
RELACION DE ANEXOS		VIII
GLOSARIO.		IX
RESUMEN.		XI
ABSTRACT.		XII
1. INTRODUCCIÓN.		1
2. ANTECEDENTES.		5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.		8
4. JUSTIFICACION.		9
5. HIPOTESIS.		10
6. OBJETIVOS.		11
6.1. Objetivo general.		11
6.2. Objetivos particular.		11
7. MATERIAL Y METODOS.		12
7.1 Muestreo de campo		12
7.2 Cultivos de fitoplancton		12
7.3 Fase Experimental 1 (Exposición y depuración)		14
7.4 Fase Experimental 2		15
7.5 Fase Experimental 3		15
7.6 Extracción de toxinas de dinoflagelados		17
7.7 Extracción de toxinas en almejas		18

7.8. Hidrólisis	18
7.9 Determinación de toxinas por HPLC con oxidación post-columna	19
8. RESULTADOS	21
8.1 Fase Experimental 1	22
8.2 Concentración y perfil de toxinas de <i>G. catenatum</i>	22
8.3 Perfil de toxinas en <i>M. squalida</i> (Fase experimental 1)	23
8.4 Toxicidad total en almejas	24
8.5 Fase Experimental 2	29
8.6 Concentración y perfil de toxinas de <i>G. catenatum</i>	29
8.7 Toxicidad total en almejas	29
8.8 Fase Experimental 3	34
8.9 Concentración y perfil de toxinas de <i>G. catenatum</i>	34
8.10 Toxicidad total en almejas	35
8.11 Análisis comparativo de los experimentos	40
9. DISCUSION	42
9.1. Evaluación de TP en poblaciones silvestres de almeja chocolata	42
9.2 Efecto del dinoflagelado en la almeja	43
9.3 Perfil de toxinas en <i>G. catenatum</i>	44
9.4 Biotransformación de TP en la almeja chocolata	47
9.5 Mecanismos de depuración	52
10. CONCLUSIONES	54
11. RECOMENDACIONES	55
12. LITERATURA CITADA	56
13. ANEXOS	68

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Carga que presentan las toxinas a pH neutro	2
Figura 2	Area de muestreo mostrando las estaciones de colecta de <i>Megapitaria squalida</i>	12
Figura 3	Cámaras de incubación utilizadas para la alimentación de <i>M. squalida</i> con <i>G. catenatum</i> en la fase experimental 3	16
Figura 4	Cromatograma de toxinas paralizantes de <i>M. squalida</i> de la estación del Mogote, no se observó ningún tipo de toxina	21
Figura 5	Cromatograma del HPLC de TP realizado con el homogenizado de almeja chocolate donde se observan las áreas y los tiempos de retención de las principales toxinas identificadas (STX, saxitoxina; NeoSTX, neosaxitoxina; GTX2, gonyaulatoxina 2; GTX3 gonyaulatoxina 3).	24
Figura 6	Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente por 100 gramos de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 1. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa (α , 0.05). R^2 =coeficiente de correlación.	26
Figura 7	Variación de las diversas toxinas (en % molar) en <i>M. squalida</i> durante la fase experimental 1 alimentada con <i>G. catenatum</i> durante cada uno de los días de muestreo (1,3,5,8,14 Y 17).	28

Figura 8	Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente por 100 gramos de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 2. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa ($\alpha, 0.05$). R^2 = coeficiente de correlación.	31
Figura 9	Variación de las diversas toxinas (en % molar) en <i>M. squalida</i> durante la fase experimental 2 alimentada con <i>G. catenatum</i> durante cada uno de los días de muestreo (1,3,5,7,9, 11 Y 13).	33
Figura 10	Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente por 100 gramos de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 3. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa ($\alpha, 0.05$). R^2 = coeficiente de correlación.	37
Figura 11	Variación de las diversas toxinas (en % molar) en <i>M. squalida</i> durante la fase experimental 3 alimentada con <i>G. catenatum</i> durante cada uno de los días de muestreo (1,3,5,7,11, 13 Y 15).	39
Figura 12	Comparación de la eliminación de cada tipo de toxina paralizante en <i>M. squalida</i> alimentada con <i>G. catenatum</i> . Datos promedio de los tres tratamientos experimentales.	41
Figura 13	Comparación del perfil de toxinas (% molar) de <i>G. catenatum</i> y la almeja luego de ser alimentada por 48 hrs durante el experimento numero 3. Las toxinas fueron agrupadas en sulfocarbamato (SULFOCAR), decarbamato (DECARBA) y carbamato (CARBA).	48

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Condiciones en las que se mantuvo a <i>M. squalida</i> en las tres fases experimentales, así como la densidad celular de <i>G. catenatum</i> utilizada como alimento	16
Tabla 2	Transformación de las toxinas sulfocarbamatadas (tipo B y C) a sus análogos por hidrólisis	19
Tabla 3	Valores del Factor de Toxicidad de TP	20
Tabla 4	Composición de toxinas de la cepa de <i>G. catenatum</i> , utilizada en el primer experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél)	22
Tabla 5	Promedio de la densidad celular de <i>G. catenatum</i> con la que fueron alimentadas cada una de las almejas en la fase experimental 1	23
Tabla 6	Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el primer experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la Norma Oficial Mexicana ($\mu\text{g STXeq}/100\text{ g}$)	25
Tabla 7	Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental 1	27
Tabla 8	Composición de toxinas de la cepa de <i>G. catenatum</i> , utilizada en el segundo experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél)	29

Tabla 9	Promedio de la densidad celular de <i>G. catenatum</i> con la que fueron alimentadas cada una de las almejas en la fase experimental 2	29
Tabla 10	Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el segundo experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la Norma Oficial Mexicana ($\mu\text{g STXeq}/100\text{ g}$)	30
Tabla 11	Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental 2	32
Tabla 12	Composición de toxinas de la cepa de <i>G. catenatum</i> , utilizada en el tercer experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél)	34
Tabla 13	Promedio de la densidad celular de <i>G. catenatum</i> con la que fueron alimentadas las almejas en la fase experimental 3	34
Tabla 14	Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el tercer experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la Norma Oficial Mexicana ($\mu\text{g STXeq}/100\text{ g}$)	36
Tabla 15	Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental 3	38
Tabla 16	Comparación del perfil de toxinas paralizantes en <i>G. catenatum</i>	45
Tabla 17	Registros de <i>G. catenatum</i> y datos de toxicidad asociados a esta especie en el Pacífico Mexicano (Modificado de Gárate-Lizárraga <i>et al.</i> , 2004a)	47

RELACION DE ANEXOS

Anexo 1. Determinación de toxinas PSP por HPLC/FD

Anexo 2. Sistema de HPLC usado para determinación de PSP con un par-iónico, con oxidación post-columna y detección de fluorescencia

Anexo 3. Técnica de Hummert et al. (1997), para efectuar las determinaciones de toxinas paralizantes.

GLOSARIO

Biotransformación: muchos compuestos son transformados en el organismo debido a la acción de enzimas. Esta transformación puede consistir en la degradación (oxidación, reducción o hidrólisis), donde el compuesto pierde parte de su estructura, o en la síntesis de nuevas sustancias con el compuesto como parte de la nueva molécula (conjugación). El resultado de la biotransformación puede ser la inactivación completa o parcial de los efectos del compuesto, el aumento o activación de los efectos, o el cambio por nuevos efectos dependientes de las características de la sustancia sintetizada (Enciclopedia en línea Wikipedia).

Cepas: cultivo establecido a partir del aislamiento de una sola célula y que se mantiene por reproducción asexual.

Cinética: estudio de la velocidad a la que se producen ciertos procesos; por ejemplo las reacciones químicas o enzimáticas, (Real Academia Española Online).

Conversión: cambio de una cosa en otra (Diccionario de la Lengua Española © 2005 Espasa-Calpe S.A., Madrid).

Desintoxicación: procedimiento terapéutico destinado a eliminar los efectos de una intoxicación aguda o crónica. (Enciclopedia Microsoft® Encarta® Online 2007).

Epímero: un estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos.

Epimerización: conversión de una sustancia en su epímero.

Florecimiento: el fitoplancton también puede ser responsable de algunos problemas ecológicos cuando se desarrolla demasiado: en una situación de exceso de nutrientes y de temperatura favorable, estos organismos pueden multiplicarse

rápidamente formando lo que se suele llamar florecimiento. (Enciclopedia en línea Wikipedia).

Hidrólisis: reacción química del agua con una sustancia. Entre las sustancias que pueden sufrir esta reacción se encuentran numerosas sales, que al ser disueltas en agua, sus iones constituyentes se combinana con los iones hidronio u oxonio H_3O^+ o bien con los iones hidroxilo, OH^- , o ambos. (Enciclopedia en línea Wikipedia).

Higroscópicas: se refiere a todos los compuestos que atraen agua en forma de vapor o de líquido de su ambiente. Algunos de los compuestos higroscópicos reaccionan químicamente con el agua como los hidruros o los metales alcalinos. (Enciclopedia en línea Wikipedia).

Saxitoxina: son derivados guanidinos heterociclicos que son producidas por dinoflagelados del género *Alexandrium* (*Gonyaulax*), *Pyrodinium* y *Gymnodinium* (Shimizu, 1987).

Toxina: sustancia venenosa producida por la actividad metabólica de ciertos organismos vivos, como bacterias, insectos, plantas y reptiles. (Enciclopedia en línea Encarta)

RESUMEN

Durante un ciclo anual se evaluó la incidencia de toxinas paralizantes (TP) en poblaciones silvestres de almeja chocolata (*Megapitaria squalida*), provenientes de dos localidades del sur de la Bahía de La Paz y simultáneamente se realizaron experimentos de laboratorio, para determinar su tasa de depuración al ser alimentada con *Gymnodinium catenatum*, un dinoflagelado productor de toxinas paralizantes. No se registró la presencia de TP en las poblaciones silvestres, a lo largo del ciclo anual. Por tanto el trabajo se enfocó principalmente a evaluar las tasas de transformación y depuración de TP de la almeja *M. squalida* al ser alimentada con *G. catenatum*. Se realizaron tres experimentos utilizando una cepa de moderada toxicidad (26 a 28 pg de saxitoxina equivalente (STXeq)). La tasa máxima de ingestión fue de entre 100 y 250 cel ml⁻¹. Las almejas de los lotes experimentales también fueron recolectadas en la Bahía de La Paz y aclimatadas por espacio de 2 días, proporcionándoles alimento *ad libitum* (*Chaetoceros* sp.) antes de iniciar los experimentos. Las almejas no mostraron efectos adversos y mantuvieron una tasa de ingestión constante, durante el período en que fueron expuestas a concentraciones variables de *G. catenatum*. El máximo nivel de toxinas acumulado en periodos cortos, puede exceder el límite permitido por la norma sanitaria (80 pg STXeq 100g⁻¹). No obstante la tasa de desintoxicación puede considerarse rápida y en ningún caso supero los 10 días posteriores a la exposición del dinoflagelado tóxico. El perfil de TP en la cepa de *G. catenatum* estuvo compuesto principalmente de dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2 en los 3 experimentos, las toxinas B1, STX y NeoSTX se presentaron solo en los dinoflagelados utilizados como alimento en 2 experimentos, mientras que el perfil de toxinas de la almeja chocolata en los tres experimentos, estuvo constituido por: STX, NeoSTX, GTX2, dcGTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y C2. Por lo que se sugiere que la almeja puede transformar toxinas del grupo N-sulfocarbamato a toxinas carbamato en poco tiempo, aunque la toxicidad total (STXeq), no alcanza a rebasar el límite máximo permisible para el consumo humano.

Palabra clave: *Gymnodinium catenatum*, dinoflagelado, toxinas paralizantes, Bahía de La Paz

ABSTRACT

The presence of (TP) paralytic shellfish toxins, in wild population of chocolata clam (*Megapitaria squalida*), was evaluated along annual cycle in La Paz Bay. Simultaneously we evaluated the depuration rate of TP in clams, feeder with a dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum*, a TP producer. We don't registered TP in native clams of La Paz bay, and therefore we focused the investigation to determine the rate of transformation and depuration of TP by *M. squalida*. We realized three experiments used a moderate strain (26 A 28 pg STXeq), and a maximum ingestion interval was 100 – 250 cel ml⁻¹. The clams used in the experiments were obtained in La Paz Bay also and acclimated during 48 hours, feeder *ad libitum* with *Chaetoceros* sp. We do not observe mortality or sublethal effects related with the ingestion of the dinoflagellate, but in some cases the level of toxins accumulated in the clams rebased the maximum permissible (80 pg STXeq 100g⁻¹), in short periods of time. In spite of that, the depuration rate will be considered faster and never during more than 10 days. Toxins profiles of *G. catenatum* include nine toxins, from these the dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2 were the more important, and the B1, STX y NeoSTX, were present only in two of the three experiments. Thereafter, paralytic toxin profile in clams was composed by STX, NeoSTX, GTX2, dcGTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y C2. These results suggesting certain capacity of clams for transform the N-sulfocarbamate to carbamate toxins in short period of time, although the total toxicity don't reached the maximum permissible.

Key words: *Gymnodinium catenatum*, dinoflagellate, paralytic shellfish toxins, Bahía de La Paz

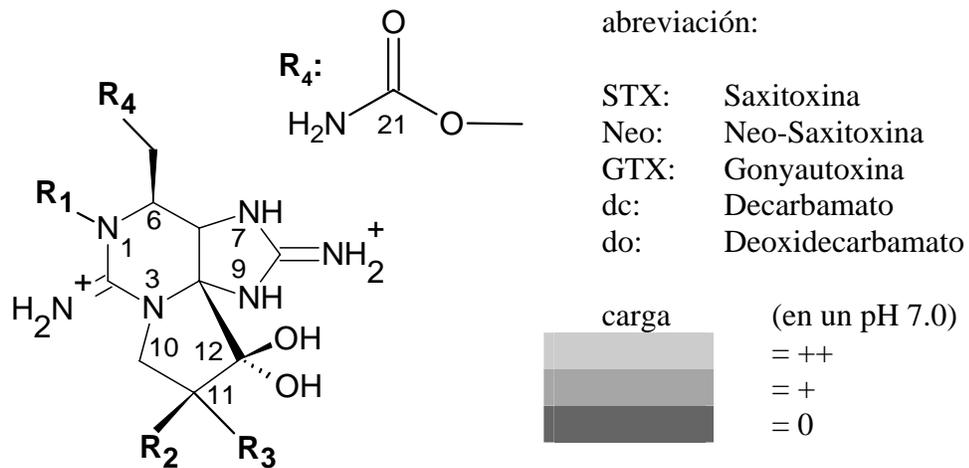
1. INTRODUCCIÓN

La aparición de especies productoras de toxinas, es cada vez más frecuente y su distribución se ha ido ampliando conforme se realizan estudios enfocados a la detección de este tipo de especies, en diferentes partes del mundo. La aparición de florecimientos algales nocivos, también se ha incrementado y de acuerdo con Hallegraeff *et al.* (1995), existen diversos factores asociados a este incremento como son: un mayor conocimiento de la distribución de especies tóxicas, el aumento en la utilización de aguas costeras para la acuicultura y la estimulación de florecimientos tóxicos por eutrofización antropogénica. Estos florecimientos también han sido relacionados a condiciones climáticas inusuales y a la invasión de quistes de resistencia, llevados en el agua de lastre de barcos o provenientes de la introducción de moluscos bivalvos con quistes de dinoflagelados de un área a otra (Kimmerer *et al.*, 1994).

De aproximadamente 2,000 especies de dinoflagelados (Taylor, 1990), alrededor de 50 producen o tienen la capacidad de producir toxinas que pueden causar algún tipo de daño a los seres humanos. Y de éstas, únicamente 15 especies de los géneros *Alexandrium*, 2 especies de *Pyrodinium* y *Gymnodinium* producen toxinas paralizantes (Faust y Gullede, 2002).

Las toxinas paralizantes son solubles en mezclas de disolventes orgánicos polares (metanol, etanol o acetonitrilo), son estables en medios ácidos y extremadamente inestables en medios alcalinos con presencia de oxígeno (Muñoz-Cabrera y Ramírez-Camarena, 2000). Regularmente se encuentran en formas ionizadas y son altamente higroscópicas. Aunque este tipo de toxinas se consideran estables al calor, su estabilidad puede variar considerablemente dependiendo de su estructura y pH, por ejemplo, la saxitoxina es extremadamente estable a altas temperaturas y a pH bajos. Las toxinas paralizantes están constituidas por un núcleo tetrahidropurínico, todas ellas son análogas a la saxitoxina, siendo ésta la primera y más estudiada. Estas toxinas se pueden dividir en tres grupos dependiendo de la carga neta que presentan a pH neutro. Las saxitoxinas (STXs) presentan carga neta 2⁺ (STX, NeoSTX, dcSTX, dcNeoSTX, doSTX); el grupo de las Gonyaulatoxinas (GTXs), formado por las GTXs 1-6, B1=GTX5 y B2=GTX6, las decarbamoil-

Gonyaulatoxinas (dcGTXs), presentan una carga neta 1⁺, y por último, el grupo de las sulfocarbamoil-saxitoxinas (C1-C4), presentan carga neta 0 (Lagos, 2002). Esta carga característica es importante ya que de ella depende su afinidad a los canales de sodio y por lo tanto de la potencia de la toxina (Fig. 1).



			TOXINAS			
			Carbamato	N-Sulfocarbamato	Decarbamato	Deoxycarbamato
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ : OCO-NH ₂	R ₄ : OCONH-SO ₃ ⁻	R ₄ : OH	R ₄ : H
H	H	H	STX	B ₁	dcSTX	doSTX
OH	H	H	Neo	B ₂	dcNeo	-
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX ₁	C ₃	dcGTX ₁	-
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX ₂	C ₁	dcGTX ₂	doGTX ₂
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX ₃	C ₂	dcGTX ₃	doGTX ₃
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX ₄	C ₄	dcGTX ₄	-

Figura 1. Carga que presentan las toxinas paralizantes con un pH neutro.

El dinoflagelado desnudo *Gymnodinium catenatum*, es un productor de toxinas paralizantes (TP) y se ha documentado que en las costas mexicanas, existe un incremento en su frecuencia de aparición, principalmente a lo largo de las costas del Océano Pacífico desde Baja California hasta Oaxaca (Cortés-Altamirano y Alonso-Rodriguez, 1997, Ronson-Paulin, 1999; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005). Debido a la potencia de las toxinas que produce este dinoflagelado, su presencia representa un peligro latente, ya que puede ser consumido por diversos tipos de moluscos filtradores, siendo éstos los principales vectores de toxinas hacia el ser humano (Kimmerer *et al.*, 1994). El primer reporte que se tiene en México sobre florecimientos tóxicos causados por el dinoflagelado *G. catenatum* es para el año de 1979 en que ocurrió un brote de TP en donde 3 personas fallecieron (Mee *et al.*, 1986). En los últimos años, se ha documentado ampliamente la existencia de dinoflagelados productores de TP en aguas mexicanas, además de *G. catenatum*, destaca por su abundancia y frecuencia de aparición; *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (De la Garza-Aguilar, 1983; Mee *et al.*, 1986; Cortés-Altamirano *et al.*, 1993; Lechuga- Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998; Mancilla-Cabrera *et al.*, 2000; Orellana-Cepeda *et al.*, 1998; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004a,b; Band-Schmidt *et al.*, 2005). En un estudio reciente Okolodkov y Gárate-Lizárraga *et al.* (2006), registran la presencia de otras especies capaces de generar TP como; *Alexandrium catenella*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichii* y *A. minutum*.

Generalmente las especies de moluscos bivalvos son insensibles a las toxinas paralizantes y pueden acumular altas concentraciones, como es el caso del mejillón *Mytilus edulis* (Bricelj *et al.*, 1990). Sin embargo existen especies como el ostión *Crassostrea virginica* que acumulan niveles relativamente bajos de toxinas, debido a que son más sensibles a las TP, por lo que al estar expuestos a células tóxicas reaccionan y cierran completamente las valvas evitando así la ingestión y acumulación de toxinas (Gainey y Shumway, 1988). El límite máximo de toxinas que puedan acumular los moluscos bivalvos dependerá de la especie de dinoflagelado que se trate, la densidad celular que mantengan y su toxicidad específica, así como la duración de los florecimientos (Bricelj y Shumway, 1998).

Los moluscos bivalvos tienen diferente habilidad para acumular, biotransformar y eliminar toxinas paralizantes por lo que estos son usados como organismos centinelas para el monitoreo de la presencia de TP. Sin embargo, la cinética de acumulación y depuración de las toxinas puede variar de acuerdo a la respuesta extrínseca del molusco a los factores ambientales, como temperatura, salinidad, densidad celular del dinoflagelado y sobre todo del tiempo de exposición de las poblaciones de moluscos (Bricelj y McQuarrie, 2003). Por tanto, los resultados de este tipo de bioensayos, deben tomarse con reserva, debido a que algunas especies de mejillones tienen una capacidad de asimilación y desintoxicación relativamente rápida y también pueden existir diferencias en la cinética de eliminación de las toxinas (Bricelj y Shumway, 1998).

Se sabe que los cambios en el perfil de toxinas en los tejidos de la almeja pueden incrementarse o disminuir, en función de la retención selectiva o la eliminación de las toxinas por diferentes vías (Bricelj y Shumway, 1998). Por tanto, cada especie de molusco puede responder de forma distinta ante la presencia de TP. Se tienen antecedentes de estudios donde se comparan los perfiles de toxinas derivados del fitoplancton natural con presencia de *G. catenatum* y de diferentes tipos de almejas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004 a,b; Band-Schmidt *et al.*, 2004) y se han realizado estudios en condiciones controladas de laboratorio sobre los efectos del dinoflagelado tóxico *G. catenatum* en la tasa de ingestión y aclaramiento en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, así como la tasa de eliminación de estas toxinas (Estrada *et al.*, 2007). En el presente trabajo se pretende examinar el grado de transformación y la tasa de depuración de las TP provenientes del dinoflagelado *G. catenatum*, en la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*), bajo condiciones de laboratorio. Esta especie de almeja se distribuye ampliamente en la región, por lo que resulta un excelente candidato para utilizarse como organismo “centinela” en el monitoreo de las toxinas. Es claro entonces que el desconocimiento de las tasas de depuración y transformación de las toxinas nos impide tener un plan de manejo en cuanto a las medidas precautorias, particularmente en términos del tiempo, para la implantación de las vedas sanitarias. Por lo anterior, en este trabajo se estudian la tasa de depuración de una especie de molusco de importancia

comercial en la región de Baja California Sur con el propósito de conocer sus características en la cinética de transformación de las TP y así determinar su potencialidad como especie “centinela”.

2. ANTECEDENTES

Recientemente se han incrementado los estudios referentes a la acumulación y eliminación de las toxinas en los moluscos bivalvos, sobre todo en lugares donde los florecimientos tienden a ser recurrentes (Blanco *et al.*, 1997; Jaime *et al.*, 2006). Chen y Chou (2001), observaron que al alimentar durante 18 días a la almeja púrpura *Hiautula rostrata* Lighttoot, con el dinoflagelado *Alexandrium minutum* Halim, la glándula digestiva acumuló grandes concentraciones de TP. Sekiguchi *et al.* (2001), evaluaron la acumulación y depuración de las toxinas paralizantes en la escalopa *Patinopecten yessoensis* alimentada con el dinoflagelado *A. tamarense*, encontrando que la cantidad de toxina era proporcional a la cantidad de dinoflagelados ingerido.

Bauder *et al.* (2001), en la escalopa *Argopecten irradians* al alimentarla durante dos semanas con el dinoflagelado epibéntico *Prorocentrum lima*, el total de toxinas retenidas fue < 1% del total de toxinas ingeridas, mientras que en el periodo de depuración, hubo una rápida eliminación de toxinas DSP.

Silvert *et al.* (1998) no encontraron evidencias de una respuesta inhibitoria en el consumo de la almeja del Atlántico *Spitula solidissima*, cuando esta es alimentada con *Alexandrium* spp. No obstante, la desintoxicación fue muy lenta (meses o años) y observaron elevadas concentraciones de toxinas en diferentes tejidos. Estos autores mencionan también que dependiendo del tipo de toxinas que contenga el dinoflagelado, puede presentarse una biotransformación de las toxinas e incrementarse significativamente el grado de toxicidad que puede ser transferida hacia un consumidor secundario.

En un estudio realizado en especies de moluscos comerciales como: *Callista chione*, *Glycymeris glycymeris*, *Venus gallina*, *Acanthocardia tuberculatum*, *Donax trunculus*, *Ruditapes decussatus*, *Crassostrea gigas* y *Mytilus galloprovincialis*, el perfil de toxinas mostró tres patrones diferentes de transformación de toxinas. En un primer grupo, el perfil de TP era similar al dinoflagelado responsable *G. catenatum*, con un gran predominio de toxinas del tipo C. El segundo grupo, mostró un perfil de toxinas ligeramente diferente al del alga tóxica con una baja proporción de toxinas N-sulfocarbamato, finalmente el tercer grupo mostró un perfil de toxinas muy diferente al de las células de *G. catenatum*, con un incremento en toxinas carbamato: Neosaxitoxina (NeoSTX) en mejillones (*M. galloprovincialis*) y decarbamoylsaxitoxina (dcSTX) en berberechos (*A. tuberculatum*) (Taleb *et al.*, 2003).

En condiciones naturales, se ha observado que algunos moluscos pueden incrementar el grado de potencia de las toxinas que han ingerido. En estudios realizados en España y Portugal, aquellos moluscos que consumieron *G. catenatum* mostraron una conversión de toxinas de tipo N-sulfocarbamato a toxinas carbamato (Anderson *et al.*, 1989, Franca *et al.*, 1996, Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1989, Oshima *et al.*, 1990, 1993, Vale y Sampayo, 2001). En cambio en otras regiones como Tasmania, se han registrado perfiles muy similares tanto para el dinoflagelado (*G. catenatum*) como para los moluscos contaminados, caracterizados por altas proporciones de toxinas N-sulfocarbamato de baja potencia (98-99% y 77-93%, respectivamente) (Oshima *et al.*, 1987).

Cortés-Altamirano *et al.* (1993), realizaron los primeros estudios en condiciones naturales en México, utilizando bioensayo en ratón, encontraron niveles altos de saxitoxina en muestras de ostión (*Crassostrea iridescens*) y mejillón (*Choromytilus palliopuncatus*) en las costas de Oaxaca y Chiapas, determinando un tiempo de depuración de dos meses. Es importante apuntar que estos autores no consideraron los niveles de células presentes durante los muestreos de moluscos por lo que este cálculo de depuración es especulativo. En el Golfo de California, Gárate-Lizárraga *et al.* (2004a), obtuvieron niveles altos de TP ($298 \mu\text{gSTXeq}100\text{g}^{-1}$) en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) en mayo de 1999 provenientes de Bahía Concepción y en ostras (*Crassostrea iridiscens*) ($39.4 \mu\text{gSTXeq}100\text{g}^{-1}$) (abril 2001)

procedentes de la Bahía de Mazatlán. Posteriormente, Gárate-Lizárraga *et al.* (2004b) registraron por primera vez, la presencia de TP en almeja chocolata en la Bahía de La Paz, observando bajas concentraciones (0.14 - 5.46 $\mu\text{g}/\text{STXeq}/100\text{ g}$) y un perfil de toxinas compuesto principalmente por STX, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, C2, dcSTX y B1.

En el Golfo de California una de las especies productoras de toxinas paralizantes de mayor distribución y abundancias es el dinoflagelado *G. catenatum*, este organismo tiene un amplio intervalo de tolerancia a la temperatura y puede prosperar en temperaturas que van de 11.5 °C a 30°C, con un desarrollo óptimo entre 21°C y 29°C. En cuanto a la salinidad puede tolerar de 25 a 40 ‰ y con un crecimiento óptimo entre 28 a 38 ‰ (Band-Schmidt *et al.*, 2004). Esta adaptabilidad le permite prosperar en una amplia gama de ambientes al igual que la almeja chocolata, por lo que es muy probable que la interacción consumidor-presa pudiera establecerse con cierta frecuencia.

Se ha encontrado que cepas de *G. catenatum* provenientes de Bahía Concepción tienen un perfil de toxinas similar a las observadas en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*). El promedio de toxicidad en *G. catenatum* es bajo (26.7 pg STX eq/cel), y posee pocas toxinas potentes del grupo carbamato (NeoSTX, GTX1 y GTX4) y la ausencia de STX. En las muestras de almeja catarina, las toxinas dcSTX, dcGTX2 y dcGTX3, fueron las toxinas con mayor porcentaje molar y la biotransformación no fue significativa en este molusco (Band-Schmidt *et al.*, 2005).

En Bahía Concepción los valores de abundancia de *G. catenatum* son muy variables, Gárate-Lizárraga *et al.* (2001) registraron valores entre 1,800 a 3,000 cél/L mientras que Gárate-Lizárraga *et al.* (2004a) observaron densidades de hasta medio millón de cél/L. No obstante, la concentración total de TP que se ha encontrado en moluscos ha sido alta e incluso en algunas ocasiones ha llegado al límite permisible para consumo humano (80 $\mu\text{g eqSTX}/100\text{ g carne}$) (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004a), sugiriendo que *G. catenatum* tiene un grado de toxicidad elevado o bien que los moluscos podrían estar acumulando o biotransformando las toxinas. En Bahía de La Paz, Gárate-Lizárraga *et al.* (2004b) reportaron concentraciones bajas de *G. catenatum* (160-2,400 céls/L). Sin embargo, recientemente Hernández-Sandoval *et*

al. (2007) reportaron densidades de 2,390 hasta 600,000 células/L⁻¹ de *G. catenatum* en el periodo febrero-abril.

En síntesis se puede afirmar que existe una importante cantidad de trabajos donde se aborda la problemática de la depuración y transformación de las toxinas paralizantes. Sin embargo, es claro que los antecedentes para las especies de la región del Pacífico son escasos y se restringen a reportes de florecimientos ocasionales donde se han detectado las toxinas en moluscos, y de manera especulativa han propuesto periodos de depuración.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los moluscos tienen la capacidad de ingerir, seleccionar y retener o modificar ciertas toxinas. De acuerdo con Ritchie y Rogart (1977) y Kao (1993), la mayoría son prácticamente insensibles al efecto de las saxitoxinas, debido a que en muchos de ellos los impulsos nerviosos se transmiten a través de canales de calcio, en tanto que las saxitoxinas bloquean específicamente los canales de sodio (Lehane, 2000). Sin embargo los efectos pueden variar de especie a especie y de región en región (Gainey y Shumway, 1988). La saxitoxina puede persistir en el cuerpo de los moluscos por largos períodos, dependiendo de la especie y del tejido involucrado, pero también existen moluscos capaces de eliminar las toxinas rápidamente y solo presentan toxinas cuando están sujetos a la acción directa de un florecimiento tóxico (Lehane, 2000). Estas características han permitido obtener información relevante para la detección temprana o bien para inferir la evolución del fenómeno en condiciones naturales en circunstancias donde el fenómeno no es percibido de manera tradicional (“mar de color”). Así por ejemplo, la evaluación de las tasas de intoxicación-desintoxicación en moluscos, de amplio consumo humano, es importante para obtener estimaciones de la intensidad y duración de periodos críticos en el ambiente natural (Morono *et al.*, 1998). Estudios realizados con anterioridad indican que la concentración máxima de toxinas paralizantes (Chen y Chou, 2001) en bivalvos han sido registradas dentro de las 2 primeras semanas, después de ser

expuestos a florecimientos tóxicos. Sin embargo existen pocos estudios a este respecto en México, por lo que es necesario realizar investigaciones que aborden la problemática de la intoxicación y desintoxicación de moluscos bivalvos, ya que éstos constituyen una fuente importante de alimento en las regiones costeras. Por otro lado, considerando que en Baja California Sur y a nivel nacional, la producción de cultivos marinos va en aumento, este tipo de estudios podría tener una respuesta favorable en el sector productivo, debido a que los cultivos de diversas especies representan una fuente importante de empleos.

La almeja chocolata *Megapitaria squalida* se distribuye a lo largo de todo el país, y en Baja California Sur, mantiene el segundo lugar entre los moluscos bivalvos de mayor abundancia y consumo (Gutiérrez *et al.*, 2000). En México, este tipo de moluscos tienen una gran aceptación, debido a su bajo costo y a que se encuentra disponible la mayor parte del año.

Los avances en la capacidad de predecir el tiempo y duración de florecimientos tóxicos podrían ayudar a reducir las pérdidas económicas en las regiones donde la extracción de moluscos representa una fuente importante de ingresos. Pero sobre todo, es necesario desarrollar una cultura de la prevención de problemas de salud, ligados a la aparición de florecimientos masivos de especies tóxicas. Por tanto es necesario contar con estudios que permitan proponer líneas de acción ante la presencia de especies generadoras de TP.

4. JUSTIFICACION

M. squalida es un molusco filtrador que tiene una amplia distribución desde la Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México hasta Mácora, Perú (Keen, 1971), es una especie comercialmente importante que se encuentra presente todo el año y se comercializa a precios accesibles para la población (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2000). En Bahía de La Paz existen pequeños bancos naturales y se le puede encontrar a lo largo de todo el año, donde en ocasiones se ha reportado que presentan toxinas paralizantes (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004b). Por otro lado, *G. catenatum* es un dinoflagelado que puede ser consumido por organismos filtradores y se presenta en el Golfo de California la mayor parte del año, aunque en bajas

abundancias (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2002). La cepa utilizada de Bahía Concepción en B.C.S., tiene un contenido moderado de toxinas paralizantes (26 a 28 pgSTX eq/cél) (Band-Schmidt *et al.*, 2004).

Los moluscos tienen la capacidad de concentrar y biotransformar TP y pueden actuar como vector de estas a otros niveles tróficos incluyendo al hombre. En algunas regiones de nuestro país, el consumo de moluscos contaminados representa un grave riesgo de salud pública. Hasta el año de 1995, en México se tenían registros clínicos de 330 casos de intoxicaciones y 17 defunciones ocasionados por el consumo de moluscos bivalvos contaminados por florecimientos tóxicos (Cortés-Altamirano *et al.*, 1996), actualmente estas cifras no han sido actualizadas por el Sector Salud, pero se sabe que la incidencia ha ido en aumento, sobre todo en la costa sureste del Pacífico.

En diversas regiones de nuestro país el consumo de moluscos es importante, por lo que la presencia de florecimientos algales nocivos pueden representar un grave riesgo para la salud pública, por lo que es primordial conocer la capacidad y el tiempo que tardan los moluscos para acumular y eliminar toxinas, para poder establecer las medidas sanitarias pertinentes

Por otro lado, los moluscos bivalvos en México representan una fuente de ingresos importante, por lo que se debe de ampliar el conocimiento que se tenga, sobre la posible toxicidad de los dinoflagelados, así como de los efectos que éstos ocasionan en las distintas especies de moluscos de importancia comercial.

5. HIPOTESIS

La almeja chocolata *M. squalida* tiene la capacidad de consumir y biotransformar toxinas paralizantes, transformando las toxinas N-sulfocarbamato (baja toxicidad) a toxinas carbamato y decarbamato (alta y media toxicidad) en tiempos relativamente cortos.

6. OBJETIVOS

6. 1. Objetivo general

Evaluar las tasas de transformación y depuración de TP de la almeja *M. squalida* al ser alimentada con *G. catenatum*.

6.2. Objetivos particulares

- Determinar el perfil de toxinas del cultivo de *G. catenatum*.
- Determinar las posibles vías de transformación que tienen las toxinas paralizantes al ser ingeridas por *M. squalida*.
- Determinar la tasa de depuración de *M. squalida* al alimentarla con *G. catenatum*.
- Determinar en dos áreas de pesca en la Bahía de La Paz, el perfil de TP en *M. squalida*.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1. Muestreo de campo.

Se recolectaron almejas adultas en dos localidades de la Bahía de La Paz (Fig. 2). En la zona del Mogote, se realizó un muestreo mensual de agosto del 2003 a agosto del 2004. En el Comitán, se realizaron muestreos quincenales de julio del 2003 a agosto del 2004. En cada muestreo se colectaron un mínimo de 6 almejas. Una vez recolectadas se trasladaron al laboratorio y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis.

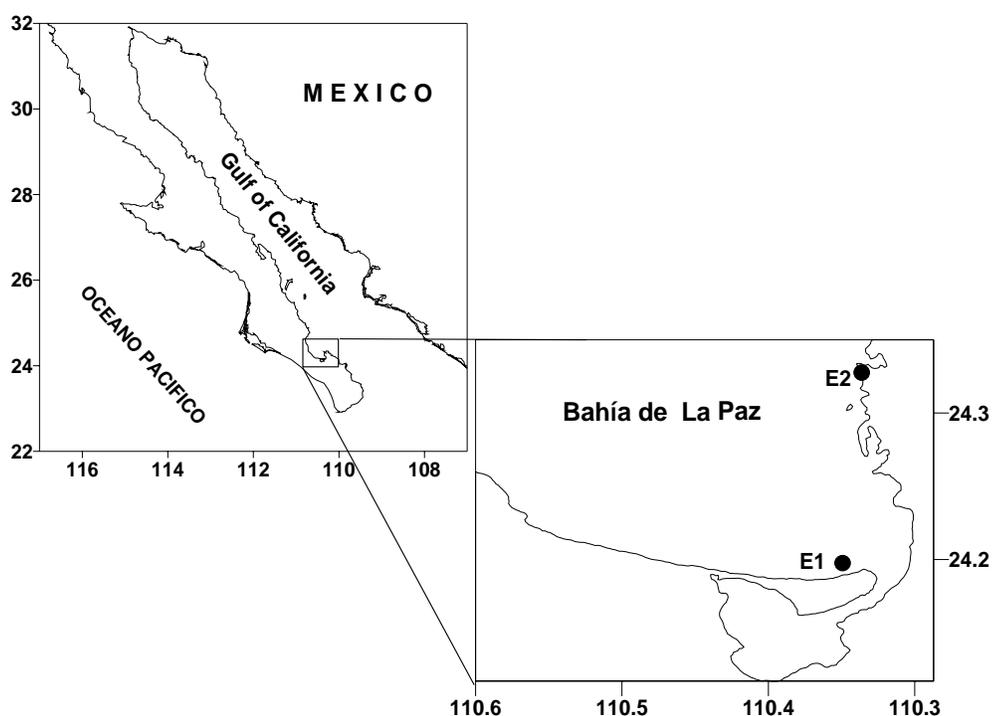


Figura 2. Área de muestreo mostrando las estaciones zona de colecta de *M. squalida*

7.2. Cultivos de fitoplancton

Se seleccionó una cepa de *Gymnodinium catenatum* (GCCV-7, CODIMAR) con un contenido de TP de 26 a 28 $\mu\text{gSTX eq/cél}$. Esta cepa fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S. (Band-Schmidt *et al.*, 2004) y cultivada en medio f/2 (Guillard, 1975) modificado mediante la adición de selenio (H_2SeO_3 10^{-8}M) y reduciendo la

concentración de cobre (CuSO_4 10^{-8}M) (Anderson *et al.*, 1989). Los cultivos fueron mantenidos con una salinidad de 33 a 34 ‰, en un cuarto de incubación con temperatura controlada ($22\text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), con un régimen de 12:12 de luz- oscuridad y a una iluminación de $150\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Un cultivo de *Chaetoceros* sp., mantenido en medio marino f/2 (Guillard, 1975) adicionado con silicatos y sin adicionar selenio, bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y ciclo de luz-oscuridad, fue utilizado como alimento control en el primer experimento.

Todos los medios de cultivo se esterizaron en una autoclave a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min.

7.2.1. Escalamiento.

Se escalaron los cultivos progresivamente desde los 25 mL hasta un volumen de 3 a 4 litros, utilizando agua de mar esterilizada por medio de una autoclave. Se utilizaron los cultivos en fase de crecimiento exponencial para alimentar a las almejas.

7.2.2. Conteo celular.

Para determinar la densidad celular de los cultivos se tomaron alícuotas de 10 mL y se fijaron con acetato-lugol (Phytoplankton manual, UNESCO, 1978), y se cuantificaron en una cámara de Sedgewick-Rafter de 1 mL de capacidad en un microscopio óptico.

7.3. *Megapitaria squalida*. Exposición a un dinoflagelado tóxico y depuración de TP

7.3.1. Fase experimental 1

Se recolectaron 50 almejas adultas de *Megapitaria squalida* con una talla aproximada de 6.5 cm y con un peso promedio de 14 g. La aclimatación se hizo por un periodo de 24 h a una temperatura de 28°C y un ciclo de 12/12 hr de luz y oscuridad, aireación constante, en un cuarto de incubación en el Laboratorio de Fisiología Animal del CIBNOR. Para la fase experimental, se colocaron 2 almejas en frascos de 2 L de capacidad dentro de una java de plástico, adicionando 1000 mL de

agua de mar filtrada a cada frasco. El primer día se alimentaron con 350 mL de cultivo, con una concentración de 1,140 cél/mL de *G. catenatum*, el segundo día se les proporcionó 350 mL de cultivo con una concentración de 1,290 cél/mL. El tercer día se alimentaron con 500 mL de cultivo a una concentración de 970 cél/mL y finalmente al cuarto día se les dió 450 mL de cultivo con una concentración de 870 cél/mL, estas concentraciones de alimento se proporcionaron a cada frasco conteniendo las dos almejas. Simultáneamente se tuvieron lotes testigo en las mismas condiciones que las anteriores, solo que se alimentaron con *Chaetoceros sp.* En el periodo que duró la desintoxicación (16 días) se muestrearon 2 almejas cada tercer día. Las condiciones generales del experimento se muestran en la tabla 1.

Adicionalmente, se tomaron tres réplicas del cultivo de dinoflagelado, filtrando 50 mL en filtros Whatman GF/F de 25 mm de apertura de poro para evaluar la toxicidad total y el análisis del perfil de toxinas paralizantes. Se congelaron las muestras en viales criogénicos a -20 C hasta su análisis, las cuales fueron procesadas de manera individual.

7.3.2. Fase experimental 2

En una segunda fase experimental, se colectaron 30 almejas adultas con una talla promedio de 7 cm y con un peso aproximado de 17 g. La aclimatación se hizo colocándolas en un tanque de aproximadamente 500 L con agua de la Ensenada de La Paz circulando por un periodo de 3 días. Posteriormente se colocaron en una java de 50 L dentro del tanque para conservar la temperatura. La variación de la temperatura oscilo entre 24 y 28 °C durante el experimento. En esta etapa se les adiciono aireación y se alimentaron por cuatro días consecutivos con las siguientes densidades celulares de *G. catenatum*: en el primer día se les proporcionó una cantidad de 8.4 L de cultivo con una densidad celular de 1,470 cél/mL, el segundo día se les dió 11 L con una densidad celular de 2,300 cél/mL, el tercer día se adicionaron 10.5 L con una densidad celular de 1,850 cél/mL, finalmente el último día se les proporcionó una cantidad de 11 L con una densidad celular de 730 cél/mL. Después del periodo de alimentación, se muestrearon las almejas por un periodo de doce días, tomando tres almejas al azar cada tercer día para la determinación de

toxinas paralizantes, se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. Como testigos se mantuvieron 10 almejas (fuera de la java) sin alimentación. Las condiciones generales de este experimento se muestran en la tabla 1. En este experimento se analizó el tejido de las 3 almejas juntas.

Se realizó el mismo procedimiento que el experimento anterior para el análisis de toxinas y perfil de la cepa del dinoflagelado empleada como alimento.

7.3.3. Fase experimental 3

En la tercera parte experimental, se recolectaron 34 almejas adultas de una talla promedio de 8 cm con un peso aproximado de 27 g y se aclimataron durante 48 hr dentro de una java de 50 L de capacidad a una temperatura de 26°C (Laboratorio de Fisiología Animal del CIBNOR). Posteriormente, cada almeja se colocó en cámaras especiales de aproximadamente 1,500 mL y se mantuvieron dentro de la java (Fig.3), alimentándose por 2 días. En este experimento la alimentación se realizó con un sistema que permite un flujo constante de aproximadamente de 60 gotas (de alimento) por minuto por cámara. El primer día se les suministroo una cantidad de 12,450 L a una densidad celular de 612 cél/mL y el segundo día fue de 16,600 L con una densidad celular 842 cél/mL de *G. catenatum*. Las características generales de las condiciones experimentales se muestran en la tabla 1. En este experimento se tomaron muestras de los organismos (3 almejas) cada tercer día durante 14 días luego de que cesó la alimentación. Durante el tiempo que duró la fase experimental se realizaron recambios diarios de agua de mar, la cual se mantuvo a la misma temperatura durante todo el experimento. Al mismo tiempo se tenían almejas control, las cuales se mantuvieron en cámaras especiales en las mismas condiciones que las anteriores (Fig.3). Estas almejas se procesaron de manera individual. Se realizó el mismo procedimiento que el experimento anterior para el análisis de toxinas y perfil de la cepa del dinoflagelado empleada como alimento.

Tabla 1. Condiciones en las que se mantuvo a *M. squalida* en las tres fases experimentales, así como la densidad celular de *G. catenatum* utilizada como alimento

EXP.	Tempe ratura (°C)	S ‰	AIREACION	DIAS DE ALIMENTACION							
				1er día		2º. Día		3er día		4 día	
1 (50 almejas)	28°C	40	Constante	350 mL	1,140 cél/mL	350 mL	1,290 cél/mL	500 mL	970 cél/mL	450 mL	870 cél/mL
				199,500 cél/ almeja		226,275 cél/almeja		243,750 cél/almejas		195,750 cél/almeja	
2 (30 almejas)	24°C, 28°C			8.4 L	1,470 cél/mL	11 L	2,300 cél/mL	10.5 L	1,850 cél/mL	11 L	730 cél/mL
				410,760 cél/almeja		843,333 cél/almeja		646,450 cél/almeja		267,666 cél/almeja	
3 (34 almejas)	26°C			12.450 L	612 cél/mL	16.600 L	842 cél/mL				
				224,100 cél/almeja		411,094 cél/almeja					

Muestreos al tiempo 1, 3, 5, 8, 14 y 17 días (*), 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días (**) y 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 días (***) luego de finalizada la alimentación



Figura 3. Cámaras de incubación utilizadas para la alimentación de *M. squalida* con *G. catenatum* en la fase experimental 3.

7.4. Extracción de toxinas en dinoflagelados

Las determinaciones del tipo y contenido de toxinas se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Hummert *et al.*, (1997). (Ver anexos: 1,2,3).

Muestras de dinoflagelados

Para la extracción de toxinas paralizantes en el dinoflagelado *G. catenatum* a cada filtro con muestra del dinoflagelado, se le adicionó 2 mL de ácido acético 0.03 N. Posteriormente se rompió la pared celular mediante un sonicador en baño maría, por tres ocasiones durante 5 min. Finalmente las muestras se centrifugaron en una centrifuga Beckman durante 15 min a 4,000 rpm. El sobrenadante se colocó en una jeringa de 5 mL y se filtró con un filtro Rotilabo de 0.22 μm de luz de poro. Para la realización de la hidrólisis se tomó una alícuota de 150 μl , agregando 37 μl de ácido clorhídrico 1 M y se agitó durante 30 seg en un vórtex, se incubó a 90°C por 15 min dejándose enfriar, para volver a agitar por 30 seg, finalmente se adicionan 75 μl de acetato de sodio 1 M agitando inmediatamente durante 30 seg, posteriormente se inyecta al HPLC (Hewlett Packard 1600).

7.5. Extracción de toxinas en almejas.

Las determinaciones del tipo y contenido de toxinas se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Hummert *et al.* (1997). Se midió y pesó cada una de las almejas, posteriormente se desconcharon y el tejido vivo se homogenizó en una licuadora casera (Osterizer) y se pesó en una balanza analítica para obtener una muestra de 2 g. A esta muestra se le adicionó 4 mL de ácido acético 0.03 N, se homogenizó mediante un vortex (Gente 2) y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4,000 rpm, en una centrífuga Beckman GPR. Posteriormente se extrajo el sobrenadante con una jeringa desechable de 5 mL, éste sobrenadante fue filtrado a través de un filtro especial desechable marca Rotilabo de 0.22 μm de tamaño de poro. El líquido extraído se colocó en viales de 2 mL, para inyectarse posteriormente en el HPLC (Hewlett Packard 1600).

7.6. Hidrólisis.

Se realizó una hidrólisis con ácido clorhídrico para la conversión de toxinas N-sulfocarbamato, en sus análogos correspondientes de toxinas carbamato (Diener *et al.* 2006).

Del extracto anterior se tomaron 150 μl colocándose en viales de 2 mL, se agregó 37 μl de ácido clorhídrico 1 M y se agitó durante 30 seg en un vortex, se incubó a 90°C por 15 min en una estufa Blue M. Después de que se enfrió la muestra, se volvió a agitar por 30 seg en un vortex, adicionando 75 μl de acetato de sodio 1 M, agitando vigorosamente durante 30 seg. Posteriormente se realiza una segunda inyección al HPLC.

Es importante mencionar que los extractos deben ser lo más transparentes posible, para no tapar los filtros de la columna del HPLC, por lo que de ser necesario se puede realizar un segundo centrifugado en una microcentrifuga Heraeus a 13,000 rpm durante 10 min.

7.7. Determinación de toxinas por HPLC con oxidación post-columna.

La identificación y cuantificación de toxinas, se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando un cromatógrafo (Hewlett Packard 1600). Este aparato es de alta sensibilidad y tiene una precisión y reproducibilidad que permite obtener información sobre la composición cualitativa y cuantitativa (perfil) de los complejos tóxicos (Lagos, 2002), el cual como principio básico tiene la separación química de una fase móvil y una líquida de las moléculas de una solución.

7.8 Identificación y cuantificación de toxinas

Las toxinas se identifican por el tiempo de retención o bien co-inyectando soluciones conocidas de STX, NeoSTX, GTX2, GTX3 obtenidas de Consejo Nacional de Ciencia de Canadá (National Research Council of Canada, en inglés). La cuantificación se obtiene con el factor de respuesta y las áreas de la fluorescencia emitida utilizando los estándares de toxinas antes mencionados. Para la determinación de las áreas se utiliza el software CHEMSTATION. Este método no separa las toxinas sulfocarbamatadas por lo que se realiza una hidrólisis para transformarlas en sus análogos (Tabla 2).

Tabla 2. Transformación de las toxinas sulfocarbamatadas (tipo B y C) a sus análogos por hidrólisis

B1	STX
B2	NeoSTX
C1	GTX2
C2	GTX3
C3	GTX1
C4	GTX4

La toxicidad total se obtiene de manera indirecta utilizando los factores de equivalencia de los diversos análogos de la saxitoxina (Tabla 3) y se expresan en

STXeq por cada 100 g de molusco. Los cálculos se hacen considerando: el peso de la muestra (en este caso fue de 2 g), el volumen de extracción (4 mL) y el volumen de inyección (50 µl), así como las diferentes áreas identificadas comparándolas con los cromatogramas obtenidos de las soluciones estándar. A fin de tener las relaciones moleculares los valores son también expresados en % molar obtenidos considerando los pesos moleculares (Tabla 3).

Tabla 3. Valores del Factor de Toxicidad de las TP

Toxina	PM*	Factor de toxicidad**	Toxina	PM*	Factor de toxicidad	Toxina	PM*	Factor de toxicidad
STX	301.31	1	dcSTX	258.28	0.51	B1	380.36	0.06
Neo	317.31	0.92	dcGTX2	353.34	0.65	B2	396.36	0
GTX 1	412.36	0.99	dcGTX3	353.34	0.75	C3	492.41	0.01
GTX 2	396.36	0.36				C1	476.42	0.01
GTX 3	396.36	0.64				C2	476.42	0.1
GTX 4	412.36	0.73				C4	492.41	0.06

* peso molecular; ** Oshima (1995)

Tasas de depuración.

Con el objetivo de clasificar a la almeja chocolate dentro de los grupos rápidos, moderados o lentos de acuerdo con el tiempo que tardan en eliminar las toxinas ingeridas, así como para poder determinar la cinética de depuración de TP, se ajustaron los valores totales por día a un modelo exponencial, siguiendo el criterio de Bricelj y Shumway (1998). Se realizó una regresión exponencial negativa para interpretar los resultados de depuración de las toxinas.

Análisis estadísticos.

Se aplicó un ANOVA con el software Statistica 6 para ver si había diferencias significativas en los tres tratamientos.

8. RESULTADOS

Toxicidad de muestras de campo de *M. squalida*

A continuación se muestran los resultados del muestreo de almejas en dos áreas de La Paz durante un ciclo anual: Las dos áreas seleccionadas se ubican en la región sur de la Bahía de La Paz y en ambas se explota artesanalmente la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*). No se detectó la presencia de toxinas en almejas adultas. Los cromatogramas que se obtuvieron al realizar la inyección de las muestras no dieron resultados positivos para ninguna toxina a lo largo del ciclo anual. Esto indica que almejas estuvieron libres de toxinas o bien mantuvieron concentraciones por debajo de los límites de detección del método y por tanto muy alejados del límite máximo permitido (Fig. 4).

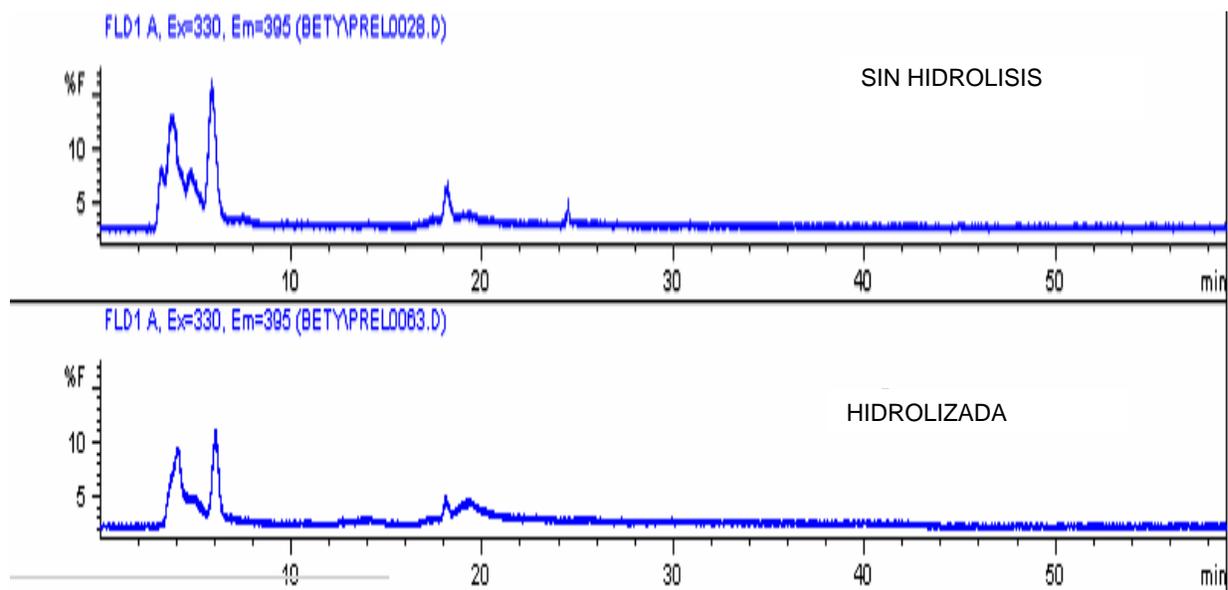


Figura 4. Cromatograma de toxinas paralizantes de *M. squalida* de la estación del Mogote, no se observó ningún tipo de toxina.

8.1. Fase experimental

8.2. Concentración y perfil de toxinas de *G. catenatum*

La toxicidad total de la cepa utilizada de *G. catenatum* (GCCV – 7), en términos de equivalentes de STX, fue muy variable. A pesar de que en los tres experimentos se utilizaron cultivos de la misma cepa en su fase exponencial de crecimiento, la toxicidad fluctuó entre 3 y 88 pg STXeq/cél⁻¹. La cepa utilizada en el primer experimento fue la más tóxica, seguida por la del segundo (10 pg STXeq/cél⁻¹) y tercer experimento (3.08 pg STXeq/cél⁻¹). Al igual que otras cepas provenientes de Bahía Concepción, la cepa GCCV – 7, presentó un bajo porcentaje de STX y las toxinas B1, B2, C3 y C4 no fueron detectadas o se encontraron en concentraciones por debajo de 3% en pmol TP (Tabla 4). No obstante, esta cepa presentó un perfil de toxinas muy semejante al de otras cepas aisladas de Bahía Concepción con altos porcentajes de toxinas C1 y C2 (23 – 70% y de 20 a 53% respectivamente), así como concentraciones menores de NeoSTX, dcSTX, dcGTX-2 y dcGTX3 (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de toxinas de la cepa de *G. catenatum*, utilizada en el primer experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél)

	STX	NeoSTX	GTX2	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	B 2	C 1	C 2	Total
Pmol	26.20	60.27	11.07	64.44	48.65	13.67	5.30	2006.41	593.05	2829.04
%	0.93	2.13	0.39	2.28	1.72	0.48	0.19	70.92	20.96	100
pgSTXeq/cél	7.89	17.59	1.58	8.49	11.17	3.62	-	9.56	28.25	88.16

- = No detectado

8.3. Perfil de toxinas en *M. squaleda* (Fase experimental 1).

En el primer experimento, las almejas fueron alimentadas por un espacio de cuatro días con una concentración promedio (Tabla 5).

Tabla 5. Promedio de la densidad celular de *G. catenatum* con la que fueron alimentadas cada una de las almejas en la fase experimental 1.

Día	cél/mL	Alimento proporcionado mL	Célula por almeja
1	1,140	175	199,500
2	1,293	175	226,275
3	975	250	243,750
4	870	225	195,750

Las almejas no sufrieron daño aparente, ni modificación de su comportamiento o mortandad durante la fase de intoxicación. No se determinó la tasa de ingestión ni la tasa de aclaramiento, y por tanto no se puede hablar de un porcentaje de incorporación de toxinas. En términos de la composición porcentual de toxinas observadas en la almeja, se aprecia una concentración significativa de toxinas carbamato y en particular de NeoSTX (Fig. 5), durante los días posteriores al término del período de alimentación, contrastando con el perfil del dinoflagelado donde las toxinas del grupo C, aportaron más del 90%. Posteriormente, este tipo de toxinas se eliminó en menor tiempo (4 - 6 días) por las almejas, mientras que las del grupo decarbamato y N-sulfocarbamato, permanecieron en el tejido de la almeja, por un período mayor (de 12 a 16 días), siendo éstas últimas de una toxicidad menor (Tabla 6).

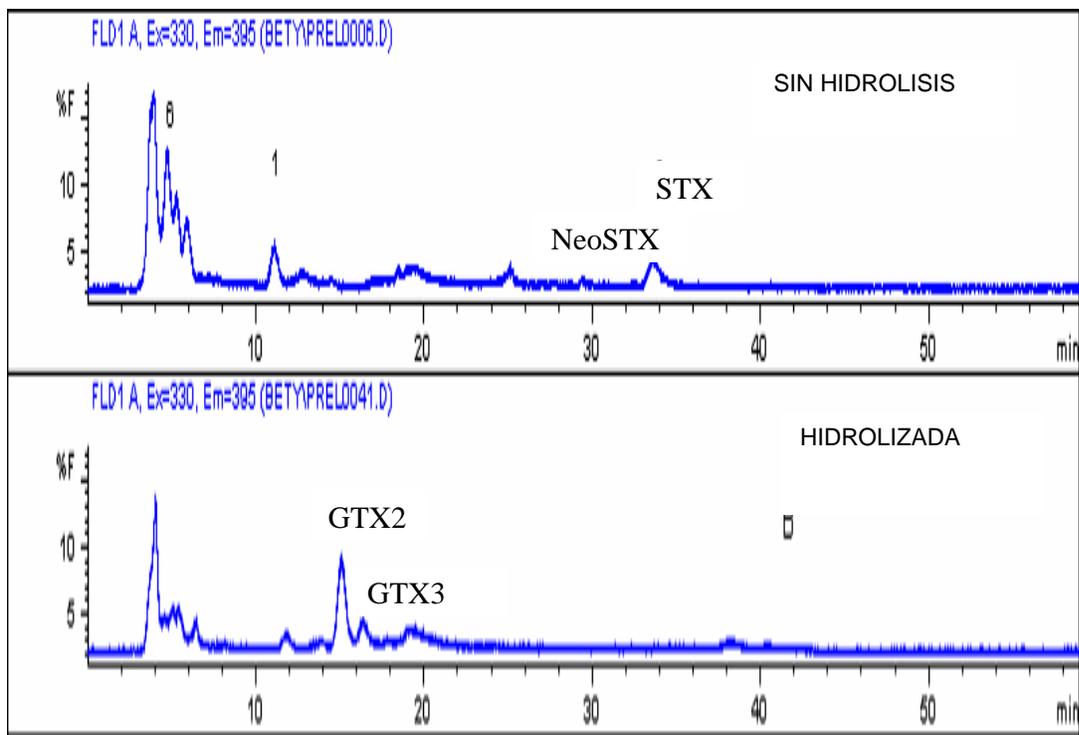


Figura 5. Cromatograma del HPLC de TP realizado con el homogenizado de almeja chocolata donde se observan áreas y tiempos de retención de las principales toxinas identificadas (STX, saxitoxina; NeoSTX, neosaxitoxina; GTX2, gonyaulatoxina 2; GTX3 gonyaulatoxina 3).

8.4. Toxicidad total en almejas

Para expresar la toxicidad total de las almejas durante el periodo de muestreo, a partir de los datos de STXeq, se realizaron las conversiones para obtenerlos en STXeq/100g molusco, que es la unidad estándar para la presentación del nivel de toxicidad, siendo 80 µg de STXeq/100 g de carne de molusco el límite máximo permisible para su consumo humano.

Tabla 6. Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el primer experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la norma oficial mexicana ($\mu\text{g STXeq}/100\text{ g}$).

Muestra día/almeja	STX	Neo STX	GTX2	GTX3	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 2	ngSTX eq/g	$\mu\text{g STXeq}/100\text{g molusco}$
1	32.66	253.40	8.37	6.04	-	-	5.52	10.02	316.01	31.60
3a	15.78	146.33	6.02	9.62	-	-	-	1.49	179.24	17.92
3b	21.08	125.54	-	-	-	-	-	2.69	149.30	14.93
3c	72.51	70.91	10.83	-	26.51	11.46	3.92	4.41	200.55	20.06
5a	25.63	97.45	11.62	-	-	-	4.75	5.02	144.47	14.45
5b	45.43	24.33	10.13	-	-	-	7.66	3.73	91.27	9.13
8a	36.72	28.89	9.65	-	-	-	4.35	-	79.61	7.96
8b	17.74	-	-	-	7.26	3.14	2.80	11.41	42.35	4.24
14a	4.15	-	-	1.58	3.04	1.32	-	4.91	15.00	1.50
14b	-	-	-	-	-	-	2.35	3.31	5.67	0.57
17a	-	-	9.18	-	5.79	2.51	-	2.92	20.40	2.04
17b	16.60	-	2.63	-	3.35	1.45	1.17	4.49	29.70	2.97

- = No detectado

Con el objetivo de clasificar a la almeja chocolata dentro de los grupos rápidos, moderados o lentos de acuerdo con el tiempo que tardan en eliminar las toxinas ingeridas, así como para poder determinar la cinética de depuración de TP, se ajustaron los valores totales por día a un modelo exponencial, siguiendo el criterio de Bricelj y Shumway (1998). Los valores que obtuvimos se ajustaron a un modelo exponencial inverso para determinar la eliminación de toxinas en la almeja durante los 16 días que duro el muestreo (Fig. 6).

Con esto se puede tener idea del tiempo límite para el establecimiento de una posible veda, en caso de que se presente una contingencia relacionada con la presencia de productores de TP.

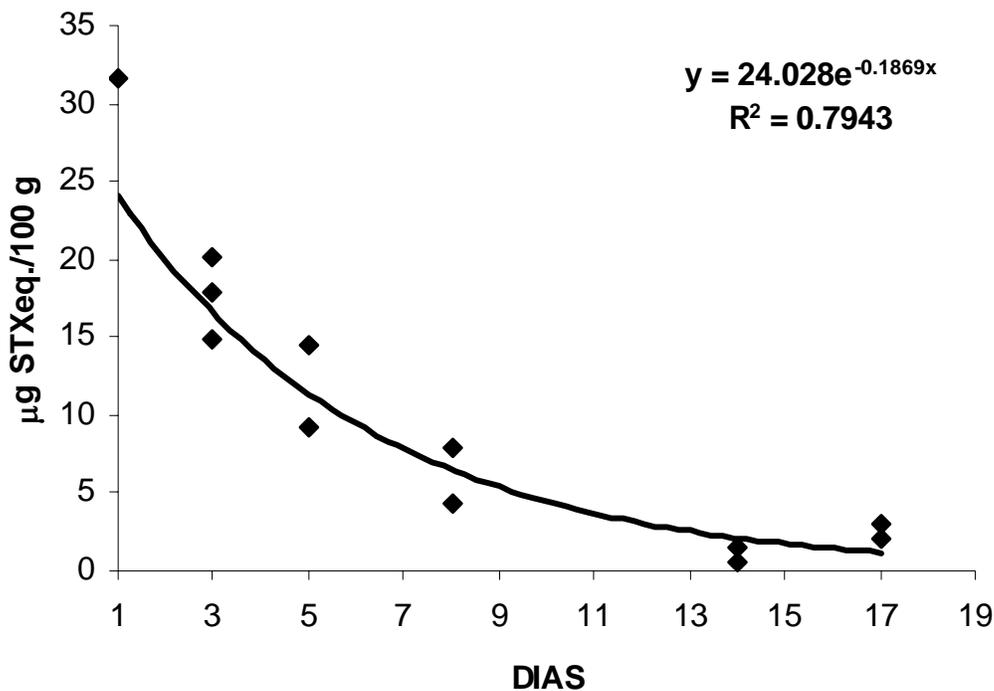


Figura 6. Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente/ 100 g de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 1. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa (α , 0.05). R^2 =coeficiente de correlación.

En los primeros días de intoxicación, el perfil de toxinas de cada una de las almejas muestreadas, está compuesto en un mayor porcentaje por toxinas del grupo carbamato (~80%), ~14% del N-sulfocarbamato y un ~8% decarbamato, pero al final del periodo experimental, se obtienen toxinas del tipo N-sulfocarbamato (~63%), de las decarbamato (~37%) y las del grupo carbamato se encuentran ausentes (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental1.

Muestra día/almeja	STX	Neo STX	GTX2	GTX3	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 1	C 2
1	9.45	63.30	3.83	1.75	-	-	7.57	-	14.10
3a	9.36	74.95	5.66	5.71	-	-	-	-	4.31
3b	14.79	76.03	-	-	-	-	-	-	9.18
3c	22.86	19.30	5.41	-	22.68	17.12	5.86	-	6.77
5a	14.64	48.05	10.51	-	-	-	12.84	-	13.96
5b	33.18	15.34	11.72	-	-	-	26.50	-	13.27
8a	32.52	22.09	13.53	-	-	-	18.26	13.60	-
8b	12.36	-	-	-	13.74	10.37	9.24	15.58	38.71
14a	5.92	-	-	-	11.76	8.88	-	39.40	34.03
14b	-	-	-	-	-	-	20.70	49.36	29.94
17a	-	-	-	-	28.98	21.88	-	22.94	26.20
17b	-	-	-	-	15.69	11.84	9.61	25.15	37.71

- = No detectado

Las almejas de manera individual presentan diferencias en la composición molar de manera porcentual, al inicio del experimento de intoxicación el perfil está compuesto de toxinas del grupo carbamato, un perfil diferente al de la cepa de *G. catenatum* utilizado como alimento, probablemente resultado de una biotransformación de toxinas en el bivalvo, posteriormente éstas van siendo eliminadas y finalmente tenemos un perfil formado por toxinas N-sulfocarbamato con un 62.85 % que son de baja toxicidad y por un 37.14 % de toxinas decarbamato de toxicidad media, se realizó el promedio de los resultados obtenidos de las 2 almejas muestreadas el mismo día, para observar de una manera gráfica el perfil de toxinas expresados en % molar de TP (Fig. 7).

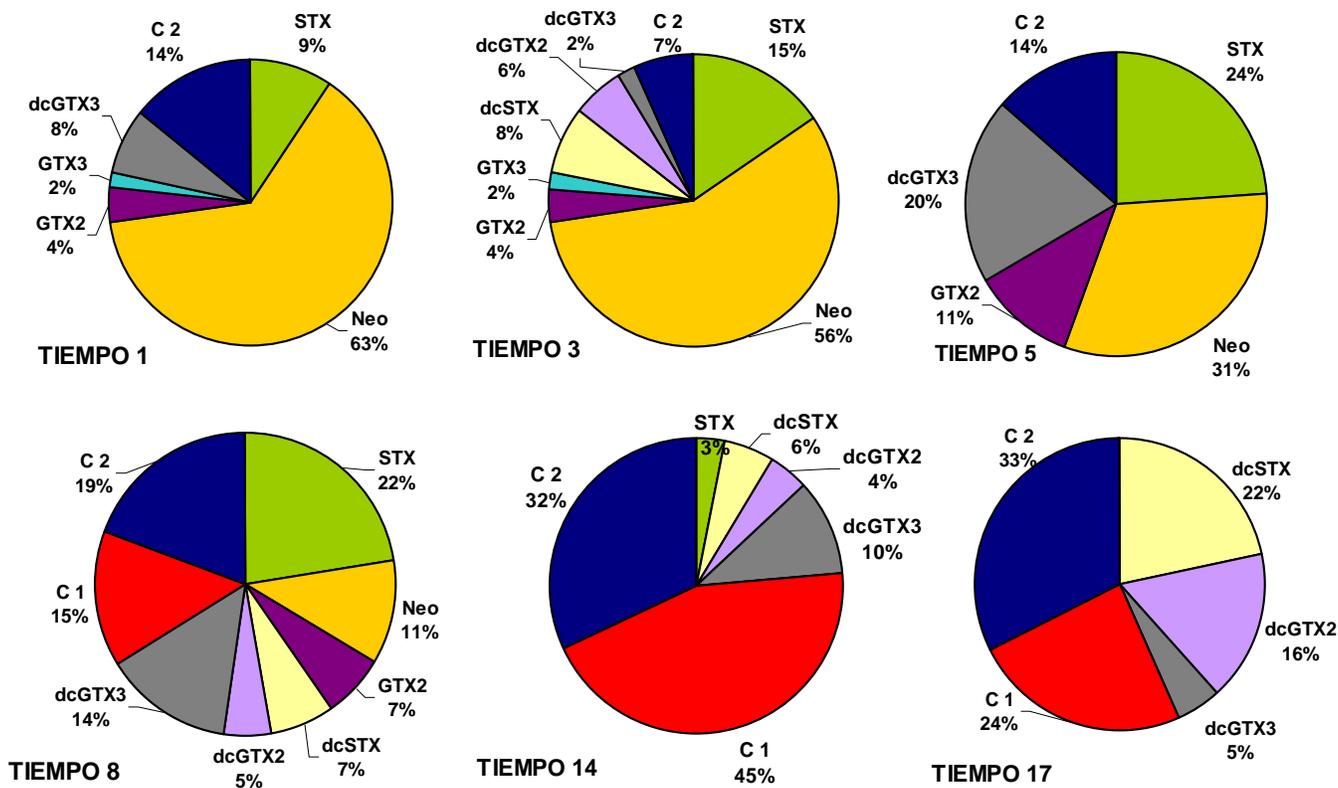


Figura 7. Variación de las diversas toxinas (en % molar) en *M. squalida* durante la fase experimental 1 alimentada con *G. catenatum* durante cada uno de los días de muestreo (1, 3, 5, 8, 14 y 17).

8.5. Fase experimental 2.

8.6. Concentración y perfil de toxinas de *G. catenatum*

El perfil de toxinas de *G. catenatum* en esta ocasión estuvo conformado por un 84% de toxinas del tipo C y B que pertenecen a las N-sulfocarbamato que son las menos tóxicas, el 12% esta formado por NeoSTX y STX que son del grupo carbamato y son de las más tóxicas, finalmente menos del 4% pertenecen a las decarbamato consideradas de las medianamente tóxicas (Tabla 8). La cepa de *G. catenatum* utilizada en este experimento, fue la única donde se registraron las toxinas B1 y B2.

Tabla 8. Composición de toxinas de la cepa de *G. catenatum*, utilizada en el segundo experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél)

	STX	NeoSTX	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	B 1	B 2	C 1	C 2	Total
Pmol	2.01	16.32	1.51	1.14	2.42	1.48	4.59	42.68	81.76	153.91
%	1.31	10.60	0.98	0.74	1.57	0.96	2.98	27.73	53.12	100
pgSTXeq/cél	0.61	4.76	0.20	0.26	0.64	0.03	-	0.20	3.90	10.60

- = No detectado

8.7. Toxicidad total en almejas

En el segundo experimento, las almejas fueron alimentadas por un periodo de 4 días (Tabla 9). Las almejas tampoco sufrieron daño aparente, ni modificación de su comportamiento ni se tuvo mortandad durante la fase de intoxicación.

Tabla 9. Promedio de la densidad celular de *G. catenatum* con la que fueron alimentadas cada una de las almejas en la fase experimental 2.

Día	cél/mL	Alimento proporcionado mL	Célula por almeja
1	1,467	280	410,760
2	2,300	367	844,100
3	1,847	350	646,450
4	730	367	267,910

En contraste con el primero, en el segundo experimento se molieron las 3 almejas muestreadas el mismo día, se conserva un perfil tóxico en la almeja muy semejante al observado en *G. catenatum*. En términos de la composición porcentual, las toxinas N-sulfocarbamato aportan la mayor proporción del perfil de toxinas, a lo largo de todo el período de depuración. No obstante, al igual que en el primer experimento, durante los días posteriores al término del período de alimentación, se observó un incremento en las toxinas del grupo carbamato y decarbamato, que van disminuyendo en concentración conforme transcurre el período de desintoxicación (Tabla 10).

La toxicidad total de las almejas durante el segundo experimento se presenta en la Tabla 10. El valor más alto, correspondió al primer día de muestreo y fue ligeramente superior al obtenido en el primero (31.60 μg de STXeq/100 g), aunque también se ubica por debajo del límite permisible para el consumo humano.

Tabla 10. Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el segundo experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la norma oficial mexicana (μg STXeq/100 g).

Día en que se tomo la muestra	STX	NeoSTX	GTX2	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 2	ngSTX eq/g	μg STXeq/100g molusco
1	48.08	46.72	36.48	54.40	23.52	-	125.35	334.57	33.4
3	29.61	-	17.27	32.51	14.05	-	51.72	145.19	14.5
5	39.73	-	9.43	-	-	-	24.47	73.63	7.3
7	27.97	-	10.79	17.72	7.66	-	16.95	81.11	8.1
9	-	-	-	7.31	3.16	2.44	11.11	24.03	2.4
11	-	-	-	4.51	1.95	2.00	7.35	15.82	1.5
13	-	-	-	10.08	4.36	3.92	11.01	29.38	2.9

En el segundo experimento se probó de nuevo, cual era el mejor ajuste para describir la desintoxicación de la almeja chocolata durante los 12 días de muestreo, se probó un modelo exponencial, siguiendo el criterio de Bricelj y Shumway (1998), nuestra matriz de datos se ajustó a un modelo exponencial inverso (Fig. 8).

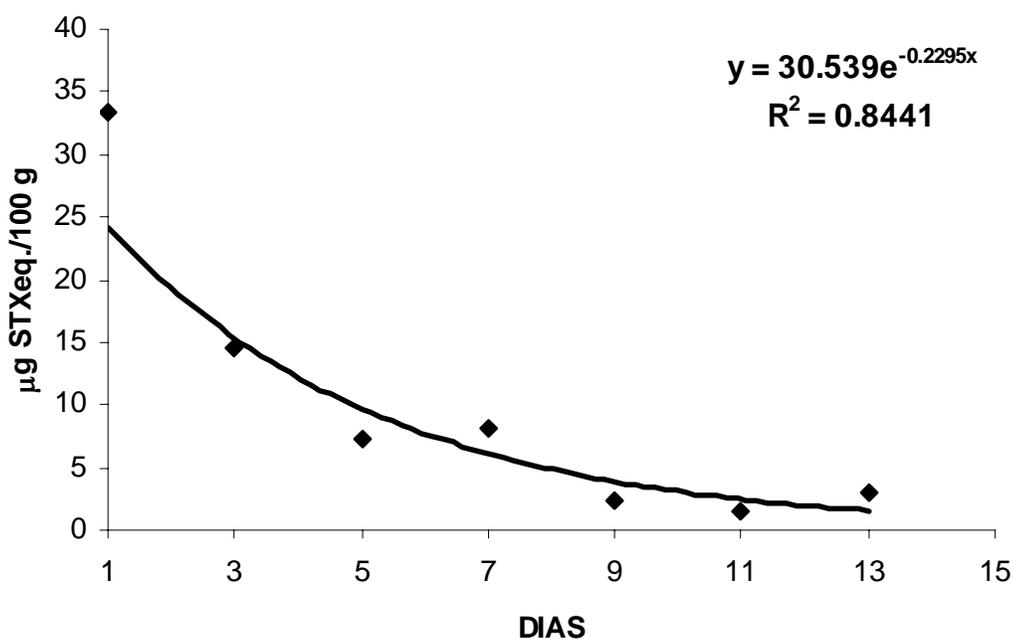


Figura 8. Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente/100 g de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 2. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa (α , 0.05). R^2 = coeficiente de correlación.

En términos del porcentaje molar de cada grupo almejas analizadas, en los primeros días de muestreo, el perfil estuvo compuesto de un total de 7 análogos: STX, NeoSTX, GTX2, (carbamato ~9%) dcSTX, dcGTX2, (decarbamato ~16%), C1 y C2 (N-sulfocarbamato ~75 %) (Tabla 11), pero al final el perfil incluía solo 5 toxinas: dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2 (decarbamato ~20% y N-sulfocarbamato ~80%).

Tabla 11. Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental 2.

Día en que se tomo la muestra	STX	NeoSTX	GTX2	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 1	C 2
1	2.93	2.46	3.52	8.99	6.79	-	38.15	37.16
3	3.19	-	2.95	9.51	7.18	-	50.03	27.13
5	8.85	-	3.33	-	-	-	61.30	26.53
7	6.37	-	3.89	10.95	8.27	-	51.73	18.78
9	-	-	-	8.65	6.53	5.05	56.17	23.60
11	-	-	-	7.50	5.66	5.82	59.08	21.93
13	-	-	-	9.32	7.04	6.34	59.04	18.26

- =No detectado

En los primeros días de muestreo, el perfil de toxinas está compuesto en un 8.91% del grupo carbamato, 75.31% de N-sulfocarbamato y 15.78% de toxinas decarbamatas, pero al final del periodo de muestreo, probablemente por una eliminación selectiva de toxinas del grupo carbamato se observa que éstas se han eliminado por completo. Finalmente solo las del grupo N-sulfocarbamato (77.3%) y las decarbamato (22.7%) son las que persisten en los tejidos de la almeja (Fig. 9).

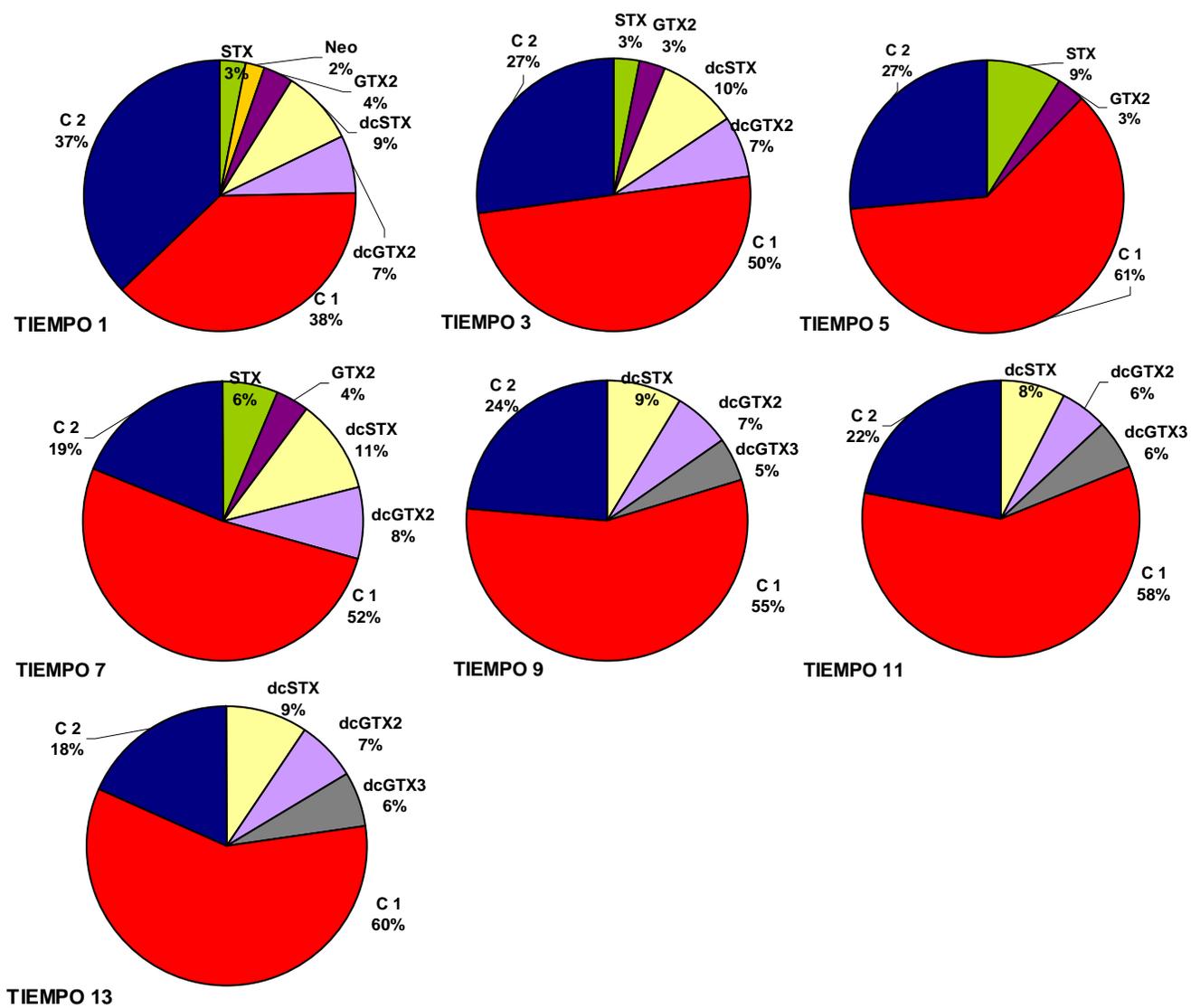


Figura 9. Variación de las diversas toxinas (en % molar) en *M. squalida* durante la fase experimental 2 alimentada con *G. catenatum* durante cada uno de los días de muestreo (1,3,5,7,9, 11 y 13).

8.8. Fase experimental 3

La concentración y perfil de toxinas de *G. catenatum* utilizada en el tercer experimento fue muy diferente al de los cultivos utilizadas en los experimentos previos. Destacando este cultivo por presentar un perfil de solo 5 toxinas, con una ausencia total de toxinas carbamato y el porcentaje más alto de toxinas del grupo decarbamato (55.22 %), mientras que las del grupo N-sulfocarbamato, aparece con un porcentaje de 44.78% (Tabla 12).

Tabla 12. Composición de toxinas de la cepa de *G. catenatum*, utilizada en el tercer experimento, expresados en pmol, %molar y pg de saxitoxina equivalente por célula (pg STXeq/cél).

	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 1	C 2	Total
Pmol	6.38	3.85	4.02	6.01	5.55	25.81
%	24.70	14.94	15.58	23.27	21.51	100
pgSTXeq/cél	0.84	0.89	1.07	0.03	0.26	3.08

- = No detectado

8.9. Perfil de toxinas en la almeja chocolata

En el tercer experimento, las almejas fueron alimentadas por un periodo de 2 días y la concentración promedio de células de *G. catenatum* se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Promedio de la densidad celular de *G. catenatum* con la que fueron alimentadas las almejas en la fase experimental 3.

Día	cél/mL	Alimento proporcionado mL	Células por almeja
1	612	366	223,992
2	842	488	410,896

Las almejas tampoco sufrieron daño aparente, ni modificación de su comportamiento ni se tuvo mortandad durante la fase de intoxicación. Al igual que en los experimentos anteriores, el perfil de toxinas observado en las almejas es indicativo de una biotransformación de las toxinas consumidas, durante el período de alimentación. Durante los primeros 4 días del periodo de muestreo, se observa la presencia de toxinas carbamato (STX, NeoSTX, GTX2 y GTX3), que estuvieron ausentes en el perfil de toxinas del dinoflagelado. Este incremento concuerda con la disminución relativa de toxinas decarbamato, durante los primeros 4 días del período de desintoxicación. En los días subsecuentes, se observa un patrón de desintoxicación muy semejante al del los otros dos experimentos (Tabla 14).

8.10. Toxicidad total en almejas

Debido a que el cultivo de *G. catenatum* en este experimento no contenía el tipo de toxinas carbamato, que son las de mayor toxicidad, la toxicidad total de las almejas en el tercer experimento fue la menor (10.09 µg de STXeq/100 g) de los tres experimentos realizados (Tabla 14).

Tabla 14 Toxicidad de las diversas toxinas en la almeja en el tercer experimento, expresados en ng STXeq/g y en las unidades establecidas por la norma oficial mexicana ($\mu\text{g STXeq}/100\text{ g}$).

Día en que se tomo la muestra	STX	NeoSTX	GTX2	GTX3	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 1	C 2	ngSTX eq/g	$\mu\text{g STXeq}/100\text{g molusco}$
1a	6.69	46.03	10.15	-	15.13	15.95	-	0.81	6.14	100.92	10.09
1b	11.74	120.93	13.36	-	18.07	19.05	-	0.81	8.57	192.54	19.25
1c	0.00	-	2.74	-	3.80	4.00	-	0.18	0.00	10.73	1.07
3a	5.91	-	3.56	-	8.41	8.87	2.27	0.53	4.43	33.97	3.40
3b	10.04	-	5.60	-	18.21	19.20	-	-	6.01	59.27	5.93
3c	5.89	-	2.75	-	8.12	8.56	-	0.45	3.68	29.46	2.95
5a	6.25	-	2.77	2.83	10.11	10.65	-	0.36	0.68	33.65	3.37
5b	-	-	-	-	4.61	4.86	-	0.30	0.65	10.42	1.04
5c	-	-	1.49	1.16	7.00	7.38	-	0.68	1.69	19.41	2.55
7a	-	-	1.90	2.02	10.49	11.05	-	-	0.00	25.46	1.69
7b	-	-	1.63	-	6.96	7.34	-	0.33	0.63	16.90	2.14
7c	-	-	1.30	-	5.87	6.19	1.97	-	2.07	17.41	1.74
9a	-	-	-	-	3.32	3.50	3.05	0.13	1.73	11.74	1.17
9b	-	-	-	-	4.55	4.80	-	-	2.50	11.84	1.18
9c	-	-	1.35	-	3.99	4.21	1.85	-	2.07	13.46	1.35
11a	-	-	2.66	-	7.48	7.89	-	-	2.28	20.31	2.03
11b	-	-	-	-	3.65	3.85	3.72	-	-	11.22	1.12
11c	-	-	-	-	3.86	4.07	2.90	-	2.06	12.89	1.29
13a	-	-	-	-	4.45	4.69	-	-	2.08	11.22	1.12
13b	-	-	-	-	5.15	5.43	-	0.24	1.62	12.44	1.24
15a	-	-	-	-	2.75	2.90	3.23	-	0.95	9.84	0.98
15b	-	-	-	-	3.22	3.39	4.16	0.20	1.38	12.35	1.23

- = No detectado

De manera gráfica (Fig. 10), se observa de una manera más clara como la toxicidad va disminuyendo conforme pasa el tiempo de depuración de toxinas. Se aplicó de nuevo la regresión lineal para ésta fase experimental.

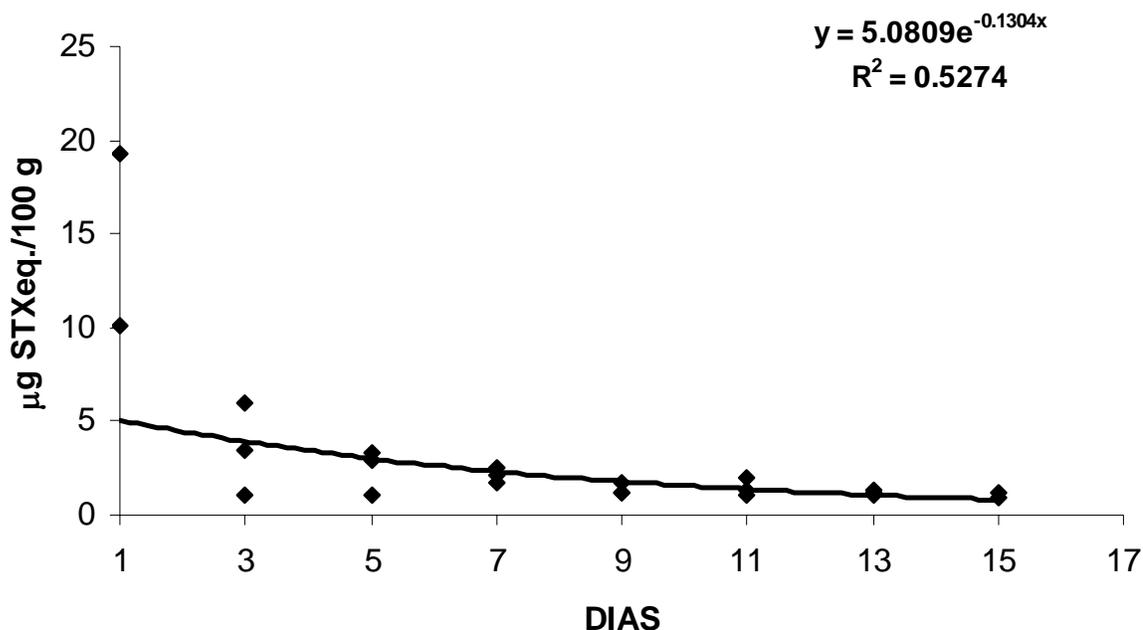


Figura 10. Relación entre el contenido de toxinas (μg de saxitoxina equivalente/100 g de tejido) y el tiempo (días) durante el experimento 3. Los datos se ajustaron a un modelo exponencial inverso (línea sólida). La relación es significativa (α , 0.05). R^2 = coeficiente de correlación.

En términos del porcentaje molar de cada grupo almejas analizadas, en los primeros días de muestreo, el perfil estuvo compuesto de un total de 7 análogos formados por STX, NeoSTX, GTX2, (carbamato ~34%), dcSTX, dcGTX2 (decarbamato ~25%), C1 y C2 (N-sulfocarbamato ~41%) (Tabla 15), pero al final el perfil incluía solo 5 toxinas: dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 (~44%), C1 y C2 (~56%).

Tabla 15. Perfil de toxinas paralizantes (% molar), registrado en almejas durante la fase experimental 3.

Día en que se tomo la muestra	STX	NeoSTX	GTX2	GTX3	dcSTX	dcGTX2	dcGTX3	C 1	C 2
1a	3.02	21.45	9.68	-	15.63	9.45	-	23.22	17.54
1b	3.49	37.12	8.39	-	12.29	7.43	-	15.15	16.12
1c	0.00	-	18.60	-	27.87	16.85	-	36.68	-
3a	5.46	-	6.94	-	17.77	10.74	2.38	30.84	25.87
3b	7.92	-	9.33	-	32.88	19.88	-	-	29.99
3c	6.34	-	6.25	-	19.98	12.08	-	30.31	25.04
5a	7.86	-	7.37	4.23	29.09	17.59	-	28.43	5.44
5b	-	-	-	-	26.33	15.92	-	47.46	10.30
5c	-	-	3.77	1.65	19.15	11.58	-	51.09	12.75
7a	12.52	-	7.81	4.67	46.74	28.26	-	-	-
7b	7.73	-	5.92	-	27.32	16.52	-	35.70	6.81
7c	-	-	6.93	-	33.91	20.50	5.66	-	33.00
9a	-	-	-	-	21.76	13.15	9.94	23.74	31.41
9b	-	-	-	-	32.03	19.37	-	-	48.60
9c	-	-	8.71	-	27.93	16.89	6.43	-	40.05
11a	-	-	11.84	-	36.04	21.79	-	-	30.34
11b	-	-	-	-	47.35	28.63	24.02	-	-
11c	-	-	-	-	28.93	17.49	10.80	-	42.78
13a	-	-	-	-	34.48	20.85	-	-	44.67
13b	-	-	-	-	26.67	16.12	-	33.96	23.25
15a	-	-	-	-	31.85	19.25	18.59	-	30.30
15b	-	-	-	-	19.38	11.72	12.46	33.50	22.94

-= No detectado

El período de depuración de la almeja en el tercer experimento se muestra un tanto diferente en las etapas finales con respecto a los dos ensayos previos. Durante los primeros días, el perfil de toxinas está compuesto en un 12% del grupo carbamato, 62% de N-sulfocarbamato y 26% de decarbamato. Al final del periodo de muestreo se observa un equilibrio entre las toxinas decarbamato y N-sulfocarbamato (Fig. 11).

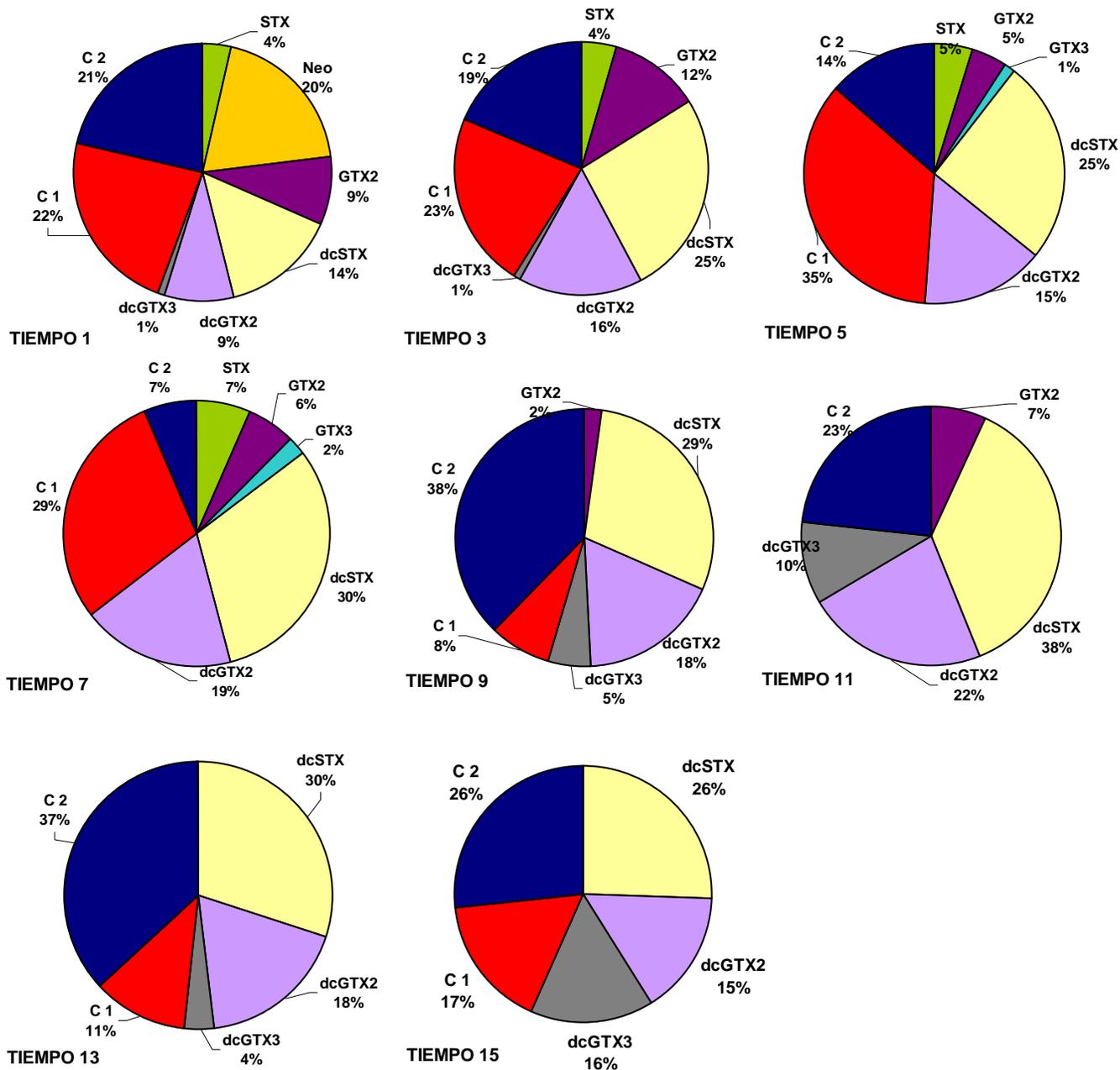


Figura 11. Variación de las diversas toxinas (en % molar) en *M. squalida* durante la fase experimental 3 alimentada con *G. catenatum* durante cada uno de los días de muestreo (1,3,5,7,11, 13 y 15).

8.11. Análisis comparativo de los experimentos

En la Figura 12 se hace un comparativo de la cinética de desintoxicación de la almeja chocolata en los tres experimentos. Los cambios en la composición relativa de toxinas ocurren rápidamente después de la ingestión. La cinética de desintoxicación cambia en función del perfil tóxico de *G. catenatum*, en los tres experimentos se aprecia una tendencia general a la rápida eliminación de todas las toxinas, durante la primera fase de eliminación. Se observa además un incremento momentáneo alrededor del sexto día de aquellas toxinas (STX, dcGTX), que pueden producirse cuando se presenta una biotransformación de las toxinas ingeridas, por vía metabólica en la almeja.

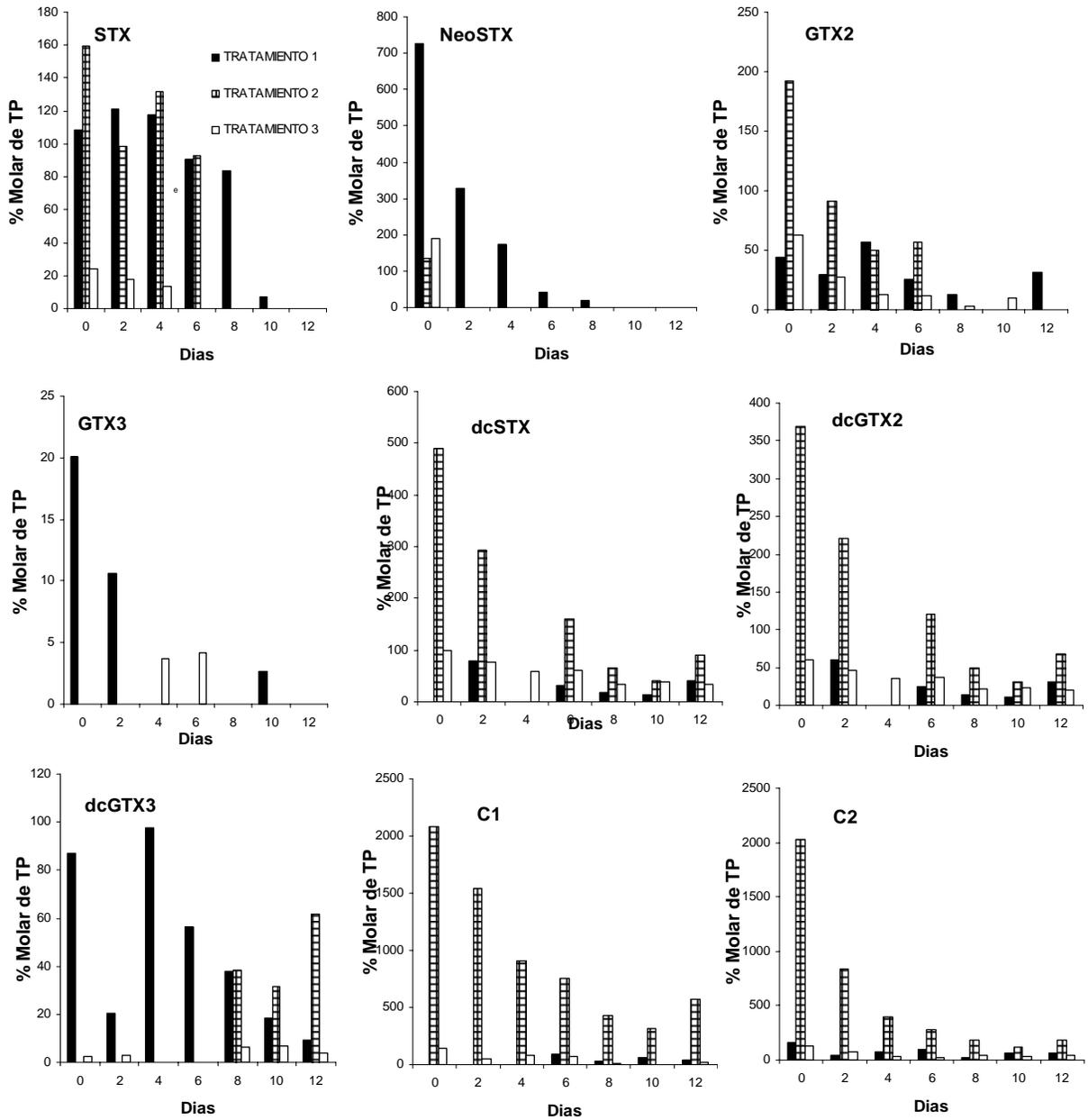


Figura. 12 Comparación de la eliminación de cada tipo de toxina paralizante en *M. squalida* alimentada con *G. catenatum*. Datos promedio de los tres tratamientos experimentales.

9. DISCUSIÓN

9.1. Evaluación de TP en poblaciones silvestres de almeja chocolate

En la primera parte del trabajo, se buscó conocer el grado de susceptibilidad de las poblaciones naturales de la almeja chocolate en dos zonas de la Bahía de La Paz, donde tradicionalmente se pesca esta almeja. Como único antecedente se tenía el trabajo de Gárate-Lizárraga *et al.* (2004b), donde se evaluó a lo largo de un ciclo anual, la incidencia de TP en muestras de fitoplancton natural (recolectado con red) y en poblaciones nativas de almeja chocolate. Estos autores registran para la Bahía de La Paz una abundancia relativamente baja de *G. catenatum* (160 -2600 cel L⁻¹), en comparación a otras localidades dentro del Golfo de California, donde se han encontrado concentraciones de varios millones de células por litro (Mee *et al.*, 1986). Asimismo, es importante mencionar que Gárate-Lizárraga *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre el contenido de toxinas en cepas de diferentes localidades del Golfo de California, en el cual se incluyeron dos cepas de *G. catenatum* de La Bahía de La Paz. El promedio de ambas cepas de Bahía de La Paz fue de 90.7 pg/cél y estuvo formada por 7 análogos de la saxitoxina.

No obstante su baja incidencia, destaca la existencia de una gran similitud entre los perfiles de toxinas del fitoplancton natural, de varias cepas aisladas en diferentes localidades en el Golfo de California y las encontradas en la almeja chocolate. Siete son las toxinas que aparecieron de forma regular (GTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, C1 y C2), pero las toxinas C1 y C2 fueron las más importantes tanto en el fitoplancton natural como en la almeja y junto con las toxinas dcGTX2 y dcGTX3 aportaron cerca del 80% de las toxinas en base molar (Band-Schmidt *et al.*, 2004b; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004).

Sin embargo, en el monitoreo mensual que se realizó en dos localidades en la Bahía de La Paz no se registró la presencia de TP. En nuestros experimentos se utilizaron ejemplares de almejas silvestres provenientes de la bahía, registrándose en éstas un perfil de 9 toxinas en las que se incluyen las 7 toxinas consideradas como características de las poblaciones de *G. catenatum*, más la STX y NeoSTX. En ninguno de los tres experimentos, se registraron las toxinas B1 ni B2 en la

almeja, a pesar de que en los experimentos 1 y 2 si fueron detectadas en el dinoflagelado.

9.2 Efecto del dinoflagelado en la almeja

En bivalvos, las partículas alimenticias son llevadas dentro de la cavidad del manto por corrientes de los cilios branquiales, capturadas en las branquias y transportadas a la cavidad bucal por >tracts> alimenticios dorsales y/o ventrales. La cantidad de corriente generada por las branquias esta en función de la frecuencia de beats “latidos” de los cilios laterales los cuales pueden ser alterados para aumentar o disminuir la cantidad de partículas en contacto con las branquias. Aunque la velocidad de movimiento es autónomo, la frecuencia de “latidos” ciliares esta bajo control de los ganglios viscerales a través del nervio branquial (Aiello y Guideri, 1965). Sin embargo, cuando se corta el nervio branquial en el mejillón *Mytilus edulis* los movimientos ciliares continúan por varios días aunque a una velocidad mucho menor (Aiello, 1960).

Estudios de videoscopia en la almeja *Mia arenaria* muestran que después de 10 minutos a la exposición al dinoflagelado tóxico *A. tamarense*, la almeja presentaba convulsiones musculares, contracciones y colapso de las branquias (Bricelj y Shumway, 1998). Estos autores también notaron que algunas almejas que no tenían respuesta a los estímulos táctiles aun después de 10 hrs de exposición, las branquias parecían relajadas y sin formación de corrientes de alimentación dentro de la cavidad palial. Una hipótesis que explica esta inhibición de la alimentación es que las toxinas provocan un bloqueo a los canales de sodio en estas almejas. El mecanismo parece una incapacidad postingestión y no la quimiosensación que evita la digestión. Esta incapacitación para alimentarse parece estar en función de la tasa inicial de ingestión celular, la toxicidad celular, el tamaño de la almeja y la distribución de las toxinas en los diversos tejidos de la almeja, así como de las diferencias genóticas intraespecíficas en la sensibilidad a las toxinas paralizantes. Los organismos en nuestros experimentos no mostraron mortalidad significativa además de que no se observaron cambios en el comportamiento

alimenticio (producción de mucus, cerrado o apertura de las valvas, etc.), que sugieran un efecto del dinoflagelado o sus toxinas sobre la almeja. Este nulo o bajo efecto del dinoflagelado podría asociarse a su baja toxicidad y predominio de toxinas sulfocarbamatadas.

9.3 Perfil de toxinas en *G. catenatum*

Bajo ciertas condiciones, la molécula de saxitoxina puede cambiar de una forma molecular a otra, sin menoscabo de su estabilidad. Estas transformaciones pueden ser llevadas a cabo por los dinoflagelados que la producen y/o por los moluscos, que adquieren la saxitoxina vía consumo del dinoflagelado. Los cambios en el perfil de toxinas en dinoflagelados pueden estar asociados a factores extrínsecos como la temperatura y la disponibilidad de algunos macro y micronutrientes (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004b, 2005,2006; Band-Schmidt *et al.*, 2005), así como también del grado de bioconversión de las TP asociado a la acción bacteriana (Smith *et al.*, 2001).

De acuerdo con los trabajos de Band-Schmidt *et al.* (2006), el contenido de toxinas de las cepas provenientes del Golfo de California, suele ser más elevado que el observado en las poblaciones de fitoplancton natural. Esto puede estar relacionado con las condiciones de crecimiento, ya que también pueden presentarse diferencias atribuibles al tipo de medio de cultivo utilizado. Por ejemplo, utilizando un medio *f/2* modificado para el cultivo de las cepas provenientes de Bahía Concepción (mismo lugar de donde proviene la cepa utilizada en los experimentos), se obtiene la presencia constante de las toxinas dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2, en tanto que la NeoSTX se presenta solo en algunas cepas (Band-Schmidt *et al.*, 2005). En cambio, al utilizar medio GSe (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2006), se obtiene un perfil de toxinas más amplio, compuesto por; NeoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2, C1 y C2. Al igual que el caso anterior, la presencia de las toxinas STX y C4 puede variar dependiendo de la cepa, pero no se registró la presencia de GTX2 ni GTX3.

Este perfil concuerda más con el observado por Gárate-Lizárraga *et al.* (2006) en el fitoplancton natural, cuando existió una presencia significativa de *G. catenatum*. Por otra parte en este estudio, también se utilizó medio *f/2* con adición de selenio, obteniendo un perfil de toxinas muy similar (Tabla 16), pero a diferencia de las cepas estudiadas por Band-Schmidt *et al.* (2006), nosotros si observamos la presencia de la toxina GTX2.

Tabla 16. Comparación del perfil de toxinas paralizantes en *G. catenatum*

Tipo de Toxina												REFERENCIA	
STX	Neo STX	GTX2	dc STX	dc GTX2	dc GTX3	B1	B2	C1	C2	C3	C4		
34.6			8.97	37.02	12.01	7.4							Gárate-Lizárraga, <i>et al.</i> , 2004. BAPAZ Muestras de red Marzo de 2002
			62.9	37.1									Gárate-Lizárraga, <i>et al.</i> , 2004. BAPAZ Muestras de red Mayo de 2002
1.4			8.26	52.45	18.49	5.69		10.5	3.21				Gárate-Lizárraga, <i>et al.</i> , 2004. BAPAZ Muestras de red Agosto de 2002
	2.9		22.0	23.2	7.9		0.6	33.6	10.6				Band-Schmidt, <i>et al.</i> , 2005 BACO Cepas (17 días)
	0.6		27.6	27.5	9.4		0.1	27.2	7.0				Band-Schmidt, <i>et al.</i> , 2005 BACO Cepas (22 días)
	12.1		2.6	3.3	0.9	0.7	4.3	50.9	22.0	2.7	0.6		Band-Schmidt, <i>et al.</i> , 2006 BACO Cepas (10 días)
0.1	8.6		2.8	4.5	1.4	0.8	3.7	55.9	20.6	1.6	0.1		Band-Schmidt, <i>et al.</i> , 2006 BACO Cepas (25 días)
0.93	2.13	0.39	2.28	1.72	0.48		0.19	70.92	20.96				CEPA UNO LAB.
1.31	10.60		0.98	0.74	1.57	0.96	2.98	27.73	53.12				CEPA DOS LAB.
			24.70	14.93	15.58			23.27	21.50				CEPA TRES LAB.

Se ha postulado que en el Golfo de California, las diferencias existentes en la composición del perfil de toxinas de las diferentes cepas, puede estar ligada a las distintas localidades de las cuales provienen y por tanto podrían reflejar las adaptaciones de cada población de *G. catenatum* a un lugar determinado (Band-Schmidt *et al.*, 2006). No obstante, en otros dinoflagelados como en el caso de *Alexandrium tamarense* se pueden presentar cambios drásticos en la proporción de toxinas carbamato y N-sulfocarbamato tanto en el perfil de toxinas de poblaciones silvestres, como en las cepas cultivadas, aún y cuando estas fueron recolectados dentro de una misma zona. Esto, refuerza la idea de la existencia de poblaciones silvestres con perfiles de toxinas diferentes en el medio natural, creciendo en la misma zona (Kazuhiko *et al.*, 2002). Por otra parte en poblaciones naturales de *G. catenatum* en Bahía Concepción se ha observado una variación en el perfil de toxinas, tanto en forma espacial como temporal, encontrándose que existe un mayor número de análogos de la saxitoxina en la temporada donde *G. catenatum* es más abundante y se encuentra formando cadenas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2006).

Por otro lado, el contenido de toxinas en los dinoflagelados también puede variar dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo. De acuerdo con Anderson *et al.* (1990) y John y Flynn (2000), las toxinas pueden ser más fácilmente sintetizadas a partir del nitrógeno reciclado en el propio dinoflagelado y no necesariamente a partir del nitrógeno inorgánico recién incorporado. Esto podría incrementar la tasa de renovación del nitrógeno necesario para la producción de toxinas (John y Flynn, 2000). En cambio, la limitación del fósforo podría promover un incremento en el grado de toxicidad en dos rutas principales: Cuando existe una cantidad limitante de fósforo, se incrementa la concentración de aminoácidos intracelulares libres, lo que podría conducir a un aumento en la concentración de los precursores para la síntesis de las toxinas, o por otro lado incrementar la síntesis por vía del incremento en la concentración del nitrógeno a nivel de la concentración de metabolitos de bajo peso molecular (Anderson *et al.*, 1990). La limitación del fósforo también puede tener un efecto adverso en la inhibición de la síntesis final de la toxina, lo que permitiría que esta síntesis

continuara a niveles más altos que en condiciones normales, por tanto es de esperarse que el estatus del fósforo juegue un papel relevante en la definición del perfil de toxinas de los dinoflagelados (Eurgain *et al.*, 2002). Considerando lo anterior se esperaría que existieran diferencias en el perfil de toxinas en función de su origen, pero aún existe controversia con respecto a los factores que generan estas diferencias (Tabla 17).

Tabla 17. Registros de densidades de *G. catenatum* y datos de toxicidad asociados a esta especie en el Pacífico Mexicano (Modificado de Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004a)

	Fecha	<i>G. catenatum</i> Cells x 10 ⁶	Toxicidad µg STXeq 100 g ⁻¹	Referencias
29°N Golfo Cal.	Marzo-1939	≈1	Sin datos	Graham 1943
Mazatlán, Sin.	Abril-1979	≈1.2 to 6.6	20 - 7640	Mee et al. (1986)
Mazatlán, Sin.	Abril-1979	≈0.24 to 1.760	20 - 7640	Morey-Gaines et al. (1986)
P. Libertad, Son.	Marzo-1981	0.19	Sin datos	Cortés-Altamirano et al. (1999)
Mazatlán, Sin.	Abril-1985	Sin datos	Sin datos	Cortés-Altamirano et al. (1999)
Mazatlán, Sin	Abril-1997	2.2 to 5	29	Cortés-Altamirano and Alonso-Rodríguez (1997)
Mazatlán, Sin	Abril-2001	0.01	39.40	Gárate-Lizárraga et al (2004)
Acapulco, Gro.	Marzo-1999	0.007 to 0.037	120-209	Mancilla-Cabrera et al. (2000)
Acapulco, Gro.		.0025–3300	20.65 - 1455	Gárate-Lizárraga et al. (2007)
Manzanillo, Col	Marzo-Mayo-1999	arriba 3.5	Sin datos	Morales-Blake et al. (2000)
P. Interior, Col.	Abril-1999	≈2.5 to 3.3	Sin datos	Figueroa and Zepeda (2000)
Bahía Concepción	Marzo-1990	0.0018- 0.003	Sin datos	Gárate-Lizárraga et al. (2001)
Bahía Concepción	Mayo-1999	arriba 0.57	63.8 - 298	Gárate-Lizárraga et al (2004)
Bahía de La Paz	Marzo-2002, Feb- Abril 2007	000160- .660	0.14 - 46	Gárate-Lizárraga et al (2004); Henández-Sandoval et al (2007)

9.4. Biotransformación de TP en la almeja chocolata

Algunos cambios significativos en la composición de las toxinas probablemente ocurrieron en la *M. squallida* en este estudio. De las toxinas N-sulfocarbamato (C1+2) que son las menos potentes, pueden sufrir una biotransformación probablemente como resultado de una conversión no-enzimática. Esta conversión se conoce que puede fácilmente ocurrir a un pH bajo (pH~3) (Hall *et al.*, 1990), y podría resultar de las condiciones ácidas que están presentes en el intestino, esto podría ser indicativo de una biotransformación de toxinas del tipo C a toxinas del grupo carbamatadas como la STX y NeoSTX.

La digestión extracelular en el estómago o digestión intracelular en la glándula digestiva podría ser el principal mecanismo responsable, sin embargo este proceso de biotransformación de toxinas en moluscos se puede dar en dos direcciones, hacia el incremento o bien hacia la disminución de la potencia de las toxinas ingeridas. Muchos moluscos pueden contener menos toxinas del tipo C y altas concentraciones de toxinas carbamato que la de los organismos que las causa (Oshima *et al.*, 1990), sugiriendo la posibilidad de que ocurre una hidrólisis enzimática en N-sulfato (Oshima, 1995).

Lo anterior puede modificar la toxicidad total. Durante los primeros dos días de la fase de desintoxicación, se registra la mayor concentración de toxinas carbamato y en particular de la toxina de mayor toxicidad, la NeoSTX. Esto es indicativo de una biotransformación de toxinas del grupo N-sulfocarbamato en sus análogos del grupo carbamato, dentro de la almeja. Una observación que apoya este supuesto es el hecho de que la NeoSTX, se registra en la almeja durante el segundo experimento, a pesar de que no fue registrada en la cepa de *G. catenatum*. Otra evidencia de esta transformación la da el análisis del perfil de toxinas de almejas alimentadas por 48 hr con *G. catenatum*, en la fase experimental 3, donde se observa un fuerte incremento de toxinas carbamato en comparación con la cepa utilizada como alimento (Figura 13).

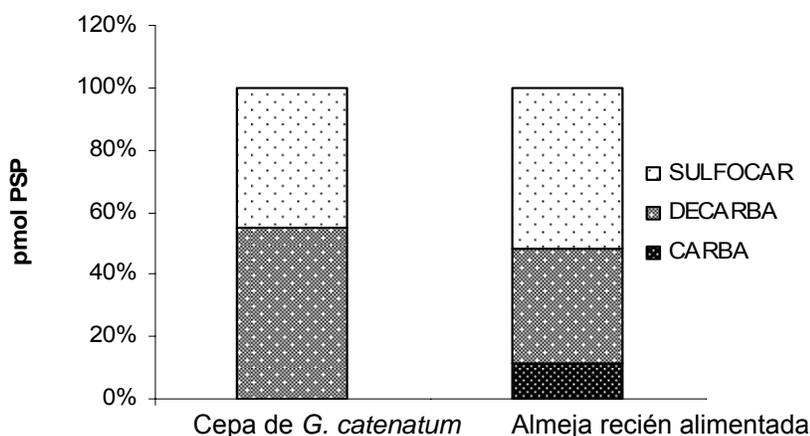


Figura 13.- Comparación del perfil de toxinas (% molar) de *G. catenatum* y la almeja luego de ser alimentada por 48 hrs durante el experimento número 3. Las toxinas fueron agrupadas en sulfocarbamato (SULFOCAR), decarbamato (DECARBA) y carbamato (CARBA).

Cambios en el perfil de toxinas en los tejidos de moluscos podrían surgir de una retención selectiva o eliminación de toxinas individuales, epimerización o a diversos procesos de biotransformación: conversión reductora en presencia de reductantes naturales, hidrólisis a un pH bajo, ó conversión enzimática (Cembella *et al.*, 1993, 1994; Oshima, 1995).

Se sabe que los cambios en el perfil de toxinas en los tejidos de la almeja pueden incrementarse o disminuir, en función de la retención selectiva o la eliminación de las toxinas por diferentes vías (Bricelj y Shumway, 1998). Por tanto, cada especie de molusco puede responder de forma distinta ante la presencia de TP. Aunque ya se han hecho estudios donde se comparan los perfiles de toxinas derivados del fitoplancton natural con presencia de *G. catenatum* y de diferentes tipos de almejas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004 a,b; Band-Schmidt *et al.*, 2004), se han realizado estudios en condiciones controladas de laboratorio sobre los efectos del dinoflagelado tóxico *G. catenatum* en la tasa de ingestión y de aclaramiento en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, así como la eliminación de estas toxinas (Estrada *et al.*, 2007).

La acumulación de toxinas en las diferentes especies de moluscos puede variar en respuesta a factores extrínsecos, como temperatura, densidad celular del dinoflagelado y tiempo de inmersión de las poblaciones intermareales (Quayle, 1969). Pero también puede modificarse en función del metabolismo particular de cada especie de molusco. Algunas especies tienen la capacidad de modificar la composición de toxinas ingeridas por vía metabólica o por transformación química, afectando con esto la toxicidad total (Sullivan *et al.*, 1983, Oshima, 1995). Este proceso de biotransformación de toxinas en moluscos se puede dar en dos direcciones, hacia el incremento o bien hacia la disminución de la potencia de las toxinas ingeridas. Nuestros resultados muestran evidencias de que ambas tendencias, se presentan en la almeja chocolata, durante las fases de intoxicación y desintoxicación.

Las toxinas del tipo N-sulfocarbamato y particularmente las del tipo C son muy estables en la mayoría de los moluscos, esto concuerda con el predominio de este tipo de toxinas en los experimentos 2 y 3 y su incremento en la etapa final del

periodo de depuración en el primer experimento. No obstante, algunas especies de moluscos tienen la capacidad de romper el enlace químico del radical N-sulfato y transformar las toxinas N-sulfocarbamato (C1, C2, C3, B1, B2) a sus contrapartes carbamato (GTX2, GTX3, GTX1, GTX4, STX, NeoSTX) en condiciones de $\text{pH} \leq 7$ y temperaturas altas (Hall y Reichardt, 1984; Oshima, 1995). De acuerdo a lo anterior las diferencias entre el perfil de toxinas encontradas en la cepa del dinoflagelado *G. catenatum* y la almeja chocolata *M. squalida*, en los primeros días del proceso de desintoxicación, sugiere una hidrólisis de toxinas del tipo C a toxinas del grupo carbamato (STX y NeoSTX) (Jaime *et al.*, 2007), esto es más notable en el primer experimento (realizado a 28 °C), donde el porcentaje molar de la NeoSTX se incrementa en varios órdenes de magnitud, en correspondencia con el descenso de las toxinas C1 y C2, durante los días posteriores a la ingestión del dinoflagelado (Fig. 8). Este hecho es una de las principales diferencias de nuestro estudio con respecto a lo observado por Gárate-Lizárraga *et al.* (2004b), quien postula que la almeja chocolata, tiene una baja capacidad de biotransformación, debido a que no encuentra grandes diferencias entre el perfil de toxinas de la almeja y el observado en *G. catenatum*. Considerando nuestros resultados, surge el cuestionamiento de si la presencia de las toxinas NeoSTX y STX en los dos bivalvos mencionados por Gárate-Lizárraga *et al.* (2004a), es el resultado de haber consumido una especie de dinoflagelado que contenía ambas toxinas o si ambas especies de bivalvos tienen la capacidad de biotransformar las toxinas N-sulfocarbamato.

Esta bioconversión ha sido confirmada para diferentes moluscos; en España y Portugal, aquellos moluscos que consumieron *G. catenatum* mostraron una conversión de toxinas de tipo N-sulfocarbamato a toxinas carbamato consideradas de las más potentes (Anderson *et al.*, 1989, Franca *et al.*, 1996, Rodríguez-Vázquez *et al.*, 1989, Oshima *et al.*, 1990, 1993, Vale y Sampayo, 2001). Takatani (1998) encuentra diferencias significativas entre el perfil de toxinas de *G. catenatum* y el registrado en bivalvos marinos de Japón. Las toxinas GTX2, GTX3, NeoSTX y STX, se registraron en los bivalvos, pero no así en las células del dinoflagelado. Oshima (1995), trabajando con almejas japonesas (*Mactra*

chinensis y *Peronidia venulosa*), identifica a la carbamoilaza como la enzima involucrada en la transformación de estas toxinas. Esta enzima actúa en la hidrolización del radical N-sulfocarbamato para convertirlas en toxinas decarbamato, generalmente se lleva a cabo en el tejido digestivo y muestra una gran especificidad de sustrato por lo que esta actividad suele ser característica de pocas especies de molusco (Jaime *et al.*, 2007). Estudios realizados en Corea por Chang *et al.* (1988) con *Mytilus edulis* encontraron el mismo cambio en el perfil de toxinas asociado con un pH alto y temperatura elevada. En esa misma especie pero en China (Lee *et al.*, 2000) también reportaron un incremento de toxinas carbamato asociado a su bioconversión. En *Placopecten magellanicus*, procesos enzimáticos en la transformación de GTXs a STX fueron registrados por Shimizu *et al.* (1981) en Japón. Sullivan *et al.* (1983) registra esta misma conversión en la almeja *Prototheca staminea*. En tanto que Bricelj *et al.* (1991) dan cuenta de este tipo de conversión metabólica en la almeja *Mercenaria sp.*

9.5. Fase de depuración

Las transformaciones químicas en moluscos han sido documentadas para algunas especies de moluscos como la escalopa *Patinopecten yessoensis* que retiene toxinas por varios meses, exhibiendo cambios significativos en el perfil de toxinas durante el periodo de depuración. Shimizu y Yoshioka (1981) fueron los primeros en demostrar que en tejidos de la escalopa, las toxinas GTXs y NeoSTX podrían ser convertidas a STX. En la almeja *Protothaca staminea*, Sullivan *et al.* (1983) reportaron que las toxinas carbamato y N-sulfocarbamato podrían ser biotransformadas en compuestos decarbamato, obteniendo como producto final en el metabolismo a la STX.

Nuestros resultados sugieren que este tipo de transformaciones se verifican en la almeja chocolate durante el periodo de depuración, dado que se observa la característica disminución del grupo de toxinas N-OH (GTX 1,4 y NeoSTX) acompañado por un incremento en el grupo N-H (GTX 2,3 y STX)(Oshima, 1995; Jaime *et al.*, 2007), lo que sugiere, una reducción química. Esta reacción generalmente es acompañada por la eliminación del grupo sulfato a nivel del C11,

transformando así los β -epímeros (C2, GTX3, GTX4) producidos por el dinoflagelado, en α -epímeros (que son termodinámicamente más estables) después de ser ingeridos por el molusco (Bricelj y Shumway, 1998; Jaime *et al.*, 2007). Ambas reacciones pueden estar ligadas a la presencia de agentes reductores naturales (cisteína, glutatión) y/o a la actividad enzimática de las bacterias que comúnmente habitan en los moluscos (Kotaki *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 2001).

Por otro lado, la presencia de toxinas STX y dcSTX durante los días 4-8 en los diferentes experimentos, pueden derivarse de los productos de degradación de varias toxinas del tipo C y Gonyaulatoxinas (GTXs), que a han pasado por reducciones químicas y enzimáticas (desulfatación y deshidroxilación) e hidrólisis (eliminación del radical decarbamato y N-sulfato) (Lehane, 2000).

9.5. Mecanismos de depuración

Cuando se examina la concentración total de toxinas y su correspondiente tasa de depuración, pueden establecerse tres fases (Figs. 7, 9 y 11); la primera, donde la tasa de desintoxicación es muy rápida, se presenta en el desarrollo inicial del período de desintoxicación y la segunda más lenta inicia al segundo o tercer día y termina hacia el final del período de desintoxicación, finalmente una tercera fase, donde el contenido de toxinas cambia a una tasa más lenta, debido al predominio de toxinas N-sulfocarbamato. La cinética de desintoxicación de doble fase, ha sido descrita, como el patrón usual de depuración en moluscos (Silver y Cembella, 1995; Lassus *et al.*, 1989; Bricelj *et al.*, 1991; White *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1997), para aquellos que han sido sometidos a la influencia de organismos productores de TP así como para los que han consumido toxinas DSP (Marcaillou-Lebaut *et al.*, 1993).

En general, en los moluscos bivalvos las transformaciones fuertes se presentan en mayor medida en el tejido digestivo, que en el muscular (Jaime *et al.*, 2007). Aunque en este estudio se trabajó con el macerado de la almeja completa, durante las primeras 48 hrs del período de desintoxicación, observamos una

disminución de la toxicidad total equivalente a la observada en el tracto digestivo de diversas especies (Bricelj *et al.*, 1991; Jaime *et al.*, 2007) (Figs. 8, 10 y 12).

Esta desintoxicación afecta principalmente a las toxinas con mayor grado de toxicidad (NeoSTX, GTX2, GTX3), por lo que concluimos que la almeja chocolata posee los mecanismos para convertir las TP a toxinas de baja toxicidad o metabolitos excretables.

En opinión de Blanco *et al.* (1997), la cinética de depuración en dos fases tiene dos componentes; la pérdida metabólica vía heces fecales y la eliminación de células tóxicas y del mismo sistema digestivo, ya que este tiene una alta tasa de renovación. Durante el proceso de desintoxicación, gracias a una fuerte afinidad de la membrana de las células digestivas se concentra las TP, en las células exteriores (más viejas) del tracto digestivo y solo una fracción sería transferida hacia otras células u otros tejidos (Blanco *et al.*, 1997). Cuando termina la exposición del molusco a la presencia del fitoplancton tóxico, las primeras células involucradas en la producción de heces son las más externas (con una mayor carga de toxinas), de forma tal que transfieren una elevada toxicidad a las heces, produciendo una fuerte disminución de la toxicidad en el molusco. Este mecanismo puede ser suplementario a la destrucción de las células del fitoplancton tóxico vía digestión, como ha sido sugerido por Silvert y Cembella, (1995) y Bricelj y Cembella (1995).

Por otro lado, el efecto de estas toxinas modificadas, ha sido poco estudiado en humanos (García-Camacho *et al.*, 2007). De hecho la toxicidad que pudiera transferirse a los humanos u otros consumidores de moluscos podría depender no solo de la abundancia y potencia de las toxinas propias de los dinoflagelados, sino también de la biotransformación de estas toxinas por parte de los mismos moluscos (Asakawa *et al.*, 1984, 1995). Por otro lado, los dinoflagelados pueden producir además de las toxinas ya conocidas, una variedad de polipéptidos complejos que aún no han sido identificados, pero que pueden tener efectos citotóxicos, antitumorales, antibióticos, antimicóticos inmunosupresores y/o neurotóxicos (Wright y Cembella, 1998).

Como se mencionó anteriormente, la almeja chocolata es un molusco bivalvo que es consumido durante todo el año sobre todo por la población costera, por lo que con este estudio se pudo establecer que esta almeja tiende a eliminar toxinas rápidamente en tan solo dos semanas y puede ser consumida sin riesgo alguno.

10. CONCLUSIONES

La almeja chocolata *Megapitaria squalida* no sufre daño fisiológico aparente cuando es expuesta a *Gymnodinium catenatum*.

Se sugiere la existencia de una bioconversión de toxinas de baja toxicidad (N-sulfocarbamato) a toxinas de alta toxicidad (Carbamato) en la almeja chocolata, aunque la concentración que pueda alcanzar, dependerá del tiempo que este expuesta al dinoflagelado tóxico.

El perfil de TP en la cepa de *G. catenatum* estuvo compuesto de dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, C1 y C2 en los 3 experimentos, las toxinas STX y NeoSTX se detectaron en 2 experimentos y la toxina B1 solo en el segundo experimento. Lo que sugiere que este dinoflagelado mantiene un perfil estable pero que puede tener cambios en respuesta posiblemente a cambios ligeros en las condiciones de crecimiento.

El perfil de la almeja chocolata en los tres experimentos realizados incluyó las siguientes toxinas STX, NeoSTX, GTX2, dcGTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y C2.

La cinética de depuración de la almeja chocolata, no varía en función del grado de toxicidad y se ajusta a un modelo exponencial inverso. La cinética de eliminación se dividió en tres fases: 1ª. Fase. Eliminación de toxinas de mayor toxicidad y la

más rápida. 2ª. Fase. Mayor concentración de toxinas decarbamato pero hay una baja notable de toxicidad total. 3ª Fase. Existe un predominio de toxinas N-sulfocarbamato.

Las toxinas del grupo carbamato fueron las primeras en ser eliminadas, mientras que las del grupo decarbamato y N-sulfocarbamato permanecen por más tiempo en el tejido de la almeja.

La eliminación de toxinas en la almeja puede deberse a tres procesos principales:

1. Reducción química: que consiste en la disminución del grupo N-OH e incremento en el grupo NH.
2. Reducción enzimática: procesos de desulfatación y deshidroxilación.
3. Hidrólisis: eliminación del radical decarbamato y N-sulfato.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar la misma concentración de dinoflagelados con que se alimenta la almeja chocolata para evitar posibles cambios en el perfil de toxinas.

De ser posible, colocar a las almejas de manera individual para medir su tasa de ingesta diaria de alimento.

Que la fase experimental se realice con lotes de almejas de la misma talla y peso para observar posibles variaciones en el perfil de toxinas.

Esta almeja elimina rápidamente toxinas de alta toxicidad, por lo que sería interesante realizar estudios en otras almejas de interés comercial.

12. LITERATURA CITADA

Aiello, E. 1960. Factors affecting ciliary activity on the gill of the mussel *Mytilus edulis*. *Physiology.Zoology*. 33:120-135.

Aiello, E. & G. Guideri. 1965. Distribution and function of the branchial nerve in the mussels. *Biology Bulletin*. 129:431-438.

Anderson, D. M., J. J. Sullivan & B. Reguera. 1989. Paralytic shellfish poisoning in Northwest Spain: the toxicity of *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 27:665-674.

Anderson, D. M., D. M. Kulis, J. J. Sullivan, S. Hall & C. Lee. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biology*. 104: 511-524.

Asakawa, M., M. Takagi, A. Iida & M. Oishi. 1984. Studies on the conversion of paralytic shellfish poison (PSP) components by biochemical reducing agents. *Eiseikagaku*, 33: 50-55.

Asakawa, M., K. Miyazawa, H. Takayama & T. Noguchi. 1995. Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* as the source of paralytic shellfish poison (PSP) contained in bivalves from Hiroshima Bay, Hiroshima prefecture, Japan. *Toxicon* 33:691-697.

Band-Schmidt, C.J., L. Morquecho-Escamilla, C.H. Lechuga-Devéze & D.M. Anderson. 2004. Effects of growth and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Journal of Plankton Research*. 26:1-12.

Band-Schmidt, C.J., J. Bustillos-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, C.H. Lechuga-Devéze, K. Reinhardt & B. Luckas. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten*

ventricosus G. B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. Harmful Algae. 4. 21-31.

Band-Schmidt, C. J., J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho-Escamilla, I. Gárate-Lizárraga, R. Alonso-Rodríguez, A. Reyes-Salinas, K. Erler & B. Luckas. 2006. Variation of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. Journal of Phycology 42:757-768.

Bauder, A.G., A.D. Cembella, V.M. Bricelj & M.A. Quilliam. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. Marine Ecology Progress Series. 213:39-52.

Blanco, J., A. Moróño, J. Franco & M.I. Reyero. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One-and two-compartment models and the effect of some environmental variables. Marine Ecology Progress Series. 158:165-175.

Bricelj, V.M., J.H. Lee & A.D. Cembella. 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. Marine Ecology Progress Series. 74:33-46.

Bricelj, V. M., J. H. Lee, A. D. Cembella & D. M. Anderson. 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series. 63: 177-188.

Bricelj, V. M. & A. D. Cembella. 1995. Fate of gonyautoxins in surfclams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxigenic *Alexandrium*. In: Lassus, P., Arzul G., Erard, E., Gentien, P. y Marcaillou, C. (eds). Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris. 413-418 p.

Bricelj, V. M. & S.E. Shumway. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, Transfer Kinetics and Biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*. 6:315-383.

Bricelj, V. M. & S.P. MacQuarrie. 2003. Intrinsic factors influencing the accumulation of PSP toxins in bivalve molluscs. In: *Molluscan Shellfish Safety*. Villalba, A., Reguera, B., Romalde, Jesús L. y Beiras, R.(eds). Xunta de Galicia. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 121-126 p.

Cortés-Altamirano R. & R. Alonso-Rodríguez. 1997. Mareas rojas durante 1997 en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Ciencias Marinas*. 15:31-37.

Cortés-Altamirano, R., D.U. Hernández-Becerril & R. Luna-Soria. 1996. Red tides in México: A review, In: T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Sendai, Japan. 101-105. p.

Cortés-Altamirano, R., L. Muñoz-Cabrera & O. Sotomayor-Navarro. 1993. Envenenamiento paralítico por mariscos (PSP), causado por el dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en la costa suroeste de México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Autónoma de México, 20: 43-54.

Chang, D., D. Shin, H. Cho, M. Park, J. Pylon & Y. Park. 1988. Studies on distribution, characterization and detoxification of paralytic shellfish poison in Korea 2: Purification and characterization of PSP extracted from cultured sea mussel, *Mytilus edulis*. *Bulletin of the Korean Fisheries Society*. 21:161-168.

Chen, Ch. Y. & H.N. Chou. 2001. Acumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins by purple clam *Hiatula rostrata* Lightfoot. *Toxicon*. 39: 1029-1034.

De la Garza-Aguilar. 1983. Food poisoning by ingestion of shellfish. *Salud Pública de México* 25, 145-150.

Estrada, A. N., N. Lagos, C. García, A. N. Maeda-Martínez & F. Ascencio. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Biology*. 151:1205-1214.

Eurgain, H. John & K.J. Flynn. 2002. Modelling changes in paralytic shellfish toxin content of dinoflagellates in response to nitrogen and phosphorus supply. *Marine Ecology Progress Series*. 225:147-160.

Faust, A.M. & A.R. Gullledge. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. Smithsonian Institution. Contributions from the United States National Herbarium. Volume 42:1-144.

Franca, S., P. Alvito., I. Sousa, A. Gago, J. A. Rodríguez-Vázquez, J.M. Leao, M. Comesaña, P. Thibault, P. Burdaspal, J. Bustos & T. Legarda. 1996. The toxin profile of some PSP toxin producing dinoflagellates occurring in Portuguese coastal waters as determined by alternative analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. y Fukuyo, Y. (eds). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Sendai, Japan: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 19-522 p.

Gainey, L.F. & S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research*, 7(4):623-628.

Gárate-Lizárraga, I., M. L. Hernández-Orozco, C. Band-Schmidt & G. Serrano-Casillas. 2001. Red tides along the coasts of the Baja California Peninsula, Mexico (1984 to 1999). *Oceánides*, 16:127-134.

Gárate-Lizárraga, I., J. Bustillos-Guzmán & R. Alonso-Rodríguez. 2002. Distribution of *Gymnodinium catenatum* Graham, in coastal waters of México. Harmful Algae News, Paris, France. 23:1-2.

Gárate-Lizárraga, I., J. Bustillos-Guzmán, R. Alonso-Rodríguez & B. Luckas. 2004a. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. Marine Pollution Bulletin, 48: 397-402.

Gárate-Lizárraga, I., J. Bustillos-Guzmán, K. Erler, M.S. Muñetón-Gómez, B. Luckas & A. Tripp-Quezada. 2004b. Paralytic shellfish toxin in the chocolata clam, *Megapitaria squalida*, in Bahía de La Paz, Gulf of California. Biología Tropical. 52:51-58.

Gárate-Lizárraga, I., J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho-Escamilla, C. J. Band-Schmidt, R. Alonso-Rodríguez, K. Erler, B. Luckas, A. Reyes-Salinas & D.T. Góngora-González. 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. Marine Pollution Bulletin, 50:208-236.

Gárate-Lizárraga, I., J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, F. Hernández-Sandoval, K. Erler & B. Luckas. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles in net phytoplankton samples from Bahía Concepcion, Gulf of California, Mexico. Elsevier, Marine Pollution Bulletin, 52:800-815.

García-Camacho, F., J. Gallardo-Rodríguez, A. Sánchez-Mirón, M. C. Cerón-García, E. H. Belarbi, Y. Chisti & E. Molina-Grima. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. Biotechnology Advances. 25:176-194.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of marine animals. Smith, L.W. and Chanley, M.H. (eds). Plenum, New York, 26-60 p.

Gutiérrez, B. J. A., D. Díaz M. & B. Bermúdez A. 2000. Evaluación de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Veneridae) en el Parque Nacional Bahía de Loreto, Baja California Sur, México. *Insulario*. Junio, 13:20-24.

Hall, S. & P. B. Reichardt. 1984. Cryptic paralytic shellfish toxins. En: E. P. Ragelis, *Seafood Toxins*, Washington, D. C. (ed) American Chemical Society, 113-124 p.

Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson & A.D. Cembella. 1995. Manual on harmful marine microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission. UNESCO. 551 p.

Hummert, C., M. Ritscher, K. Reinhardt & B. Luckas. 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*, 45:312-16.

Jaime, E., G. Gerdt & B. Luckas. 2007. In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae*, 6:308-316.

John, E.H. & K. J. Flynn. 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *European Journal of Phycology*, 35:11-23.

Kao, C.Y. 1993. Chapter 4. Paralytic shellfish poisoning. In: *Algal toxins in seafood and drinking water*. IR Falconer (ed.) Academic Press, London and New York. 75-86 p.

Kazuhiko, I., T. Suzuki & A. Ito. 2002. Variety of PSP toxin profiles in various culture strains of *Alexandrium tamarense* and change of toxin profile in natural *A. tamarense* population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 273: 51-60.

Keen, A.M. 1971. Sea shells of tropical West America. Marine molluscs from Baja California to Peru. California, Stanford University Press. 1025 p.

Kimmerer, W. J., E. Gartside, & J. J. Orsi. 1994. Predation by an introduced clam as the probable cause of substantial declines in zooplankton in San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 113, 81–93.

Lagos, N. 2002. Principales toxinas de origen fitoplanctónico: Identificación y cuantificación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). In: *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. E. A. Sar., M. E. Ferrario & B. Reguera (eds.). Instituto Español Oceanográfico. 55-77.

Lassus, P., J.M. Fremy, M. Ledoux, M. Bordouil & M. Bohec. 1989. Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon*. 12:1313-1321.

Lechuga-Devéze, C.H. & M.L. Morquecho-Escamilla. 1998. Early spring potentially harmful phytoplankton in Bahía Concepción, Gulf of California. *Bulletin of Marine Science*. 63: 503-512.

Lee, H. O., B. S. Cheun, E. Watanabe & M.S. Han. 2000. Application of a channel biosensor for toxicity measurements in cultured *Alexandrium tamarense*. *Journal of Natural Toxins*. 9: 341-348.

Lehane, L. 2000. Paralytic Shellfish Poisoning: A review. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and forestry. Australia, Canberra.

Mancilla-Cabrera, E., C. Ramírez-Camarena & L. Muñoz-Cabrera. 2000. Primer registro de *Gymnodinium catenatum* Graham (Gymnodiniaceae) como causante de marea roja en la Bahía de Acapulco, Gro. , México. In: Ríos-Jara, R., Juárez-Carrillo, E., Pérez-Peña, M., López Iriarte, E., Robles-Jarero, E. G., Hernández-Becerril, D. U., Silva-Briano, M. (eds.), Estudios sobre el plancton marino en México y el Caribe. Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara, México. 85-86 p.

Marcaillou-Lebaut, C., B. Bardin, M. Bardouil, M. Bohec, L. Le Dean, P. Masselin & P. Truquet. 1993. DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda T.J. Shimizu Y. (eds) Toxic phytoplankton blooms at the sea. Elsevier, Amsterdam. 531-535.

Mee, L. D., M. Espinosa & G. Díaz. 1986. Paralytic Shellfish Poisoning with a *Gymnodinium catenatum* Red Tide on the Pacific Coast of Mexico. Marine Environment Research. 19:77-92.

Moroño, A., J. Maneiro, Y. Pazos & J. Blanco. 1998. Modelling the accumulation of PSP toxins in Galicia mussel: Results and Perspectives. . In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. y Wyatt, T. (eds). Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO.

Muñoz-Cabrera, L. & C. Ramírez-Camarena. 2000. Toxicología de toxinas marinas y métodos de bioensayo en ratón para su análisis. Primer curso en Norteamérica y el Caribe sobre toxinas marinas y floraciones algales nocivas. La Paz, B.C.S. México. 15 p.

Okolodkov, Y. G. & I. Gárate-Lizárraga. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. Acta Botanica Mexicana 74:1-154.

Orellana-Cepeda, E., E. Martínez-Romero, L. Muñoz-Cabrera, P. López-Ramírez, E. Cabrera-Mancilla & C. Ramírez-Camarena. 1998. Toxicity associated with blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in southwestern Mexico. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L., Wyatt, T., (eds.), Harmful Algae Proceedings. VIII International Conference on Harmful Algae, Vigo, Spain, 25-29 June 1997. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 60 p.

Oshima, Y. 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. (eds) Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier, Paris, 475-480 p.

Oshima, Y., M. Hasegawa, T. Yasumoto, G. Hallegraeff & S. Blackburn. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmania shellfish. *Toxicon* 25:1105-1111.

Oshima, Y., K. Sugino, H. Itakura, M. Hirota & T. Yasumoto. 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (eds) Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, 391-396 p.

Oshima, Y., H. Itakura, L. Kian-Chuan, T. Yasumoto, S. Blackburn, & G. M. Hallegraeff. 1993. Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In: Smayda, T. J. y Shimizu, Y. (eds). Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam: Elsevier. 907-912p.

Quayle, D. B. 1969. Paralytic shellfish poisoning in British Columbia. *Bulletin of Fishery Research Board Canada*. 169:1-162.

Ritchie, J.M. & R.B. Rogart. 1977. The binding of saxitoxin and tetrodotoxin to excitable tissue. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 79:1-50.

Rodríguez-Vázquez, J. A., A. Gago-Martínez, Y. Oshima, K. Supino, J. S. Lee & T. Yasumoto. 1989. Analysis of toxins in mussels from the Atlantic coast of Spain. In: Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (eds). *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Amsterdam: Elsevier. 367-374 p.

Ronson-Paulin, J. A. 1999. Análisis retrospectivo y posibles causas de mareas rojas tóxicas en el litoral del sureste mexicano (Guerrero, Oaxaca, Chiapas) *Ciencias del Mar, Universidad Nacional Autónoma de México* 9:40-56.

Sekiguchi, K., S. Sato, T. Ogata, S. Kaga & M. Kodama. 2001. Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. *Marine Ecology Progress Series*. 220:213-218.

Shimizu, Y. & M. Yoshioka. 1981. Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates. *Science*. 212:547-9.

Shumway, S.E. 1995. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Reviews in Fisheries Science*. 3:1-31.

Silvert, W., M. Bricelj & A. Cembella. 1998. Dynamic Modelling of PSP toxicity in the surfclam (*Spitula solidissima*): Multicompartmental kinetics and biotransformation. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. y Wyatt, T. (eds). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO.

Silvert, W. & A.D. Cembella. 1995. Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*: 52:521-531.

Smith, E. A., F. Grant & F. Gallacher. 2001. Biotransformation of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2345-2353.

Sullivan, J.J., W.T. Iwaoka & J. Liston. 1983. Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 114: 465-72

Takatani, T., H. Akaeda, T. Kaku, M. Miyamoto, H. Mukai & T. Noguchi. 1998. Paralytic shellfish poison infestation to oyster *Crassostrea gigas* due to dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in Amasuka Islands, Kumamoto Prefecture. *Japanese of Food hygienic Society of Japan* 39, 292-295.

Taleb, H., P. Vale, R. Ségou, R. Amanhir & M. Blaghen. 2003. Inter-specific variability of PSP toxin profiles and toxin content in different molluscan shellfish species from Morocco. In: *Molluscan Shellfish Safety*. Villalba, A., Reguera, B., Romalde, Jesús L. & Beiras, R. (eds). Xunta de Galicia. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 127-133 p.

Taylor, F.J.R. 1990. Phylum Dinoflagellata. In Jones and Bartlett series in Life Science. (ed.) L.Margulis. Boston, M.A. 419-437 p.

Vale, P. & M. A. de M. Sampayo. 2001. Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. *Toxicon*. 39:561-571.

Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano- Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez & F. García-Domínguez. 2000. Ciclo reproductivo de la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Soberby, 1835) (Bivalvia:Veneridae) en Bahía Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiológica* 10:165-168.

White, A.W., J. Nassif, S.E. Shumway & D.K. Whittaker. 1993. Recent occurrence of paralytic shellfish toxins in offshore shellfish in the Northeastern United States. In: Smayda T.J. Shimizu Y. (eds) *Toxic phytoplankton blooms at the sea*. Elsevier, Amsterdam. 435-440 p.

Wright, J.L.C. & A.D. Cembella. 1998. Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins. In: Anderson D. M., Cembella A.D. (eds). *Physiological ecology of harmful algal blooms*. NATO ASI series Berlin: Springer-Verlag. 427-51 p.

ANEXOS

1.- Determinación de toxinas PSP por HPLC/FD

Sistema de inyección:	30 a 50 μ L
Fase estacionaria:	Luna 5 μ m RP-C18 (250 mm X 4,6 mm) Phenomenex
Fase móvil:	A: 98.5% 11 mM ac. octanesulfónico y 40 nM de ac. fósfórico, ajustar el pH a 6.9 con NH_3^+ , 1.5 % de tetrahidrofurano (THF). B: 83.5% 11 mM de a. octanesulfónico y 40 mM de ac. fósfórico, ajustar el pH a 6.9 con NH_3^+ , 15% de acetonitrilo y 1.5% de tetrahidrofurano (THF). C: 98% 40 mM de ac. fósfórico, ajustar el pH a 6.9 con NH_3^- , y 1.5% de tetrahidrofurano (THF).

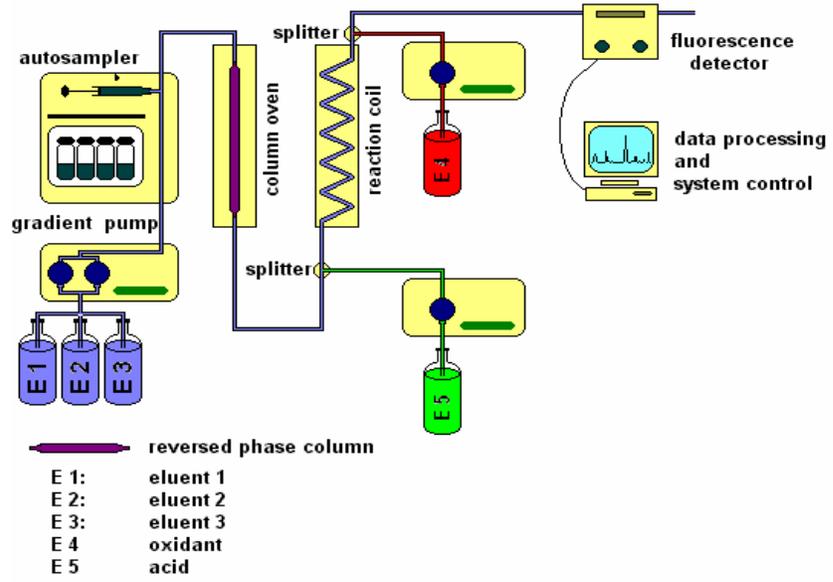
Gradiente:	tiempo	A(%)	B(%)	C(%)	flujo (mL/min)
	0.0	50	0	50	1.0
	10.0	50	0	50	1.0
	12.0	0	100	0	1.0
	35.0	0	100	0	1.0
	36.0	100	0	0	1.0
	47.0	100	0	0	1.0
	48.0	50	0	50	1.0
	57.0	50	0	50	1.0

Temperatura de columna: 25°C (\pm 3°C).

Derivatización Post-columna: Oxidación: 10.0 mM ac. periódico y 550 mM de una solución de NH_3^+ (0.3 mL/min)
Acidificación: 1.0 M Ac. Nitrico (0.4 mL/min)
Temperatura: 50°C

Detección: Ex.: 330 nm, Em.: 395 nm (Figura 4).

2.- Sistema de HPLC usado para determinación de PSP con un par-iónico, con oxidación post-columna y detección de fluorescencia



3.- Técnica de Hummert *et al.* (1997), para efectuar las determinaciones de toxinas paralizantes.

El análisis de cromatografía se llevó a cabo usando un gradiente de par-iónico utilizando tres tipos de soluciones (Tabla1) usando ácido octanesulfónico a diferentes concentraciones, ajustando el pH 6.9 con una solución de amonio, esto para realizar la separación de toxinas paralizantes. Después de la oxidación post-columna se utiliza ácido periódico para realizar la oxidación, posteriormente se acidifico con acido nítrico, finalmente las toxinas extraídas son detectadas por fluorescencia.

Tabla 1. Preparación de las tres soluciones utilizadas en la separación de toxinas paralizantes.

Solución A	Solución B	Solución C
4.758 gramos de ácido. octanesulfónico en 1800 mL de agua destilada grado HPLC	5.624 gramos de ácido. octanesulfonico en 1800 mL de agua destilada grado HPLC	A 1800 mL de agua destilada grado HPLC agregarle 80 mL de ac. fósforico al 80%
Agregar 80 mL de ac. fosfórico al 80%	Agregar 100 mL de ac. fosfórico al 80%.	
Ajustar el pH a 6.9 con una solución de amonio al 27%	Ajustar el pH a 6.9 con una solución de amonio al 27%	Ajustar el pH a con una solución de amonio al 27%
Aforar a 2 L, agregar 30 mL de THF*	Aforar a 2 L, agregar 36 mL de THF y 360 mL de acetonitrilo	Aforar a 2 L y agregar 30 mL de THF

* Tetrahidrofurano