



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EFFECTO TOXICO DE CEPAS DE *Chattonella* spp.
(RAPHIDOPHYCEAE) SOBRE LAS FASES INICIALES DE
VIDA DE *Paralabrax maculatofasciatus*
(TELEOSTEI: SERRANIDAE) Y *Litopenaeus vannamei*
(DECAPODA: PENAEIDAE)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

PRESENTA

ALFREDO PEREZ MORALES

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR, DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 01 del mes de diciembre del 2011 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 titulada:

"EFECTO TÓXICO DE CEPAS DE *Chattonella* spp. (RAPHIDOPHYCEAE) SOBRE LAS FASES INICIALES DE VIDA DE *Paralabrax maculatofasciatus* (TELEOSTEI: SERRANIDAE) Y *Litopenaeus vannamei* (DECAPODA: PENAEIDEA)"

Presentada por el alumno:

PÉREZ
Apellido paterno

MORALES
materno

ALFREDO
nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	8	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

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

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

DR. JOSÉ BUSTILLOS GUZMÁN

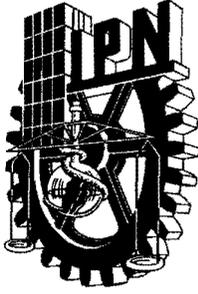
DRA. ALMA SOCORRO SOBRINO FIGUEROA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 2 del mes Diciembre del año 2011
el (la) que suscribe MC. ALFREDO PÉREZ MORALES alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro A080083 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EFECTO TÓXICO DE CEPAS DE *Chattonella* spp. (RAPHIDOPHYCEAE) SOBRE LAS FASES INICIALES DE VIDA DE
Paralabrax maculatofasciatus (TELEOSTEI: SERRANIDAE) Y *Litopenaeus vannamei* (DECAPODA: PENAE.IDEA)"

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. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: alfredo_pm@yahoo.com.mx - cjband@yahoo.com

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

MC. ALFREDO PÉREZ MORALES

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado con número de registro 103374. Al Instituto Politécnico Nacional y al CICIMAR por enriquecer mi formación académica y por la beca PIFI.

Al proyecto SEP-CONACyT 61126 y a los proyectos Institucionales SIP-20100192 y 20110590 del Instituto Politécnico Nacional

A mi familia

A mi papá por heredarme la curiosidad, a mi mamá por heredarme la persistencia, a mis hermanos por estar siempre apoyándome. Gracias familia.

A mi compañera de vida

Anel, gracias por todo tu amor, cariño y comprensión, nunca hubiera culminado sin todo tu apoyo. Gracias por estar conmigo.

A los integrantes de la comisión revisora de tesis

Dra. Christine J. Band Schmidt, Dr. David A. Siqueiros Beltrones, Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, Dr. José Bustillos Guzmán, Dra. Alma S. Sobrino Figueroa.

A quienes me apoyaron en los aspectos técnicos y logísticos

Dra. Christine Band Schmidt, Dr. José Luís Ortíz Galindo, Dr. Sergio F. Martínez Díaz, Dr. José Bustillos Guzmán, Dra. Alma S. Sobrino Figueroa, M. en C. Ismael Gárate Lizárraga, Biol. Mar. Erick J. Núñez Vázquez, Biol. Rocío Pacheco Chávez y a todos los que escapan a mi memoria.

A la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) del CIBNOR por las cepas de rafdofíceas facilitadas.

Al Laboratorio Acuicultura Mahr de producción de postlarvas de camarón por los nauplios donados para la realización de esta investigación.

A la Dra. Andrea Bourdelais del Centro de Ciencias Marinas de Carolina del Norte, E. U. A. por las pruebas de detección de brevetoxinas.

Especialmente a la Dra. Aída Martínez López por sus sabios consejos y por todas sus atenciones.

A mis compañeros y amigos

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	iv
GLOSARIO.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. FLORECIMIENTOS ALGALES NOCIVOS POR RAFIDOFÍCEAS.....	4
2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS RAFIDOFÍCEAS EN MÉXICO.....	7
2.3. COMPUESTOS TÓXICOS GENERADOS POR RAFIDOFÍCEAS.....	11
2.3.1. BREVETOXINAS.....	11
2.3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	13
2.3.3. ÁCIDOS GRASOS.....	15
2.4. PERFIL DE PIGMENTOS.....	16
2.5. BIOENSAYOS CON PECES.....	18
2.6. BIOENSAYOS CON CAMARONES.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. CULTIVOS / CEPAS DE <i>Chattonella</i>	25
6.1.1. CEPAS.....	25
6.1.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS.....	25
6.1.3. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	25
6.1.4. ESCALAMIENTO.....	26
6.1.5. TALLAS.....	26
6.1.6. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS, BREVETOXINAS, ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ÁCIDOS GRASOS.....	26
6.2. <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	29
6.2.1. CAPTURA DE REPRODUCTORES.....	29
6.2.2. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES.....	29

6.2.3.	ALIMENTACIÓN Y MANTENIMIENTO.....	29
6.2.4.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE EMBRIONES.....	30
6.2.5.	TIEMPO DE DESARROLLO EN LA ONTOGENIA INICIAL.....	30
6.2.6.	ENSAYOS DE TOXICIDAD: EXPOSICIÓN DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> A DIVERSAS CEPAS DE <i>Chattonella</i>	31
6.3.	<i>Litopenaeus vannamei</i>	32
6.3.1.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE NAUPLIOS.....	32
6.3.2.	ENSAYOS DE TOXICIDAD: EXPOSICIÓN DE <i>Litopenaeus vannamei</i> A DIVERSAS CEPAS DE <i>Chattonella</i>	33
6.4.	PRUEBA PROBIT.....	34
6.5.	PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	34
7.	RESULTADOS.....	35
7.1.	CEPAS DE <i>Chattonella</i>	35
7.1.1.	DENSIDAD CELULAR, TASA DE CRECIMIENTO Y TALLA.....	35
7.1.2.	PIGMENTOS.....	37
7.1.3.	BREVETOXINAS.....	37
7.1.4.	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	38
7.1.5.	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.....	38
7.2.	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	40
7.2.1.	TIEMPO DE DESARROLLO.....	40
7.2.2.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> DE EMBRIONES EN FASE DE SEGMENTACIÓN A APTEROLARVAS.....	41
7.2.3.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i> DE EMBRIONES A APTEROLARVAS.....	42
7.2.4.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i> DE ELEUTEROEMBRIONES A APTEROLARVAS.....	43
7.2.5.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> DE EMBRIONES EN FASE DE SEGMENTACIÓN A APTEROLARVAS.....	44
7.2.6.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BAPAZ) (CSPV-3) DE EMBRIONES EN FASE DE SEGMENTACIÓN A APTEROLARVAS.....	45
7.2.7.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BACO) (CSCV-1) DE EMBRIONES EN FASE DE SEGMENTACIÓN A APTEROLARVAS.....	46
7.2.8.	CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i>	47
7.2.9.	CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EN FASE DE SEGMENTACIÓN EXPUESTOS A CEPAS DE <i>Chattonella</i>	48
7.2.10.	TIEMPO LETAL 50 DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i>	49
7.2.11.	TIEMPO LETAL 50 DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	50

7.2.12.	TIEMPO LETAL 50 DE <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> BAPAZ.....	51
7.3.	<i>Litopenaeus vannamei</i>	52
7.3.1.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1).....	52
7.3.2.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> BAPAZ (CSPV-3) Y ISJ (CSJV-2).....	53
7.3.3.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BACO) (CSCV-1).....	54
7.3.4.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1, -2 Y -3).....	55
7.3.5.	TIEMPO LETAL 50 DE <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella subsalsa</i> Y <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	56
7.3.6.	TIEMPO LETAL 50 DE <i>Litopenaeus vannamei</i> EXPUESTOS A <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1, -2 Y -3).....	57
8.	DISCUSIÓN.....	58
8.1.	CEPAS DE <i>Chattonella</i>	58
8.2.	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	68
8.3.	<i>Litopenaeus vannamei</i>	72
9.	CONCLUSIONES.....	76
10.	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	77
11.	REFERENCIAS.....	78

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Especie, clave de cepas, densidad celular máxima, tasa de crecimiento y talla (longitud y ancho) de las cepas de <i>Chattonella</i> evaluadas en este trabajo.....	36
Tabla 2. Contenido de pigmentos ($\mu\text{mol}\cdot\text{cel}^{-1}$) de cepas de <i>Chattonella</i> aisladas del Golfo de California.....	37
Tabla 3. Radical superóxido ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg proteína}^{-1}$) y peroxidación lipídica ($\text{nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) de cepas de <i>Chattonella</i> aisladas del Golfo de California.....	38
Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (%) de cepas de <i>Chattonella</i> aisladas del Golfo de California.....	39
Tabla 5. Condiciones de cultivo para cepas del género <i>Chattonella</i>	61

FIGURAS

Figura 1.	Distribución de especies de rafidofíceas ▲ <i>Chattonella</i> spp., ■ <i>Fibrocapsa japonica</i> y ▼ <i>Heterosigma akashiwo</i> en México (Hernández-Becerril & Bravo-Sierra, 1999; Cortés-Lara <i>et al.</i> , 2003; Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2004, 2005; Barraza-Guardado <i>et al.</i> , 2004; Frausto-Sotelo, 2004; Cortés-Altamirano <i>et al.</i> , 2006; Martínez-López <i>et al.</i> , 2006; Gárate-Lizárraga <i>et al.</i> , 2009a; Hakspiel-Segura <i>et al.</i> , 2009; López-Cortés <i>et al.</i> , 2011; Rodríguez-Palacio <i>et al.</i> , 2011).....	8
Figura 2.	Esqueletos estructurales de brevetoxinas tipo A y B.....	11
Figura 3.	Fases de desarrollo de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> expuestas a diversas cepas de <i>Chattonella</i> spp del Golfo de California.....	32
Figura 4.	Fases de desarrollo de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas a diversas cepas de <i>Chattonella</i> spp del Golfo de California.....	33
Figura 5.	Desarrollo embrionario (de embrión en fase de segmentación a eleuteroembrión) de la cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a 23 °C ajustado al modelo de crecimiento logístico.....	40
Figura 6.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1) ($2 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	41
Figura 7.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de embrión al ser expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1) (2, 4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	42
Figura 8.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de eleuteroembrión al ser expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1) (2, 4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	43
Figura 9.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1) ($2 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	44
Figura 10.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BAPAZ) (CSPV-3) ($4 \cdot 8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	45
Figura 11.	Mortalidad (%) de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BACO) (CSCV-1) ($4 \cdot 8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹), al dinoflagelado <i>Prorocentrum micans</i> (4 y $8 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹) y al control.....	46

Figura 12. Concentración letal 50 para embriones de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en FS= Fase de segmentación, EM= Embrión y EL= Eleuteroembrión expuestos a la cepa <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1).....	47
Figura 13. Concentración letal 50 para embriones de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en FS= Fase de segmentación, con las cepa <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1), <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (CSCV-1), <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (CSPV-3) y <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1)....	48
Figura 14. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en FS= Fase de segmentación, EM= Embrión y EL= Eleuteroembrión expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1).....	49
Figura 15. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en FS= Fase de segmentación expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1).....	50
Figura 16. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en FS= Fase de segmentación expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> BAPAZ (CSPV-3).....	51
Figura 17. Mortalidad (%) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a partir de nauplio 2 al ser expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1) con concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹ y a las microalgas control.....	52
Figura 18. Mortalidad (%) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a partir de nauplio 2 al ser expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> BAPAZ (CSPV-3) e ISJ (CSJV-2) con concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹ y a las microalgas control.....	53
Figura 19. Mortalidad (%) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a partir de nauplio 2 al ser expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (BACO) (CSCV-1) con concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹ y a las microalgas control.....	54
Figura 20. Mortalidad (%) de <i>Litopenaeus vannamei</i> a partir de nauplio 2 al ser expuestos a tres cepas de <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1, -2 y -3) con concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cel·ml ⁻¹ y a las microalgas control.....	55
Figura 21. Tiempo letal 50 para <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestos a <i>Chattonella subsalsa</i> (CSNAV-1) y a <i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i> (CSPV-3, CSJV-2 y CSCV-1)....	56
Figura 22. Tiempo letal 50 para <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestos a <i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> (CMOPAZ-1, -2 y -3).....	57

GLOSARIO

Ácidos grasos: Cadenas de hidrocarbónos unidas a un grupo carboxilo terminal; la cadena hidrocarbonada puede ser saturada (sin dobles enlaces) o insaturada (con uno o más dobles enlaces), aunque también existen ácidos grasos con enlaces triples (Mathews, 1999).

Ácidos grasos poliinsaturados: Ácidos grasos que contienen dos o más enlaces dobles. Los de las series n-3 y n-6 se consideran esenciales debido a que no pueden ser sintetizados o en su caso en pequeñas cantidades que resultan insuficientes, por lo que deben ser obtenidos del alimento ya que son necesarios para la vida de los animales (Mathews, 1999).

Aminoácidos: Moléculas orgánicas que contienen nitrógeno en forma de $-NH_2$ y un grupo carboxilo $-COOH$ unidos al mismo átomo de carbono. Son los integrantes estructurales de las moléculas de las proteínas (Mathews, 1999).

Concentración letal media (CL₅₀): Es la concentración evaluada por inmersión o ingesta que se espera cause la muerte del 50 % de la población sujeta a estudio dentro de un tiempo fijo (Bedaux & Kooijman, 1994).

Cepa: Variante genética de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada por clonación debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias (Krebs, 1985).

Curva de crecimiento: Es la curva que representa el desarrollo de una población en condiciones naturales o de cultivo (Krebs, 1985).

Dosis letal media (DL₅₀): Es la dosis suministrada directamente al organismo por inyección, vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc., la cual se espera cause la muerte del 50 % de población sujeta a estudio dentro un tiempo fijo (Bedaux & Kooijman, 1994).

Electrón: Partícula subatómica con carga eléctrica negativa, igual en magnitud a la carga positiva del protón, pero con una masa mucho menor (Nelson & Cox, 2004).

Embrión: Primer periodo de la ontogenia que inicia con la activación del huevo y finaliza con la alimentación exógena, caracterizado por la nutrición exclusiva derivada del aporte materno y por presentar tres fases: segmentación, embrión y eleuteroembrión (Belanger, 2010).

Especies reactivas de oxígeno (ERO): Término usado para designar a los radicales libres del oxígeno (O_2^- y OH^-), así como a los derivados no radicales (H_2O_2) (Nelson & Cox, 2004).

Estrés oxidativo: Situación de pronunciado desequilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, lo que provoca daños oxidativos (Cooper, 2002).

Florecimientos algales nocivos (FAN): Son una multiplicación acelerada y acumulación de algas unicelulares microscópicas de una o varias especies fitoplanctónicas en respuesta a condiciones físico-químicas del ambiente (luz, temperatura, salinidad, vientos, nutrientes, entre otros) favorables para su reproducción; en ocasiones se forman agregaciones con millones de células por litro y debido a sus pigmentos fotosintéticos pueden causar que la superficie del agua de mar cambie de color, tornándose pardo o marrón, se consideran nocivos cuando se presentan efectos por las toxinas que algunas especies producen, además de que provocan daño físico, anoxia, reducción de irradiancia solar, entre otros (Smayda, 1997).

Mastigonemas: Vellosoidades situadas en los flagelos de organismos unicelulares que sirven para orientar su movimiento (Hara & Chihara, 1987).

Nauplio: Término utilizado para designar al estadio recién eclosionado de algunos crustáceos incluyendo al camarón recién eclosionado (Williamson, 1982).

Radiación fotosintéticamente activa (PAR): Es el intervalo de longitud de onda luminosa cuya radiación es capaz de producir actividad fotosintética al ser absorbida por plantas y otros organismos fotosintéticos, como microalgas y bacterias, en general se acepta que va de los 400 a los 700 nanómetros (Kirk, 2011).

Polimorfismo: Presencia en una sola población de dos o más formas fenotípicamente distintas de una característica cuya variación se halla determinada genéticamente (Krebs, 1985).

Radical libre: Cualquier molécula que puede tener una existencia independiente y que tiene uno o más electrones no apareados (Nelson & Cox, 2004).

Tilacoide: Saco aplanado o vesícula que forma parte de la estructura de la membrana interna del cloroplasto. Es el sitio donde se realizan las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fosforilación (Cooper, 2002).

Toxicidad: Es la propiedad relativa de un químico el cual es referido a su potencial de causar daño a organismos vivos (Rand & Petrocelli, 1985).

Toxina: Substancias de naturaleza proteica o liposacárida de origen vegetal, animal o bacteriano que cuentan con una estructura química determinada que desencadena desordenes fisiológicos específicos. Puede producir efectos adversos en un sistema biológico, dañando su estructura, función o provocando la muerte (Rand & Petrocelli, 1985).

RESUMEN

Las rafidofíceas son un grupo de microalgas marinas que tienen la capacidad de producir compuestos tóxicos tales como brevetoxinas (PbTx), especies reactivas de oxígeno (ERO) y ácidos grasos poliinsaturados (AGP), los cuales pueden ser dañinos para diferentes organismos y pueden causar mortalidades principalmente en peces adultos, aunque su impacto potencial en fases iniciales de vida de peces y crustáceos se desconoce. En este estudio se caracterizaron diversas cepas de *Chattonella* spp. del Golfo de California en cuanto a densidad celular, tasa de crecimiento y talla, así como perfil de pigmentos, presencia de PbTx, ERO y perfil de ácidos grasos, además se determinó el efecto de estas cepas en embriones de *Paralabrax maculatofasciatus* y en nauplios de *Litopenaeus vannamei*, para lo cual se colocaron embriones de *P. maculatofasciatus* en fase de segmentación (FS) (1/pozo) en placas de microdilución; se adicionó por placa, 1 ml de diferentes concentraciones celulares (CC) (2 a $10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) de *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1), *C. marina* var. *marina* (CSPV-3 y CSCV-1), así como agua de mar estéril con medio f/2 y el dinoflagelado (no tóxico) *Prorocentrum micans* como controles, culminando en la fase de apterolarva. Para el caso de *L. vannamei* se colocaron nauplios en estadio 2 (1/pozo) y se adicionó por placa 1 ml de diferentes CC (0.5 a $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) de *Chattonella subsalsa*, *C. marina* var. *marina* (CSPV-3, CSJV-2 y CSCV-1), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3), así como *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica* como controles; el ensayo culminó en la fase de zoea 3. Embriones y nauplios se incubaron por triplicado a 23° C. En base a los resultados se observó que las cepas de *Chattonella* spp. presentaron un intervalo de tallas de 33.7-90 µm y 18.5-41.7 µm de longitud y ancho, respectivamente, una densidad celular de 3.17 - $4.59 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.21-0.35 div·día⁻¹. Los pigmentos determinados son característicos de rafidofíceas; todas las cepas produjeron ERO, no se detectaron PbTx, y presentaron un perfil característico de ácidos grasos. En cuanto al efecto sobre los organismos probados se determinó que en *P. maculatofasciatus*, las cepas de *Chattonella* spp. provocan porcentajes de mortalidad diferentes sobre las fases iniciales del desarrollo; la FS fue la más sensible con mortalidades del 98 % con *C. subsalsa*. La cepa de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) provocó mortalidad en embriones con una CL₅₀ de $1.73 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, mientras que *C. subsalsa* provocó altas mortalidades con un TL₅₀ de 20 h. Las cepas de *C. marina* var. *ovata*, seguido de *C. marina* var. *marina* (CSPV-3) mostraron las mayores mortalidades de las larvas, las cuales se incrementaron gradualmente conforme a la concentración celular (2 , 4 , 6 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹). En *L. vannamei* no se observó efecto en la fase de nauplio, solo en la fase de zoea. La mortalidad mayor (100%) de *L. vannamei* la causaron las cepas de *C. marina* var. *ovata* CMOPAZ-2 y CMOPAZ-3 en concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ con un TL₅₀ de 3 días y 19 h. Estos resultados muestran un efecto diferencial entre las diversas cepas de *Chattonella* spp. y sus concentraciones al ser suministradas a embriones de *P. maculatofasciatus* y a nauplios de *L. vannamei*. Las cepas de *Chattonella* spp. evaluadas causaron efectos tóxicos en la ontogenia inicial de peces y crustáceos, reflejándose en altos porcentajes de mortalidad.

ABSTRACT

Raphidophyceans are a group of marine microalgae that have the ability to produce toxic compounds such as brevetoxins (PbTx), reactive oxygen species (ROS) and polyunsaturated fatty acids (AGP), which can be harmful to different organisms and can cause mortality mainly in adult fish, although its potential impact on early life stages of fish and crustaceans is unknown. In this study we characterized various strains of *Chattonella* spp. in the Gulf of California, in terms of cell density, growth rate and size as well as profile of pigments, the presence of PbTx, ROS and fatty acid profile, in addition, we determined the effect of these strains on *Paralabrax maculatofasciatus* embryos and *Litopenaeus vannamei* nauplii, for which, embryos of *P. maculatofasciatus* on segmentation stage (SS) were placed (1/well) in microdilution plates, were added 1 ml per plate of different cell concentrations (CC) (2 to $10 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹) of *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1), *C. marina* var. *marina* (CSPV-3 and CSCV-1), as well as sterile seawater with f/2 medium and the dinoflagellate (nontoxic) *Prorocentrum micans* as controls, culminating in apterolarva phase. In the case of *L. vannamei*, nauplii in stage 2 were placed (1/well) and added 1 ml per plate of different CC (0.5 to $6 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹) of *C. subsalsa*, *C. marina* var. *marina* (CSPV-3, CSJV-2 and CSCV-1), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 and -3), as well as *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis suecica* as controls, culminating in the zoea 3 stage. Embryos and nauplii were incubated in triplicate at 23° C. Based on the results, *Chattonella* strains showed a size range of 33.7-90 µm and 18.5-41.7 µm of long and wide, respectively, a cell density of 3.17 - $4.59 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹ and growth rate from 0.21 to 0.35 div·day⁻¹. The pigments found are characteristic of raphidophyceans, all strains produced ROS, was not detected PbTx, and presented a characteristic profile of fatty acids. Regarding the effect on the organisms tested, was determined that in *P. maculatofasciatus*, *Chattonella* spp strains cause different mortality rates on the early stages of development, the SS was the most sensitive with 98% mortality with *C. subsalsa*. The strain of *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) caused mortality in embryos with an LC₅₀ of $1.73 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹, while *C. subsalsa* caused high mortality with a LT₅₀ of 20 h. Strains of *C. marina* var. *ovata*, followed by *C. marina* var. *marina* (CSPV-3) showed the highest mortality of the larvae, which increased gradually as the cell concentration (2, 4, 6 and $8 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹). In *L. vannamei* not was observed effect on the nauplii stage, only in the zoea stage. The higher mortality (100%) of *L. vannamei* was caused by the strains of *C. marina* var. *ovata* CMOPAZ-2 and CMOPAZ-3 at concentrations of $3 \cdot 10^3$ cell·ml⁻¹, with a LT₅₀ of 3 day and 19 h. These results show a differential effect between the various strains of *Chattonella* spp. and their concentrations to be supply to embryos of *P. maculatofasciatus* and nauplii of *L. vannamei*. The strains of *Chattonella* spp. caused toxic effects in the early ontogeny of fish and crustaceans, reflected in high rates of mortality.

1. INTRODUCCIÓN

Las rafdofíceas son fitoflagelados unicelulares que se clasifican en la Clase Raphidophyceae dentro de la división Heterokontophyta. La Clase Raphidophyceae se encuentra dividida en tres géneros de agua dulce (*Gonyostomum*, *Merotrichia* y *Vacuolaria*) y cinco géneros marinos (*Chattonella*, *Chlorinimonas*, *Fibrocapsa*, *Haramonas* y *Heterosigma*) (Yamaguchi *et al.*, 2010). Existen especies de agua dulce y marinas con longitudes de 10 μm (*Heterosigma akashiwo*) a 130 μm (*Chattonella antiqua*) (Hallegraeff & Hara, 1995). Diversas especies de rafdofíceas pueden formar florecimientos algales nocivos (FAN) provocando agotamiento de oxígeno (anoxia); además, generan compuestos mortalmente tóxicos para diversos organismos marinos, principalmente peces, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector pesquero (Kimura *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2008; Jugnu & Kripa, 2009).

Las rafdofíceas presentan características bioquímicas y morfológicas singulares: son móviles, cuentan con dos flagelos que emergen de la parte anterior de la célula, el flagelo anterior presenta mastigonemas, es más largo, dinámico y dirigido hacia adelante conteniendo mastigonemas (Andersen, 2004); el flagelo más corto es rígido, liso y se encuentra pegado al cuerpo (Hara & Chihara, 1987). La forma de la célula puede ser esférica, ovoide, elongada o periforme, ligeramente comprimida dorso-ventralmente, dependiendo de los factores ambientales y de las condiciones de cultivo (Hallegraeff & Hara, 1995; Tomas, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2004).

Inicialmente este grupo fue considerado exclusivamente de agua dulce, sin embargo también se encuentran en ambientes salobres o marinos, incluso habitan en sustratos arenosos tales como las especies de los géneros *Haramonas* y *Chlorinimonas* (Yamaguchi *et al.*, 2010). Se encuentran en aguas costeras templadas, subtropicales y subárticas (Itakura *et al.*, 1996). Su coloración varía de verde brillante (especies de agua dulce) a dorado-pardo o pardo (especies marinas), contienen pigmentos fotosintetizadores como clorofila *a*, *c*₁ y *c*₂, y β -caroteno; las rafdofíceas de agua dulce contienen diadinoxantina, heteroxantina y

vauqueriaxantina y las especies marinas contienen fucoxantina, violaxantina, auroxantina y zeaxantina (Potter *et al.*, 1997; Mostaert *et al.*, 1998).

Las células son desnudas o con una delgada capa mucilaginosa, contienen diversos aparatos de Golgi y poseen un núcleo grande (Jeffrey *et al.*, 1997; Andersen, 2004). Presentan eyectosomas (*Heterosigma*), tricocistos y mucocistos (*Chattonella* y *Fibrocapsa*) que se descargan fácilmente, así como numerosos cloroplastos (10-30) alojados principalmente en la periferia del citoplasma (Hallegraeff & Hara, 1995).

Se ha reportado en diversas regiones del mundo que los FAN de rafidofíceas están asociados con altas mortalidades de peces, ocasionando pérdidas millonarias, principalmente en la piscicultura (Hershberger *et al.*, 1997; Twiner *et al.*, 2001; Jugnu & Kripa, 2009). No obstante, en poblaciones naturales los impactos de los FAN de rafidofíceas no se han cuantificado con precisión (Backe-Hansen *et al.*, 2001; Bourdelais *et al.*, 2002).

Diversos autores han abordado el estudio de los efectos que provocan las rafidofíceas en organismos superiores, aunque poco se conoce en relación a los mecanismos de acción de los metabolitos tóxicos producidos por las rafidofíceas, tales como la producción de brevetoxinas/compuestos similares a las brevetoxinas (PbTx) (Khan *et al.*, 1996a, b, 1997, 1998), especies reactivas de oxígeno (ERO) (Oda *et al.*, 1997; Twiner & Trick, 2000; Marshall *et al.*, 2002a), óxido nítrico (NO) (Kim *et al.*, 2006, 2008), ácidos grasos poliinsaturados libres (AGPI) (Marshall *et al.*, 2002b, 2003), compuestos hemoaglutinantes y hemolisinas (Fu *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2005; De Boer *et al.*, 2009)

Las rafidofíceas son altamente sensibles a los fijadores usados comúnmente para la preservación de muestras de fitoplancton; previo al año 2000 no se habían detectado en costas mexicanas. A la fecha, la observación de muestras de fitoplancton *in vivo* y la especialización del personal encargado de revisar las muestras ha sido fundamental para detectar la presencia de este y otros grupos de fitoflagelados en aguas mexicanas (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2011). Recientemente se ha registrado la presencia de varias especies de rafidofíceas con potencial tóxico:

Chattonella marina, *C. subsalsa*, *C. marina* var. *ovata*, *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo* (Band-Schmidt *et al.*, 2005; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2011; Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011), las cuales se han asociado a mortandades de peces en el rango de 48 a 60 toneladas (t) (Cortés-Altamirano *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios se centran en los efectos nocivos que causan las rafdofíceas en peces adultos y en moluscos (Hallegraeff *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). Aún se desconoce si el estar en contacto con fases larvarias en el ambiente provoque mortalidades de importancia que perjudiquen al reclutamiento y por ende a las pesquerías.

En este documento se presentan los resultados de la caracterización de cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California, tales como: crecimiento, morfología, perfil de pigmentos, así como la detección de brevetoxinas, especies reactivas de oxígeno y perfil de ácidos grasos. Además, se presentan los resultados de bioensayos realizados con las diversas cepas de *Chattonella* para evaluar su potencial tóxico en embriones de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y en nauplios de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1. FLORECIMIENTOS ALGALES NOCIVOS POR RAFIDOFÍCEAS

Florecimientos algales nocivos (FAN) causados por rafidofíceas se han documentado en diversas regiones del mundo. Los primeros reportes se remontan a 1964 en el Mar Interior de Seto, Japón, donde provocaron altas mortalidades de peces en cultivo (*Seriola quinqueradiata*, *S. rivoliana*, *Spondylisoma cantharus* y *Pagrus major*), originadas principalmente por *C. antiqua*, *C. marina* y *H. akashiwo*, durante las décadas de los 70's y 80's. Estos eventos se presentaron recurrentemente cada año al inicio de la primavera cuando la temperatura del agua se incrementó a 25 °C y la irradiancia osciló entre 30 y 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ (Okaichi, 1989). En la parte Este del Mar Interior de Seto, las rafidofíceas y en particular *C. antiqua* ocasionaron en 1972, pérdidas a los acuacultores por 7.1 billones de yen (~\$60 millones de dólares) al provocar la muerte de 14.2 millones de peces marinos (*S. quinqueradiata*). Se ha estimado que la densidad celular mínima letal para *S. quinqueradiata* es de $11\cdot 10^4$ cél·L⁻¹ de *C. antiqua*, estas densidades son más bajas que las necesarias para causar decoloración en el agua ($1\cdot 10^6$ cél·L⁻¹) (Nakamura & Watanabe, 1983; Imai *et al.*, 2006). Últimamente se ha reportado que las rafidofíceas forman FAN regularmente de julio-agosto en estas localidades.

En la Bahía de Osaka, Japón en 1978, se presentó una serie de cinco eventos de FAN de junio a octubre con una duración de 30 a 40 días (20-27 °C, 13-33 ups y pH 8-8.4), durante estos brotes periódicos se observó que los cambios de salinidad favorecieron a *H. akashiwo* particularmente al declinar la salinidad (Watanabe *et al.*, 1982). Esta especie ha causado mortalidades de peces en diversas regiones, en 1989 se documentó un denso florecimiento de *H. akashiwo* ($0.5\text{-}2\cdot 10^6$ cél·L⁻¹) en la Bahía de Big Glory, Isla Steward, Nueva Zelanda, que provocó la mortalidad de salmones "chinook" en cultivo con pérdidas por 600 toneladas (t) (Chang *et al.*, 1990). En la zona de Puget Sound, frente a Washington (E. U. A.) se asoció un florecimiento de *H. akashiwo* a salmones silvestres muertos durante el otoño de 1994. Diversos investigadores han observado que en esta localidad dichos eventos también provocan altas mortalidades de salmón cultivado en jaulas flotantes, generando pérdidas para los piscicultores con un estimado de 4 a 5 millones de

dólares por año (Horner *et al.*, 1997). En abril de 1995 un FAN generado por *H. akashiwo* se registró en la Bahía de Kagoshima, Japón, prolongándose por varias semanas causando mortalidad de peces marinos (*S. quinqueradiata*) en cultivo, durante este evento la concentración celular registrada fue mayor a $1 \cdot 10^8$ cél·L⁻¹ (Khan *et al.*, 1997).

En particular con el género *Chattonella* se documentaron dos reportes de FAN en la década de los 90's. El primero en la Bahía de Boston al Sur de Australia durante los meses de abril a mayo de 1996, donde se observó un FAN de *Chattonella marina* con concentraciones superiores a $66 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹, este evento se asoció a la mortalidad del 75 % del total del stock de atunes de aleta azul (*Thunnus maccoyii*) en cultivo con un estimado de 1,700 t y con pérdidas valuadas en 40 millones de dólares (Hallegraeff *et al.*, 1998). El segundo fue en el lago salado de Salton Sea, California (E. U. A.), donde *C. marina* fue observada por primera vez en 1997 de abril a noviembre con densidades de $6 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹, causando mortalidades en peces principalmente tilapia (*Oreochromis mossambicus*), posteriormente en julio de 1998 y agosto de 1999 se presentó *C. marina* con concentraciones más elevadas (2.2 y $11.5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, respectivamente) (Tiffany *et al.*, 2001).

A partir del año 2000 a la fecha el registro de estas especies ha ido en aumento, en la costa Oeste de Dinamarca se registraron durante mayo del 2000, diversos eventos de FAN provocados principalmente por *Chattonella* sp. Lu & Göbel (2000) reportaron su presencia en tres puntos principalmente, uno a 10 km frente a la Isla Sylt, el siguiente de 10-18 km frente a la costa de Esbjerg y el último a 10 km frente a Hirtshals, con densidades celulares de 10, de 8.7 a 11 y de $1.8 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, respectivamente. Cerca de esta localidad, en la Bahía de Flødevigen (Noruega) se presentó un florecimiento de *C. marina* en marzo del 2001 con densidades relativamente altas, donde en 10 de las 19 estaciones se registraron más de $5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, con una concentración máxima de $12.5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, en este evento Lars-Johan *et al.* (2002) mencionaron que *H. akashiwo* estuvo presente en todas las estaciones con densidades promedio de $5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹ y una máxima de $13.5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, además estimaron que este florecimiento provocó la mortalidad de 1,100 t de salmón.

FAN de *Chattonella marina* se han reportado para las costas de la India al Norte de Kerala durante septiembre de 2002 y 2003 con densidades celulares máximas de $28 \cdot 10^7$ y $13.5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, respectivamente con una extensión de 50 km y un ancho de 3 km aproximadamente. *C. marina* fue la especie dominante aunque otras especies de fitoplancton estuvieron presentes resaltando: *Coscinodiscus asteromphalus* ($8 \cdot 10^4$ cél·L⁻¹), *Pleurosigma normanii* ($2 \cdot 10^4$ cél·L⁻¹) y *Noctiluca sigma* (552 cél·L⁻¹). Jugnu & Kripa (2009) detectaron que durante los eventos de FAN de *C. marina* las pesquerías en esta zona fueron modificadas, ya que especies que se capturaban habitualmente permanecieron ausentes, principalmente los crustáceos: *Portunus pelagicus*, *P. sanguinolentus*, *Parapenaeopsis stylifera* y *Metapenaeus dobsoni* y los peces zooplanctófagos *Stolephorus* spp., *Thryssa* spp. y *Leiognathus* spp. Además notaron que decrecieron las capturas de especies de niveles tróficos intermedios mientras que las capturas de depredadores tope aumentaron.

En septiembre de 2007 *Chattonella globosa* fue observada al Este del Estrecho de Skagerrak (Noruega) extendiéndose hacia la costa Oeste a inicios de noviembre. En 2008 fue la especie dominante al presentarse con una densidad de $53 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹, reportándose también la presencia de *Pseudochattonella* sp. y *Heterosigma akashiwo*, ocasionando una mortalidad de 100 t de peces marinos cultivados en jaulas (Lømsland *et al.*, 2010).

Frente a las costas y estuarios de Uruguay, se han asociado mortalidades masivas de peces con rafdofíceas, estos episodios han coincidido con cambios abruptos de salinidad. Méndez *et al.* (2010) a partir de revisar muestras de fitoplancton *in vivo* de éstas localidades desde el 2007, han observado: *Chattonella marina* var *antiqua*, *F. japonica* y *H. akashiwo* de enero a mayo, coincidiendo justo cuando la temperatura del agua oscila de 17 a 22 °C y la salinidad de 24.7 a 33.4 ups. Efectos similares fueron observados en Grecia a finales de febrero de 2009, donde se detectaron peces muertos de poblaciones naturales y de cultivo en jaulas flotantes en los Golfos de Maliaco y Thermaikos durante un FAN. Los peces presentaron la vejiga natatoria inflamada y espesa mucosidad en branquias. El fitoplancton obtenido de las branquias fue identificado como *Chattonella* sp. siendo esta la especie dominante en muestras de fitoplancton con densidades de 0.05 a

$1.3 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹, Yiagnosis *et al.* (2010) reportaron que el fenómeno terminó en mayo con toneladas de peces muertos de diversas especies (*Mugil cephalus*, *Pagellus erythrinus*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* y *Umbrina cirrosa* entre otros).

2.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS RAFIDOFÍCEAS EN MÉXICO

Rafidofíceas con potencial tóxico de los géneros: *Chattonella*, *Fibrocapsa* y *Heterosigma* se han observado recientemente en el litoral Mexicano (Fig. 1), tanto para las costas del Océano Pacífico y Golfo de California, como para las costas del Golfo de México (Cortés-Lara *et al.*, 2003; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2006; Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011).

En la Bahía Matanchén, Nayarit, un florecimiento de *Fibrocapsa japonica* se presentó en febrero del 2003 con concentraciones de 4 a $6 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹ dominando con el 97 % sobre el resto del fitoplancton (Cortés-Lara *et al.*, 2003). En mayo del mismo año en la Bahía Kun Kaak, Sonora, pescadores de la zona observaron grandes mortalidades de peces en las playas, así como de almejas, pulpos y pepinos de mar en el fondo marino, en un área de 95 km². Barraza-Guardado *et al.* (2004) reportaron la presencia de *Chattonella marina* en concentraciones de 4.8 a $5.7 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹ en estaciones costeras, $3.2 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹ en estaciones a 1 km paralelas a la costa y $1.4 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹ en el fondo marino. Las especies de peces afectados fueron: *Haemulopsis nitidus*, *Ophichthus triserialis*, *Congriperla estriada*, *Ophiodon galaeoides*, *Gnathypops snyderi*, *Citarichthys gilberti*, y de moluscos fueron: *Atrina maura*, *A. tuberculosa*, *Pinna rugosa*, *Dosinia ponderosa*, *Megapitaria aurantiaca*, *M. squalida*, *Chione gnidia*, *Hexaplex erythrotomus* y *Laevycardium elatum*. En el estado colindante de Sinaloa sobre la costa Este del Golfo de California, se observó en la Laguna de Navachiste, en septiembre del 2005, un FAN de *C. subsalsa* con concentraciones de entre 5 y $9.6 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹, Martínez-López *et al.* (2006) notaron que las condiciones ambientales durante este evento fueron favorables para el desarrollo de *C. subsalsa*: temperatura promedio de 33.1 °C, 38.5 ups, 7.9 pH, 6.8 mg·L⁻¹ O₂, 0.28 µM NO₂, 0.64 µM NO₃, 4.4 µM NH₃, 0.46 µM PO₄.

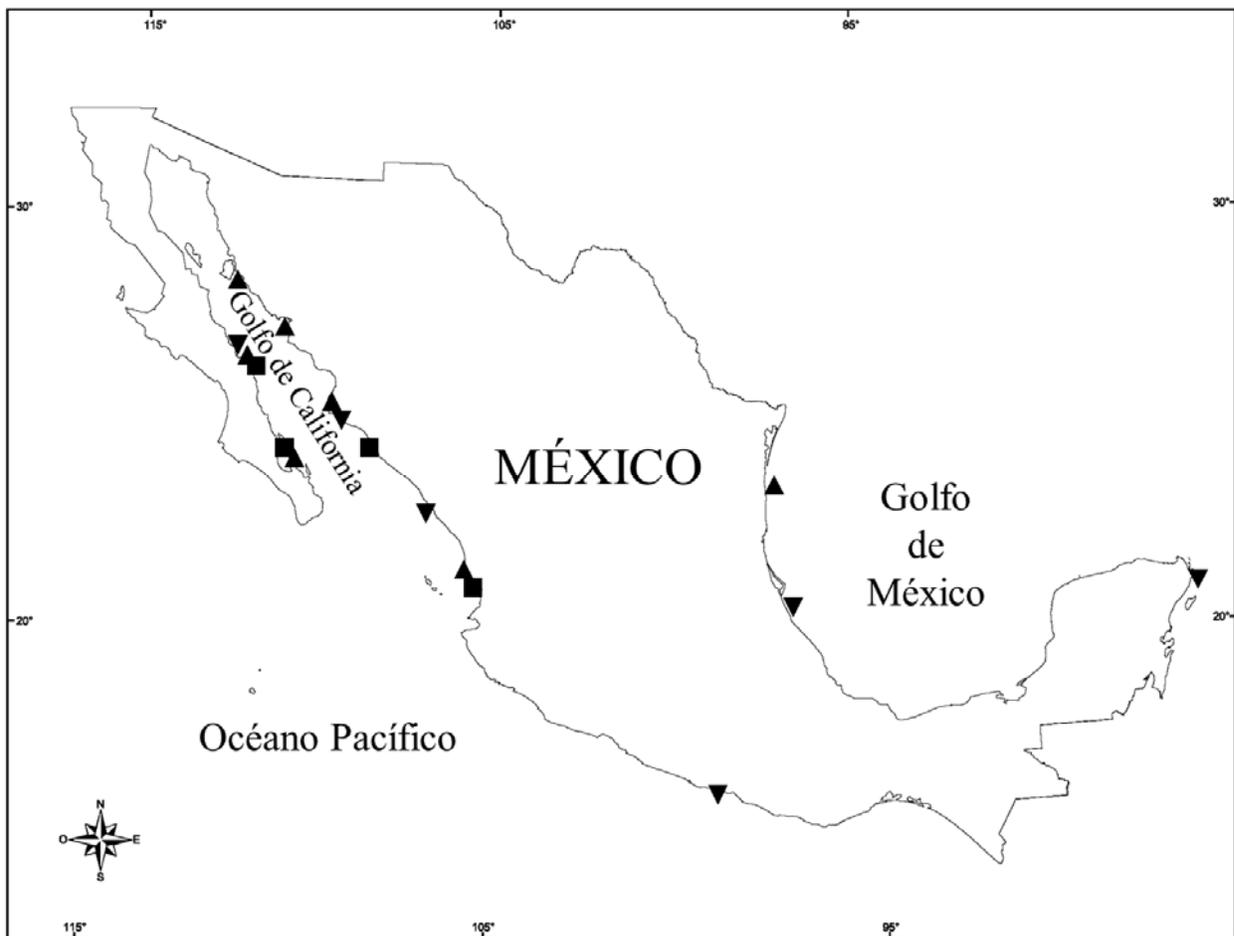


Figura 1. Distribución de especies de rafidofíceas ▲*Chattonella* spp., ■*Fibrocapsa japonica* y ▼*Heterosigma akashiwo* en México (Hernández-Becerril & Bravo-Sierra, 1999; Cortés-Lara *et al.*, 2003; Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2005; Barraza-Guardado *et al.*, 2004; Frausto-Sotelo, 2004; Cortés-Altamirano *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a; Hakspiel-Segura *et al.*, 2009; López-Cortés *et al.*, 2011; Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011).

Florecimientos de *Chattonella marina* y *C. ovata* se han observado en las costas de Sinaloa. De abril a mayo del 2006 se formó un FAN con densidades máximas de $7.5 \cdot 10^5$ cél·L⁻¹, bajo condiciones físico-químicas en promedio de 22 °C, 34.6 ups y 5.3 mg·l⁻¹ O₂, provocando mortalidades de peces pelágicos tales como palometas (*Trachinotus paitensis*), peces bentónicos, moluscos y crustáceos. Aunque no fueron identificadas las especies que fueron afectadas al concluir este evento, lograron realizar un estimado de 12,000 a 15,000 peces aproximadamente o

su equivalente de 48 a 60 toneladas que se encontraron distribuidas a lo largo de 3 km de playa (Cortés-Altamirano *et al.*, 2006).

En el estado de Tamaulipas se han reportado dos registros de FAN por *Chattonella*, el primero en el estero de Barberena en Tamaulipas donde en mayo del 2007 se registró a *C. subsalsa* con una concentración máxima de $61.3 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, posteriormente en abril del 2008 se presentó *C. marina* en el estero de Garrapatas con una concentración de $95.6 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, a pesar de que en estos dos eventos se presentaron otras especies fitoplanctónicas durante los FAN, ambas especies dominaron con abundancias relativas superiores al 90 % (Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011).

En el estero El Tortugón y en la boca de la laguna costera de Macapule, Sinaloa se reportaron durante los meses fríos de enero-abril del 2008 proliferaciones de *Heterosigma* ($4.6 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹) coincidiendo con los máximos niveles de clorofila *a* detectados ($201 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) sin registrarse mortalidades de peces (Hakspiel-Segura *et al.*, 2009). *H. akashiwo* ha sido detectada en diversas zonas costeras tales como Tuxpan, Ver., Acapulco, Gro. y Puerto Morelos, Q. Roo (Hernández-Becerril & Bravo-Sierra, 1999; Band-Schmidt *et al.*, 2004).

Recurrentemente en la Bahía de La Paz, B. C. S. se ha detectado la presencia de rafidofíceas, durante abril a mayo de 2005 se observó un florecimiento de *C. marina* con concentraciones de 1.9 a $3.5 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹ a una temperatura de 22° C (Band-Schmidt *et al.* 2005) sin registro de mortandad de peces. Posteriormente de diciembre de 2008 a mayo de 2009 se identificaron células de *Chattonella* y *Fibrocapsa* a partir de muestras de red de fitoplancton, aunque se presentaron en bajas concentraciones. *C. marina* fue reportada en diciembre de 2008 y en febrero de 2009, *F. japonica* fue encontrada en mayo de 2009. *C. marina* var. *ovata* se registró de enero a mayo de 2009, con concentraciones desde $3 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹ en febrero a $37 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹ en marzo de este mismo año, las condiciones físicas y químicas asociadas a estos flagelados fueron de 20.8 a 21.5 °C en marzo y de 21.2 a 22 °C en abril, nitratos de 0.47 a 8 µM, ortofosfatos de 0.2 a 1.5 µM, clorofila *a* de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2009a; López-Cortés *et al.*, 2010). A su vez, de finales de marzo a mediados de mayo del 2009, se documentó la interacción de *C. marina* y

Gymnodinium catenatum; *C. marina* fue la especie más abundante con densidades desde $14 \cdot 10^3$ hasta $36 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹ a nivel sub-superficial, mientras que *G. catenatum* se registró con densidades de $1 \cdot 10^3$ a $19 \cdot 10^3$ cél·L⁻¹, López-Cortés *et al.* (2011) asociaron este evento a la disminución de los procesos de mezcla que se suscitaron en estas fechas en la Bahía de La Paz.

Recientemente se identificaron las especies del género *Chattonella* que habitan en el Golfo de California, utilizando las cepas CSPV-1, -2 y -3 aisladas de la Bahía de La Paz, B. C. S. en el 2003, la cepa CSNAV-1 aislada de la Bahía de Navachiste, Sin. en el 2006, la cepa CSCV-1 aislada de Bahía Concepción, B. C. S. en el 2000, la cepa CSJV-1 aislada de las costas de la Isla San José, B. C. S. en el 2007 y la cepa CSPAZ-1 aislada de la Bahía de La Paz, B. C. S. en el 2009. Mendoza-Flores (2011) observó a partir de la región 5.8S del ADN ribosomal y del gen COI del genoma mitocondrial que las cepas forman dos grupos, el primero compuesto por *Chattonella subsalsa* y el segundo por *C. marina*, *C. antiqua* y *C. ovata*, siendo estas últimas especies consideradas como un subgrupo, ya que determinó que los valores de divergencia evolutiva que tienen estas cepas en ambas regiones no son lo suficiente grandes como para separar en especies diferentes al complejo *marina/antiqua/ovata*, por lo que estableció en su estudio que las cepas aisladas del Golfo de California se dividen en dos especies para el género *Chattonella*, siendo éstas: *Chattonella subsalsa* y *Chattonella marina* con las variedades, *marina* y *ovata*.

2.3. COMPUESTOS TÓXICOS GENERADOS POR RAFIDOFÍCEAS

2.3.1. BREVETOXINAS

Las brevetoxinas (PbTx) son neurotoxinas poliéter cíclicas, liposolubles, incoloras, insípidas, estables al calor y a los ácidos (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Se han identificado diez compuestos bioactivos pertenecientes al grupo de las PbTx, derivados de dos esqueletos básicos (Fig. 2), clasificados con base en su estructura química como tipo A con un esqueleto flexible de 10 anillos éter y tipo B con un esqueleto rígido de 11 anillos éter (Lin *et al.*, 1981; Shimizu *et al.*, 1986; Baden, 1989).

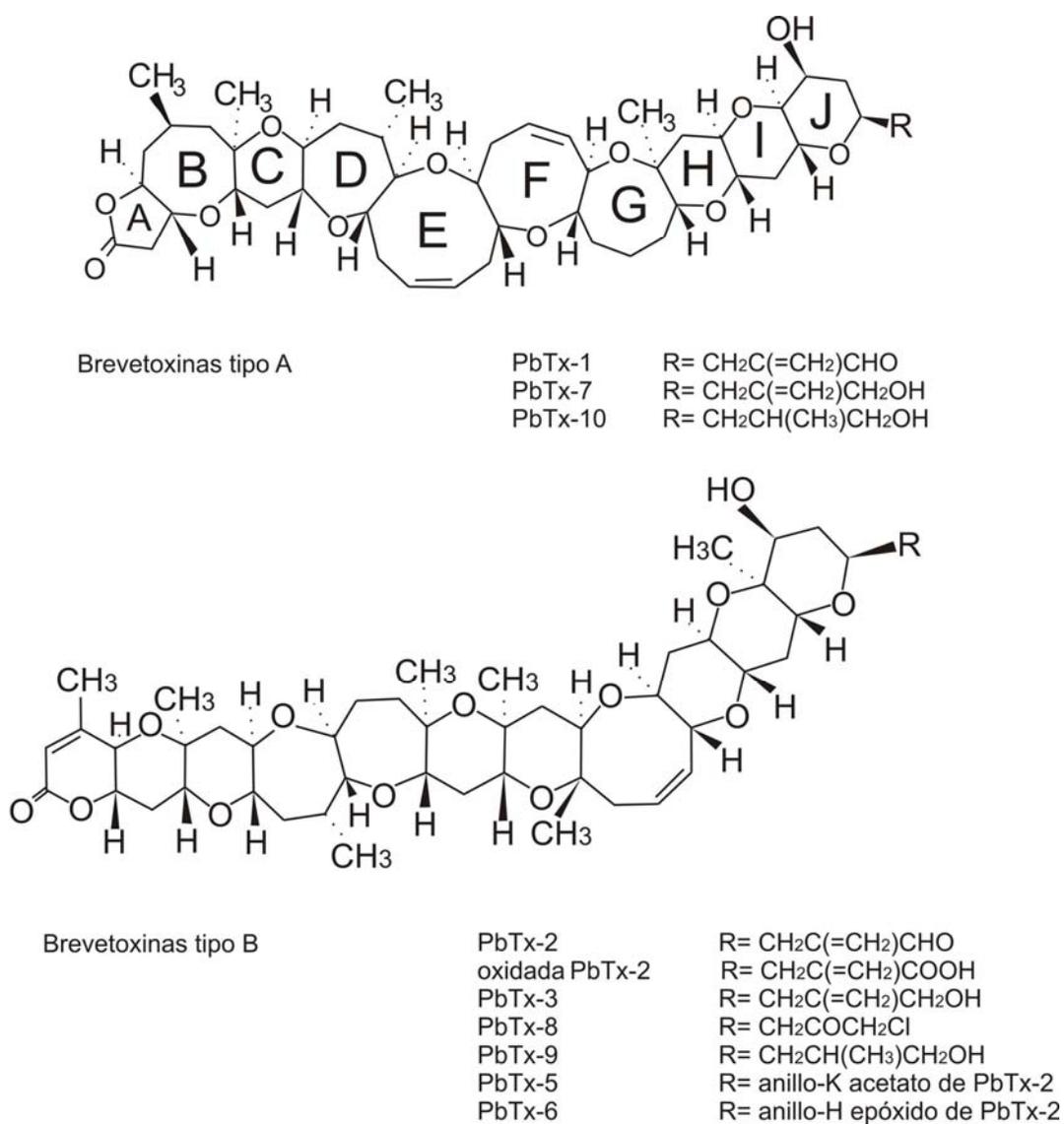


Figura 2. Esqueletos estructurales de brevetoxinas tipo A y B.

Las PbTx cuentan con enlaces específicos que tienden a unirse con afinidad y especificidad a los canales del ión sodio (Na^+) sensibles al voltaje (CSSV), enlazándose en el sitio 5 del canal y alterando sus propiedades biofísicas. Además, estimulan e incrementan la permeabilidad de la membrana plasmática. Los efectos de esta unión cambian el potencial de activación de los CSSV hacia valores más negativos (el potencial normal al interior de la pared celular se encuentra entre -90 y -40 mV), provocando su apertura e impidiendo su inactivación, facilitando la entrada de iones de Na^+ a la célula e incrementando la tasa de liberación de neurotransmisores en respuesta a una estimulación nerviosa (Baden, 1989; Jeglitsch *et al.*, 1998). Las PbTx causan efectos neurotóxicos en el sistema nervioso central; debido a una prolongada despolarización de la membrana ocurre una desestabilización celular, causando agudas lesiones neuronales y muerte de neuronas (Manger *et al.*, 1995; Jeglitsch *et al.*, 1998). Los CSSV son fundamentales para el óptimo funcionamiento de corazón, neuronas y músculos (Baden, 1989; Baden *et al.*, 2005).

Las PbTx fueron identificadas por primera vez en el dinoflagelado *Karenia brevis* (*Ptychodiscus brevis*), sin embargo se ha documentado que las rafdofíceas son capaces de generar estas toxinas. En estudios realizados con *C. marina* se han identificado 4 toxinas que corresponden a las PbTx-2, PbTx-9, PbTx-3 y PbTx-2 oxidada (Onoue *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1995, 1998). Trabajos similares se han realizado con *F. japonica* en donde se han determinado 5 compuestos denominados como: FjTx-I, FjTx-II, FjTx-IIIa, FjTx-IIIb y FjTx-IV, los cuales son idénticos estructuralmente a PbTx-1, PbTx-2, PbTx-9, PbTx-3 y PbTx-2 oxidada respectivamente. En la fase exponencial y estacionaria de crecimiento de *F. japonica* se ha observado que la FjTx-II es la más abundante (Khan *et al.*, 1996). En otras investigaciones, se identificaron 4 compuestos neurotóxicos en *H. akashiwo* los cuales fueron denominados como: HaTx-I, HaTx-IIa, HaTx-IIb y HaTx-III que correspondieron a las brevetoxinas PbTx-2, PbTx-9, PbTx-3 y PbTx-2 oxidada (Khan *et al.*, 1997). Después de 1998, no hay reportes de PbTx en rafdofíceas, al parecer fue un falso positivo (Bourdelais *com. per.*).

2.3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que derivan del oxígeno tales como los aniones superóxido (O_2^-), radicales libres hidroxilo (OH^\cdot) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Tanaka *et al.*, 1994). Las ERO presentan diferente grado en el proceso de reducción, por orden creciente de reactividad se presentan: el anión superóxido (O_2^-) que es un potente agente oxidante muy reactivo con el agua, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) que es el más reactivo de los anteriores (Mathews, 1999; Nelson & Cox, 2004). Éstos tres representantes de ERO son los que exhiben mayor capacidad de difusión y de reacción. El OH^\cdot está implicado en reacciones tales como la peroxidación de lípidos y la generación de otros radicales tóxicos que pueden producir lesiones celulares (Alberts *et al.*, 1994; González *et al.*, 2001).

Los organelos identificados que producen ERO dentro de las células eucariotas son: los cloroplastos (fotosíntesis), las mitocondrias (fosforilación oxidativa), la membrana plasmática (lipooxigenasa y prostaglandina sintetasa), el retículo endoplásmico (citocromos) y los peroxisomas citoplasmáticos (oxidasas y catalasas) (Alberts *et al.*, 1994; Mathews, 1999; Irihimovitch & Shapira, 2000).

Estas moléculas provocan estrés oxidativo, a nivel celular desnaturalizan enzimas, despolimerizan polisacáridos, causan daños genéticos y pueden ocasionar muerte celular (Okamoto y Colepicolo, 1998; Marshall *et al.*, 2003). Además, interactúan rápidamente con otras moléculas y son capaces de modificar pequeñas biomoléculas libres (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos simples, lípidos), macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) y estructuras supramoleculares (membranas y lipoproteínas) ocasionando efectos dañinos en un amplio rango de biomoléculas esenciales tales como la dimerización del ADN que se sostiene en las sucesivas duplicaciones de la célula, repitiéndose los errores de lectura del código genético, dando lugar a mutaciones (Alberts *et al.*, 1994; Cooper, 2002; Nelson & Cox, 2004). Durante la peroxidación de lípidos de la membrana celular (producidos por oxidación de ácidos grasos) dan origen a productos tóxicos que a su vez, producen con el tiempo la destrucción progresiva de la membrana celular al perder su impermeabilidad y fluidez por alteración de los gradientes iónicos, con lo que se

pierde su capacidad de barrera selectora culminando con la muerte celular. Participan en el entrecruzamiento de proteínas (aminoácidos) de membranas plasmáticas e intracelulares, en la inhibición de enzimas asociadas a las membranas plasmáticas y mitocondriales, provocando la pérdida de su integridad y función, inclusive ocasionan la ruptura de organelos celulares (Alberts *et al.*, 1994; Mathews, 1999; Nelson & Cox, 2004).

La generación de especies reactivas de oxígeno es una característica común de las rafdofíceas (Marshall *et al.*, 2005a, b), que se ha asociado a efectos adversos en organismos acuáticos, contribuyendo a cambios patológicos en las branquias de los peces (Ishimatsu *et al.*, 1996a; Tiffany *et al.*, 2001). En comparación con otras especies de microalgas, las rafdofíceas producen altos niveles de radical hidroxilo (OH^\cdot), anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sin estar en condiciones desfavorables o de estrés ($>2 \text{ nmol } 10^4 \text{ cél}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Twiner *et al.*, 2001). La mayoría de especies del género *Chattonella* producen ERO, aunque también se han detectado ERO en otras especies de rafdofíceas, tales como *Heterosigma akashiwo* y *Fibrocapsa japonica*, que producen O_2^- y H_2O_2 (Marshall *et al.*, 2005a, b). Se ha documentado que la producción de ERO por parte de las rafdofíceas es directamente proporcional a su densidad celular, pero cuando alcanzan la fase estacionaria las proporciones entre las ERO cambian, ya que algunas disminuyen rápidamente tal como ocurre con el anión superóxido (O_2^-) que se presenta en mayores cantidades durante la fase de crecimiento exponencial (Kawano *et al.*, 1996; Twiner & Trick, 2000).

Las especies del género *Chattonella* son las que presentan una mayor producción de ERO dentro de las rafdofíceas; aproximadamente $1,950 \text{ pmol min}^{-1} \times 10^4 \text{ cél}^{-1}$ (Kawano *et al.*, 1996), 25% más que *H. akashiwo* (Twiner & Trick, 2000). Twiner *et al.* (2001) mencionaron que diversas poblaciones de una misma especie separadas geográficamente producen diferentes niveles de ERO, tal como el H_2O_2 en *H. akashiwo* con rangos de 0.14 a 0.90 μM .

El método para determinar la producción de radicales superóxido (O_2^-) mediante la técnica de espectrofotometría durante la reducción del ferricitocromo c, así como el método para cuantificar la peroxidación de lípidos a partir de la medición

de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) propuestos por Drossos *et al.*, 1995 y Ohkawa *et al.*, 1979 (respectivamente) se han utilizado ampliamente por diversos autores. Utilizando como indicadores de estrés oxidativo la producción de radical superóxido y la peroxidación de lípidos para evaluar propiedades antioxidantes y protectoras de estrógenos contra actividad oxidante en músculo esquelético y cardíaco en ratones (Persky *et al.*, 2000), para evaluar la respuesta a hipoxia y reoxigenación en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Zenteno-Savín *et al.*, 2006), para evaluar la salud de tortugas marinas (*Chelonia mydas agassizii*) por exposición a contaminantes ambientales o enfermedades (Valdivia *et al.*, 2007), así como para evaluar el daño oxidativo en acociles (*Cherax quadricarinatus*) alimentados con diferentes niveles de proteínas y lípidos (Zenteno-Savín *et al.*, 2008).

2.3.3. ÁCIDOS GRASOS

Diversos autores han documentado que las rafigofíceas producen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), principalmente ácido eicosapentaenoico (ácido timnodónico EPA, 20:5 ω 3), ácido eicosatetraenoico (ácido araquidónico AA, 20:4 ω 6) y ácido octadecatetraenoico (ácido esterearidónico OTA, 18:4 ω 3) (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2002b; Fu, 2003; Fu *et al.*, 2004; De Boer *et al.*, 2009).

Mostaert *et al.* (1998) determinaron el perfil de ácidos grasos en diversas especies de rafigofíceas marinas, manifestando que 5 de ellos fueron los principales representantes de este grupo encontrándose en porcentajes de 8 a 21 %. Los mayores componentes registrados de los ácidos grasos saturados fueron el 14:0 y el 16:0, de los ácidos grasos monoinsaturados fueron el 16:1 *cis* y de los AGPI el 18:4 y el 20:5. Los menores componentes con promedios de 1.4 a 4.3 % fueron los ácidos grasos insaturados 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 α , 18, 20:4 y 22:6, los cuales fueron detectados en la mayoría de las cepas evaluadas. Marshall *et al.* (2002b) detectaron altos niveles (de 19 a 26 %) de ácido octadecatetraenoico 18:4 ω 3 en cepas de *C. marina*, *F. japonica* y *H. akashiwo*, sin embargo a pesar de encontrarse este ácido graso en menor proporción en el resto de las cepas de rafigofíceas, fue un

componente dominante en la mayoría de las especies que se analizaron (de 12 a 16.5 %). El ácido eicosapentaenoico se presentó en todas las cepas en altos porcentajes (de 14.8 a 24.5 %), siendo las cepas de *C. marina* y *F. japonica* las que mostraron los valores más altos (23.4 y 24.5 %, respectivamente), también notaron que los ácidos grasos 18:5 ω 3 y 22:5 ω 3 no fueron detectados en las cepas de *F. japonica*.

En un estudio similar, Pezzolesi *et al.* (2010) determinaron cantidades considerables de AGPI en diversas cepas de *F. japonica* del Mar Adriático, resaltando el ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3) (13.33 μ g·cél), seguido del ácido octadecatetraenoico (18:4 ω 3) (7.94 μ g·cél) y en menores concentraciones el ácido eicosatetraenoico (20:4 ω 3) (2.51 μ g·cél); a nivel extracelular no se detectaron estos compuestos. Además, a partir de 54 fracciones diferentes extraídas de *F. japonica* detectaron un alto porcentaje de ácido eicosapentaenoico (36.8 %) seguido del ácido octadecatetraenoico y del ácido eicosatetraenoico con 8.5 y 6.4 %, respectivamente.

2.4 PERFIL DE PIGMENTOS

Los principales pigmentos fotosintéticos detectados en rafdofíceas son la clorofila *a*, clorofila *c*1 y *c*2, así como pigmentos accesorios carotenoides, en las rafdofíceas de agua dulce se presentan β -caroteno, diadinoxantina, heteroxantina y vauqueriixantina; en las especies marinas se presentan β -caroteno, fucoxantina, violaxantina, auroxantina y zeaxantina (Mostaert *et al.*, 1998; Andersen, 2004).

La composición de pigmentos fotosintéticos fue determinada en las rafdofíceas: *Chattonella marina*, *C. antiqua*, *C. ovata*, *Heterosigma akashiwo*, *Olisthodiscus luteus*, *Fibrocapsa japonica* y *Haramonas dimorpha*, Mostaert *et al.* (1998) mencionaron que la clorofila *a* junto con la clorofila *c*1 y/o *c*2 fueron los principales pigmentos de todas las rafdofíceas. Siendo *C. antiqua* y *F. japonica* las que presentaron la mayor cantidad de los pigmentos β -caroteno, fucoxantina, auroxantina y zeaxantina mientras que *C. marina* y *H. akashiwo* presentaron la mayor cantidad de violaxantina y clorofila *c*2, respectivamente. Además, destacaron que cepas de la misma especie no mostraron composición de pigmentos idénticos.

Band-Schmidt *et al.* (2004) determinaron el perfil de pigmentos de *C. marina* y *F. japonica* en dos medios de cultivo (f/2 y GSe); señalaron que los pigmentos más abundantes en las dos especies en ambos medios fue la clorofila *a* (61-68 %), seguido por la fucoxantina (22-25 %), clorofila *c*1-2 (7-9 %), β -caroteno (2-3 %) y diadinixantina (0.3-4 %), resaltando que los valores obtenidos en el contenido de pigmentos entre medios de cultivo fueron similares con las mismas especies, con excepción de *C. marina* que mostró menos diadinoxantina con el medio f/2 (0.3 %) comparado con el medio GSe (4 %).

Al comparar dos cepas de *C. marina* aisladas de Australia y Japón Marshall & Newman (2002) determinaron que exhiben diferencias en tolerancia a altas intensidades de luz visible (PAR), ya que observaron que la concentración de violaxantina y zeaxantina por célula se incrementaba de 4.7 a 4.8 veces más en la cepa japonesa al compararla con la australiana al exponerlas a niveles de alta irradiancia ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$). Estos investigadores señalan que debido a las diferentes condiciones ambientales donde habitan, las cepas australianas son más aptas para desarrollarse en condiciones de alta irradiancia cercanas a la superficie marina y que la cepa de Japón utiliza el ciclo de las xantofilas para moderar la inhibición por alta irradiancia.

2.5. BIOENSAYOS CON PECES

Se han usado ampliamente pruebas de toxicidad en embriones de peces para evaluar los efectos en el ambiente de compuestos tóxicos por aportes antropogénicos o por organismos productores de toxinas. Las principales especies de peces utilizadas en este tipo de pruebas son: *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Prochilodus lineatus*, entre otros (Kazlauskienė & Stasiūnaitė, 1999; Tong, 1999; Strmac *et al.*, 2002; Colman & Ramsdell, 2003; Lefebvre *et al.*, 2004; Campagna *et al.*, 2006). Los efectos letales (agudos o crónicos) son determinados al comparar los resultados con los controles para identificar la CL₅₀ (Campagna *et al.*, 2006; OECD, 2006; Embry *et al.*, 2010).

La evaluación de los efectos de químicos en los estadios embrionarios de peces constituyen alternativas confiables a las comúnmente efectuadas con juveniles o adultos, en experimentos comparativos de CL₅₀ entre embriones, juveniles y adultos, la correlación es alta (0.95) con pendientes cercanas a 1.0 en las regresiones lineales (Strmac *et al.*, 2002; Belanger *et al.*, 2010; Embry *et al.*, 2010). La Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2006) considera que en las pruebas de toxicidad con embriones de peces, la exposición en los tratamientos debe detenerse cuando los embriones inician la alimentación exógena, puesto que sus intervalos (embriones en segmentación, embriones y eleuteroembriones) (Balon, 2001) son formas de vida no protegidas en las regulaciones estipuladas por la unión europea (UE), logrando con esto homogenizar los protocolos estándar internacionales para pruebas de toxicidad en peces, ya que en América y Asia no existe tal estatus regulatorio.

Los estudios realizados con embriones de peces en relación al efecto de los compuestos tóxicos generados por microalgas o por contacto con sus células son escasos, la mayoría de estos trabajos se han centrado en documentar las reacciones producidas en juveniles o peces adultos.

El efecto de las brevetoxinas PbTx-1 Y PbTx-3 en embriones se ha caracterizado en *Oryzias latipes*, Kimm-Brinson & Ramsdell (2001) reportaron que el incremento de las dosis por microinyección de 1 a 4 ng de PbTx-1 por embrión

provoca: curvatura lateral de la columna, problemas en la eclosión, incluso malformaciones en el cráneo y ojos mal posicionados. En relación a la PbTx-3 se ha reportado que dosis superiores a $1 \text{ ng} \cdot \text{embrión}^{-1}$ provocaron convulsiones continuas, rompimiento de vasos sanguíneos, arritmias en la función cardiovascular así como decremento en el éxito de eclosión. Además, Colman & Ramsdell (2003) determinaron que la DL_{50} para estos embriones es de $4 \text{ ng} \cdot \text{embrión}^{-1}$ de PbTx-3. En ambos estudios los autores reportaron que los embriones intentaron eclosionar por la cabeza y no por la cola como comúnmente se ha observado en peces, ocasionando eclosiones parciales y muerte, señalando que el ritmo cardíaco de los embriones es afectado de forma distinta al adicionar PbTx-1 y PbTx-3 provocando bradicardia y taquicardia, respectivamente.

En lo que respecta a *Paralabrax maculatofasciatus*, la mayoría de los trabajos realizados en las fases iniciales de vida se han enfocado a estudios fisiológicos y de optimización en la producción de semilla (Álvarez-González, 1999; 2003; Peña-Martínez, 2000; 2005; Pliego-Cortés, 2005; García-Gómez, 2006; Martínez-Brown, 2007; Rodríguez-Trejo, 2008), aunque también se han realizado investigaciones en relación a la patogenicidad por bacterias *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp., en donde se ha utilizado exitosamente como organismo experimental (Moreno-Legorreta, 2004; Macayo-Alvear, 2006).

2.6. BIOENSAYOS CON CAMARONES

Los principales estudios en donde han utilizado camarones en fases iniciales como organismos para bioensayos se han enfocado especialmente en la optimización de la producción y de la calidad de larvas (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Barón-Sevilla *et al.*, 2004; Hernández-Sandoval, 2004); de estos trabajos resalta la gran cantidad de investigaciones realizadas en torno a infecciones experimentales con bacterias *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp. (Robertson *et al.*, 1998; Roque *et al.*, 2000; Unzueta-Bustamante *et al.*, 2004; Trujillo *et al.*, 2005; Makarov, 2011), originadas como respuesta a la gran demanda de información por parte de la camaronicultura.

En lo que corresponde a investigaciones por el efecto de los compuestos tóxicos de microalgas formadoras de FAN en fases iniciales de camarón, poco se ha publicado, sin embargo diversos autores han documentado los daños que los eventos FAN han ocasionado, tanto en las pesquerías de camarón como en los estanques de cultivo (agotamiento de oxígeno principalmente) (Cortés-Altamirano & Licea-Durán, 1999; Hernández-Becerril *et al.*, 2007; Cortés-Altamirano & Sierra-Beltrán, 2008; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011).

Los eventos FAN en la industria de la camaronicultura han provocado mortalidades, bajo crecimiento, lesiones y producción de mucus en las branquias de camarones que eventualmente mueren. En las granjas de cultivo de camarón localizadas al noroeste de México, las microalgas más comunes que se han reportado en los cultivos y que causan daño son *Synechocystis diplococcus*, *Anabaena elenkinii*, *A. aequalis*, *Oscillatoria limnetica*, *Schizothrix calcicola*, *Peridinium trochoideum*, así como los dinoflagelados *Prorocentrum minium* y *Gymnodinium* spp que eventualmente han causado afectaciones (Cortés-Altamirano & Agraz-Hernández, 1994; Cortés-Altamirano & Licea-Durán, 1999; Alonso-Rodríguez & Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004). En la Bahía de La Paz, B. C. S. y en estanques de cultivo de camarón se han observado especies como *Scrippsiella trochoidea* y *Cochlodinium polykrikoides* en altas densidades (65.16 y $8 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹, respectivamente) sin causar efectos nocivos a los camarones (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004, 2009b).

En la Bahía de Kun Kaak, Sonora, se registró un evento FAN dominado por el género *Chattonella*, en esta región los laboratorios de producción de post-larvas de camarón resultaron afectados con la mortalidad del 40 % de su producción (Barraza-Guardado *et al.*, 2004). De igual forma, en la Bahía de Mazatlán *Gymnodinium catenatum* se presenta con regularidad en muestras de fitoplancton, además se ha observado que esta especie aún con bajas densidades causa mortalidad en larvas y adultos de camarón en cultivo y de poblaciones naturales (Alonso-Rodríguez & Páez-Osuna, 2003).

Pérez-Linares *et al.* (2003), expusieron postlarvas de *Litopenaeus vannamei* a la cianobacteria *S. calcicola* durante 15 días. Reportaron que las postlarvas expuestas a *S. calcicola* pesaron menos y mostraron una baja tendencia al crecimiento ($r^2= 0.4631$) al compararlas con las postlarvas del grupo control ($r^2= 0.9345$), mencionan también que no se presentaron mortalidades inusuales, con porcentajes del 20 % en ambos casos, además observaron que las postlarvas de *L. vannamei* expuestas a *S. calcicola* mostraron una reducida actividad alimenticia durante el periodo de prueba, por lo que realizaron cortes histológicos de estos organismos y lograron detectar daños en el tracto gastrointestinal, por lo que infieren que este tipo de lesiones interfieren en la absorción de alimento.

Ensayos de toxicidad aguda en postlarvas de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones celulares de los dinoflagelados *G. catenatum* y *Karenia brevis* mostraron que concentraciones $<10^3$ cél·ml⁻¹ de ambos dinoflagelados exhibieron mortalidades y comportamiento semejantes al control, mientras que concentraciones $>10^4$ cél·ml⁻¹ provocaron la muerte y comportamiento errático. Además Pérez-Linares *et al.* (2009) detectaron toxinas PSP y NSP en todos los tejidos comestibles del camarón al exponerlos a pruebas de toxicidad crónica, resaltando que glándulas gástricas y músculo retienen toxinas por mayor tiempo al compararlos con otros tejidos, aún después de un periodo de depuración.

3. JUSTIFICACIÓN

La incidencia y aparente incremento de florecimientos algales nocivos (FAN) en las costas de México, ha originado mayor atención a especies de microalgas tóxicas, ya que pueden causar efectos adversos en el ecosistema, en la salud humana y en diversos campos comerciales (turismo, pesca, acuicultura).

Las rafidofíceas se han asociado con la producción de diversos compuestos que pueden ser tóxicos para diversos grupos de organismos marinos y han ocasionado muertes masivas de peces cultivados y de poblaciones naturales en diversas regiones del mundo. A pesar de estar presentes en costas mexicanas existen pocas investigaciones acerca de las rafidofíceas, debido en parte a su extrema fragilidad ante los métodos convencionales de preservación en muestras de fitoplancton y a la falta de personal calificado para su identificación.

El efecto tóxico en peces adultos de diversas especies de rafidofíceas se ha determinado en varios estudios, sin embargo, poco se conoce sobre el impacto potencial en embriones de peces y nauplios de camarones que forman parte del zooplancton y tienen menos posibilidad de evadir la alta densidad de células durante un FAN, lo cual puede repercutir en la incorporación de nuevos reclutas a los stocks de peces y crustáceos marinos.

Bajo este argumento, nos planteamos la necesidad de determinar la toxicidad y el impacto de las cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California sobre otros niveles tróficos potencialmente sensibles a sus metabolitos tóxicos. De acuerdo a lo anterior, se seleccionó como organismos de prueba a la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) y al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), estas dos especies tienen valor comercial regional y nacional, además, por encontrarse en la misma zona geográfica pueden llegar a estar expuestas a especies de *Chattonella*, desencadenando en un efecto nocivo en sus poblaciones.

El conocimiento generado por esta investigación permitirá determinar si los organismos de prueba son potencialmente afectados en sus fases iniciales de vida por las rafidofíceas del Golfo de California.

4. HIPÓTESIS

Dadas las características tóxicas de la Clase Raphidophyceae y a los antecedentes en altas mortalidades de peces y otras especies marinas en presencia de estas microalgas, se espera que provoquen la mortalidad de embriones de *Paralabrax maculatofasciatus* en sus tres fases iniciales de desarrollo (segmentación, embrión y eleuteroembrión), así como la mortalidad de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* al exponer ambos organismos a las células de las diversas cepas del género *Chattonella* del Golfo de California, dado que la sensibilidad en fases larvianas es mayor para ambas especies.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de diversas cepas de *Chattonella* spp. (Raphidophyceae) del Golfo de California en la ontogenia inicial de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* y del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en relación al porcentaje de mortalidad que provoquen.

OBJETIVOS PARTICULARES

Cepas de *Chattonella*

- Caracterizar las cepas de *Chattonella* spp. en cuanto a densidad celular, tasa de crecimiento, talla y perfil de pigmentos, así como presencia de brevetoxinas, especies reactivas de oxígeno y perfil de ácidos grasos.

Paralabrax maculatofasciatus

- Determinar la mortalidad en embriones de *P. maculatofasciatus* desde fase de segmentación, embrión y eleuteroembrión hasta apterolarvas al ser expuestos a diferentes concentraciones de cepas de *Chattonella* spp.
- Determinar la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) de los embriones en fase de segmentación, embrión y eleuteroembrión de *P. maculatofasciatus* al ser expuestas a diversas cepas de *Chattonella* spp.

Litopenaeus vannamei

- Determinar la mortalidad en *L. vannamei* desde fase de nauplio dos hasta zoea tres al ser expuestos a diversas cepas de *Chattonella* spp.
- Determinar el tiempo letal medio (TL₅₀) de larvas de camarón blanco *L. vannamei* al exponerlas a diversas cepas de *Chattonella* spp.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. CULTIVOS / CEPAS DE *Chattonella*

6.1.1. CEPAS

Se utilizaron diversas cepas de las rafidofíceas del género *Chattonella*: *C. subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *marina* (CSPV-1, -2, -3, CSJV-1, -2 y CSCV-1) y *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3) (Mendoza-Flores, 2011). A estas cepas se les determinó: densidad celular máxima, tasa de crecimiento y talla (longitud y ancho), así como perfil de pigmentos fotosintéticos, brevetoxinas, especies reactivas de oxígeno y el perfil de ácidos grasos. Las microalgas utilizadas como controles en los bioensayos con *Paralabrax maculatofasciatus* y con *Litopenaeus vannamei* fueron el dinoflagelado *Prorocentrum micans*, la diatomea *Chaetoceros calcitrans* y la clorofícea *Tetraselmis suecica* (no tóxicas).

6.1.2. MANTENIMIENTO DE CEPAS

Las microalgas se cultivaron a temperatura de 23 ± 1 °C, salinidad de 35 ± 1 ups, intensidad luminosa de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. El agua de mar fue previamente filtrada a través de 2 filtros de cartucho dispuestos en serie, con capacidad de retención de partículas de 5 y 1 μm , desinfectada con 6 lámparas de luz ultravioleta y finalmente esterilizada por autoclave. El agua de mar estéril se enriqueció con nutrientes del medio de cultivo f/2 adicionando selenio ($\times 10^{-8}$ M) (Anderson *et al.*, 1984). La resiembra de las microalgas se realizó a intervalos de 20 días en matraces de 250 ml con 20 ml de medio de cultivo.

6.1.3. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para realizar las curvas de crecimiento de las diversas cepas de *Chattonella* se sembró cada una con una concentración inicial de $500 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ en 150 ml de medio de cultivo en recipientes de cultivo de tejido de 250 ml (Falcon) por triplicado. Se tomaron muestras de 2 ml de los cultivos cada tercer día, los cuales se fijaron con lugol ácido hasta llegar a la fase estacionaria. Los conteos se realizaron utilizando una cámara Sedgwick-Rafter de 1.0891 ml de volumen.

6.1.4. ESCALAMIENTO

Se realizaron siembras escalonadas en condiciones estériles para las rafdofíceas *Chattonella subsalsa*, *C. marina* var. *marina* (CSPV-3, CSCV-1 y CSJV-2), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3), así como para *Prorocentrum micans*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*. Los escalamientos se realizaron de manera progresiva comenzando con volúmenes desde 25 ml, 250 ml y 1500 ml para los diversos experimentos. La resiembra se realizó en la fase exponencial tardía adicionando un 10% en volumen de pre-inóculo.

6.1.5. TALLAS

Para determinar la talla celular de las cepas de *Chattonella* se realizaron las mediciones de longitud y ancho, cuantificando al menos 30 ejemplares de cada cepa con ayuda de un microscopio compuesto Olympus CK2 con reglilla micrométrica.

6.1.6. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS, BREVETOXINAS, ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ÁCIDOS GRASOS

Para determinar el perfil de pigmentos, brevetoxinas, especies reactivas de oxígeno y perfil de ácidos grasos, los cultivos fueron cosechados en la fase exponencial. Para análisis de pigmentos y de brevetoxinas las células fueron recolectadas por filtración a través de filtros de fibra de vidrio GF/F y congeladas a -20° C hasta ser analizados. Para los análisis de ERO y de ácidos grasos los cultivos fueron centrifugados a 2000 g.

Para la extracción de pigmentos los filtros fueron colocados en 2 ml de acetona moliéndolos en tubos de vidrio para luego centrifugarlos. El extracto fue mezclado con 100 µl de acetato de amonio 0.5 N e inyectado a través de un serpentín de 100 µl dentro de un sistema HPLC (Hewlett Packard Series 1100) con un detector de red de diodos. La identificación se realizó al comparar el tiempo de retención y características espectrales con las de estándares de pigmentos comerciales (Agencia Internacional para determinaciones de ¹⁴C, Dinamarca), la cuantificación se obtuvo por el factor de respuesta del pigmento (área pico del

HPLC/masa del pigmento) obtenida con los estándares de pigmentos comerciales, bajo las condiciones descritas por Bustillos-Guzmán *et al.* (2000).

Para la detección de brevetoxinas en cepas de *Chattonella*, los filtros con células fueron sonicados con metanol por 1 min y filtrados usando un filtro de cartucho de nylon de 0.2 μm . El filtrado fue secado usando una aspiradora de velocidad durante la noche, después de 24 h se adicionaron 500 μl de acetona a las muestras. En 50 μl de cada muestra se adicionaron 50 μl de aceto-nitrilo al 98% con 0.1% de ácido fórmico, 4 μl de esta mezcla fue inyectada en el espectro de masas (método LC/MS), adicionalmente a este método se realizó la detección de brevetoxinas por resonancia magnética, ya que con LC/MS podrían dar falso positivo (Bourdealis, *com. per.*). Las muestras fueron evaluadas para detectar PbTx-1, 2, 3, 6, 9, PbTx-ácido carboxílico, brevenal y brevisin.

Para la detección de especies reactivas de oxígeno en cepas de *Chattonella*, la producción de radicales superóxido (O_2^-) endógeno fue evaluado por espectrofotometría durante la reducción de ferricitocromo usando 15 μl de citocromo c (tipo VI de corazón de caballo (horse heart), Sigma) (Drossos *et al.*, 1995). La cantidad de O_2^- producido fue calculado usando el coeficiente de extinción para el cambio entre ferricitocromo c y ferrocitocromo c, $E_{550} = 21 \text{ nm}\cdot\text{cm}^{-1}$. Los resultados son expresados en nano moles de O_2^- por min por mg de proteína.

La peroxidación de lípidos fue evaluada determinando el contenido de tejido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa *et al.*, 1979). Una curva estándar de malondialdehído bis-(dietilacetal) fue probada en paralelo con las muestras y la concentración de TBARS en las muestras fue calculada con esta curva estándar, los resultados son expresados en nano moles de TBARS por mg de proteína.

Para la detección de ácidos grasos en cepas de *Chattonella*, a partir de centrifugación se obtuvo biomasa seca de microalgas que se lavó con 0.5 M de formato de amonio antes de liofilizarse. La extracción y metanolisis de ácidos grasos fueron realizados por trans-esterificación directa (Lepage & Roy, 1984, 1986; Barnung & Grahl-Nielsen, 1987). Las muestras fueron colocadas en tubos de cristal de paredes gruesas adicionando 500 μl de HCl metanólico seco 2N herméticamente

cerrado con tapas forradas de teflón, sonicadas por 20 min y calentados a 90° C por 2 h en un baño de agua, el exceso de ácido hidroclicóricó fue removido bajo un flujo de nitrógeno. La solución restante fue mezclada con 4 ml de hexano y 0.5 ml de agua destilada en un vortex y centrifugada por 5 min a 10° C en 2000 g. La capa superior de hexano con ácidos grasos fue separada y se adicionaron 10 µl de hidroxitolueno butilado (BHT 1%) para prevenir la oxidación.

Los metil-ésteres fueron analizados por cromatografía de gas fusionados a una columna de capilaridad de sílice de 30 m x 0.25 mm, con glicol polietileno en la fase estacionaria con un espesor de 0.25 mm y helio como gas acarreador. La columna fue montada en cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectro de masas (GCD 1800B, Hewlett-Packard, Palo Alto, California). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo de helio 0.9 ml·min⁻¹ con temperatura de inyección de 250 °C. Después de la inyección, la temperatura de la columna fue programada a la siguiente secuencia: 110 °C por 3 min, incrementándose a 165 °C a una tasa de 30 °C·min⁻¹ y mantenida a 220 °C por 35 min. El detector fue fijado en 260 °C y la fuente de iones fue puesta a 70 eV.

La identificación de ácidos grasos se basó en la interpretación del espectro de masas y la comparación de estas con las generadas para estándares comerciales de 30 ácidos grasos metil-ésteres (AGME) comúnmente encontrados en organismos marinos (Sigma, St. Louis, E. U. A.). Cuando se detectaron los isómeros de los ácidos grasos el tiempo de retención de al menos uno de los isómeros en estándares comerciales permitieron el posicionamiento del doble enlace de los otros isómeros debido a que los isómeros con dobles enlaces cercanos al grupo éster no se detectan en comparación con isómeros con dobles enlaces más lejanos. Diferencias entre respuestas de detección de ácidos grasos fueron calculadas al graficar 5 concentraciones diferentes de AGME, en el intervalo de 20 a 10 µg·ml⁻¹ sobre el eje de las "x" contra sus áreas pico sobre el eje de la "y". Los análisis de regresión de cada gráfica indicaron el factor respuesta de cada ácido graso.

6.2. *Paralabrax maculatofasciatus*

6.2.1. CAPTURA DE REPRODUCTORES

La recolecta de reproductores de la cabrilla arenera se realizó en la Bahía de La Paz (BAPAZ) a bordo de una embarcación de 7 m de eslora con motor fuera de borda y con un contenedor acondicionado a modo de “vivero” para el transporte de peces vivos a las instalaciones de CICIMAR. La pesca y captura se efectuó con líneas de nylon y anzuelos colocando como carnada manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en trozos. Conforme se pescaban las cabrillas se trasladaban al tanque de confinamiento de la embarcación, realizando recambios constantes de agua de mar para evitar pérdidas por asfixia. Al reunir cerca de 70 organismos se transportaron inmediatamente al Sistema Cerrado de Inducción al Desove (SCID) y se bañaron con agua dulce por 10 min para eliminar parásitos.

6.2.2. ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES

Las cabrillas se mantuvieron en observación durante dos semanas a modo de cuarentena para que se acondicionaran al cautiverio y se recuperarán de la tensión provocada por el esfuerzo de la pesca. Los peces se colocaron en cuatro tanques cilíndricos de fibra de vidrio con fondo plano de 1,100 l de capacidad a razón de 6 hembras por 4 machos, bajo condiciones de fotoperiodo de 13 h de luz por 11 h de obscuridad y $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (Rosales-Velásquez, 1997).

6.2.3. ALIMENTACIÓN Y MANTENIMIENTO

A partir del segundo día en cautiverio los reproductores de *P. maculatofasciatus* fueron alimentados con mojarras (*Eucinostomus* spp.), dado que son buen alimento para obtener desoves viables y de buena calidad (Rosales-Velásquez, 1997). Las mojarras fueron obtenidas mediante capturas cada segundo o tercer día con una red de arrastre de tipo chinchorro playero en la laguna de La Paz. La alimentación se efectuó a saciedad, suministrando diariamente las mojarras en trozos las cuales previamente fueron enjuagadas con agua dulce y congeladas por lo menos 24 h previas a su utilización. La limpieza del SCID se realizó diariamente por sifoneo directo en los tanques y por retrolavados del filtro de arena alternados cada

segundo o tercer día. La determinación de amonio (NH_4^+ , $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \pm 0.01$) y nitritos (NO_2 , $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \pm 0.001$) se efectuó cada inicio de semana por medio de métodos colorimétricos (Strickland y Parsons, 1972) con ayuda de un espectrofotómetro (Spectronic, modelo Genesys 2).

6.2.4. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE EMBRIONES

Se obtuvieron desoves voluntarios de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* a partir de un lote de reproductores mantenido en cautiverio en el SCID, el cual fue diseñado para inducir mediante el control del régimen foto-térmico a la madurez gonadal y de aquí obtener desoves de forma natural sin necesidad de tratamientos químicos o manuales; cada tanque del SCID se drena por decantación mediante un tubo de PVC de 1.5" colocado al centro, desembocando en un tanque de precipitación que contiene un recolector de huevos en forma de canasta con una luz de malla de 500 μm (Rosales-Velázquez, 1997). Una vez obtenido el desove se colocó en una probeta de 1 L de capacidad, para después ser aforado a 1 L, esto con el fin de separar por densidad a los huevos fecundados (porción flotante) de los muertos o no fecundados y de otras partículas inertes. Después de 5 a 10 minutos se enjuagó gentilmente y se colocó en una incubadora con capacidad de 10 L con agua de mar estéril mantenido en movimiento y oxigenándolo mediante una ligera aireación proporcionada por una bomba para acuario.

La forma de los blastómeros y la simetría en el patrón de división fueron considerados como criterios de calidad según lo propuesto por Shields *et al.* (1997), si la división de los blastómeros era homogénea se consideraron como buenos candidatos para los ensayos de toxicidad.

6.2.5. TIEMPO DE DESARROLLO EN LA ONTOGENIA INICIAL

Se determinaron los tiempos de desarrollo de *P. maculatofasciatus* desde embrión en fase de segmentación hasta eleuteroembrión, con la finalidad de ubicar los tiempos en los que se realizarían las observaciones en las pruebas de toxicidad. Para ello se colocó un lote de embriones recién fecundados en una incubadora con agua de mar previamente esterilizada, con aireación ligera mediante la ayuda de una

bomba para acuario, a temperatura de 23° C. La identificación de cada una de las fases de desarrollo se realizó con base en Ortíz-Galindo (*com. per.*); se tomó una muestra de los embriones incubados y se observó al microscopio, identificando las características propias de cada fase, se regresó la muestra y se tomó otra nuevamente para evitar sesgos ocasionados por la luz constante.

6.2.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD: EXPOSICIÓN DE *Paralabrax maculatofasciatus* A DIVERSAS CEPAS DE *Chattonella*

La sensibilidad de la cabrilla arenera a los metabolitos tóxicos producidos por diversas cepas de *Chattonella* se evaluó en tres fases de desarrollo: embriones en fase de segmentación, embrión y eleuteroembrión (Balon, 2001). Los experimentos se concluyeron al pasar del periodo embrionario a la fase de larva (apterolarva), correspondiente al periodo larvario, el cual se presenta al absorberse completamente el saco vitelino (Fig 3).

Después de la fecundación, una vez iniciada la segmentación, los embriones se colocaron (1 embrión·pozo⁻¹) con ayuda de una pipeta Pasteur en 48 placas de microdilución de poliestireno con celdas de 1.8 ml de volumen y fondo plano de acuerdo a la metodología propuesta por Panini *et al.* (2001). Enseguida, se adicionaron de manera aleatoria 1 ml de diferentes concentraciones celulares desde fase de crecimiento inicial o lag hasta fase exponencial tardía (de 2 a 10·10³ cél·ml⁻¹) de *C. subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) y *C. marina* var. *marina* (CSPV-3 y CSCV-1), por placa por triplicado; como controles se utilizó agua de mar estéril adicionada con el medio de cultivo f/2 y un tratamiento con el dinoflagelado *Prorocentrum micans* (no tóxico). Las fases de embrión y eleuteroembrión solo fueron evaluadas con *C. subsalsa*, para lo cual se colocaron en las placas los embriones en fase de segmentación con 200 µl de agua de mar estéril, añadiendo su respectivo tratamiento al alcanzar las fases de exposición deseadas (8 h y 22 h después de la fecundación, respectivamente). Las placas se mantuvieron a 23° C en una incubadora de acrílico. Las observaciones de las placas se realizaron a las 8 h al presentarse la fase de embrión, a las 22 h al presentarse la fase de eleuteroembrión y de aquí en adelante cada 12 h.

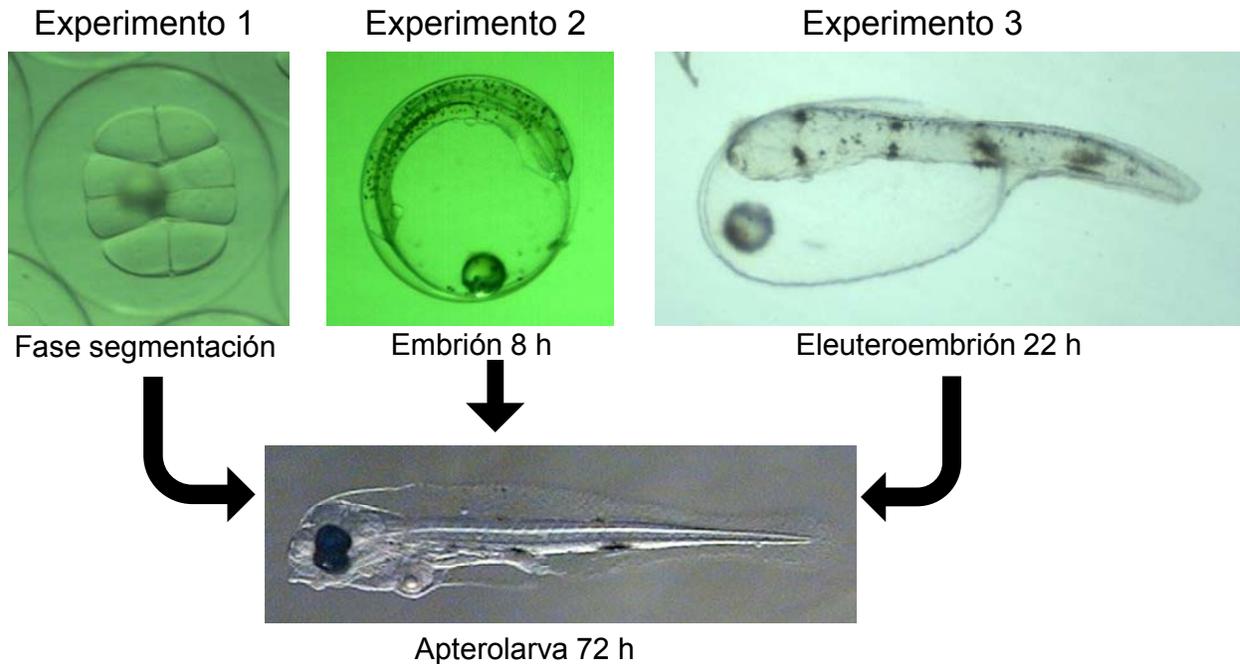


Figura 3. Fases de desarrollo de *Paralabrax maculatofasciatus* expuestas a diversas cepas de *Chattonella* spp del Golfo de California.

6.3. *Litopenaeus vannamei*

6.3.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE NAUPLIOS

Nauplios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* fueron donados por el laboratorio de producción de postlarvas de camarón Acuicultura Mahr. Los nauplios fueron colocados dentro de bolsas de polietileno conteniendo agua de mar filtrada y transportados en hieleras a las instalaciones del CICIMAR-IPN. Una vez en el laboratorio los nauplios se colocaron en obscuridad a temperatura ambiente. Con el fin de evaluar la calidad del lote de nauplios, se tomaron al menos tres muestras y se realizaron pruebas de atracción a la luz, si nadaban con vigor se consideraron como buenos candidatos para las pruebas de toxicidad y se procedía a su incubación (Cuéllar-Anjel *et al.*, 2010; Guerra *et al.*, 2010). La identificación de cada una de las fases de desarrollo de *L. vannamei* se realizó con base en lo descrito previamente por Kitani (1986).

6.3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD: EXPOSICIÓN DE *Litopenaeus vannamei* A DIVERSAS CEPAS DE *Chattonella*

La sensibilidad de los nauplios a los metabolitos tóxicos producidos por las rafidofíceas se evaluó desde la fase de nauplio 2. El experimento se concluyó al alcanzar la fase de zoea 3, la cual precede a la fase de mysis 1 que corresponde al periodo carnívoro de los camarones (Fig. 4).

Se colocaron (1 nauplio·pozo⁻¹) con ayuda de una pipeta Pasteur en 48 placas de microdilución de poliestireno con celdas de 1.8 ml de volumen y fondo plano, de acuerdo a la metodología propuesta por Panini *et al.* (2001). Enseguida, se adicionaron de manera aleatoria 1 ml de diferentes concentraciones celulares desde fase de crecimiento lag hasta fase exponencial tardía (de 0.5 a 6·10³ cél·ml⁻¹) de *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *marina* (CSPV-3, CSJV-2 y CSCV-1) y *C. marina* var. *ovata*, (CMOPAZ-1, -2 y -3). Además, se añadieron dos tratamientos conteniendo *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*, las cuales fueron utilizadas como controles. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado. Los bioensayos con la misma cepa y diferente concentración fueron de cultivos independientes. Las placas se mantuvieron a 23° C en una incubadora de acrílico. Las observaciones de las placas se realizaron cada 24 h debido a que el desarrollo de los camarones a esta temperatura es más lento.

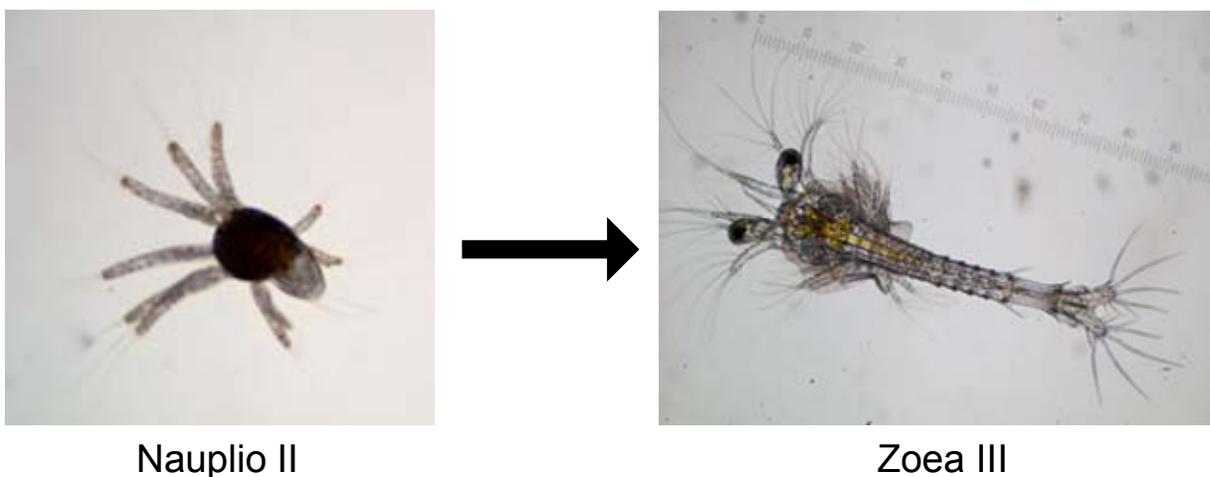


Figura 4. Fases de desarrollo de *Litopenaeus vannamei* expuestas a diversas cepas de *Chattonella* spp del Golfo de California.

6.4. PRUEBA PROBIT

La prueba Probit es usada para evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de una población. La prueba Probit es un modelo de regresión especializado de variables de respuesta binomial, transforma las respuestas sigmoides en lineales efectuando una regresión de esta relación. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un parámetro de caracterización denotado para este bioensayo como CL₅₀ (concentración letal media), DL₅₀ (dosis letal media) y TL₅₀ (tiempo letal medio) (Bedaux & Kooijman, 1994; Division of Water Quality, 2001).

6.5. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

A los datos obtenidos de las pruebas de toxicidad, se les calculó la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza con la prueba de Levin. Al cumplir con ambos supuestos se compararon las medias utilizando un análisis de varianza de una vía. Se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey HSD con la finalidad de comparar las posibles diferencias entre tratamientos y una prueba de diferencia mínima detectable (MDS) ($\alpha = 0.05$) (Sokal & Rohlf, 1981), mediante el programa Statistica v7 (Statsoft, Inc. 1984–2006).

7. RESULTADOS

7.1. CEPAS DE *Chattonella*

7.1.1. DENSIDAD CELULAR, TASA DE CRECIMIENTO Y TALLA

C. subsalsa (CSNAV-1) fue la que presentó mayor densidad celular con $4,592 \pm 802 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ a los 9 días de cultivo, así como la tasa más baja de crecimiento con $0.209 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$. Las cepas CSPV-1 y -3 que corresponden a las cepas de *Chattonella marina var marina* aisladas de Bahía de La Paz fueron semejantes en la densidad celular máxima obtenida ($4,163 \pm 701$ y $4,004 \pm 853 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente) exhibiendo una ligera variación entre ellas en relación a la tasa de crecimiento (0.354 ± 0.1 y $301 \pm 0.03 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$, respectivamente), siendo la cepa CSPV-2 la que mostró la densidad celular y la tasa de crecimiento menor ($3,168 \pm 254 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $0.262 \pm 0.04 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$, respectivamente) (Tabla 1).

En relación a la talla, las células de *Chattonella marina var. marina* (CSCV-1) aisladas de Bahía Concepción fueron las que mostraron la mayor talla ($66\text{-}90 \mu\text{m}$ y $36\text{-}40 \mu\text{m}$, longitud y ancho respectivamente). Mientras que las células de *Chattonella marina var marina* (CSPV-1) aisladas de Bahía de La Paz exhibieron tallas menores ($33.7\text{-}60 \mu\text{m}$ y $21.4\text{-}29.5 \mu\text{m}$, longitud y ancho respectivamente), aunque con variaciones en longitud superiores a $25 \mu\text{m}$, al igual que la cepa CSJV-2, seguido de la cepa CSCV-1 con variaciones de $24 \mu\text{m}$. Las células de la cepa CSPV-3 fueron las más angostas ($18.5\text{-}23\text{-}6 \mu\text{m}$).

Tabla 1. Especie, clave de identificación, densidad celular máxima, tasa de crecimiento y talla (longitud y ancho) de las cepas de *Chattonella* evaluadas en este trabajo

Especie	Lugar de aislamiento	Clave	Densidad celular máxima (cél·ml ⁻¹)	Tasa de crecimiento (div·día ⁻¹)	Longitud (µm)	Ancho (µm)
<i>Chattonella subsalsa</i>	BANAV	CSNAV-1	4,592 ± 802	0.209 ± 0.02	48.0—56.7	22.5—30.8
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	BAPAZ	CSPV-1	4,163 ± 701	0.354 ± 0.10	33.7—60.0	21.4—29.5
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	BAPAZ	CSPV-2	3,168 ± 254	0.262 ± 0.04	38.5—48.0	28.6—30.2
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	BAPAZ	CSPV-3	4,004 ± 853	0.301 ± 0.03	43.2—47.1	18.5—23.6
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	ISJ	CSJV-1	nd	nd	45.2—45.9	30.1—30.3
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	ISJ	CSJV-2	nd	nd	41.4—66.5	30.4—41.7
<i>Chattonella marina</i> var. <i>marina</i>	BACO	CSCV-1	3,636 ± 331	0.299 ± 0.06	66.0—90.0	36.0—40.0
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i>	BAPAZ	CMOPAZ-1	nd	nd	46.0—62.0	34.0—36.0
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> *	BAPAZ	CMOPAZ-2	nd	nd	nd	nd
<i>Chattonella marina</i> var. <i>ovata</i> *	BAPAZ	CMOPAZ-3	nd	nd	nd	nd

Claves de origen: BANAV= Bahía de Navachiste, Sin., BAPAZ= Bahía de La Paz, B. C. S., ISJ= Isla San José, B. C. S. y BACO= Bahía Concepción, B. C. S.

nd= no determinado

*Sin caracterizar

7.1.2. PIGMENTOS

Las cepas de *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) y *Chattonella marina* var. *marina* (CSPV-1) presentaron el mayor contenido de clorofila c1-2 (0.085 y 0.075 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$), fucoxantina (0.170 y 0.158 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$), violaxantina (0.046 y 0.034 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$), fuco- (0.028 y 0.029 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$), y clorofila a (0.495 y 0.362 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$), siendo además la cepa CSNAV-1 la que cuenta con la mayor cantidad de los pigmentos carotenoides: diadinoxantina, zeaxantina y β -caroteno (0.012, 0.011 y 0.036 $\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente) al compararlas con el resto de las cepas evaluadas (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de pigmentos ($\mu\text{mol}\cdot\text{cél}^{-1}$) de cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California.

Cepa	CSPV-1	CSPV-2	CSPV-3	CSCV-1	CSNAV-1
Chl c1-2	0.075	0.056	0.049	0.059	0.085
Fucoxantina	0.158	0.109	0.098	0.114	0.170
Violaxantina	0.034	0.024	0.027	0.031	0.046
Fuco-	0.029	0.021	0.021	0.024	0.028
Diadinoxantina	0.003	0.004	0.003	0.004	0.012
Zeaxantina	0.001	0.002	0.001	0.001	0.011
Clorofila a	0.362	0.266	0.266	0.290	0.495
β -caroteno	0.019	0.017	0.018	0.019	0.036

Chl c1-2 = Clorofila c1 y c2

Fuco- = Pigmento semejante a Fucoxantina

7.1.3. BREVETOXINAS

Por el método LC/MS se detectó que las cepas CSPV-1, -2 y -3, así como las cepas CSNAV-1 y CSCV-1, contenían brevetoxinas de tipo PbTx-1 y -2, sin embargo al confirmar la presencia de estas toxinas por el método de resonancia magnética, resultó negativa.

7.1.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En general se observó en todas las cepas de *Chattonella* una baja producción de radical superóxido, presentando las concentraciones más altas las cepas CSCV-1 y CSPV-1 (0.056 y $0.047 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg}\cdot\text{proteína}^{-1}$, respectivamente); en cuanto a la capacidad de peroxidación lipídica la cepa CSPV-1 fue la que presentó la mayor capacidad aunque con una variación alta ($138.096 \pm 88.632 \text{ nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$), siendo la cepa CSPV-2 la que presentó una concentración menor ($2.997 \pm 1.198 \text{ nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) (Tabla 3).

Tabla 3. Radical superóxido ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) y peroxidación lipídica ($\text{nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) de cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California.

Cepa	Radical superóxido O_2^- ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$)	Peroxidación lipídica ($\text{nmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$)
CSPV-1	0.047 ± 0.021	138.096 ± 88.632
CSPV-2	0.011 ± 0.001	2.997 ± 1.198
CSPV-3	0.009 ± 0.004	45.737 ± 3.297
CSNAV-1	0.034 ± 0.057	17.665 ± 27.650
CSCV-1	0.056	56.706

7.1.5. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

El perfil de ácidos grasos de las cepas de *Chattonella* se muestra en la Tabla 4. El ácido graso saturado más abundante fue el 16:0 (ácido palmítico) con valores máximos en la cepa CSNAV-1 (25.8 %) y mínimos en la cepa CSPV-1 (11.1 %). De los ácidos grasos monoinsaturados el 16:1 ω -7 (ácido palmitoleico) fue el que se encontró en mayor porcentaje con valores muy cercanos entre cepas (6.3-3.3 %). En relación a los ácidos grasos poliinsaturados, el 18:4 ω 3 (ácido estearidónico) y el 20:5 ω 3 (ácido eicosapentaenoico) fueron los más abundantes. Además el 18:4 ω 3 fue el ácido graso que mostró las mayores diferencias entre cepas principalmente en la CSPV-3 y la CSNAV-1 (21.8 y 1.1 %, respectivamente), seguido por el 20:5 ω 3, notándose principalmente entre las cepas CSPV-1 y CSNAV-1 (27.6 y 10.1 %, respectivamente).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (%) de cepas de *Chattonella* aisladas del Golfo de California.

Ácido graso	CSPV-1	CSPV-2	CSPV-3	CSNAV-1	CSCV-1
12:0	0.3	0.0	0.0	0.5	0.1
14:0	5.3	5.8	4.2	6.1	6.2
15:0	0.4	0.4	0.3	2.5	0.5
16:0	11.1	19.2	12.5	25.8	13.8
18:0	0.6	0.5	0.6	1.2	1.6
22:0	1.0	0.2	1.1	0.2	1.2
24:0	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3
∑ Saturados	18.7	26.0	18.7	36.4	24.7
16:1 ω 9	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0
16:1 ω 7	4.7	6.3	4.1	3.3	4.0
16:1 ω 5	0.7	0.4	0.4	1.3	0.3
16:1 ω 13 <i>trans</i>	nd	nd	nd	nd	nd
16:1	2.0	1.5	2.1	0.1	2.1
16:1	2.0	1.3	2.0	2.4	1.2
18:1 ω 9	0.9	1.6	1.0	4.3	2.2
18:1 ω 7	0.4	0.3	0.4	0.7	0.5
∑ Monoinsaturados	10.6	11.6	10.0	12.3	10.3
16:2	1.1	0.5	0.6	0.3	0.4
18:2 ω 6	1.2	1.6	2.1	10.8	2.7
∑ Poliinsaturados	2.2	2.1	2.7	11.1	3.0
16:3 ω 3	0.4	0.4	0.2	0.1	0.2
18:3 ω 6	0.6	0.6	1.2	1.7	1.4
18:3 ω 3	2.9	3.9	3.1	1.4	6.5
18:4 ω 3	21.3	20.0	21.8	1.1	18.2
18:5 ω 3	nd	nd	nd	nd	nd
20:3 ω 6	0.3	0.1	0.5	2.0	0.7
20:4 ω 6	3.7	2.6	4.6	5.5	5.4
20:4 ω 3	1.7	0.6	1.5	1.1	0.4
20:5 ω 3	27.6	25.6	25.2	10.1	19.8
22:5 ω 6	4.8	2.3	5.8	5.6	4.0
22:5 ω 3	0.9	1.2	0.9	1.1	0.8
22:6 ω 3	3.6	3.0	3.2	8.8	3.4
∑ Altamente poliinsaturados	67.7	60.0	68.0	38.5	60.7
∑ ω 3	58.3	54.5	56.0	23.7	49.2
∑ ω 6	9.4	5.5	12.0	14.9	11.5
(∑ ω 3/∑ ω 6)	6.2	10.0	4.7	1.6	4.3

nd= no detectado

7.2. *Paralabrax maculatofasciatus*

7.2.1. Tiempo de desarrollo

La duración de las diferentes fases de desarrollo de *P. maculatofasciatus* después de la fecundación a 23 °C fueron: embrión en segmentación 0-42 min, embrión 8 h y eleuteroembrión 22 h (Fig. 5). Todos los tratamientos culminaron al presentarse la fase de larva apterolarva la cual se presenta a las 72 h post-fecundación.

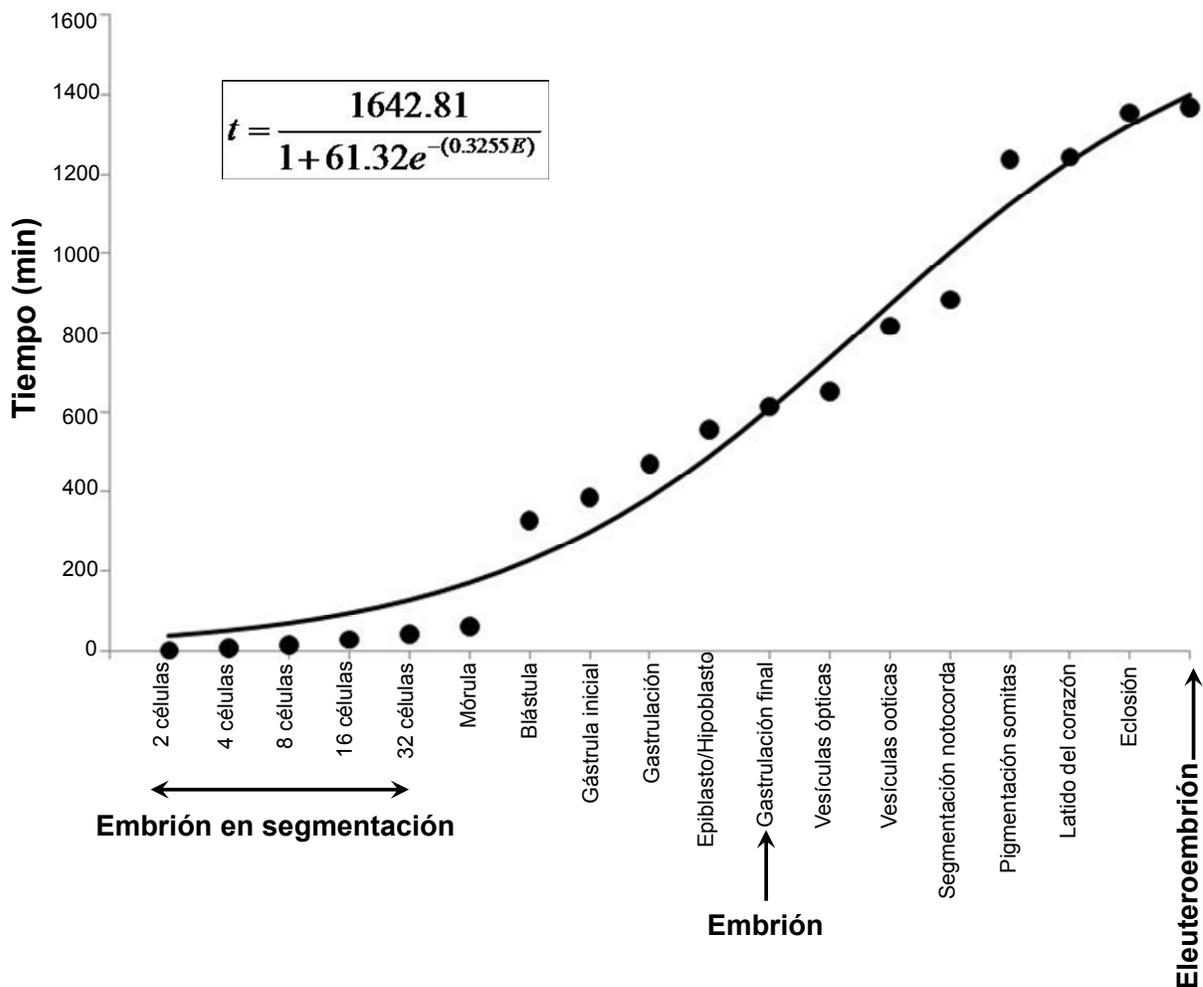


Figura 5. Desarrollo embrionario (de embrión en fase de segmentación a eleuteroembrión) de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* a 23 °C ajustado al modelo de crecimiento logístico.

7.2.2. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella subsalsa* de embriones en fase de segmentación a apterolarvas

Se observaron diferencias significativas con respecto al control en los tratamientos de *C. subsalsa* (CSNAV-1) de 6 a $10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 6). Además, estas tres concentraciones mostraron un incremento notable en la mortalidad (del 6 al 91 %, aproximadamente) a partir de las 8 h de exposición cuando el embrión está totalmente formado, este incremento lineal se mantuvo constante hasta las 34 h. Con la concentración de *C. subsalsa* de $4 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ se observó un incremento paulatino con mortalidades máximas de $44.27 \% \pm 8.22$. El resto de los tratamientos evaluados no presentaron diferencia significativa con respecto a los tratamientos controles, alcanzando mortalidades máximas del 23 %.

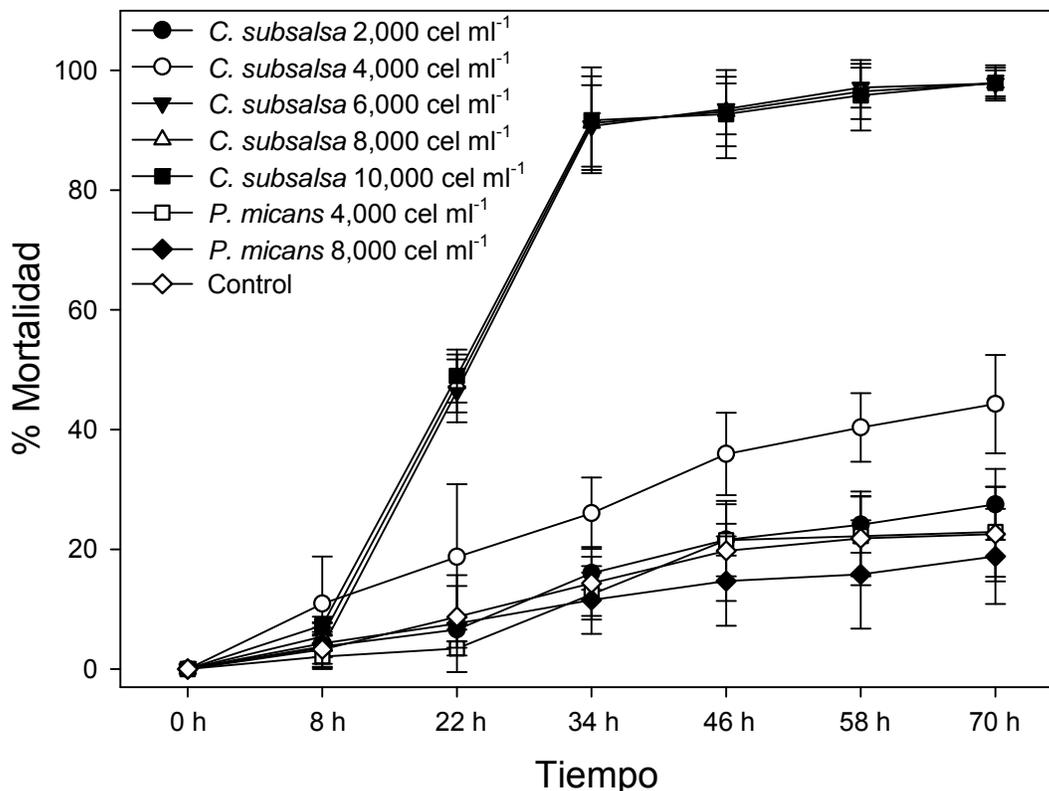


Figura 6. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) ($2-10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.3. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella subsalsa* de embriones a apterolarvas

Se observaron diferencias significativas con respecto al control con la concentración de *C. subsalsa* (CSNAV-1) de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 7), notándose su mayor incremento en mortalidad a las 34 h (39.82 % \pm 0.86), manteniendo un aumento paulatino hasta el final del ensayo (50 % \pm 1.45). El tratamiento con *Prorocentrum micans* de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ mostró el menor porcentaje de mortalidad (11.40 % \pm 4.08), incluso menor que el tratamiento control (14.16 % \pm 3.24). El resto de los tratamientos probados no presentaron una diferencia significativa en el porcentaje de mortalidad, con valores por debajo del 20 %.

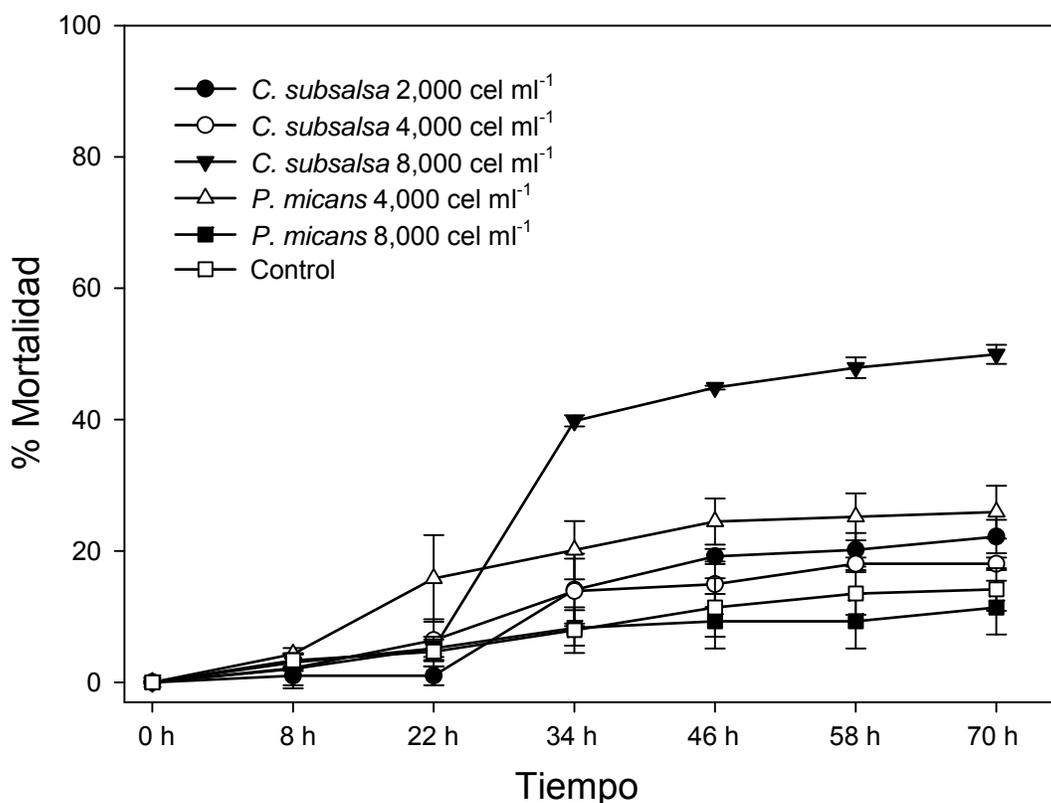


Figura 7. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de embrión al ser expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) (2, 4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.4. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella subsalsa* de eleuteroembriones a apterolarvas

Se observaron diferencias significativas en la mortalidad con respecto al control, en primer orden con la concentración de *C. subsalsa* (CSNAV-1) de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, seguido de la concentración de $4 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ con un incremento lineal desde las 0 h hasta las 34 h y con mortalidades máximas de $61.46 \% \pm 1.47$ y $49.55 \% \pm 9.47$, respectivamente (Fig. 8). Además, la concentración de *C. subsalsa* de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ mostró un incremento a las 58 h separándose de la semejanza que mantenía con la concentración de $4 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹. En el tratamiento con *P. micans* de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ se observó un mayor porcentaje de mortalidad ($33.33 \% \pm 5.89$) en relación a ensayos realizados en las fases de segmentación y embrión, incluso por arriba de la concentración de *C. subsalsa* de $2 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ ($26.04 \% \pm 1.47$) (Figura 4).

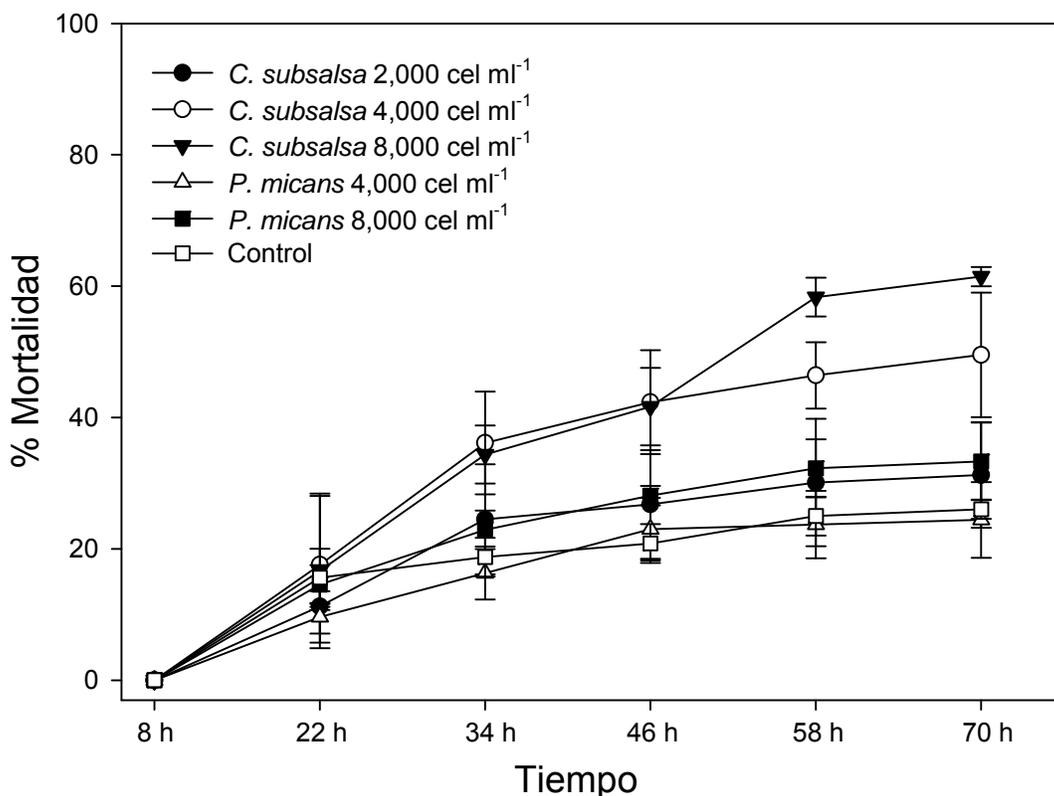


Figura 8. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de eleuteroembrión al ser expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) (2 , 4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.5. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* de embriones en fase de segmentación a apterolarvas

Las concentraciones de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) de 2 a $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 9) mostraron incrementos notables en la mortalidad de las 8 h a las 34 h de exposición, manteniéndose hasta el final del ensayo. La concentración de *C. marina* var. *ovata* de $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ mostró un incremento lineal en el porcentaje mortalidad de 8 h a 34 h, con una mortalidad máxima de $96.08 \% \pm 0.11$. La concentración de *C. marina* var. *ovata* de $2 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ mostró un incremento lineal en el porcentaje de mortalidad (del 10 al 48 %, aproximadamente) de 22 h a 46 h. La concentración de $10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ exhibió el porcentaje de mortalidad más bajo ($6.19 \% \pm 2$) de las concentraciones de *C. marina* var. *ovata*.

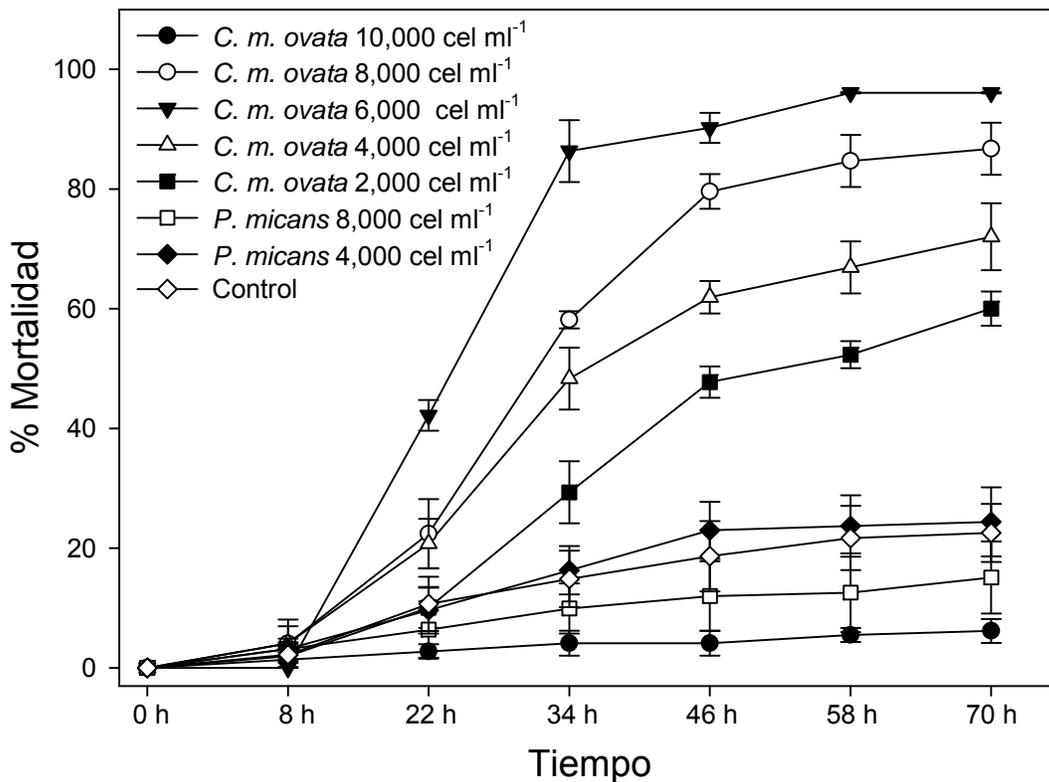


Figura 9. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) ($2 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.6. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) de embriones en fase de segmentación a apterolarvas

Las concentraciones de 4 a $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *marina* (BAPAZ) (CSPV-3) evaluadas mostraron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad con respecto al control (Fig. 10), mostrando una mayor mortalidad desde las 8 h a las 34 h. La mayor mortalidad (91.09 % \pm 8.27) fue observada con la concentración de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *marina* (CSPV-3). El resto de los tratamientos probados no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad, con valores por debajo del 25 %.

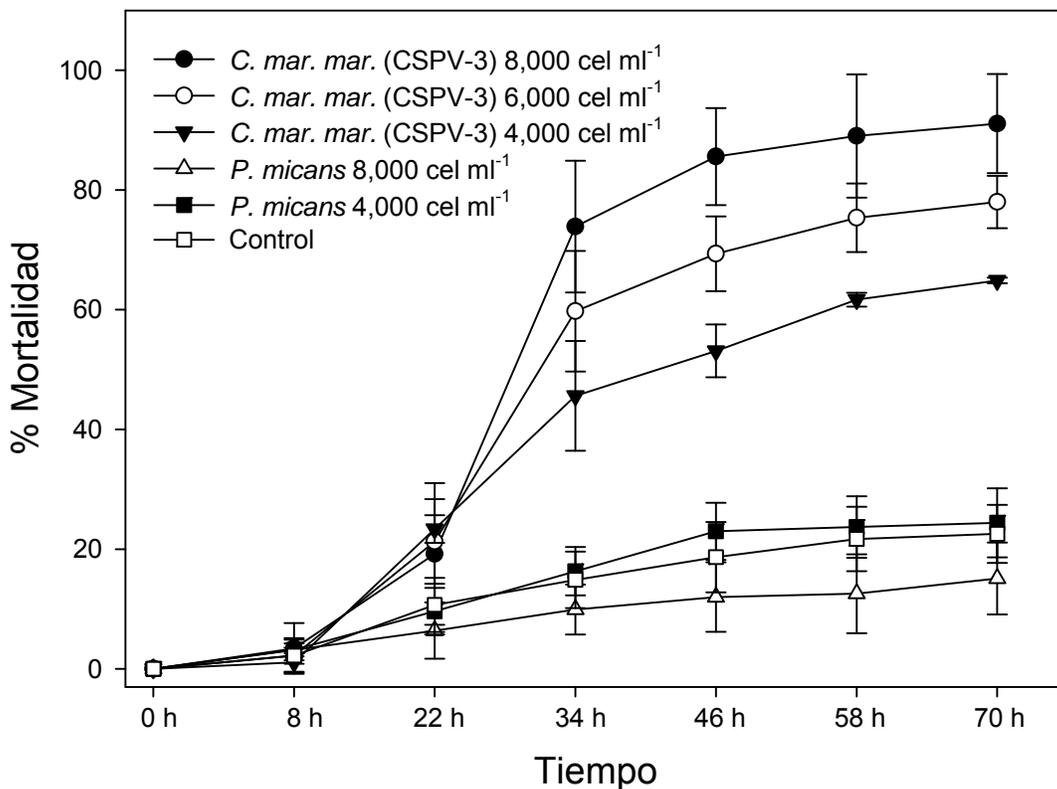


Figura 10. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* (BAPAZ) (CSPV-3) (4 - $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.7. Ensayos de toxicidad en *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BACO (CSCV-1) de embriones en fase de segmentación a apterolarvas

Las concentraciones de *Chattonella marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) de 4 a $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ no mostraron diferencias significativas con respecto al control, con porcentajes de mortalidad menores al 15 %, los cuales fueron inferiores a los obtenidos con *P. micans* de $4 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y al control ($24.42 \% \pm 5.77$ y $22.56 \% \pm 4.84$, respectivamente) (Fig. 11). El incremento paulatino (de 3 a 14 %, aproximadamente) en la mortalidad con las rafidofíceas se presentó desde las 8 h y hasta el final del ensayo.

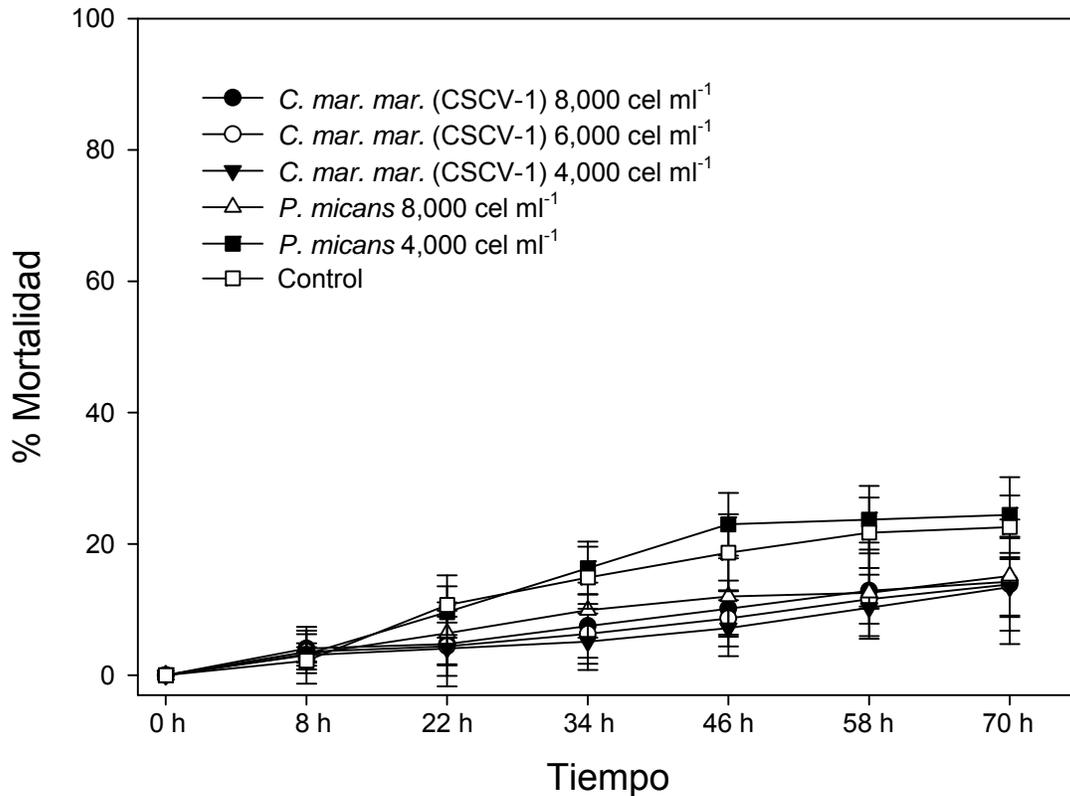


Figura 11. Mortalidad (%) de *Paralabrax maculatofasciatus* a partir de embriones en segmentación al ser expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) (4 - $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) y al control.

7.2.8. Concentración letal 50 de *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella subsalsa*

El periodo de embriones en fase de segmentación a apterolarvas de *P. maculatofasciatus* fue el más sensible a la exposición de *C. subsalsa* (CSNAV-1) con una CL_{50} de $3.2 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y el periodo menos sensible fue el de embriones a apterolarvas con una CL_{50} de $10.23 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 12).

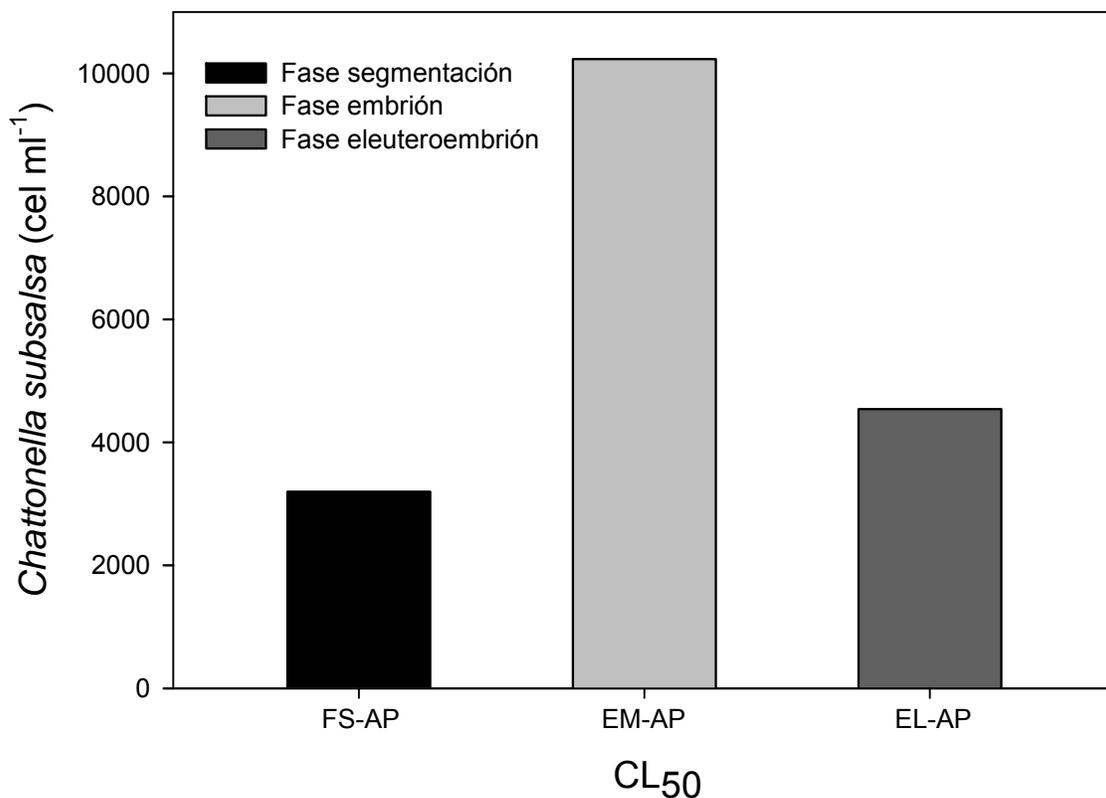


Figura 12. Concentración letal 50 para embriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en FS= Fase de segmentación, EM= Embrión y EL= Eleuteroembrión expuestos a la cepa *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1).

7.2.9. Concentración letal 50 de *Paralabrax maculatofasciatus* en fase de segmentación expuestos a cepas de *Chattonella*

Se observó que en el periodo de fase de segmentación a apterolarva la cepa de *C. marina* var. *ovata* fue la que causó la mayor sensibilidad con una CL_{50} de $1.73 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 13). Las cepas de *C. marina* var. *marina* BAPAZ y *C. subsalsa* mostraron una CL_{50} similar ($\sim 3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹). La cepa de *C. marina* var. *marina* BACO no causó mortalidades superiores al 50 % por lo que la CL_{50} no pudo ser calculada.

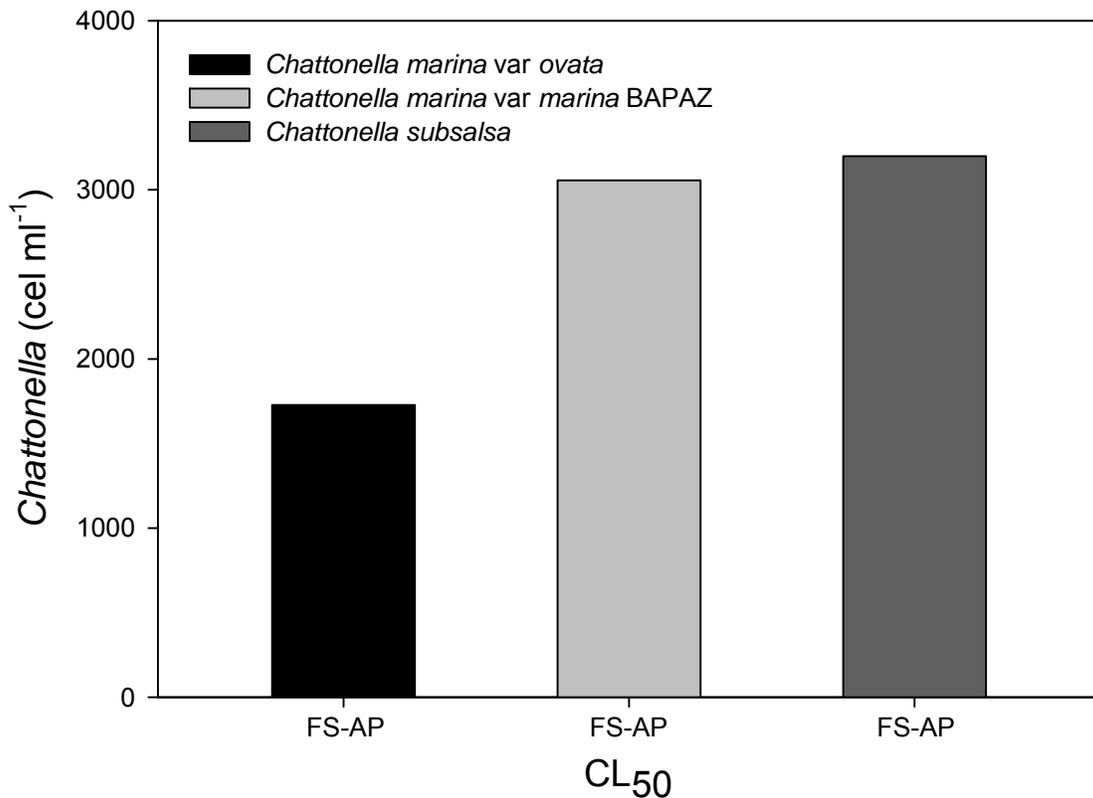


Figura 13. Concentración letal 50 para embriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en FS= Fase de segmentación, con las cepa *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1), *Chattonella marina* var. *marina* (CSCV-1), *Chattonella marina* var. *marina* (CSPV-3) y *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1).

7.2.10. Tiempo letal 50 de *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella subsalsa*

Se observó que el TL₅₀ en embriones de fase segmentación a apteolarvas fue similar (~20 h) al ser expuestos a *C. subsalsa* (CSNAV-1) con las concentraciones de 6, 8 y 10·10³ cél·ml⁻¹ (Fig. 14). En cambio, en el caso de las fases de embrión y eleuteroembrión el TL₅₀ fue mayor (59 h, 32 min y 54 h 31 min, respectivamente) al de la fase de segmentación, al ser expuestos a la concentración de *C. subsalsa* de 8·10³ cél·ml⁻¹.

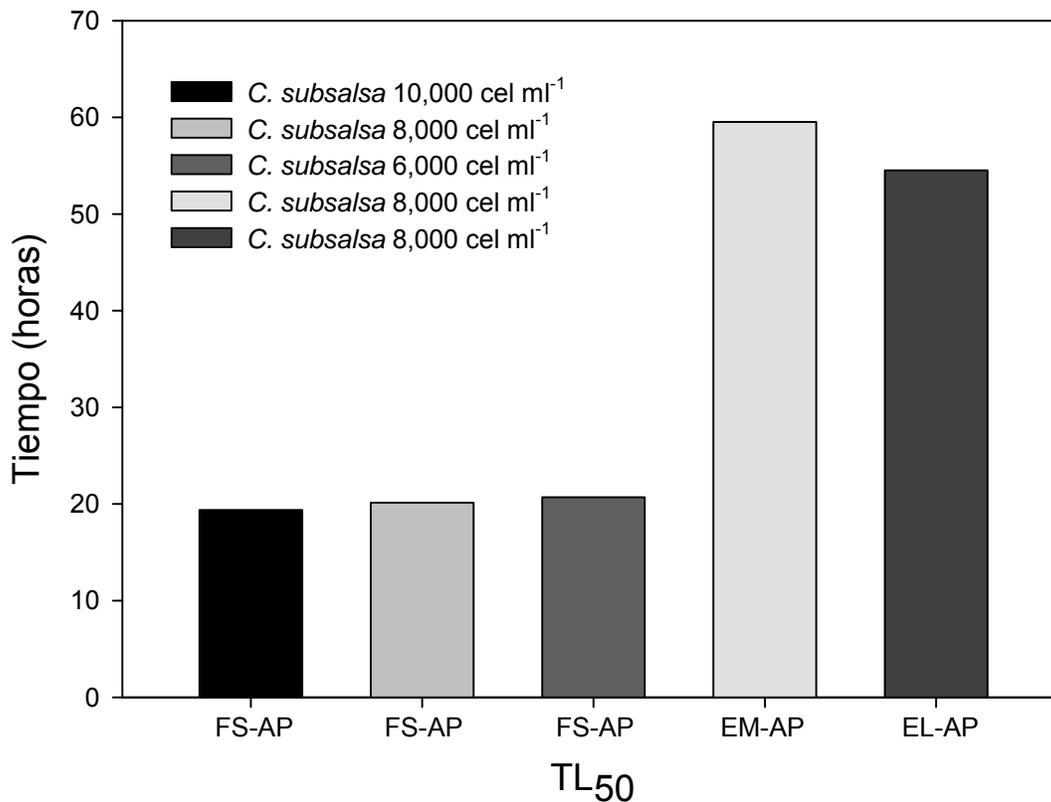


Figura 14. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en FS= Fase de segmentación, EM= Embrión y EL= Eleuteroembrión expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1).

7.2.11. Tiempo letal 50 de *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata*

Se observó que el TL₅₀ de embriones en fase de segmentación a apterolarvas se presenta dentro de las primeras 24 h de exposición (23 h, 37 min) con la concentración de $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) (Fig. 15). En cambio al exponer los embriones a *C. marina* var. *ovata* con la concentración de $2 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ el TL₅₀ se duplicó (53 h, 37 min).

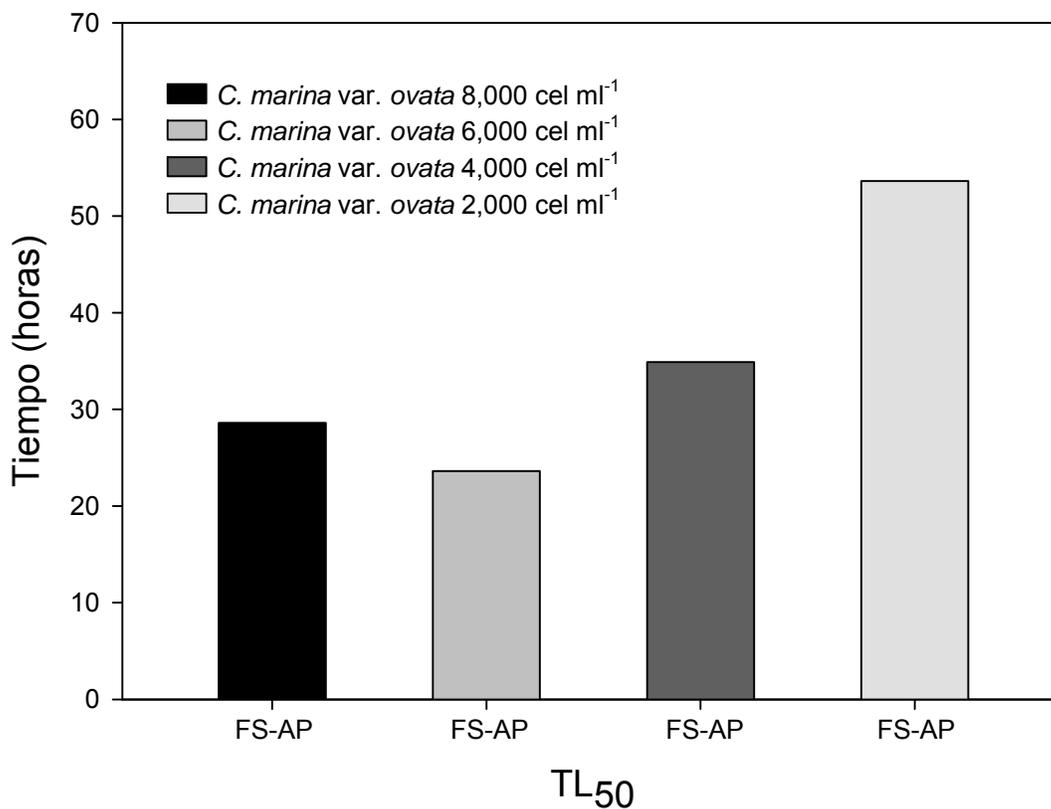


Figura 15. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en FS= Fase de segmentación expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1).

7.2.12. Tiempo letal 50 de *Paralabrax maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BAPAZ

Se observó que el TL₅₀ de embriones en fase de segmentación a apterolarvas fue inversamente proporcional a la concentración celular de *C. marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) (Fig. 16). Al exponer los embriones en fase de segmentación a *C. marina* var. *marina* (CSPV-3) con la concentración de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ el TL₅₀ fue de 28 h y con la concentración de $4 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ el TL₅₀ fue de 42 h.

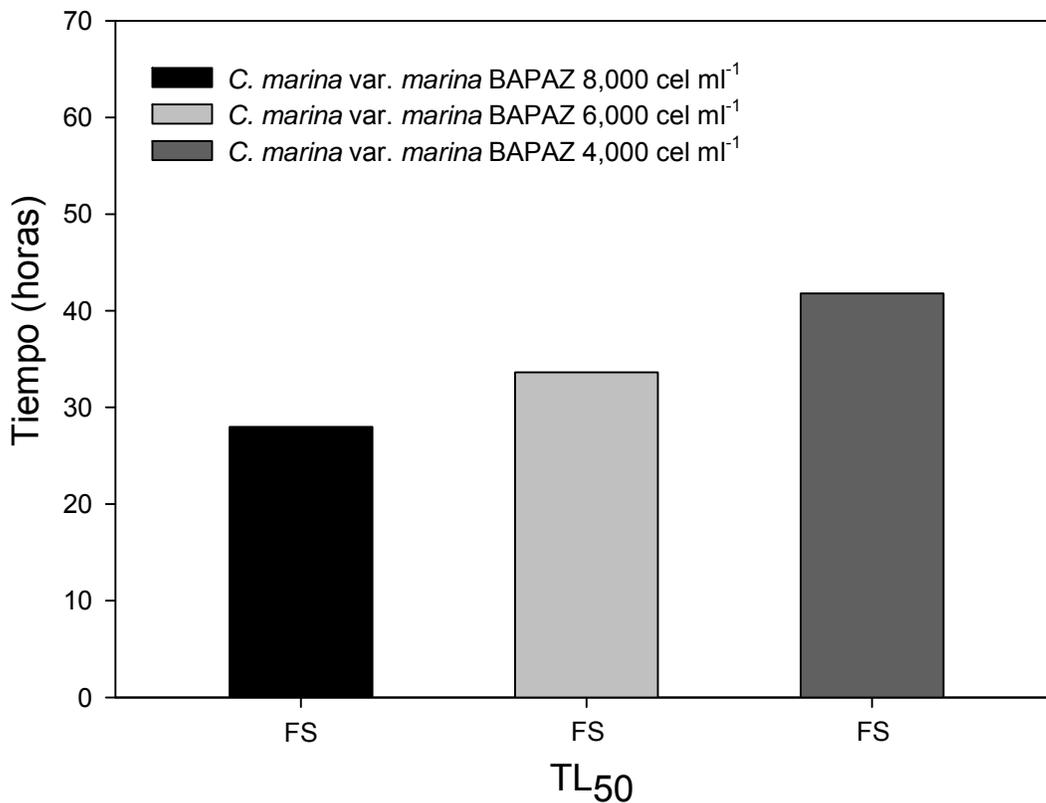


Figura 16. Tiempo letal 50 para embriones de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en FS= Fase de segmentación expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3).

7.3. *Litopenaeus vannamei*

7.3.1. Ensayos de toxicidad en *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1)

Se observaron diferencias significativas con respecto a las microalgas control con la concentración de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. subsalsa* (CSNAV-1), mostrando un incremento lineal en el porcentaje de mortalidad de las 96 a las 144 h, siendo en este tiempo donde se registró la mortalidad del 100 % de los individuos expuestos (Fig. 17). El resto de los tratamientos presentó una mortalidad menor al 25 % al concluir el ensayo. Cabe mencionar que a las 72 h alcanzaron la fase de zoea 1, iniciando la alimentación exógena.

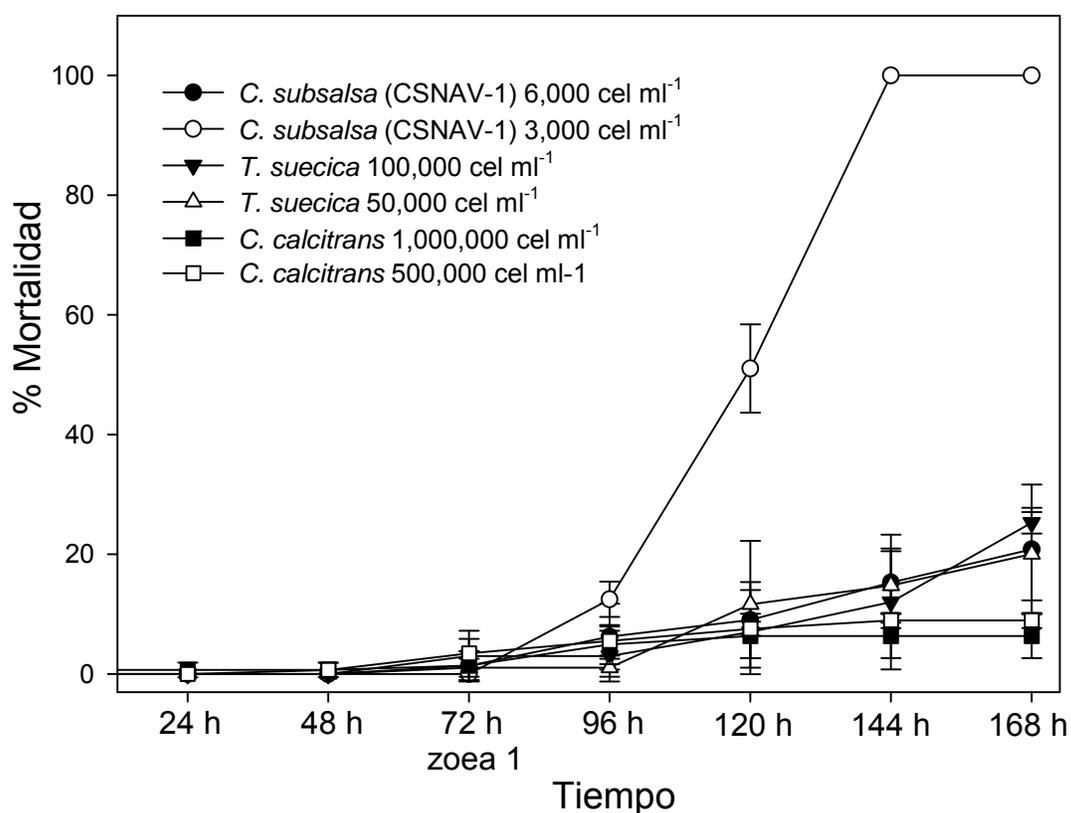


Figura 17. Mortalidad (%) de *Litopenaeus vannamei* a partir de nauplio 2 al ser expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) con concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y a las microalgas control.

7.3.2. Ensayos de toxicidad en *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) e ISJ (CSJV-2)

Se observaron diferencias significativas con respecto al control con las cepas de *C. marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) e ISJ (CSJV-2) a la concentración de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 18). Cabe mencionar que con la cepa CSJV-2 se observó un incremento lineal en el porcentaje de mortalidad a partir de las 96 h de exposición, concluyendo con la mortalidad del 100 % de los individuos expuestos en 144 h. Los tratamientos con *T. suecica* y *C. calcitrans* no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad, con valores por debajo del 25 %.

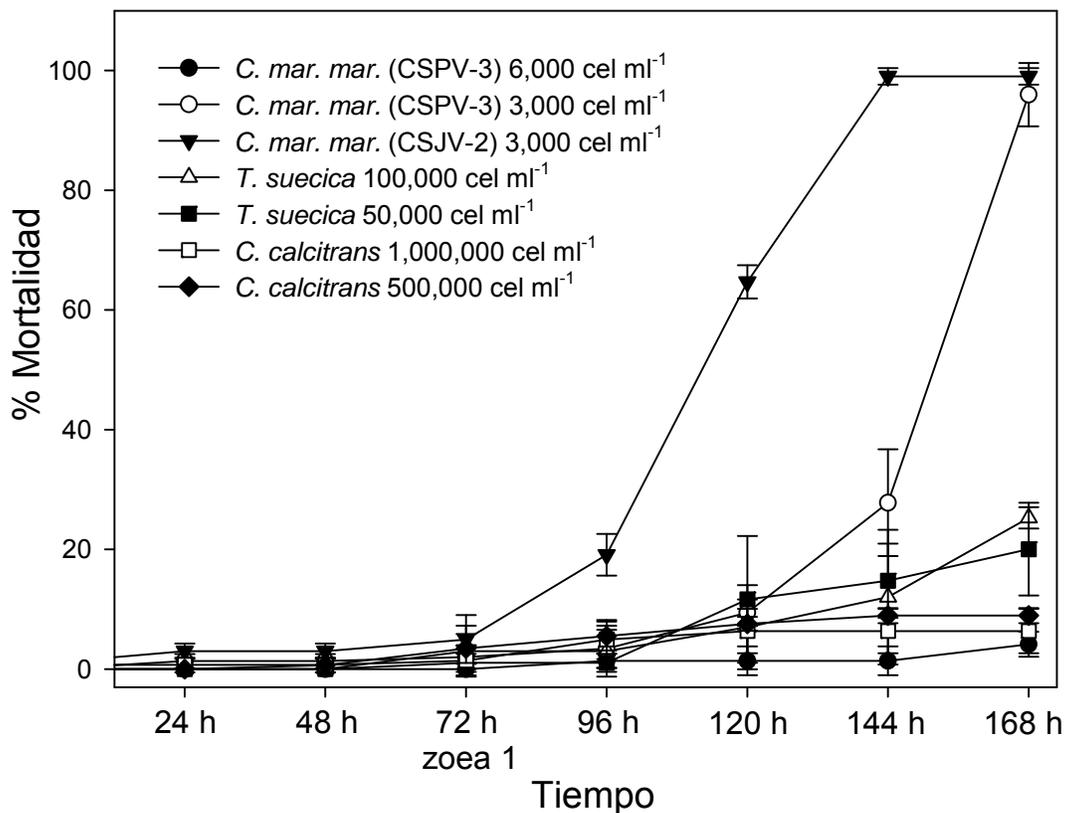


Figura 18. Mortalidad (%) de *Litopenaeus vannamei* a partir de nauplio 2 al ser expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) e ISJ (CSJV-2) con concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y a las microalgas control.

7.3.3. Ensayos de toxicidad en *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1)

Las tres concentraciones evaluadas de *C. marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) mostraron diferencias significativas con respecto a las microalgas control (Fig. 19). Las concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *marina* (CSCV-1) presentaron un incremento lineal en la mortalidad de las 72 h a las 144 h y de las 96 h a las 144 h, respectivamente. A las 144 h se observó una mortalidad del 100 % con la concentración de $0.5 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *marina* (CSCV-1). Al concluir el ensayo se registraron mortalidades menores al 25 % con los tratamientos de *T. suecica* y *C. calcitrans*.

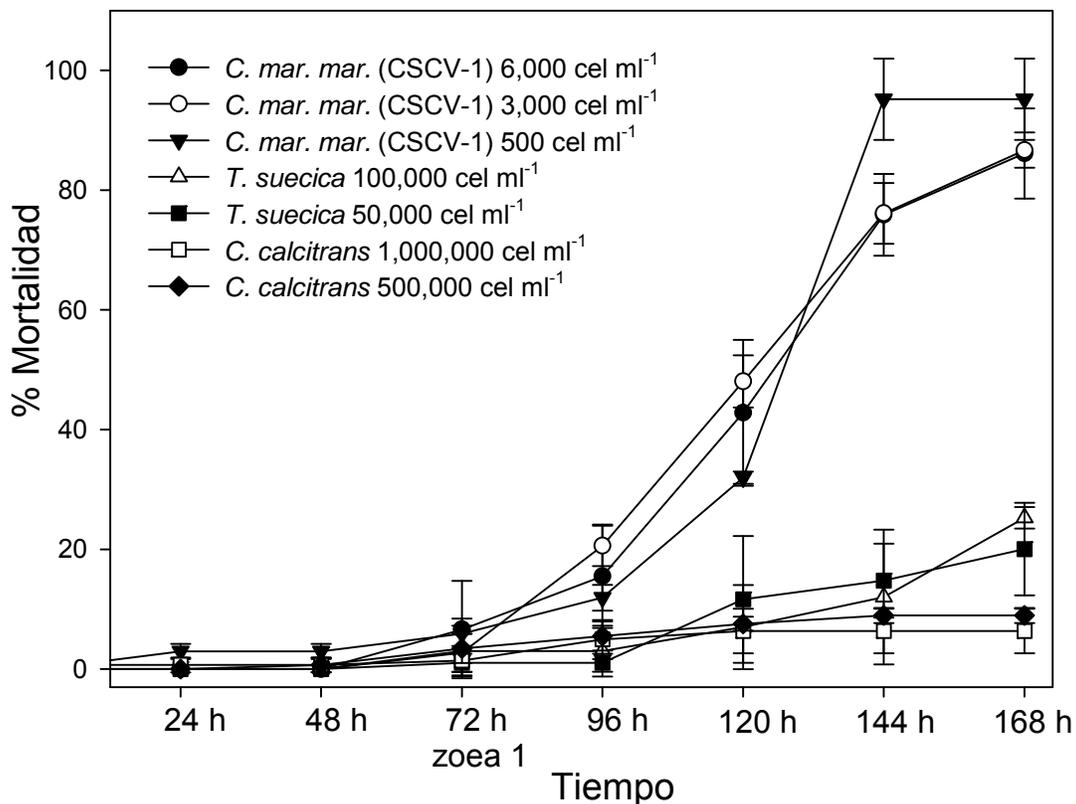


Figura 19. Mortalidad (%) de *Litopenaeus vannamei* a partir de nauplio 2 al ser expuestos a *Chattonella marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) con concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y a las microalgas control.

7.3.4. Ensayos de toxicidad en *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3)

Las mayores mortalidades (~100 %) se observaron a las 120 h de exposición con las concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-2 y -3), seguido de las concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) con mortalidades cercanas al 100 % al final del ensayo 144 h (Fig. 20). Con las con las concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de CMOPAZ-2 y -3 se observó un marcado incremento lineal en la mortalidad de las 72 a las 120 h, provocando una mortalidad de 0 a 100 % de los individuos expuestos en un lapso de 48 h. Se registraron mortalidades menores al 25 % con los tratamientos de *T. suecica* y *C. calcitrans*.

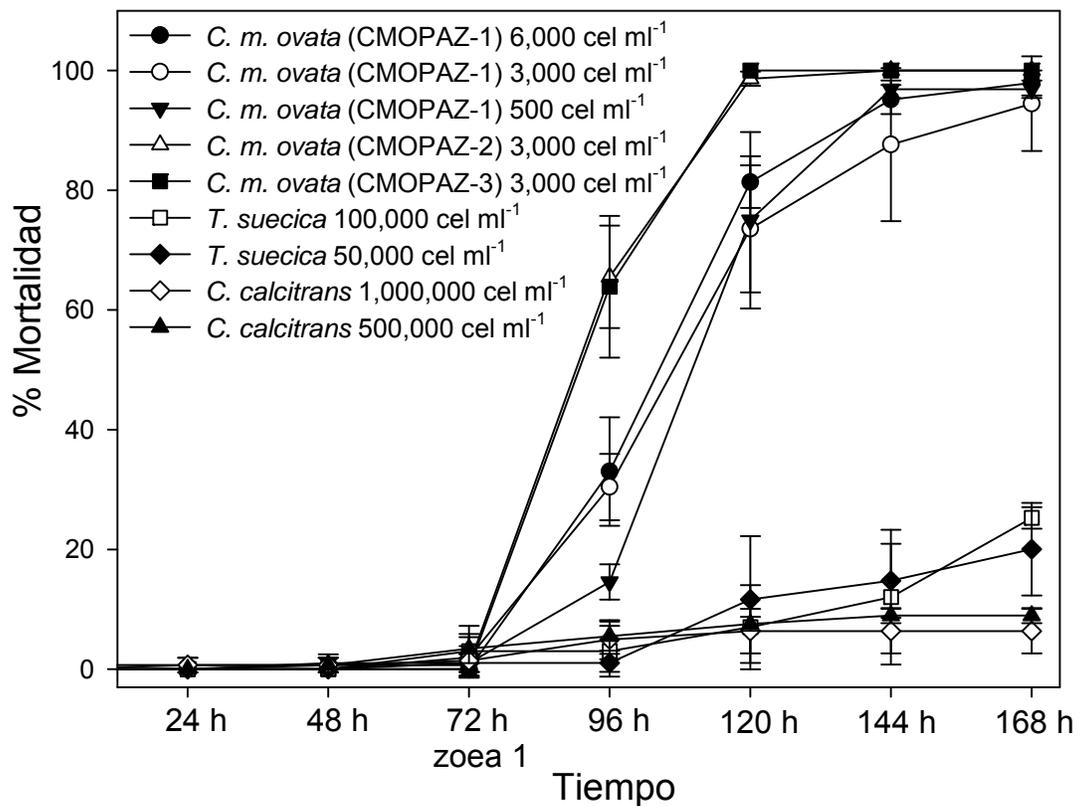


Figura 20. Mortalidad (%) de *Litopenaeus vannamei* a partir de nauplio 2 al ser expuestos a tres cepas de *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3) con concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ y a las microalgas control.

7.3.5. Tiempo letal 50 de *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella subsalsa* y *Chattonella marina* var. *marina*

Se observó que el TL₅₀ en *L. vannamei* al ser expuestos a *C. marina* var. *marina* (CSJV-2) con la concentración de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ fue ligeramente menor (4 días y 10 h) que el resto de los tratamientos, ya que al calcular el TL₅₀ en *L. vannamei* al ser expuestos a *C. subsalsa* y *C. marina* var. *marina* (CSNAV-1 y CSCV-1) con las concentraciones de 0.5, 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ los valores fueron similares (~5 días) (Fig. 21).

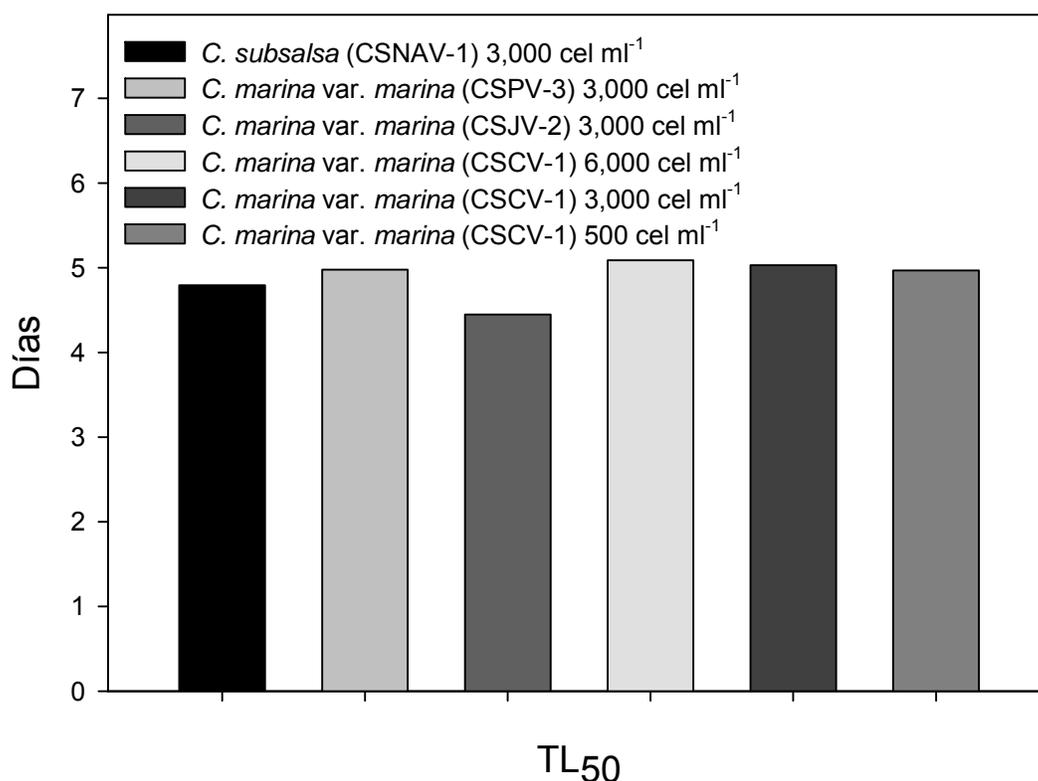


Figura 21. Tiempo letal 50 para *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) y a *Chattonella marina* var. *marina* (CSPV-3, CSJV-2 y CSCV-1).

7.3.6. Tiempo letal 50 de *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3)

Se observó que el TL₅₀ en *L. vannamei* al ser expuestos a *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) con las concentraciones de 0.5, 3 y 6·10³ cél·ml⁻¹ fue similar (~4 días y 12 h) (Fig. 22). En caso del TL₅₀ para *L. vannamei* expuestos a *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-2 y -3) con las concentraciones de 3·10³ cél·ml⁻¹ también fue similar, aunque con valores menores (3 días y 19 h).

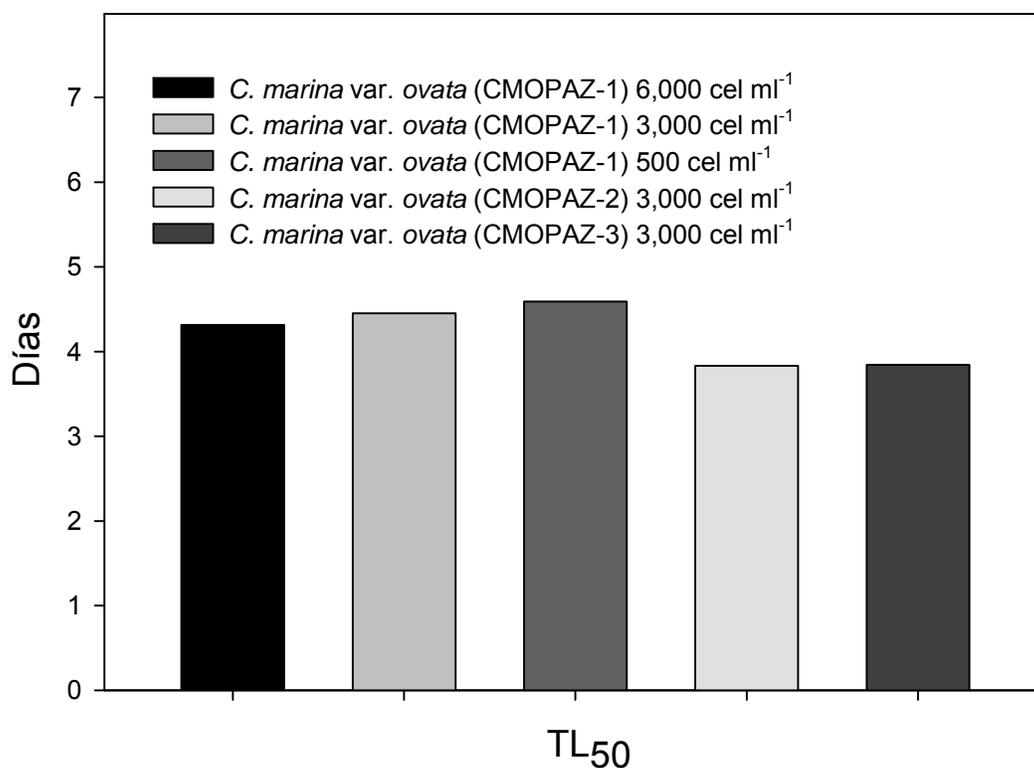


Figura 22. Tiempo letal 50 para *Litopenaeus vannamei* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3).

8. DISCUSIÓN

8.1. Cepas de *Chattonella*

En este estudio se observó que las cepas del género *Chattonella* aisladas del Golfo de California presentaron diferencias en densidad celular, tasa de crecimiento y talla (Tabla 1). *Chattonella subsalsa* fue la cepa que presentó la mayor densidad celular ($4.59 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) a pesar de mostrar la tasa más baja de crecimiento, estos valores coinciden con los reportados por Band-Schmidt *et al.* (2010) bajo las mismas condiciones de cultivo (Tabla 5), aunque ligeramente menores a los reportados por Zhang *et al.* (2004) quienes obtuvieron con cepas de Carolina del Norte y Sur densidades mayores (2.9 y $1.2 \cdot 10^4$ cél·ml⁻¹, respectivamente) variando la intensidad luminosa a $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$ y el fotoperiodo a 16:8 h (L:O).

Las principales diferencias en relación a las cepas de *Chattonella marina* var. *marina* se observaron entre la CSPV-1 y CSPV-3 con respecto a la CSPV-2, la cual mostró una densidad celular 25 % menor que las otras dos, siendo la cepa CSPV-1 la que presentó la tasa de crecimiento más alta (0.354 div·día⁻¹) (Tabla 1), las densidades máximas obtenidas con estas cepas son similares a las reportadas por Band-Schmidt *et al.* (2004) (2.78 - $3.76 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), la mayor tasa de crecimiento registrada es consistente con lo reportado por Marshall & Hallegraeff (1999) bajo las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo, las densidades celulares obtenidas en este estudio son inferiores a lo reportado en la literatura para las cepas aisladas de Japón que van desde $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Khan *et al.*, 1995) hasta $8.17 \cdot 10^6$ cél·ml⁻¹ (Huang *et al.*, 2009) y a las reportadas para cepas de Australia con $5 \cdot 10^4$ cél·ml⁻¹ (Marshall & Hallegraeff, 1999) (Tabla 5), lo anterior indica que probablemente los nutrientes requeridos para elevar las densidades celulares de las diversas cepas de *Chattonella* evaluadas en este trabajo no fueron disponibles, en parte debido a que los medios de cultivo fueron diferentes en algunos trabajos reportados previamente por otros investigadores y a que posiblemente, algunos micronutrientes a nivel traza no se encontraban en el agua marina de donde se prepararon los medios de cultivo en este estudio, por lo que es probable que las condiciones para la formación de FAN con altas densidades aún no se hayan presentado para las poblaciones naturales de *Chattonella* del Golfo de California, ya que en las costas de Tamaulipas se ha

reportado *C. subsalsa* con densidades de $61.3 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹ en el 2007 y *C. marina* con densidades de $95.6 \cdot 10^6$ cél·L⁻¹ en el 2008 (Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011).

En relación a la talla, Demura *et al.* (2009) realizaron un estudio con 31 cepas de *Chattonella marina* aisladas del Mar Interior de Seto (Japón) y determinaron que la longitud celular promedio oscila en 42.3 ± 3.3 µm y el ancho celular promedio en 23.7 ± 1.4 µm, estos valores son similares a los observados en este trabajo. Las células de *Chattonella marina* var. *marina* (CSCV-1) aisladas de Bahía Concepción fueron las que mostraron mayor longitud y ancho (66-90 µm y 36-40 µm, respectivamente), lo que concuerda con lo reportado por Band-Schmidt *et al.* (2004) con esta misma cepa (62-77 µm y 35-37 µm, longitud y ancho respectivamente). Las células de la cepa CSCV-1 se mostraron ligeramente más grandes que las tallas máximas de longitud (49.8 ± 6.6 µm, cepa N14) y ancho (30.3 ± 2.6 µm, cepa N116) reportadas por Demura *et al.* (2009). Mientras que las células de *C. marina* var. *marina* (CSPV-1) aisladas de Bahía de La Paz fueron las que exhibieron las células más pequeñas (33.7-60 µm y 21.4-29.5 µm, longitud y ancho respectivamente), con valores semejantes a las células de menor longitud (35.2 ± 3.3 µm, cepa D3015) encontradas por Demura *et al.* (2009).

Respecto a las variaciones morfológicas observadas se ha documentado que las células de rafdofíceas presentan variaciones entre cepas, mostrando características de desarrollo distintas y morfología variable (polimorfismos) al cultivarlas bajo diferentes condiciones de laboratorio, probablemente debido a requerimientos fisiológicos y ecológicos diferentes o variaciones genéticas (Marshall & Hallegraeff, 1999; Band-Schmidt *et al.*, 2004; Demura *et al.*, 2009). Al respecto, se ha documentado que la morfología celular de *C. marina* está directamente afectada por la temperatura; bajo condiciones óptimas de crecimiento (25 °C, 30 ups) se ha observado que la forma celular en fase exponencial y estacionaria temprana está dominada por la forma de elipse (82-96 %) y en fase lag por la forma esférica (51 %), mientras que a 10°C, 90% de la población se vuelve esférica después de 10 días de inoculadas, en cuanto a la salinidad, se ha documentado que solo el 86 % de las células tienen forma de elipse en 35 ups, en 10 ups el 40 % de las células comienzan a tornarse esféricas hasta el día 10 y la mayoría se vuelven esféricas en la fase

estacionaria, en 5 ups las células en forma de elipse comienzan a cambiar su forma después del día 2 de inoculación y todas se tornan esféricas en el día 10 (Kahn *et al.*, 1998; Marshall & Hallegraeff, 1999).

En este estudio, las células de *Chattonella marina* var. *marina* (CSPV-3) fueron las más esbeltas (18.5-23-6 μm), ligeramente más anchas que las reportadas para otra cepa de *C. marina* (16.2 \pm 3.6 μm , cepa D5011) y las tallas celulares de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) fueron parecidas al promedio de talla (60.1 \pm 5.8 μm y 31.4 \pm 2.7 μm , longitud y ancho respectivamente) previamente documentado por Demura *et al.* (2009). Al comparar las observaciones de la talla celular en las cepas de *Chattonella* en este trabajo con las de otros autores muestran la heterogeneidad como una característica común en las rafdofíceas, lo cual se marcó claramente con las células de *C. marina* var. *marina* (CSPV-1) que mostraron la mayor variación en longitud (33.7-60 μm).

En los ensayos realizados en este estudio, las condiciones de temperatura, intensidad de luz, fotoperiodo, al igual que la salinidad y los nutrientes suministrados fueron las mismas para todas las cepas, por lo que las variaciones en densidad celular, tasa de crecimiento y talla pueden ser atribuibles a la variabilidad individual y a las características propias de cada especie o cepa de *Chattonella*.

Tabla 5. Condiciones de cultivo para cepas del género *Chattonella*.

Especie	Temperatura (°C)	Salinidad (ups)	Irradiancia ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$)	Fotoperiodo h L:O	Tasa de crecimiento (div·día ⁻¹)	Concentración celular máxima (cél·ml ⁻¹)	Referencia
<i>Chattonella antiqua</i> JP	25	25-41	300-500	12:12	0.4	$1.5\cdot 10^4$	Nakamura & Watanabe, 1983.
<i>Chattonella antiqua</i> JP	15-30	10-35	110	—	0.97	—	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1991.
<i>Chattonella antiqua</i> JP	20	—	70	14:10	0.5	$2\cdot 10^4$	Nishibori & Nishijima, 2004.
<i>Chattonella marina</i> AU	25	30	150	12:12	0.47	$5\cdot 10^4$	Marshall & Hallegraeff, 1999.
<i>Chattonella marina</i> AU	25	25	400	12:12	1.08	—	Marshall & Hallegraeff, 1999.
<i>Chattonella marina</i> JP	24	33.5	40	12:12	1.42-2.0	—	Honjo, 1987.
<i>Chattonella marina</i> JP	15-30	10-35	110	—	0.81	—	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1991.
<i>Chattonella marina</i> JP	23-24	—	60	12:12	—	$8\text{-}8.5\cdot 10^3$	Khan <i>et al.</i> , 1995.
<i>Chattonella marina</i> JP	20-25	30	60-140	12:12	0.60-0.74	$1.47\text{-}1.58\cdot 10^4$	Khan <i>et al.</i> , 1998.
<i>Chattonella marina</i> JP	26	—	30	12:12	—	$2.7\cdot 10^4$	Okamoto <i>et al.</i> , 2000.
<i>Chattonella marina</i> JP	23	15-30	80	16:8	—	$6\text{-}9\cdot 10^3$	Zhang <i>et al.</i> , 2004.
<i>Chattonella marina</i> JP	24	36	100	24:0	0.65	$6.4\cdot 10^4$	Bridgers <i>et al.</i> , 2004.
<i>Chattonella marina</i> JP	20	33	40	12:12	0.67	$8.17\cdot 10^6$	Huang <i>et al.</i> , 2009.
<i>Chattonella marina</i> MX	21	35	150	12:12	—	$2.78\text{-}3.76\cdot 10^3$	Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2004.
<i>Chattonella subsalsa</i> CN	23	15-30	80	16:8	—	$0.6\text{-}2.9\cdot 10^4$	Zhang <i>et al.</i> , 2004.
<i>Chattonella subsalsa</i> CS	23	15-30	80	16:8	—	$0.7\text{-}1.2\cdot 10^4$	Zhang <i>et al.</i> , 2004.
<i>Chattonella subsalsa</i> MX	23	—	150	12:12	0.21-0.35	$3.17\text{-}4.59\cdot 10^3$	Band-Schmidt <i>et al.</i> , 2010.

AU= Australia, CN= Carolina del Norte (E. U. A.), CS= Carolina del Sur (E. U. A.), JP= Japón, MX= México.

Los pigmentos detectados en las rafidofíceas son consistentes con lo descrito para este grupo, los cuales consisten en clorofila *a*, *c*1-2, fucoxantina, β -caroteno y violaxantina que son considerados como pigmentos característicos (Kohata *et al.*, 1997; Mostaert *et al.*, 1998; Bravo-Sierra, 2004).

La clorofila *a* fue el pigmento dominante en todas las cepas además, de los cinco pigmentos accesorios que fueron determinados (fucoxantina, violaxantina, diadinoxantina, zeaxantina y β -caroteno), la fucoxantina fue el más dominante (Tabla 2), lo cual coincide con lo reportado por diversos autores quienes determinaron cuantitativamente dominante estos dos pigmentos en cepas de rafidofíceas marinas (Mostaert *et al.*, 1998; Andersen, 2004; Band-Schmidt *et al.*, 2004).

Las cepas *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) y *Chattonella marina* var. *marina* (CSPV-1) fueron las que presentaron el mayor contenido de clorofila *a* y clorofila *c*1-2, así como de fucoxantina y violaxantina (Tabla 2). En particular, la cepa CSNAV-1 mostró valores de pigmentos accesorios (carotenoides) ligeramente mayores al resto de las cepas evaluadas, lo que indica que existen variaciones en el contenido de pigmentos entre especies. Los carotenoides participan en la respuesta fotoadaptativa especialmente a través de la operación del ciclo de la violaxantina o ciclo de las xantofilas (Havaux & Niyogi, 1999; Marshall & Newman, 2002); el cual es un proceso de reacciones cíclicas que se produce en los tilacoides de los cloroplastos y se presenta cuando la energía lumínica absorbida por las plantas supera la capacidad de fotosíntesis, transformando zeaxantina a partir de violaxantina mediante catálisis por la enzima deepoxidasa, disipando el exceso de energía lumínica como energía térmica, a mayor intensidad de luz, mayor transformación de violaxantina en zeaxantina (Young *et al.*, 1997; Havaux & Niyogi, 1999). Al respecto Marshall & Newman (2002) determinaron en dos cepas de *C. marina* aisladas de Australia y Japón que en niveles de alta irradiancia ($>500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$) los niveles de violaxantina y zeaxantina para la cepa australiana se mantenían bajos (19.29 ± 6.03 y $3.56 \pm 0.41 \text{ ng}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente), mientras que para la cepa japonesa se elevaban considerablemente (90.7 ± 28.3 y $17.14 \pm 10.73 \text{ ng}\cdot\text{cél}^{-1}$, respectivamente) en cambio, notaron que en niveles de baja irradiancia ($<150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$) los valores de violaxantina y zeaxantina eran relativamente similares para la cepa

australiana (36.6 ± 18.38 y 0.99 ± 0.44 ng·cél⁻¹, respectivamente) y japonesa (45.81 ± 4.65 y 0.76 ± 0.16 ng·cél⁻¹, respectivamente), por lo que sugieren que la cepa de Japón utiliza el ciclo de las xantofilas para moderar la inhibición por alta irradiancia.

La presencia de brevetoxinas (PbTx) en los principales géneros de rafdofíceas implicados en la formación de FAN, *Chattonella*, *Fibrocapsa* y *Heterosigma* se había documentado hasta antes del año 2000, en estos estudios las principales técnicas utilizadas fueron: TLC (cromatografía de capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño) y análisis espectral de masas, las cuales comparaban los resultados con valores de referencia de estándares de PbTx (Onoue *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1995, 1996a, b, 1997, 1998).

En este estudio no se detectó la presencia de PbTx en las cepas de *Chattonella* al someter las muestra al método de resonancia magnética; resultados similares se han observado en estudios recientes con *C. marina* y con diversas cepas de *Fibrocapsa japonica* donde han reportado la ausencia de PbTx para este grupo (Marshall *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2004, 2009).

Recientemente, las técnicas para la detección de PbTx se han mejorado evitando los falsos positivos en los resultados (Bourdelaís *com. per.*); se ha documentado para diversas especies de microalgas tóxicas, que el perfil de toxinas entre cepas de una misma especie es variable y que depende de la fase de crecimiento en la que se encuentren, así como de factores ambientales externos (Jeglitsch *et al.*, 1998; Van Apeldoorn *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009), por lo que no se descarta la posibilidad de que las rafdofíceas y en particular las especies del género *Chattonella* produzcan compuestos análogos o similares a las PbTx que estén implicados en su toxicidad. Al respecto, Marshall *et al.*, (2003) negaron la presencia de PbTx en *C. marina*, sin embargo detectaron a partir de sus fracciones, moléculas de especies químicas que compartían una composición elemental muy similar a todas las toxinas marinas poliéter conocidas y probablemente con estructuras similares, señalando que es posible que pequeñas cantidades de toxinas de baja potencia estén presentes en *C. marina*.

En relación a las especies reactivas de oxígeno (ERO), en este estudio todas las cepas examinadas mostraron producción de ERO con singulares diferencias en los resultados, debido a que las cepas de *Chattonella* CSCV-1 y CSPV-1 mostraron las concentraciones más altas de radical superóxido (O_2^-) y la cepa CSPV-1 mostró la mayor capacidad de peroxidación lipídica (relacionada con radicales OH^\cdot) (Tabla 3), diferencias similares entre cepas se han observado por Oda *et al.* (1997) que manifestaron que estos valores son parcialmente debidos a su talla celular, lo cual coincide con lo observado para la cepa CSCV-1, pero difiere con lo observado para la cepa CSPV-1 que fue la que presentó la talla más pequeña, estas discrepancias pueden ser debido a la capacidad independiente de cada cepa de producir ERO y a los mecanismos que controlan esta producción (Marshall *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2007), al respecto se ha documentado a partir de observaciones microscópicas por fluorescencia, que *Chattonella marina* y *C. ovata* generan el O_2^- principalmente sobre la superficie celular mientras el H_2O_2 lo generan en compartimientos intracelulares, indicando que probablemente estas ERO se generen por procesos independientes, ya que mencionan que el sistema enzimático análogo a la NADPH oxidasa que está localizado en la superficie celular de *Chattonella* es la principal responsable de generación de O_2^- y la fuente principal de generación de H_2O_2 puede no derivarse por simple dismutación del O_2^- (Kim *et al.*, 2000, 2007). Por otra parte, las cepas de *C. marina* var. *marina* CSCV-1 y CSPV-1 fueron aisladas de localidades diferentes, por lo que pueden existir diferencias entre diversas poblaciones de una misma especie separadas geográficamente, ya que se ha observado que producen diferentes niveles de ERO, tal como el H_2O_2 en *H. akashiwo* con rangos de 0.14 a 0.90 μM (Twiner *et al.*, 2001).

Se ha documentado que la producción de radical superóxido (O_2^-) es directamente proporcional a la densidad celular de las rafdofíceas, pero cuando alcanzan la fase estacionaria esta disminuye rápidamente, además se ha observado que células esféricas generan radical superóxido (O_2^-) en menor cantidad que células alargadas, lo cual coincide con lo observado en este estudio para la cepa de *C. marina* var. *marina* CSPV-1, la cual mostró la mayor longitud y produjo la mayor cantidad de radical superóxido (O_2^-), al respecto algunos autores indican que las

máximas generaciones de radical superóxido O_2^- ocurren durante la fase de crecimiento exponencial (Ishimatsu *et al.*, 1996b; Kawano *et al.*, 1996; Twiner & Trick, 2000).

Al comparar el efecto de bloquear la fotosíntesis en *Chattonella marina* entre el fotosistema I y II entre las fases de luz y oscuridad Marshall *et al.* (2002a) determinaron que no había diferencias significativas entre el bloqueo y el tratamiento de oscuridad, mencionando que en presencia de luz la producción de O_2^- era mayor, resultados similares fueron obtenidos con el método de quimioluminiscencia por *C. antiqua* que determinaron que la generación de O_2^- depende de la fase de crecimiento celular y que la producción de O_2^- y el H_2O_2 se incrementan durante la fase luminosa (Kim *et al.*, 2005), lo que implica que este aumento está controlado parcialmente por electrones donados a través de la transferencia de electrones en la fotosíntesis permitiendo la generación de ERO (Marshall *et al.*, 2002a); además, algunos autores han documentado que la generación de O_2^- presenta sus valores máximos durante la fase de crecimiento exponencial mientras que el H_2O_2 los presenta en la fase estacionaria temprana (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007).

La producción de ERO también está relacionada con el potencial metabólico y con sistemas enzimáticos. Se ha observado que el producto inicial de radicales reactivos generados por *C. antiqua* y *C. marina* es indudablemente el radical superóxido (O_2^-) (Kim *et al.*, 1999b), que se transforma posteriormente en otros radicales libres tales como OH^- por las reacciones de Fenton o Haber-Weiss. El radical OH^- puede ser utilizado para la asimilación de nutrientes como el carbono (Oda *et al.*, 1992a, b), por lo que probablemente la cepa de *C. marina* var. *marina* CSPV-1 cuente con la capacidad de asimilar este y otros nutrientes de forma más efectiva ya que en este estudio mostró la mayor tasa de crecimiento ($0.354 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$) así como la mayor peroxidación lipídica la cual está asociada a la producción de OH^- .

En adición al radical superóxido O_2^- y al H_2O_2 , estudios recientes mostraron que *C. marina*, *C. ovata* y *H. akashiwo* producen óxido nítrico (NO), una molécula gaseosa radical con una amplia variedad de actividades biológicas la cual también puede estar involucrada en el potencial tóxico de estas microalgas. El NO es continuamente generado en la superficie celular por una enzima análoga a la óxido

nítrico sintetasa (NOS), en *C. marina* se obtuvo un estimado de 10 μM de NO en una densidad de $1 \cdot 10^4 \text{ cel} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Kim *et al.*, 2006, 2008).

De acuerdo con lo propuesto por Marshall *et al.* (2002a) la mayor producción de ERO en *C. marina* ocurre en la fase exponencial de crecimiento sugiriendo que los radicales de oxígeno están relacionados durante la actividad celular de los procesos metabólicos de la microalga, como agentes antibacteriales, protección alelopática, e involucrados en el transporte de nutrientes o en la oxidación y reducción de metales traza, tal como se ha observado en otras especies fitoplanctónicas (Palenik *et al.*, 1987; Marshall *et al.*, 2003; Garg *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos comunes para todas las cepas examinadas fueron 14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 16:1 ω 7, 16:1, 18:1 ω 9, 18:1 ω 7, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3, 20:5 ω 3 y 22:5 ω 6 (Tabla 4). Grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son comunes en rafdofíceas (Marshall *et al.*, 2002b; Fu *et al.*, 2004; De Boer *et al.*, 2009).

El perfil de ácidos grasos para las cepas de *Chattonella marina var marina* (CSPV-1, -2, -3 y CSCV-1) fue similar con algunas diferencias, la cepa CSPV-2 mostró la mayor cantidad del ácido 16:0 (ácido palmítico) (19.2 %), mientras que la cepa CSCV-1 mostró bajos valores del 18:4 ω 3 (ácido estearidónico) y del 20:5 ω 3 (ácido eicosapentaenoico) (18.2 y 19.8 %, respectivamente) en relación a las demás. Los datos observados en este estudio son consistentes con lo reportado previamente por diversos autores para esta especie (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2002b). Las diferencias en el contenido de ácidos grasos entre cepas de la misma especie observados en este trabajo pueden ser debidas en parte a características fisiológicas intrínsecas de cada cepa (Mostaert *et al.*, 1998).

Al determinar el perfil de ácidos grasos de diversas cepas de rafdofíceas, Marshall *et al.* (2002b) detectaron amplias diferencias, al comparar las cepas de *C. marina* aisladas de Australia, Japón y Nueva Zelanda, notaron que las principales diferencias radicaban en el contenido de los ácidos grasos 14:0, 18:1 ω 9 *cis* y 20:4 ω 6. Diferencias entre cepas también se han observado en las cantidades por célula de los ácidos 18:4 ω 3, 20:5 ω 3 y 20:4 ω 6 de *Fibrocapsa japonica*, aunque De Boer *et al.*, (2009) mencionan que las cantidades totales varían de 150 a 350 $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ para la mayoría de las cepas, algunas contienen desde 40 hasta 450 $\text{pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ además

de presentar porcentajes diferentes de cada ácido graso. En estudios recientes, se han detectado cantidades considerables de AGPI, tales como el 20:5 ω 3, 18:4 ω 3 y 20:4 ω 3 (13.33, 7.94 y 2.51 pg-cel, respectivamente) en diversas cepas de *F. japonica* del Mar Adriático (Pezzolesi *et al.*, 2010). Las concentraciones de AGPI están estrechamente relacionadas con la producción de compuestos hemolíticos, sin embargo se ha observado que cepas de rafdofíceas con bajo contenido de AGPI poseen alta actividad hemolítica (De Boer *et al.*, 2009).

Al comparar los resultados obtenidos de la cepa CSNAV-1 (*Chattonella subsalsa*) con las cepas restantes (*C. marina* var *marina*: CSPV-1, -2, -3 y CSCV-1), la cepa CSNAV-1 mostró bajas concentraciones de los AGPI 18:4 ω 3 (ácido estearidónico) (1.1 %) y 20:5 ω 3 (ácido eicosapentaenoico) (10.1 %), así como altas concentraciones del ácido graso poliinsaturado 18:2 ω 6 (ácido linoleico) (10.8 %) y del ácido graso saturado 16:0 (ácido palmítico) (25.8 %) (Tabla 4), lo cual difiere de los valores reportados por Marshall *et al.* (2002b) para esta especie, en donde los ácidos 18:4 ω 3 y 20:5 ω 3 son más abundantes (13.2 y 19.5 %, respectivamente), mientras que los valores del 18:2 ω 6 y 16:0 obtenidos en este trabajo son mayores a lo reportado por estos autores (3.1 y 21 %, respectivamente). Las diferencias entre *C. subsalsa* y *C. marina* en este trabajo pueden estar relacionados al metabolismo particular de cada especie, así como en la asimilación e incorporación de nutrientes.

Las concentraciones del 16:0 en *C. subsalsa* semejan más a lo determinado para *C. marina*, *C. antiqua* y *H. akashiwo* (~25 %) (Mostaert *et al.*, 1998; Marshall *et al.*, 2002b). Estos datos pueden indicar que esta especie almacena constantemente productos de reserva, ya que se ha observado que el incremento en la cantidad de ácidos grasos saturados está relacionado con la acumulación de triacilglicerol (TAG). Diversos autores han documentado que especies de microalgas cuyo hábitat natural se caracteriza por cambios rápidos en las condiciones ambientales, especialmente por cambios bruscos de temperatura y por el agotamiento de los nitratos, acumulan ácidos grasos poliinsaturados en forma de TAG, considerado como el mayor precursor de ácido araquidónico (C20:4 ω 6) y de ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3) principalmente, los cuales son componentes esenciales de las membranas celulares (Cohen *et al.*, 2000; Bigogno *et al.*, 2002).

Los AGPI pueden estar implicados en dominancia algal y en particular como inhibidores contra depredadores de zooplancton y otros animales en el ambiente acuoso (Jüttner, 2001, 2005; De Boer *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). A su vez, la producción de AGPI de origen algal se ha relacionado con la participación como mensajeros modulando la actividad enzimática, capacidad de inhibir el crecimiento de otras especies algales o zooplancton, inclusive se ha hipotetizado la actividad autoinhibitoria (Wu, *et al.*, 2006; Gentien *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011).

8.2. *Paralabrax maculatofasciatus*

En el presente estudio se mostró que la rafidofícea *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) suministrada a diferentes concentraciones provoca porcentajes de mortalidad diferentes sobre las fases iniciales del desarrollo de *P. maculatofasciatus*. Se determinó que la fase de embrión en segmentación fue la más sensible, ya que con concentraciones de 6, 8 y $10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ se presentó aproximadamente el 98 % de mortalidad al final del bioensayo (Fig. 6). La fase de eleuteroembrión mostró sensibilidad intermedia ya que con las concentraciones de 4 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ exhibió mortalidades del 49 y 61 %, respectivamente (Fig. 8). De acuerdo al modelo Probit las CL₅₀ de *C. subsalsa* son menores para embriones en segmentación y eleuteroembriones (~ 3 y $\sim 4.5 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, respectivamente) que en embriones, mostrándose como las fases de desarrollo más susceptibles a la exposición por *C. subsalsa*. Además los TL₅₀ para los bioensayos de fase de segmentación con las concentraciones de 6, 8 y $10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, fueron 3 veces más cortos a los determinados para las fases de embrión y eleuteroembrión con una concentración de $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (Fig. 14), lo que muestra que el efecto por exposición a *C. subsalsa* es más rápido en embriones en segmentación.

Se ha observado que las PbTx-1 y -3, causan efectos adversos en embriones de *Oryzias latipes* antes y después de eclosionar. Al suministrar PbTx-1 por microinyección en bajas concentraciones (1-3 ng·embrión⁻¹) han documentado problemas en la eclosión y curvatura lateral de la columna, con dosis más altas (3.4-4 ng·embrión⁻¹) detectaron malformaciones en el cráneo y ojos mal posicionados (Kimm-Brinson & Ramsdell, 2001). En el caso de la PbTx-3 observaron que dosis

superiores a $1 \text{ ng}\cdot\text{embrión}^{-1}$, provocaron convulsiones continuas, rompimiento de vasos sanguíneos, arritmias en la función cardiovascular así como decremento en el éxito de eclosión, determinando una DL_{50} de $4 \text{ ng}\cdot\text{embrión}^{-1}$ de PbTx-3 (Colman & Ramsdell, 2003).

Al exponer la fase de embrión de *P. maculatofasciatus* se observó que fue la menos sensible a *C. subsalsa* con mortalidades inferiores al 50 % ($8\cdot 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$) al final del experimento (Fig. 7). En los tratamientos control se observaron mortalidades menores al 20 %, con excepción de *P. micans* (33 %) en el bioensayo con eleuteroembriones. El desarrollo embrionario presenta diversos cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos entre una fase de desarrollo y otra. Se ha establecido que la morfogénesis desde la fertilización del huevo hasta la formación del embrión sigue el mismo modelo básico en la mayoría de peces teleósteos. En la fase de segmentación del periodo embrionario se forma el blastodisco el cual se segmenta y da origen a la formación consecutiva de los blastómeros. Durante la segmentación del blastodisco se forman tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo una vez formadas comienza la epibolia; este proceso da origen al anillo germinal y al escudo embrionario. La gastrulación se considera finalizada con el cierre del blastoporo, dando origen al embrión (Falk-Petersen, 2005). De acuerdo a las diferencias observadas en los efectos de mortalidad entre las tres fases de desarrollo con la cepa de *C. subsalsa*, probablemente la morfo-fisiología en la ontogenia inicial de *P. maculatofasciatus* esté implicada en el efecto que provocan las diferentes concentraciones de la rafidofícea en estudio, tornando al corión selectivo o limitando el intercambio de ciertas moléculas con el exterior del embrión una vez formado.

En relación a los bioensayos realizados con embriones de *P. maculatofasciatus* expuestos a *Chattonella marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1), *C. marina* var. *marina* (BAPAZ) (CSPV-3) y *C. marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) desde embriones en fase de segmentación hasta apterolarvas, se observaron efectos diferentes con cada cepa. En las cepas que exhibieron los mayores porcentajes de mortalidad se observó que algunos embriones murieron sin lograr eclosionar, estas observaciones no fueron cuantificadas debido a que se

presentaban con alta variabilidad, estos efectos se han reportado para brevetoxinas, al realizar microinyecciones de la PbTx-1 y -3 en embriones de *Oryzias latipes* intentan eclosionar por la cabeza y no por la cola como comúnmente se ha observado en peces, ocasionando eclosiones parciales y muerte (Kimm-Brinson & Ramsdell, 2001), además Colman & Ramsdell (2003) señalaron que el ritmo cardiaco de los embriones es afectado de forma distinta al adicionar PbTx-1 y PbTx-3 provocando bradicardia y taquicardia, respectivamente.

Las cepas de *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) seguida de *C. marina* var. *marina* (BAPAZ) fueron la que mostraron las mayores mortalidades, las cuales se incrementaron conforme a la concentración celular (2, 4, 6 y $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹), aunque cabe mencionar que con la mayor concentración probada de *C. marina* var. *ovata* ($10 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹) se obtuvieron resultados inocuos (Fig. 9 y 10), en este punto se ha documentado que la producción del radical superóxido (O₂⁻) en *Chattonella* es inversamente proporcional a la densidad celular, posiblemente para evitar la autotoxicidad en altas densidades, debido a que se hipotetiza la protección alelopática como la principal función de generación de ERO en rafidofíceas (Kawano *et al.*, 1996; Twiner & Trick, 2000; Marshall *et al.*, 2003).

Efectos similares relacionados a las concentraciones de *Chattonella* detectadas en este trabajo fueron observados con los peces *Acanthochromis polycanthus* (0.6-1.2 g) al ser expuestos a diversas concentraciones celulares de *C. marina* de 0.25 a $35 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, Marshall *et al.*, (2003) reportaron que los peces expuestos a concentraciones algales superiores a $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ causaron mortalidad más lentamente (143 ± 8 min) en comparación a los peces expuestos a concentraciones celulares menores a $8 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ (89 ± 6 min), a su vez mencionan que en estas concentraciones los organismos presentaron síntomas de hiperventilación, excreción de mucus y vasodilatación de las branquias, seguido de una incapacidad de mantener la posición en la columna de agua.

En los resultados obtenidos con los bioensayos resalta el efecto inofensivo que provocó la cepa de *C. marina* var. *marina* (BACO), ya que la mortalidad registrada fue menor al 15 % en las tres concentraciones suministradas (Fig. 11), incluso con porcentajes por debajo de los controles (25 %), estos resultados pueden

estar relacionadas en parte a las diferentes condiciones ambientales de su lugar de aislamiento, las cuales pueden influir en su fisiología y por ende en su toxicidad, tal como se ha observado en otras especies de rafidofíceas donde se han determinado diferencias en la producción ERO y de compuestos hemolíticos (Oda *et al.*, 1997; Fu, 2003; De Boer *et al.*, 2009).

La cepa de *C. marina* var. *ovata* fue la que causó la mayor sensibilidad en los embriones ya que mediante el modelo Probit se calculó una CL_{50} de $1.73 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, incluso menor a la calculada para *C. subsalsa*. Sin embargo los TL_{50} calculados para la cepa de *C. marina* var. *ovata* y *C. marina* var. *marina* (BAPAZ) fueron ligeramente mayores en comparación a los calculados para *C. subsalsa* con concentraciones similares, lo que indica que *C. subsalsa* provoca la mortalidad de embriones de *P. maculatofasciatus* en menor tiempo, debido probablemente a una mayor producción y/o liberación de metabolitos secundarios que resultan tóxicos para los peces, tales como la generación de ERO que puede variar de una cepa a otra, incluso se ha documentado que en presencia de peces *Chattonella* produce significativamente mayor cantidad de radical superóxido (O_2^-) que cuando no se encuentra expuesta a los peces (Twiner *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2003).

Diversos autores mencionan que la producción de ERO no es la causa principal de toxicidad en rafidofíceas, donde probablemente otros compuestos intervienen. La posible relación de los ácidos grasos poliinsaturados y sus productos de oxidación como causantes de toxicidad en peces es una de las líneas de investigación propuestas para esclarecer los efectos que las rafidofíceas provocan. En la década de los años 70 y 80 se reportó que los AGPI principalmente el 16:4 y el 18:4 pudieron ser las principales sustancias causantes de las altas mortalidades de diversas especies de peces en cultivo (*Seriola quinqueradiata*, *S. rivoliana*, *Spondyliosoma cantharus* y *Pagrus major*), las cuales se suscitaron durante eventos de FAN originados principalmente por *C. antiqua*, *C. marina* y *H. akashiwo*. Diversos autores manifestaron que la muerte fue causada por asfixia, debido a la destrucción de la superficie de las lamelas branquiales, lo cual originó el decremento del pH de la sangre de los peces como consecuencia a la falta de transferencia de oxígeno por parte de la hemoglobina (Okaichi, 1989).

Se ha propuesto que la toxicidad de *Chattonella* puede estar relacionada al efecto sinérgico de las ERO con algún otro compuesto, al respecto se ha detectado que la actividad haemolítica se suscita por la hidrólisis de lípidos en particular por la acción del radical OH⁻ de las ERO, con la consecuente formación de AGPI liberados cuando las células se rompen (Marshall *et al.*, 2003, 2005b; Kuroda *et al.*, 2005).

Marshall *et al.* (2003) proponen como acción de toxicidad de *Chattonella* que pequeñas cantidades de ácidos grasos libres pueden ser tóxicos para peces, mencionan que 0.2 mg·L⁻¹ del ácido 20:5ω3 (ácido eicosapentaenoico) en presencia de súperoxido (O₂⁻) presenta un TL₅₀ de 83 min. lo cual es equivalente a 4 mg·L⁻¹ del ácido eicosapentaenoico o alrededor de 1·10³ cél·ml⁻¹ de un cultivo de *Chattonella*, resaltando que ambas concentraciones son tóxicas para peces. Además plantean un efecto sinérgico, mencionan que la presencia de ácidos grasos libres con ERO pueden dañar las membranas de las branquias lo cual puede resultar en la muerte del pez, para lo cual proponen 3 posibles escenarios: 1. Ruptura de las membranas branquiales resultando en una capacidad respiratoria reducida, 2. Absorción de ácidos grasos libres o súperoxido (O₂⁻) dentro del torrente sanguíneo reduciendo el pH de la sangre suprimiendo la capacidad respiratoria u osmoregulatoria y/o 3. Destrucción de las células cloro reduciendo la capacidad osmoregulatoria.

Los mecanismos precisos de toxicidad por los que las rafidofíceas en particular de *Chattonella* spp. causan muertes masivas de peces y pérdidas económicas millonarias en acuicultura siguen siendo controversiales.

8.3. *Litopenaeus vannamei*

La ontogenia inicial de *Litopenaeus vannamei* es similar al de otras especies de crustáceos pertenecientes a la familia Penaeidae, los estadios larvales comprenden tres fases: nauplio, zoea y mysis durante las cuales se presentan diversos cambios morfológicos y fisiológicos (Anderson *et al.*, 1949; Kitani, 1986). La fase de nauplio comprende 6 estadios, durante esta etapa las larvas forman sus apéndices mandibulares y pequeños dientes, por lo que en esta fase solo asimilan nutrientes de reservas vitelinas acumuladas previamente durante la formación del huevo, debido principalmente a que presentan tracto digestivo rudimentario y

apéndices ventrales sin función. La fase de zoea comprende 3 estadios, en esta fase los apéndices destinados para su alimentación así como el tracto alimentario se han completado y son funcionales, consistiendo de boca, esófago, estómago, intestino y ano, iniciando su alimentación exógena de fuentes fitoplanctónicas. La fase de mysis comprende 3 estadios con morfología semejante a los adultos aunque sin las estructuras sexuales desarrolladas, esta fase se caracteriza por el cambio en su alimentación de fitoplanctófaga a zooplanctófaga (Anderson *et al.*, 1949; Kitani, 1986).

La evaluación de las diversas cepas de *Chattonella* se inició en la fase de nauplio 2 ó 3 de *L. vannamei* y culminó al alcanzar la fase de zoea 3. Las cepas que exhibieron el menor tiempo en provocar la mortalidad a *L. vannamei* fueron las cepas de *C. marina* var. *ovata* CMOPAZ-2 y -3, al suministrarlas en concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, mostrando los porcentajes de mortalidad más altos (~100 %) a las 120 h. Los resultados obtenidos con estas dos cepas, revelaron una estrecha similitud entre ellas para cada observación, con un TL₅₀ calculado de 3 días y 19 h del tiempo total de exposición, aunque cabe mencionar que fueron solo 19 h de exposición en la fase de zoea 1, lo que implica que estas cepas al ser ingeridas se mostraron altamente tóxicas.

Las cepas que siguieron en grado de toxicidad fueron *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1) en concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, así como *C. marina* var. *marina* (ISJ) (CSJV-2) en concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹. Estas dos cepas mostraron tendencias similares en el efecto tóxico contra *L. vannamei*, presentando un TL₅₀ calculado de ~4 días 10 h. La cepa de *C. marina* var. *marina* (BACO) (CSCV-1) en concentraciones de 3 y $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, así como la cepa de *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1) se mantuvieron con porcentajes de mortalidad muy cercanos a los obtenidos con las cepas anteriores, ya que se calculó un TL₅₀ de ~5 días.

Al igual que con *Chattonella* en este estudio, se ha observado en diversas microalgas formadoras de FAN que las concentraciones celulares influyen en la sobrevivencia y en el comportamiento de *L. vannamei*. Al exponer postlarvas de *L. vannamei* a diversas concentraciones celulares de los dinoflagelados *Gymnodinium catenatum* y *Karenia brevis* en concentraciones menores a 10^3 cél·ml⁻¹ los

organismos sobrevivieron más de 48 h mostrando un comportamiento normal, en cambio los organismos expuestos a concentraciones mayores a 10^4 cél·ml⁻¹ mostraron comportamiento anormal y muerte entre 6 y 32 h posteriores a la exposición. Pérez-Linares *et al.* (2009) notaron que 50 % de las células de ambos dinoflagelados fueron ingeridas por los camarones en los primeros 90 minutos de la exposición.

Con los ensayos de toxicidad de *L. vannamei* realizados en este trabajo, se observaron diferencias en el efecto de las cepas *Chattonella subsalsa* (CSNAV-1), *C. marina* var. *marina* (CSPV-3, CSJV-2 y CSCV-1) y *C. marina* var. *ovata* (CMOPAZ-1, -2 y -3). Se observó de manera general que las concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ de todas las cepas evaluadas culminó con el 100 % de mortalidad de *L. vannamei*, estas concentraciones son comunes en la naturaleza (Lu & Göbel, 2000; Tiffany *et al.*, 2001; Jugnu & Kripa, 2009).

En todos los tratamientos los efectos en la mortalidad se observaron a partir del inicio de la fase de zoea 1, justo al inicio de la alimentación exógena. Las células de todas las cepas de *Chattonella* suministradas fueron consumidas durante las tres fases de zoea de *L. vannamei*, adicionalmente se observó que también consumió las microalgas control *Tetraselmis suecica* y *Chaetoceros calcitrans* con porcentajes de mortalidad menores al 25 %, por lo que probablemente los efectos en la mortalidad de *L. vannamei* fueron por ingesta y no por contacto, debido a que el efecto en las fases de nauplio fue nulo.

A pesar de que se consideró la posibilidad de que las cepas de *Chattonella* presentaban características nutricionales inadecuadas para el desarrollo y sobrevivencia de *L. vannamei*, se observó que *C. subsalsa* (CSNAV-1) y *C. marina* var. *marina* BAPAZ (CSPV-3) en concentraciones de $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, mostraron porcentajes de mortalidad inferiores (20.83 y 4.17 %, respectivamente) a los obtenidos con las microalgas control. Se ha documentado que las rafdofíceas producen mayor cantidad de compuestos tóxicos cuando se encuentran en su fase de crecimiento exponencial en comparación con su fase estacionaria (Twiner & Trick, 2000; Liu *et al.*, 2007), por lo que los resultados obtenidos en este estudio nos pueden indicar que compuestos tóxicos generados por las células de las diversas

cepas de *Chattonella* al ser suministradas en fase de crecimiento exponencial pueden estar implicados como la causa principal de mortalidad en *L. vannamei*.

El efecto tóxico del género *Chattonella* sobre larvas de *L. vannamei* se ha observado en campo, en la Bahía de Kun Kaak, Sonora, diversos laboratorios de producción de post-larvas de camarón resultaron afectados con la mortalidad del 40 % de su producción, esto debido a que en la Bahía se registró un evento de FAN dominado por el género *Chattonella* y mediante el canal de llamada introdujeron células de *Chattonella* a sus sistemas causando las bajas (Barraza-Guardado *et al.*, 2004).

En investigaciones realizadas con postlarvas de *L. vannamei* suministrando microalgas formadoras de FAN conocidas por su toxicidad se han documentado repercusiones en tallas y pesos menores así como bajas tasas de crecimiento en relación a los controles, tal como lo observado por Pérez-Linares *et al.* (2003) con la exposición a la cianobacteria *Schizothrix calcicola*, en estos ensayos no encontraron diferencias en los porcentajes de mortalidad, sin embargo notaron que la actividad alimenticia se redujo, posteriormente detectaron a partir de cortes histológicos que presentaban daños en el tracto gastrointestinal, lo cual pudo interferir en la asimilación de nutrientes, en nuestro estudio las larvas expuestas a *Chattonella* no fueron medidas, sin embargo se observó sin cuantificar un efecto de menor talla sobre las larvas expuestas a concentraciones de $3 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹ con la mayoría de las cepas en relación a las expuestas a los controles y a las cepas de *Chattonella* con concentraciones de $6 \cdot 10^3$ cél·ml⁻¹, las larvas con menor talla aparente se registraban muertas en la siguiente observación, por lo que quizás un efecto en la asimilación de nutrientes por parte de los compuestos tóxicos producidos por las rafidofíceas en fase de crecimiento exponencial no queda descartado.

9. CONCLUSIONES

Las cepas del género *Chattonella* del Golfo de California presentaron diferencias en densidad celular, tasa de crecimiento y talla, además de presentar características morfológicas y bioquímicas diferentes.

Se confirmó por el método de resonancia magnética que las cepas de *Chattonella* spp. del Golfo de California evaluadas en este estudio no producen brevetoxinas.

El contenido de los ácidos grasos 18:4 ω 3 (ácido estearidónico) y 20:5 ω 3 (ácido eicosapentaenólico) detectado en las cepas de *Chattonella* spp en este estudio es ligeramente mayor a lo reportado en la literatura.

Las cepas de *Chattonella* evaluadas en este trabajo causaron efectos tóxicos en la ontogenia inicial de peces y crustáceos. En *Paralabrax maculatofasciatus*, la fase de embrión en segmentación fue la más sensible para la mayoría de las cepas. En *Litopenaeus vannamei* la fase de zoea fue la más sensible con todas las cepas de *Chattonella* spp.

Se observó un efecto diferencial entre las diversas cepas de *Chattonella* spp. y sus concentraciones al ser suministradas a embriones de *P. maculatofasciatus* y a nauplios de *L. vannamei*, siendo que las mismas cepas tuvieron efectos diferentes en cada grupo de los organismos de prueba, afectando solo a un grupo o ambos.

Se confirmó la hipótesis propuesta para la realización de este trabajo, mostrando que en ambas especies, las fases larvianas son altamente sensibles a la exposición de las diversas cepas de *Chattonella* spp. del Golfo de California, lo cual se vio reflejado en los altos porcentajes de mortalidad observados.

10. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

El efecto de diferentes cepas de *Chattonella* spp. del Golfo de California fue evaluado en dos organismos de gran importancia pesquera, la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*; se encontró que hubo efectos de mortalidad en ambos casos, por lo que se recomienda evaluar los siguientes aspectos como complemento a esta investigación:

Al observar los distintos efectos por cada cepa de *Chattonella* spp. en este trabajo, se sugiere seguir realizando investigaciones con rafidofíceas del litoral mexicano, con el fin de determinar si otras poblaciones de rafidofíceas en costas mexicanas son generadoras de compuestos tóxicos o si son inocuas para el medio marino.

En relación a los estudios con peces, se recomienda seguir realizando bioensayos con embriones de peces de diferentes especies, con el objetivo de determinar si algunas especies de peces son más propensas a los efectos provocados por *Chattonella* spp.

En el caso de los camarones se sugiere profundizar en los estudios de comportamiento alimenticio y requerimientos nutricionales con el fin de elucidar si los efectos por consumo de *Chattonella* spp. son estrictamente determinados por sus compuestos tóxicos.

Se sugiere investigar signos de daño a nivel histológico en organismos expuestos a diferentes concentraciones de cepas de *Chattonella* spp.

Se recomienda realizar bioensayos en las siguientes fases de desarrollo de peces y crustáceos con el fin de evaluar si existen efectos en estas etapas por parte de las diversas cepas de *Chattonella* spp. y en su caso investigar si pueden ser revertidos.

La producción de compuestos tóxicos por parte de *Chattonella* spp. aún no es clara, por lo que se sugiere identificar los posibles compuestos que causen mortalidades en peces, moluscos y crustáceos, así como sus posibles detonantes.

11. REFERENCIAS

- Alberts, A., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. D. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. Ed. Garland publishing. Nueva York, E. U. A. 1408 p.
- Alonso-Rodríguez, R. & F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219: 317-336.
- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna & I. Gárate-Lizárraga. 2004. *El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM, México, 147 p.
- Álvarez-González, C. A. 1999. *Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 108 p.
- Álvarez-González, C. A. 2003. *Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae)*. Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN, México, 164 p.
- Andersen, R. A. 2004. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *Am. J. Bot.*, 91(10): 1508-1522.
- Anderson, W. W., J. E. King & M. J. Lindner. 1949. Early stages in the life history of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull.*, 96(2): 168-172.
- Anderson, D. M., D. M. Kulis & B. J. Binder. 1984. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: cyst yield in batch cultures. *J. Phycol.*, 20: 418-425.
- Backe-Hansen, P., E. Dahl & D. Danielssen. 2001. On a bloom of *Chattonella* in the North Sea/Skagerrak in april-may 1998, 78-81. En: Hallegraeff, G. M., S. I. Blackburn, C. J. Bolch y R. J. Lewis (Eds). *Harmful Algal Blooms 2000*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001.
- Baden, D. G. 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB J.*, 3: 1807-1817.
- Baden, D. G., A. J. Bourdelais, H. Jacocks, S. Michelliza & J. Naar. 2005. Natural and derivative brevetoxins: Historical background, multiplicity and effects, *Environ. Health Perspec.*, 113(5): 621-625.
- Balon, E. K. 2001. Saltatory ontogeny and the life-history model: neglected processes and patterns of evolution. *J. Bioeconomics*, 3: 1-26.
- Band-Schmidt, C. J., L. Morquecho, D. U. Hernández-Becerril, A. Reyes-Salinas & E. Bravo-Sierra. 2004. Raphidophyceans on coasts of Mexico. *Hydrobiologia*, 515: 79-89.
- Band-Schmidt, C. J., A. Martínez-López & I. Gárate-Lizárraga. 2005. First record of *Chattonella marina* in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*, 28: 6-7.
- Band-Schmidt, C. J., A. Martínez-López, J. J. Bustillos-Guzmán, L. Carreón-Palau, L. Morquecho-Escamilla, N. O. Olguín-Monroy, T. Zenteno-Savín, F. E. Hernández-Sandoval & C. Tomas. 2010. Growth and biochemical characterization of raphidophyte strains from the Gulf of California, 280. En: Resúmenes de *Harmful algae 2010*, 14th International conference. 1-5 Noviembre 2010, Hersonissos-Creta, Grecia, 325 p.

- Barnung, T. & O. Grahl-Nielsen, 1987. The fatty acid profile in cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae. Developmental variations and responses to oil pollution. *Sarsia* 72: 415-417.
- Barón-Sevilla, B., L. F. Bückle-Ramírez & M. Hernández-Rodríguez. 2004. Intensive culture of *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, in a recirculating seawater system. *Ciencias Marinas*, 30(1B): 179-188.
- Barraza-Guardado, R., R. Cortés-Altamirano & A. Sierra-Beltrán. 2004. Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Ch. cf. ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News*, 25: 7-8.
- Bedaux, J. J. M. & S. A. L. M. Kooijman. 1994. Statistical analysis of bioassays, based on hazard modeling. *Environ. Ecol. Stat.*, 1: 303-314.
- Belanger, S. E., E. K. Balon & J. M. Rawlings. 2010. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat. Toxicol.*, 97: 88-95.
- Bigogno, C., I. Khozin-Goldberg, S. Boussiba, A. Vonshak & Z. Cohen. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60: 497-503.
- Bourdelaís, A. J., C. R. Tomas, J. Naar, J. Kubanek & D.G. Baden. 2002. New Fish-Killing Alga in Coastal Delaware Produces Neurotoxins. *Environ. Health Perspec.*, 110(5): 465-470.
- Bravo-Sierra, E. 2004. Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 52: 5-16.
- Bridgers, A., E. McConnell, J. Naar, A. Weidner, L. Tomas & C. Tomas. 2004. Comparison of regional clones of the genus *Chattonella* and *Fibrocapsa* for growth characteristics and potential toxin production, 405-407. En: Steidinger, K. A., J. H. Landsberg, C. R. Tomas & G. A. Vargo (Eds.), *Harmful algae 2002*, 10th International conference. Conference proceedings, St. Pete Beach, Florida, E.U.A., 588 p.
- Bustillos-Guzmán, J., D. López-Cortés, F. Hernández & I. Murillo. 2000. Pigment signatures associated with an anoxic coastal zone: Bahía Concepcion, Gulf of California. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 249: 77-88.
- Campagna, A. F., M. N. Eler, E. L. G. Espíndola, J. A. Senhorini, R. F. Do Rêgo & L. O. L. Silva. 2006. Dimethoate 40 % organosphosphorous pesticide toxicity in *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae, Characiformes) eggs and larvae. *Braz. J. Biol.*, 66(2B): 633-640.
- Chang, F. H., C. Anderson & N. C. Boustead. 1990. First record of a *Heterosigma* (Raphidophyceae) bloom with associated mortality of cage-reared salmon in Big Glory Bay, New Zealand. *New Zealand J. and J. Mar. Fresh. Res.*, 24: 461-469.
- Cohen, Z., I. Khozin-Goldberg, D. Adlerstein & C. Bigogno. 2000. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. *Biochem. Soc. T.*, 28(6): 740-743.
- Colman, J. R. & J. S. Ramsdell. 2003. The type B brevetoxin (Pb Tx-3) adversely affects development, cardiovascular function, and survival in medada (*Oryzias latipes*) embryos. *Environ. Health Perspec.*, 111: 1920-1925.
- Cooper, G. M., 2002. *La célula*. 2a ed. Ed. Marbán, España, 716 p.

- Cooper, W. J. & R. G. Zika. 1983. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science*, 220: 711-712.
- Cortés-Altamirano, R. & C. M. Agraz-Hernández. 1994. Presencia de *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller en estanques para cultivo de camarón. *Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa*, 1(13): 11–16.
- Cortés-Altamirano, R. & S. Licea-Durán. 1999. Florecimientos de microalgas nocivas en estanques para cultivo semi-intensivo de camarón en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 41: 157-166.
- Cortés-Altamirano, R., R. Alonso-Rodríguez & A. Sierra-Beltrán. 2006. Fish mortality associated with *Ch. marina* and *Ch. cf. ovata* (Raphidophyceae) blooms in Sinaloa (Mexico). *Harmful Algae News*, 31: 7-8.
- Cortés-Altamirano, R. & A. P. Sierra-Beltrán. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algal blooms occurring in Mexico. *Toxins Reviews*, 27: 27-77.
- Cortés-Lara, M. C., R. Cortés-Altamirano & A. Cupul-Magaña. 2003. First record of *Fibrocapsa cf. japonica* in Matanchen Bay, Nayarit, Mexican Pacific coast. *Harmful Algae News*, 24: 1-4.
- Cuéllar-Anjel, J., C. Lara, V. Morales, A. De García & O. García-Suárez. 2010. *Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei*. OIRSAOSPESCA, C.A. Panamá, 132 p.
- De Boer, M. K., M. R. Tyl, E. G. Vrieling & M. Van Rijssel. 2004. Effects of salinity and nutrient conditions on growth and haemolytic activity of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Aquat. Microb. Ecol.*, 37: 171-181.
- De Boer, M. K., M. R. Tyl, M. Fu, G. Kulk, G. Liebezeit, C. R. Tomas, A. Lenzi, J. Naar, E. G. Vrieling & M. Van Rijssel. 2009. Haemolytic activity within the species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 8: 699-705.
- Demura, M., M. H. Noël, F. Kasai, M. M. Watanabe & M. Kawachi. 2009. Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia*, 48(6): 518-535.
- Division of Water Quality. 2001. *Aquatic toxicity testing. Understanding and implementing your testing requirement*. Aquatic toxicology unit/Environmental sciences section. Water quality section. Carolina del Norte, E. U. A., 10 p.
- Drossos G., A. Lazou, P. Panagopoulos & Westaby, S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.*, 59: 169-172.
- Edvardsen, B. & I. Imai. 2006. The ecology of Harmful flagellates within Prymnesiophyceae and Raphidophyceae, 67-79 pp. En: Granéli, E. y J. T. Turner (Eds.) *Ecological Studies, Vol. 189. Ecology of harmful algae*, Springer-Verlag, E. U. A.
- Embry M. R., S. E. Belanger, T. A. Braunbeck, M. Galay-Burgos, M. Halder, D. E. Hinton, M. A. Léonard, A. Lillicrap, T. Norberg-King & G. Whale. 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.*, 97: 79-87.
- Falk-Petersen, I. B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immun.*, 19: 397-412.

- Frausto-Sotelo, E. D. 2004. *Determinación de mareas rojas y calidad de agua en la desembocadura del estero de San Cristóbal en San Blas Nayarit 2003*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nayarit, México, 65 p.
- Fu, M. 2003. *Isolation and characterization of toxins from Fibrocapsa japonica (Raphidophyceae)*. Tesis de Doctorado, Carl von Ossietzky University Oldenburg, Alemania, 85 p.
- Fu, M., A. Koulman, M. Van Rijssel, A. Lützen, M. K. de Boer, M. R. Tyl & G. Liebezeit. 2004. Chemical characterization of three hemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *Toxicon*, 43: 355-363.
- Gárate-Lizárraga, I., D. J. López-Cortés, J. J. Bustillos-Guzmán & F. Hernández-Sandoval. 2004. Blooms of *Cochlodinium polykrioides* (Gymnodiniaceae) in the Gulf of California, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 52(Suppl. 1): 51-58.
- Gárate-Lizárraga, I., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés & J. J. Bustillos-Guzmán. 2009a. Raphidophytes in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*, 40: 1-4.
- Gárate-Lizárraga, I., C. J. Band-Schmidt, D. J. López-Cortés & M. del S. Muñetón-Gómez. 2009b. Bloom of *Scrippsiella trochoidea* (Gonyaulacaceae) in a shrimp pond in the southwestern Gulf of California, Mexico. *Mar. Poll. Bull.*, 58: 145-149.
- García-Gómez, R. E. *Uso de dietas microencapsuladas para la alimentación de larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 63 p.
- Garg, S., A. L. Rose, A. Godrant & T. D. Waite. 2007. Iron uptake by the ichthyotoxic *Chattonella marina* (Raphidophyceae): impact of superoxide generation. *J. Phycol.*, 43: 978-991.
- Gentien, P., M. Lunven, P. Lazure, A. Youenou & M. P. Crassous. 2007. Motility and autotoxicity in *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae). *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362: 1937-1946.
- González, G. Z. A., J. Beaumont, G. San José, U. Moreno, B. López, S. Ravassa, P. Muñiz, A. Fortuño, M. A. Fortuño & J. Díez. 2001. Estrés oxidativo vascular y disfunción endotelial. *Nefrología*, 21(1): 61-66.
- Guerra, M., L. Alba-Valdivia, L. Pérez-Jar, J. Mejias & R. Jiménez-Cabrera. 2010. Desempeño reproductivo de dos líneas de reproductores de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* introducidos en Cuba. *REDVET*, 11(7): 1-10.
- Hakspiel-Segura, C., A. Martínez-López, B. Gonzáles-Acosta & D. Escobedo-Urías. 2009. Dinámica temporal de la estructura microbiana en la laguna costera eutrofizada del Golfo de California, 1. En: *Resúmenes de la XV Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología, A. C. 21-24 Abril 2009*, Tlalnepantla, Edo. México, México, 156 p.
- Hallegraeff, G. M. & Y. Hara. 1995. Taxonomy of harmful marine raphidophytes, 365–371. En: Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson & A. D. Cembella (Eds.). *Manual on harmful marine microalgae*, IOC of UNESCO. Manuals and guides No. 33. Francia, 551 p.
- Hallegraeff, G. M., B. L. Munday, D. G. Baden & P. L. Whitney, 1998. *Ch. marina* Raphidophyte bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus*

- maccoyii*) in South Australia, 93-96. En: Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt (Eds). *Harmful Algae, Xunta de Galicia e IOC-UNESCO*, España.
- Hara, Y. & M. Chihara. 1987. Morphology, ultrastructure and taxonomy of the raphidophycean alga *Heterosigma akashiwo*. *Bot. Mag. Tokyo*, 100: 151-163.
- Havaux, M. & K. K. Niyogi. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 8762-8767.
- Hernández-Becerril, D. U. & E. Bravo-Sierra. 1999. Presencia del fitoflagelado planctónico *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) en costas de México, 9-10. En: *X Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología, A. C. & II Reunión Internacional de Planctología*. 28-30 Abril 1999, Mazatlán, Sinaloa, México.
- Hernández-Becerril, D. U., R. Alonso-Rodríguez, C. Álvarez-Góngora, S. A. Barón-Campis, G. Ceballos-Corona, J. Herrera-Silveira, M. E. Meave del Castillo, N. Juárez-Ruíz, F. Merino-Virgilio, A. Morales-Blake, J. L. Ochoa, E. Orellana-Cepeda, C. Ramírez-Camarena & R. Rodríguez-Salvador. 2007. Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. *J. Environ. Sci. Heal. A.*, 42: 1349-1363.
- Hernández-Sandoval, F. E., 2004. *Calidad de Thalassiosira fluviatilis (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas de protozoa de Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 117 p.
- Hershberger, P. K., J. E. Rensel, J. R. Postel & F. B. Taub. 1997. *Heterosigma* bloom and associated fish kill. *Harmful Algae News*, 16: 1-4.
- Hiroishi, S., H. Okada, I. Imai & T. Yoshida. 2005. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovate* (Raphidophyceae) to cultured fish. *Harmful algae*, 4(4): 783-787.
- Hishida, Y., A. Ishimatsu & T. Oda. 1997. Mucus blockade of lamellar water channels in yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fish. Sci.*, 63(2): 315-316.
- Hishida, Y., A. Ishimatsu & T. Oda. 1999. Effect of environmental hyperoxia on respiration of yellowtail exposed to *Chattonella marina*. *Fish. Sci.*, 65(1): 84-90.
- Honjo, T. 1987. Growth potential of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) collected in Gokasho Bay, central Japan. *Bull. Plankton Soc. Japan*, 34(2): 119-124.
- Horner, R. A., D. L. Garrison & F. G. Plumley. 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. west coast. *Limnol. Oceanogr.*, 42(5, parte 2): 1076-1088.
- Huang, J., W. Yang, J. Liu, H. Li & B. Liu. 2009. Effects of temperature, salinity, and light intensity on the growth and toxin production of *Chattonella marina*. *Chinese J. Appl. Ecol.*, 20(5): 1190-1195.
- Imai, I., M. Yamaguchi & Y. Hori. 2006. Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton Benthos Res.*, 1(2): 71-84.
- Irihimovitch, V. & M. Shapira. 2000. Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of rubisco large subunit in the chloroplast. *J. Biol. Chem.*, 275(21): 16289-16295.
- Ishimatsu, A., H. Maruta, T. Tsuchiyama & M. Ozaki. 1990. Respiratory, ionoregulatory and cardiovascular responses of the yellowtail *Seriola quinqueradiata* to exposure to the red tide plankton *Chattonella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(2): 189-199.
- Ishimatsu, A., M. Sameshima, A. Tamura & T. Oda. 1996a. Histological analysis of the mechanisms of *Chattonella*-induced hypoxemia in yellowtail. *Fish. Sci.*, 62: 50-58.

- Ishimatsu, A., T. Oda, M. Yoshida & M. Ozaki. 1996b. Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Ch. marina*. *Fish. Sci.*, 62: 836-837.
- Ishimatsu, A., H. Maruta, T. Oda & M. Ozaki. 1997. A comparison of physiological responses in yellowtail to fatal environmental hypoxia and exposure to *Chattonella marina*. *Fish. Sci.*, 63(4): 557-562.
- Itakura, S., K. Nagasaki, M. Yamaguchi & I. Imai. 1996. Cyst formation in the red tide flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Plankton Res.*, 18(10): 1975-1979.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Montoura & S. W. Wright. 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography*. Ed. UNESCO. Francia, 661 p.
- Jeglitsch, G., K. Rein, D. G. Baden & D. J. Adams. 1998. Brevetoxins-3 (PbTx-3) and its derivatives modulate single tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284: 516-525.
- Jugnu, R. & V. Kripa. 2009. Effect of *Chattonella marina* [(Subrahmanyam) Hara et Chihara 1982] bloom on the coastal fishery resources along Kerala coast, India. *Indian J. Mar. Sci.*, 38: 77-88.
- Jüttner, F. 2001. Liberation of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and other polyunsaturated fatty acids from lipids as a grazer defense reaction in epilithic diatom biofilms. *J. Phycol.*, 37(5): 744-755.
- Jüttner, F. 2005. Evidence that polyunsaturated aldehydes of diatoms are repellents for pelagic crustacean grazers. *Aquat. Ecol.*, 39: 271-282.
- Kazlauskienė N. & P. Stasiūnaitė. 1999. The lethal and sublethal effect of heavy metal mixture on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in its early stages of development. *Acta Zool., Lit., Hydrobiol.*, 9(2): 47-55.
- Kawano, I., T. Oda, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 1996. Inhibitory effect of the iron chelator Desferrioxamine (Desferal) on the generation of activated oxygen species by *Chattonella marina*. *Mar. Biol.*, 126: 765-771.
- Khan, S., M. S. Ahmed, O. Arakawa & Y. Onoue. 1995. Properties of neurotoxins separated from a harmful red tide organism *Chattonella marina*. *Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh*, 47(3-4): 137-141.1
- Khan, S., O. Arakawa & Y. Onoue. 1996a. A toxicological study of the marine phytoflagellate, *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Phycologia*, 35: 239-244.
- Khan, S., O. Arakawa & Y. Onoue. 1996b. Neurotoxin production by a chloromonad *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). *J. World Aquac. Soc.*, 27(3): 254-263.
- Khan, S., O. Arakawa & Y. Onoue. 1997. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan. *Aquac. Res.*, 28: 9-14.
- Khan, S., O. Arakawa, & Y. Onoue, 1998. Physiological investigations of a neurotoxin producing phytoflagellate, *Ch. marina* (Raphidophyceae). *Aquac. Res.*, 29: 9-17.
- Kim, D., A. Nakamura, T. Okamoto, N. Komatsu, T. Oda, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 1999a. Toxic potential of the raphidophyte *Olisthodiscus luteus*: mediation by reactive oxygen species. *J. Plankton Res.*, 21(6): 1017-1027.
- Kim, D., T. Oda, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 1999b. Isolation and characterization of a mutant strain of *Chattonella marina* with decreased production of superoxide anion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(11): 1947-1952.

- Kim, D., A. Nakamura, T. Okamoto, N. Komatsu, T. Oda, T. Iida, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 2000. Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1524: 220-227.
- Kim, D., M. Watanabe, Y. Nakayasu & K. Kohata. 2004. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide associated with cell growth of *Chattonella antiqua*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 35: 57-64.
- Kim, D., M. Watanabe, Y. Nakayasu & K. Kohata. 2005. Changes in O₂⁻ and H₂O₂ production by *Chattonella antiqua* during diel vertical migration under nutrient stratification. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39: 183-191.
- Kim, D., K. Yamaguchi & T. Oda. 2006. Nitric oxide synthase-like enzyme mediated nitric oxide generation by harmful red tide phytoplankton, *Chattonella marina*. *J. Plankton Res.*, 28(6): 613-620.
- Kim, D., T. Nakashima, Y. Matsuyama, Y. Niwano, K. Yamaguchi & T. Oda. 2007. Presence of the distinct systems responsible for superoxide anion and hydrogen peroxide generation in the red tide phytoplankton *Chattonella marina* and *Chattonella ovata*. *J. Plankton Res.*, 29(3): 241-247.
- Kim, D., Y. S. Kang, Y. Lee, K. Yamaguchi, K. Matsuoka, K. W. Lee, K. S. Choi & T. Oda. 2008. Detection of nitric oxide (NO) in marine phytoplankters. *J. Biosci. Bioeng.*, 105(4): 414-417.
- Kimm-Brinson, K. L. & J. S. Ramsdell. 2001. The red tide toxin, brevetoxin, induces embryo toxicity and developmental abnormalities. *Environ. Health Perspec.*, 109(4): 377-381.
- Kimura, T., M. Watanabe, K. Kohata & R. Sudo. 1999. Phosphate metabolism during diel vertical migration in the raphidophycean alga, *Chattonella antiqua*. *J. Appl. Phycol.*, 11: 301-311.
- Kirk, J. T. O. 2011. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. 3 ed. Ed. Cambridge University Press, Reino Unido. 649 p.
- Kitani, H. 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52(7): 1131-1139.
- Kohata, K. & M. Watanabe. 1988. Diel changes in the composition of photosynthetic pigments and cellular carbon and nitrogen in *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *J. Phycol.*, 24: 58-66.
- Kohata, K., M. Watanabe, K. Yamanaka, T. Ioriya & T. Kimura. 1997. A red-tide bloom of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) in the Seto Inland Sea, Japan, in 1987 analyzed as changes in photosynthetic pigments determined by high-performance liquid chromatography. *Wat. Res.*, 31: 2269-2277.
- Krebs, C. J. 1985. *Ecología: estudio de la distribución y la abundancia*. Ed. Harla, México. 753 pp.
- Kuroda, A., T. Nakashima, K. Yamaguchi & T. Oda. 2005. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 141: 297-305.
- Lars-Johan, N., D. Einar & D. Didrik. 2002. A new bloom of *Chattonella* in Norwegian waters. *Harmful Algae News*, 23: 3-5.

- Lee, K. S., A. Ishimatsu, H. Sakaguchi & T. Oda. 2003. Cardiac output during exposure to *Chattonella marina* and environmental hypoxia in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Mar. Biol.*, 142: 391-397.
- Lefebvre, K. A., V. L. Trainer & N. L. Scholz. 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquat. Toxicol.*, 66: 159-170.
- Lepage, G., & C. C. Roy. 1984. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.*, 25: 1391-1396.
- Lepage, G., & C. C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27: 114-120.
- Lin, Y. Y., M. A. Risk, S. M. Ray, D. Van Engen, J. Clardy, J. Golik, J. C. James, K. Nakanishi. 1981. Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis*. *JACS*, 103: 6773-6775.
- Liu, W., D. W. T. Au, D. M. Anderson, P. K. S. Lam & R. S. S. Wu. 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 346: 76-86.
- Lømsland, E. R., T. M. Johnsen & W. Eikrem. 2010. Observations of *Chattonella globosa* in Norwegian coastal waters, 141. En: *Resúmenes de Harmful algae 2010, 14th International conference*. 1-5 Noviembre 2010, Hersonissos-Creta, Grecia, 325 p.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval & E. J. Núñez-Vazquez. 2010. Environmental conditions during the presence of Raphidophyceae in Bahía de La Paz, Gulf of California, 42. En: *Resúmenes de Harmful algae 2010, 14th International conference*. 1-5 Noviembre 2010, Hersonissos-Creta, Grecia, 325 p.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval y E. J. Núñez-Vázquez. 2011. Co-ocurrencia de *Chattonella marina* y *Gymnodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiológica*, 21(2): 185-196.
- Lu, D. & J. Göbel. 2000. *Chattonella* sp. bloom in North Sea, spring 2000. *Harmful Algae News*, 21: 10-11.
- Macayo-Alvear, J. 2006. *Evaluación de la patogenicidad de Vibrio spp y Aeromonas spp en eleuteroembriones y larvas de cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 76 p.
- Manger, R. L., L. S. Leja, S. Y. Lee, J. M. Hungerford, Y. Hokama, R. W. Dickey, H. R. Granade, R. Lewis, T. Yasumoto & M. M. Wekell. 1995. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguatoxins, brevetoxins, saxitoxins, and seafood extracts. *J. AOAC International*, 78(2): 521-527.
- Makarov, R. 2011. *Vibriofagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de vibrio*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 143 p.
- Marshall, J. A. & G. M. Hallegraeff. 1999. Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. *J. Plankton Res.*, 21(10): 1809-1822.

- Marshall, J. A. & S. Newman. 2002. Differences in photoprotective pigment production between Japanese and Australian strains of *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 272: 13-27.
- Marshall, J. A., M. Hovenden, T. Oda & G. M. Hallegraeff. 2002a. Photosynthesis does influence superoxide production in the ichthyotoxic alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *J. Plankton Res.*, 24(11): 1231-1236.
- Marshall, J. A., P. D. Nichols & G. M. Hallegraeff. 2002b. Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae. *J. Appl. Phycol.*, 14(4): 255-265.
- Marshall, J. A., P. D. Nichols, B. Hamilton, R. J. Lewis & G. M. Hallegraeff. 2003. Ichthyotoxicity of *Ch. marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. *Harmful Algae*, 2: 273-281.
- Marshall, J. A., M. Salas, T. Oda & G. Hallegraeff. 2005a. Superoxide production by marine microalgae: I. Survey of 37 species from 6 classes. *Mar. Biol.*, 147: 533-540.
- Marshall, J. A., T. Ross, S. Pyecroft & G. Hallegraeff. 2005b. Superoxide production by marine microalgae: II. Towards understanding ecological consequences and possible functions. *Mar. Biol.*, 147: 541-549.
- Martínez-Brown, J. M. 2007. *Efecto del nivel de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de reproductores de cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Percoidei: Serranidae) sobre la calidad de las primeras fases de vida*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 99 p.
- Martínez-Córdova, L. R., M. Ezquerro-Brauer, L. Bringas-Alvarado, E. Aguirre-Hinojosa & M. del C. Garza-Aguirre. 2002. Optimización de alimentos y prácticas de alimentación en el cultivo de camarón en el Noroeste de México, 569-581. En: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés & N. Simoes (Eds.). *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI simposium internacional de nutrición acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Martínez-López, A., C. J. Band-Schmidt, D. Escobedo-Urías & A. E. Ulloa. 2006. Bloom of *Ch. subsalsa* in an impacted coastal lagoon in the Gulf of California. *Harmful Algae*, 31(1): 4-5.
- Mathews, C. K. 1999. *Biochemistry*. 3a ed. Ed. Prentice Hall. E. U. A. 1200 p.
- Méndez, S. M., R. Akselman & C. R. Tomas. 2010. First report of *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica* and *Chattonella marina* var. *antiqua* in Uruguay, 143. En: *Resúmenes de Harmful algae 2010, 14th International conference*. 1-5 Noviembre 2010, Hersonissos-Creta, Grecia, 325 p.
- Mendoza-Flores, A. 2011. *Identificación de cepas del género Chattonella (Clase: Raphidophyceae) aisladas del Golfo de California a partir de la región 5.8S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y del gen citromo c oxidasa subunidad 1 (COI)*. Tesis de Licenciatura, UABCS, México, 59 p.
- Moreno-Legorreta, M. 2004. *Estudio de la microflora bacteriana (Vibrionaceae) presente en las fases iniciales de vida de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 80 p.
- Mostaert, A. S., U. Karsten, Y. Hara & M. M. Watanabe. 1998. Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: a chemotaxonomic re-evaluation. *Phycol. Res.*, 46: 213-220

- Munday, B. L. & G. M. Hallegraef. 1998. Mass mortality of captive southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in April/May 1996 in Boston Bay, S. Australia: a complex diagnostic problem. *Fish Pathol.*, 33: 93-96.
- Nakamura, Y. & M. M. Watanabe. 1983. Growth Characteristics of *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae) Part 1. Effects of temperature, salinity, light intensity and pH on growth. *J. Oceanogr. Soc. Japan*, 39: 110-114.
- Nakamura, A., T. Okamoto, N. Komatsu, S. Ooka, T. Oda, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 1998. Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. *Fish. Sci.*, 64(6): 866-869.
- Nelson D. L. & M. M. Cox. 2004. *Lehninger: Principles of biochemistry*. 4a ed. Ed. W H Freeman & Co., Nueva York, E. U. A. 1100 p.
- Nishibori, N. & T. Nishijima. 2004. Changes in polyamine levels during growth of a red-tide causing phytoplankton *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Eur. J. Phycol.*, 39: 51-55.
- Núñez-Vázquez, E. J., I. Gárate-Lizárraga, C. J. Band-Schmidt, A. Cordero-Tapia, D. J. López-Cortés, F. E. Hernández-Sandoval, A. Heredia-Tapia & J. J. Bustillos-Guzmán. 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *J. Environ. Biol.*, 32: 413-423.
- Oda, T., A. Ishimatsu, S. Takeshita, & T. Muramatsu. 1992a. Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Ch. marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.*, 112: 505-509.
- Oda, T., T. Akaike, K. Sato, A. Ishimatsu, S. Takeshita, T. Muramatsu & H. Maeda. 1992b. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294: 38-43.
- Oda, T., A. Nakamura, M. Shikayama, I. Kawano, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 1997. Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(10): 1658-1662.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2006. *Draft Proposal for a New Guideline: Fish Embryo Toxicity (FET) Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 11 p.
- Ohkawa H., N. Ohishi & K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 331-358.
- Okaichi, T. 1989. Red tide problems in the Seto Inland Sea, Japan, 137-142. En: Okaichi, T., D. M. Anderson & T. Nemoto (Eds.), *1st International symposium on red tides, 1987*. Conference proceedings, Takamatsu, Prefectura de Kagawa, Japón, 489 p.
- Okamoto, O. K. & P. Colepicolo. 1998. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 119: 67-73.
- Okamoto, T., D. Kim, T. Oda, K. Matsuoka, A. Ishimatsu & T. Muramatsu. 2000. Concanavalin A- Induced discharge of glycocalyx of raphidophycean flagellates, *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(8): 1767-1770.
- Onoue, Y., M. S. Haq & K. Nozawa. 1990. Separation of neurotoxins from *Chattonella marina*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(4): 695.

- Palenik, B., O. C. Zafiriou & F. M. M. Morel. 1987. Hydrogen peroxide production by a marine phytoplankter. *Limnol. Oceanogr.*, 32(6): 1365-1369.
- Panini, E. B., C. C. Mylonas, S. Zanuy, M. Carrillo, J. Ramos & M. P. Bruce. 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquaculture Int.*, 9: 189-195.
- Peña-Martínez, R. 2000. *Histología e histoquímica del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera (Paralabrax maculatofasciatus) (Percoidei: Serranidae)*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 113 p.
- Peña-Martínez, R. 2005. *Estudios de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus: aspectos alimenticios y sus aplicaciones prácticas*. Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN, México, 141 p.
- Pérez-Linares, J., M. cadena, C. Rangel, M. L. Unzueta-Bustamante & J. L. Ochoa. 2003. Effect of *Schizothrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, 218: 55-65.
- Pérez-Linares, J., J. L. Ochoa & A. Gago-Martínez. 2008. Effect of PSP toxin in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *J. Food Sci.*, 73(4): 69-73.
- Pérez-Linares, J., J. L. Ochoa & A. Gago-Martínez. 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population?. *Toxicon*, 53: 185-195.
- Persky A. M., P. S. Green, L. Stuble, C. O. Howell, L. Zaulyanov, G. A. Brazaeua & J. W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 223: 59-66.
- Pezzolesi, L., E. Cucchiari, F. Guerrini, A. Pasteris, P. Galletti, E. Tagliavini, C. Totti & R. Pistocchi. 2010. Toxicity evaluation of *Fibrocapsa japonica* from the Northern Adriatic Sea through a chemical and toxicological approach. *Harmful Algae*, 9: 504–514
- Pliego-Cortés, H. S. 2005. *Evaluación de métodos para determinar la condición nutricional de larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Percoidei: Serranidae) en cultivo*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 99 p.
- Potter, D., G. W. Saunders & R. A. Andersen. 1997. Phylogenetic relationships of the Raphidophyceae and Xanthophyceae as inferred from nucleotide sequences of the 18S ribosomal RNA gene. *Am. J. Bot.*, 84: 966-972.
- Rand, G. M. & S. R. Petrocelli. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. Hemisphere Publishing Corporation, E. U. A., 666 p.
- Robertson, P. A. W., J. Calderon, L. Carrera, J. R. Stark, M. Zherdmant & B. Austin. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 32: 151-155.
- Rodríguez-Palacio, M. C., L. Crisóstomo-Vázquez, S. Álvarez-Hernández & C. Lozano-Ramírez. 2011. Strains of toxic and harmful microalgae, from waste water, marine, brackish and fresh water. *Food Additives & Contaminants: Part A*, DOI:10.1080/19440049.2011.596164.
- Rodríguez-Trejo, M. 2008. *Efecto de diferentes niveles de ácido araquidónico en el alimento de reproductores de cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus sobre la calidad de embriones y larvas*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 76 p.

- Roque, A., A. Mazari & B. Gómez-Gil. 2000. Infección oral experimental de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* a través de bioencapsulación de *Vibrio parahaemolyticus* en *Artemia franciscana*. *Ciencias Marinas*, 26: 65-77.
- Rosales-Velázquez, M. O. 1997. *Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio*. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, México, 62 p.
- Shields, R. J., N. P. Brown & N. R. Bromage. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, 155: 1-12.
- Shimizu, Y. S., H. N. Chou, H. Bando, G. Van Duyne, J. Clardy. 1986. Structure of brevetoxin A (GB-1), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium breve*. *JACS*, 108: 514-515.
- Smayda, T. J. 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnol. Oceanogr.*, 42(5, part 2): 1132-1136.
- Sokal, R. & J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, New York, E.U.A. 859 p.
- Strickland, J. D. H. & T. R. Parsons. 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. 2a ed. Bull. 167. J. Fish. Res. Board Can. Ottawa. 310 pp.
- Strmac, M., A. Oberemm & T. Braunbeck. 2002. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *J. Fish Biol.*, 61: 24-38.
- Tanaka, K., Y. Muto y M. Shimada. 1994. Generation of superoxide anion radicals by the marine phytoplankton organism, *Chattonella antiqua*. *J. Plankton Res.*, 16(2): 161-169.
- Tang, J. Y. M., D. M. Anderson & D. W. T. Au. 2005. Hydrogen peroxide is not the cause of fish kills associated with *Chattonella marina*: Cytological and physiological evidence. *Aquatic Toxicol.*, 72: 351-360.
- Thronsen J. 1993. The planktonic marine flagellates, 591-729. En: Tomas, C. R. (Ed). *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press. E. U. A.
- Tiffany, M. A., S. B. Barlow, V. E. Matey & S. H. Hurlbert. 2001. *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia*, 466: 187-194.
- Tomas, C. R. 1998. Blooms of potentially harmful raphidophycean flagellates in Florida coastal waters, 101-103. En: Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández, & T. Wyatt (Eds.). *Harmful algae 1997, 8th International conference*. Conference proceedings, Vigo, España, 635 p.
- Tong, Z. 1999. Study on fish and amphibian embryo-larval toxicity test. *Environ. Monit. Assess.*, 55: 363-369.
- Trujillo, T., G. Aguirre-Guzmán, J. G. Sánchez & J. Rábago-Castro. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia y Mar*, IX(27): 11-18.
- Twiner, M. J. & C. G. Trick. 2000. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*. *J. Plankton Res.*, 22(10): 1961-1975.
- Twiner, M. J., S. J. Dixon & C. G. Trick. 2001. Toxic effects of *Heterosigma akashiwo* do not appear to be mediated by hydrogen peroxide. *Limnol. Oceanogr.*, 46(6): 1400-1405.

- Unzueta-Bustamante, M. L., R. Silveira-Cofficny, A. A. Prieto, G. Aguirre-Guzmán & R. Vázquez-Juárez. 2004. Susceptibilidad de *Litopenaeus schmitti* y *Cherax quadricarinatus* al virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). *Ciencias Marinas*, 30(4): 537-545.
- Valdivia, P. A., T. Zenteno-Zavín, S. C. Gardner & A. Alonso-Aguirre. 2007. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comp. Biochem. Phys. C*, 146: 111-117.
- Van Apeldoorn, M. E., H. P. Van Egmond & G. J. A. Speijers. 2001. *Neurotoxic shellfish poisoning: A review*. RIVM report 388802 023. National Institute of Public Health and the Environment. Alemania., 70 p.
- Watanabe, M. M., Y. Nakamura, S. Mori & S. Yomochi. 1982. Effects of physicochemical factors and nutrients on the growth of *Heterosigma akashiwo* HADA from Osaka Bay, Japan. *Jap. J. Phycol.*, 30: 279-288.
- Williamson, D. I. 1982. Larval morphology and diversity, 43-110. En: Bliss, D. E. (Ed.). *The Biology of Crustacea. Volumen 2. Embryology, morphology, and genetics*. Academic Press, E. U. A., 440 p.
- Wu, J. T., Y. R. Chiang, W. Y. Huang & W. N. Jane. 2006. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquat. Toxicol.*, 80: 338-345.
- Yamaguchi, M., I. Imai, & T. Honjo. 1991. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth rates of the noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakk.*, 57:1277-1284.
- Yamaguchi, M., S. Sakamoto & M. Yamaguchi. 2008. Nutrition and growth kinetics in nitrogen- and phosphorus-limited cultures of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). *Harmful Algae*, 7: 26-32.
- Yamaguchi, H., T. Nakayama, A. Murakami & I. Inouye. 2010. Phylogeny and taxonomy of the Raphidophyceae (Heterokontophyta) and *Chlorinimonas sublosa* gen. et sp. nov., a new marine sand-dwelling raphidophyte. *J. Plant. Res.*, 123: 333-342.
- Yang, W., N. Zhang, W. Cui, Y. Xu, H. Li & J. Liu. 2011. Effects of co-existing microalgae and grazers on the production of hemolytic toxins in *Karenia mikimotoi*. *Chinese J. Oceanol. Limnol.*, DOI: 10.1007/s00343-011-0274-5
- Yiagnisis, M., K. Pagou, A. Prapas, G. Rigos, I. Varkitzi, C. Nikoloudaki & F. Athanassopoulou. 2010. Massive acute finfish mortality due to the toxic raphidophyte microalga *Chattonella* sp. infestation in Greek coastal waters, 88. En: *Resúmenes de Harmful algae 2010, 14th International conference*. 1-5 Noviembre 2010, Hersonissos-Creta, Grecia, 325 p.
- Young, A. J., D. Phillip, A. V. Ruban, P. Horton & H. A. Frank. 1997. The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure Appl. Chem.*, 69(10): 2125-2130.
- Zenteno-Savín, T., R. Saldierna & M. Ahuejote-Sandoval. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Phys. C*, 142: 301-308.
- Zenteno-Savín T., E. Cortes-Jacinto, J. P. Vázquez-Medina & H. Villarreal-Colmenares. 2008. Oxidative damage in tissues of juvenile crayfish (*Cherax quadricarinatus* von Martens, 1868) fed different levels of proteins and lipid. *Hidrobiológica* 18(2): 147-154.

Zhang, C., H. B. Glasgow, P. D. R. Moeller, J. M. Burkholder, A. J. Lewitus, G. M. Melia, S. L. Morton & E. H. Allen. 2004. Evaluation of toxicity in nine raphidophytes strains isolated from different geographic regions, 198-200. En: Steidinger, K. A., J. H. Landsberg, C. R. Tomas & G. A. Vargo (Eds.), *Harmful algae 2002, 10th International conference*. Conference proceedings, St. Pete Beach, Florida, E.U.A., 588 p.