



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**DINOFLAGELADOS Y TOXINAS LIPOFÍLICAS EN BANCOS  
NATURALES DE BIVALVOS AL SUR DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S.,  
MÉXICO**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**JESÚS ERNESTINA HERNÁNDEZ CASTRO**

**LA PAZ, B.C.S., JUNIO 2017**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA 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 07 del mes de Junio del 2017 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:

"DINOFLAGELADOS Y TOXINAS LIPOFÍLICAS EN BANCOS NATURALES  
DE RIVALVOS AL SUR DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO"

Presentada por el alumno:

HERNÁNDEZ  
Apellido paterno

CASTRO  
materno

JESÚS ERNESTINA  
nombre(s)

Con registro: 

0	1	5	0	2	4	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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.**

Directores de Tesis

\_\_\_\_\_  
DR. ROSACIO LEYVA VALENCIA  
Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
DRA. CHRISTINE JOHANNA BARD SCHMIDT  
2ª. Directora de Tesis

\_\_\_\_\_  
DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

\_\_\_\_\_  
DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

\_\_\_\_\_  
DR. DAVID JAVIER LÓPEZ CORTÉS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





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

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 13 del mes de Junio del año 2017

El (la) que suscribe BM. JESÚS ERNESTINA HERNÁNDEZ CASTRO Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B150246 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA Y DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DINOFLAGELADOS Y TOXINAS LIPOFÍLICAS EN BANCOS NATURALES DE

BIVALVOS AL SUR DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO"

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: ernestina\_0905@hotmail.com - cjband@yahoo.com - ileyvalencia@gmail.com

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

BM. JESÚS ERNESTINA HERNÁNDEZ CASTRO

*Nombre y firma del alumno*

## CONFORMACIÓN DEL COMITÉ

### Dirección:

Dr. Ignacio Leyva Valencia

IPN-Centro Interdisciplinario de  
Ciencias Marinas

### Comité tutorial, revisor y sinodal:

Dra. Christine Johana Band Schmidt

IPN-Centro Interdisciplinario de  
Ciencias Marinas

Dr. David Javier López Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas  
del Noroeste, S.C.

Dra. Claudia Judith Hernández  
Guerrero

IPN-Centro Interdisciplinario de  
Ciencias Marinas

Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez

IPN-Centro Interdisciplinario de  
Ciencias Marinas

### Jurado suplente

M.C. Macial Villalejo Fuerte

IPN-Centro Interdisciplinario de  
Ciencias Marinas

## INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABLAS .....	IX
DEDICATORIA .....	XI
AGRADECIMIENTOS.....	XII
GLOSARIO .....	XIV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1-Florecimientos Algales Nocivos .....	1
1.2-Toxinas lipofílicas.....	3
1.3-Toxinas Diarreicas .....	3
1.3.1-Ácido okadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTX) .....	3
1.4-Pectentoxinas (PTX) .....	5
1.5-Iminas cíclicas (IC).....	5
1.6-Yessotoxinas (YTX) .....	7
1.7-Azaspirácidos (AZA) .....	7
1.8-Planteamiento del problema .....	8
1.9-Justificación .....	10
2.-HIPÓTESIS .....	11
3.-OBJETIVO GENERAL.....	11
4.-OBJETIVOS PARTICULARES .....	11
5.-MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
5.1-Trabajo en campo .....	12
5.2-Recolecta de los moluscos .....	13

5.3-Muestras de agua .....	13
5.4-Trabajo en laboratorio .....	14
5.5-Aislamiento de especies con potencial tóxico .....	14
5.6-Identificación y descripción de dinoflagelados .....	14
5.7-Cuantificación de especies de fitoplancton .....	15
5.8-Extracción de toxinas PSP en la columna de agua.....	15
5.9-Detección de toxinas disueltas en la columna de agua utilizando resinas .....	16
5.9.1-Extracción de toxinas hidrofílicas de los moluscos .....	17
5.9.2-Extracción de toxinas lipofílicas de los moluscos.....	18
5.9.3-Determinación de toxinas por Bioensayo en Ratón .....	18
5.9.4-Determinación de nutrientes .....	19
5.9.5-Análisis estadísticos.....	19
6.-RESULTADOS .....	20
6.1-Aislamiento de especies con potencial tóxico .....	20
6.2-Identificación y descripción de dinoflagelados en cultivo .....	20
6.3-Identificación de especies de fitoplancton.....	22
6.4-Cuantificación de dinoflagelados.....	22
6.5-Salinidad .....	27
6.6-Temperatura .....	28
6.7-Determinación de nutrientes .....	29
6.8-Extracción de toxinas PSP en la columna de agua.....	34
6.9-Detección de toxinas hidrofílicas de los moluscos .....	34
6.9.1-Detección de toxinas lipofílicas de los moluscos.....	34
6.9.2-Determinación de toxinas por Bioensayo en Ratón .....	40

7.-DISCUSIÓN.....	41
7.1-Aislamiento de dinoflagelados con potencial tóxico .....	41
7.2-Identificación y cuantificación de dinoflagelados tóxicos y/o nocivos	43
7.3-Detección de la presencia de toxinas en la columna de agua mediante el uso de resinas.....	46
7.4-Detección de la presencia de toxinas en moluscos mediante ensayos <i>in vivo</i> y mediante dos métodos analíticos.....	46
8.-CONCLUSIONES .....	53
9.-RECOMENDACIONES.....	54
10.-BIBLIOGRAFÍA.....	55
11.-ANEXOS.....	72
11.1-Anexo 1 .....	72
11.2-Anexo 2 .....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de las cinco estaciones de muestreo. ....	12
Figura 2. Especies de bivalvos analizados en el monitoreo de ficotoxinas durante el periodo 2015-2016 en el sur de la Bahía de La Paz: 1) <i>Megapitaria squalida</i> , 2) <i>Dosinia ponderosa</i> y en la Ensenada de La Paz, 3) <i>Atrina maura</i> .....	13
Figura 3. Contenedor de resina. Diseñado por: Cobos-Anaya. ....	17
Figura 4. Abundancia total de dinoflagelados encontrados en la E1 durante el periodo enero-julio de 2015.....	23
Figura 5. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E2 durante el periodo de febrero de 2015 a enero de 2016. ....	24
Figura 6. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E3 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016. ....	25
Figura 7. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E4 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016. ....	26

Figura 8. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E5 durante el periodo septiembre de 2015 a enero de 2016.....	27
Figura 9. Variación mensual de la salinidad en las cinco estaciones del sur de la BAPAZ, durante el periodo de enero de 2015 a enero de 2016.....	28
Figura 10. Variación mensual de la temperatura en las cinco estaciones del sur de la BAPAZ, durante el periodo de enero de 2015 a enero de 2016. ....	29
Figura 11. Concentración de N total, PO <sub>4</sub> y su relación N:P en la E1 durante el periodo de enero a junio de 2015. ....	30
Figura 12. Concentración de N total, PO <sub>4</sub> y su relación N:P en la E2 durante el periodo febrero de 2015 enero de 2016. ....	31
Figura 13. Concentración de N total, PO <sub>4</sub> y su relación N:P en la E3 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016. ....	32
Figura 14. Concentración de N total, PO <sub>4</sub> y su relación N:P en la E4 durante el periodo enero de 2015 enero de 2016. ....	33
Figura 15. Concentración de N total, PO <sub>4</sub> y su relación N:P en la E5 durante el periodo septiembre de 2015 a enero de 2016.....	34
Figura 16. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Dosinia ponderosa</i> en la estación E1, durante el primer semestre de 2015. ....	36
Figura 17. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Dosinia ponderosa</i> de la E2.....	37
Figura 18. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Atrina maura</i> de la E3. ....	38
Figura 19. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Atrina maura</i> de la E4. ....	39
Figura 20. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Dosinia ponderosa</i> de la E5.....	40
Figura 21.- Micrografías de <i>Proocentrum micans</i> . Imágenes observadas a 40x con DIC. Poro oral (PO), espina apical (EA), poros (Pr), patrón de poros (PPr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.....	75



Figura 22. Micrografías de <i>Prorocentrum gracile</i> . 1 y 3) observas a 40x con DIC. 2) observada a 20x con DIC. Poro oral (PO), espina apical (EA), poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.....	77
Figura 23.- Micrografías de <i>Prorocentrum compressum</i> . 1 y 2) observas a 100x con DIC. 3) observada a 20x con EPI. 4 y 5) observadas a 100x con EPI. Musílagos (Mg), Poro oral (PO), cloroplasto (CL), núcleo (N), patrón de poros 1 (PPr1), patrón de poros 2 (PPr2), aleta (A). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.....	78
Figura 24.- Micrografías de <i>Amphidinium carterae</i> . Imágenes observadas a 100x con DIC. Núcleo (N), epicono (EC), hipocono (HC), pirenoide (PY), flagelo transversal (FT). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. ....	78
Figura 25.- Micrografías de <i>Cucumeridinium</i> sp. Observadas a 40x con DIC. Epicono (EC), núcleo (N), hipocono (HC), cíngulo (C), vacuolas (V), estrías (ES). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.....	78
Figura 26.- Micrografías de <i>Pentapharsodinium</i> sp.1) observada a 100x con DIC. 2-6) observadas a 100x con EPI. Cíngulo (C), vacuola (VA), cloroplastos (CL), epiteca (ET), hipoteca (HT), placa sulcal posterior (Sp), sulcus (S). Placas apicales (1'- 4'), placas anteriores intercalares (1a – 3a), placas pre-cingulares (1''- 7''), placas cingulares (1c-5c), placas sulcales (1s-5s), placas post-cingulares (1'''- 5'''), placas antapicales (1''''- 2'''). 1, 2 y 3). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. 4, 5 y 6). Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril.....	78
Figura 27.- Micrografías de <i>Coolia monotis</i> . 1-4) observadas a 100x con DIC. 5-7) observadas a 100x con EPI. Cíngulo (C), núcleo (N), poro oral (Po), aleta cingular (AC). Placas apicales (1'-3'), placas pre-cingulares (1''- 7''), placas post-cingulares (1'''- 5'''). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.....	78
Figura 28.- Micrografías de <i>Coolia malayensis</i> . 1-4) observadas a 100x con EPI. 5) observada a 100x con DIC. Poro oral (Po), aleta sulcal (AS). Placas apicales (1'-3'), placas pre-cingulares (1''- 7''), cingulares (1c – 6c), placas post-cingulares (1'''- 5'''). 1 y 2) Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril. 3, 4 y 5) Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. ....	78

Figura 29.- Micrografías de *Prorocentrum rhathymum*. 1, 2 y 3) observadas a 40x con DIC. 4) observada a 100x con DIC. 5) observada a 100x con EPI. Cloroplastos (CL), núcleo (N), poro oral (PO), espina apical (EA), mucílago (Mg), patrón de poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro..... 78

Figura 30.- Micrografías de *Dinophysis caudata*. 1, 2 y 5) observadas a 20x con DIC. 3 y 4) observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), aleta sulcal (AS), prolongación (P), aleta cingular (AC), cíngulo (C), poros (Pr), plastos (Pl). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. .... 78

Figura 31.- Micrografías de *Dinophysis tripos*. Imágenes observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), epiteca (ET), hipoteca (HT), poros (Pr), aleta cingular (AC), aleta sulcal (AS), prolongación (P). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro..... 78

Figura 32.- Micrografías de *Dinophysis acuminata*. Observadas a 40x con DIC. Cíngulo (C), poros (Pr), epiteca (ET), aleta sulcal (AS), hipoteca (HT), radios (R1, R2 y R3). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro..... 78

Figura 33.- Micrografías de *Phalacroma rotundata*. Observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), aleta sulcal (AS), cíngulo (C), epiteca (ET), hipoteca (HT), poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro..... 78

Figura 34.- Micrografía de *Gymnodinium* sp. Observadas a 100x con DIC. Núcleo (N), cloroplastos (CL), sulcus (S), cíngulo (C), flagelo transversal (FT), epicono (EC), hipocono (HC), cloroplastos (CL). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. .... 78

Figura 35.- Micrografías de *Gymnodinium impudicum*. 1 y 2) observadas a 40x con DIC. 3) observada a 40x con EPI. 4 y 5) observadas a 100x con DIC. Cadenas de 2 y 4 células (CD2 y CD4), eyespot (EP), epicono (EC), flagelo transversal (FT), cíngulo (C), hipocono (HC), núcleo (N). 1, 2 y 4 Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril. 3 y 5) Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. .... 78

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las ficotoxinas marinas. Modificada de Alfonso-Méndez, 2008 y Otero-Fuertes, 2012..... 2

Tabla 2. Localización de las estaciones de monitoreo de dinoflagelados, toxinas disueltas en la columna de agua y en moluscos bivalvos. .... 12

Tabla 3. Cultivos que se mantienen en medio de cultivo Gse modificado, el cepario de dinoflagelados nocivos y tóxicos del CICIMAR. Se muestra la especie, división, clave de identificación, localidad, fecha de aislamiento y persona que realizó el aislamiento. .... 21

Tabla 4. Signos clínicos observados en los bioensayos en los meses de enero y febrero de 2015. .... 40

## DEDICATORIA

En primer lugar le dedico esta tesis a mi mamá **Sandra Luz Hernández Castro**, quien ha sido la persona que ha estado conmigo en todo momento, tanto en las buenas como las malas que gracias a su trabajo, esfuerzo y sacrificio nos ha apoyado a mis hermanos y a mí.

A mi **Familia** por todo su apoyo, en especial a mis hermanos (Arturo y Juan Carlos) a mi papá (Norberto), a mi prima loca que me sigue en todo (Elizabeth), a mi amiga Carmen González, a mis hermanos Lupita y Evaristo, a todas mis tías y tíos, primos y a mis abuelos.

A mis **FORAMEN MAGNUM** (Izamar, Mara Omaly, Tania, Valeria y Zurisaday), porque a pesar de que estamos separadas por la distancia nuestra amistad continua, espero pronto volver a estar juntas.

A las **Chicas FAN-CICIMAR** (Dulce Valeria y Miriam Zumaya) y **Antonino Flores** (mi único amigo cicimareño), gracias por el apoyo, por todo el tiempo que pasamos juntos compartiendo experiencias académicas (chismes) y que ahora ya forman parte de mi pequeño grupo de amigos y personas importantes en mi vida.

A la **RedMAR** por esos buenos momentos que pasamos, los cuales hacen que la ciencia sea más divertida.

A mis compañeros y profesores de la carrera de **BIOLOGÍA MARINA** así como a nuevos amigos que han entrado en mi vida (**Ivan Kalid, Diego Gijón, Santiago Cadena, Marco Medina, Roberto Aguilar, Tai Coh Ley y Ángel García**).

Gracias a todos por siempre apoyarme y creer en mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado por los proyectos: **CONACYT** 248468, 178227, **FORDECyT** 260040 a los proyectos institucionales del Instituto Politécnico Nacional: **SIP** 20151381, 2016118 y 20171082

Gracias al **CICIMAR-IPN** por el apoyo otorgado, y **CONACYT** por la beca otorgada, BECA No: 703129.

Gracias al apoyo económico de la **RedFAN**, para la asistencia a congresos y mi estancia de investigación.

A todas las instituciones que participaron en este proyecto: Instituto Politécnico Nacional (**IPN**), al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (**CIBNOR**) (Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos), al Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (**CEFAS**) (Laboratorio Weymouth), al Centro de Investigación Científica de Yucatán (**CICY**) (Unidad de Ciencias del Agua) y a la Asociación Civil Noroeste Sustentable (**NOS**).

A mis directores de tesis **Dr. Ignacio Leyva Valencia** y **Dra. Christine J. Band Schmidt**, a los miembros del comité revisor: **Dr. David López Cortés**, **Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero**, **Dra. Bertha Patricia Ceballos Vázquez** y al **M.C. Marcial Villalejo Fuerte**, por todas sus sugerencias para hacer lo mejor posible el presente trabajo.

Quiero agradecer a la **Dra. Christine** por confiar en mí y aceptarme en su equipo trabajo, por todo su apoyo y sus consejos, agradezco principalmente al **Dr. Ignacio** por su apoyo incondicional en todo momento, por el tiempo invertido, su paciencia y todos sus consejos, gracias por aceptarme en su equipo y permitirme trabajar a su lado.

Agradezco a todos los investigadores que forman parte del presente trabajo **B.M. Erick Núñez Vázquez** por todos sus consejos, su tiempo y paciencia, al **M.C. José Reyes** por todas las horas que paso conmigo ayudándome a identificar. Al **Dr.**

**Francisco Hernández** por el procesamiento de mis muestras, al **M.C. Ismael Gárate** y al **M.C. Tanos Grayeb** por las observaciones realizadas a mi trabajo.

Al tecnico **Jorge Cobos Anaya** del COSEPII-Taller de Maquinados del CIBNOR por la elaboracion de los soportes de PVC para las resinas HP-20.

A todo el resto del **equipo FAN-CICIMAR** (Ana Cristina, Aldo, Armando, Melany).

Al **Dr. Antonio Almazán** por permitirme trabajar en su laboratorio, sus consejos para la documentación de los organismos y todo el apoyo durante mi estancia de investigación.

A la asociación civil **Noroeste Sustentable (NOS)**, a la **M.C. Silvia Ramírez Luna**, gracias por todo el trabajo y esfuerzo invertido en esta investigación. A la comunidad de pescadores de **El Manglito**, especialmente a **Chiflo, Guillermo, Hubert y Omar** que en todo momento estuvieron en la mejor disposición de apoyarme durante las actividades en campo.

## **GLOSARIO**

**Ácido okadaico:** Compuesto polieter derivado de un ácido graso de 38 carbonos (C<sub>38</sub>). Considerada como una molécula pseudo-macrociclica debido al enlace del C<sub>1</sub> con el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo, con un peso molecular de 804 Da (Rossini, 2014).

**Análogo:** Es un compuesto que tiene una estructura similar a la de otro, pero difiere de él con respecto a un cierto componente. Puede diferir en uno o más átomos, grupos funcionales o subestructuras, que se sustituyen por otros átomos, grupos o subestructuras (FAO, 2016).

**Autótrofo:** Organismo capaz de sintetizar todas las moléculas orgánicas necesarias a partir de sustancias inorgánicas simples (p. ej., H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) y de alguna fuente de energía (luz en los fotosintéticos o energía química en los quimiosintéticos) (Curtis, 2007).

**Azaspirácido:** Compuesto que posee un anillo espiro triple, un anillo azáspiro único a un 2,9- dioxabicyclo nonano y un ácido carboxílico terminal (Gago-Martínez, *et al.*, 2012).

**Cepa:** Organismo con alguna variante genética que usualmente se propaga clonalmente para que estos conserven la característica de interés (Garay *et al.*, 2006).

**Dinofisistoxina:** Compuesto perteneciente al grupo de los poliéteres, constituida por una cadena lineal con un grupo carboxilo libre, que difiere del ácido okadaico en la presencia de los grupos metilos (Fernández-Cañamero, 2007).

**Dosis letal media (DL<sub>50</sub>):** Dosis que mata a la mitad de la población de animales analizados (FAO, 2016).

**Fitoplancton:** Formas vegetales de plancton. Son los organismos vegetales predominantes en el mar y constituyen la base de toda la trama alimentaria marina.

Estos organismos unicelulares son los principales agentes de la fijación fotosintética de carbono en el océano (CIECC, 2017).

**Heterótrofo:** Organismo que debe alimentarse de sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos para obtener energía y pequeñas moléculas estructurales (Curtis, 2007).

**Hidrofílico:** Capacidad de una entidad molecular o de un sustituyente para interactuar con disolventes polares, en particular con agua (FAO, 2016).

**Inyección intraperitoneal:** Introducción de soluciones en la cavidad peritoneal (Fernández *et al.*, 2009).

**Lipofílico:** Aplicado a entidades moleculares (o partes de entidades moleculares) que tienen una tendencia a disolverse en disolventes no polares semejantes a grasas (FAO, 2016).

**Mecanismo de acción:** Interacción bioquímica específica a través de la cual una sustancia produce un efecto sobre un organismo vivo o en un sistema bioquímico (FAO, 2016).

**Mixotrófo:** Capacidad que tienen algunos microorganismos de cambiar su metabolismo de autótrofo a heterótrofo, estos pueden tomar la energía que requieren de sustancias orgánicas simples sin requerir de la luz para su crecimiento (Hakim, 2012).

**Pectenotoxinas:** Moléculas de estructura química es semejante a la del ácido okadaico, a diferencia de este las pectenotoxinas forman una lactona macrocíclica (Rossini, 2014).

**Proporción de Redfield:** Es el promedio de la proporción de los nutrientes Carbono (C), Nitrógeno (N) y Fósforo (P) para la comunidad del fitoplancton y el agua de mar, esta relación es de 106:16:1 (Lagus *et al.*, 2004).

**Proporción N:P:** Cociente utilizado para conocer la relación entre el nitrógeno y el fósforo y con ello determinar si el sistema está limitado o deficiente de alguno de estos elementos (Redfield, 1958).



**Tabulación:** Sistema desarrollado el cual es utilizado para la identificación morfológica de los dinoflagelados tecados basado en la nomenclatura de las placas la cuales se encuentran en series ecuatoriales, este sistema fue propuesto por Kofoid en 1909 (Taylor, 1999).

**Toxina:** Sustancia que puede ser de naturaleza proteica o no proteica y es de origen vegetal, animal o bacteriológico, la cual cuenta con una estructura química que desencadena desordenes fisiológicos (Williams & Clarke, 1998).

**Yessotoxinas:** Compuesto sulfatado poliéter derivado de las brevetoxinas (FAO, 2004).

## RESUMEN

En la Bahía de La Paz, se han reportado florecimientos algales nocivos donde se han detectado toxinas hidrofílicas como la saxitoxina y sus análogos y el ácido domoico y toxinas lipofílicas como la ciguatoxina y el ácido okadaico. Aunque los reportes relacionados con el ácido okadaico son escasos, en la Bahía de La Paz es común la presencia de dinoflagelados productores de esta toxina, principalmente especies pertenecientes a los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*. Con base en esto, de enero del 2015 a enero de 2016 se realizó un monitoreo mensual de toxinas y fitoplancton, seleccionando cinco sitios al sur de la bahía donde existen bancos naturales de almejas (*Megapitaria squalida*, *Dosinia ponderosa* y *Atrina maura*). El objetivo de este trabajo fue identificar dinoflagelados nocivos y tóxicos que coexisten con los bivalvos en los sitios seleccionados, verificando si los moluscos presentaban acumulación de toxinas. Se tomaron muestras en la columna de agua para determinar temperatura, salinidad y nutrientes, realizar conteos celulares, además muestras con red para recolectar fitoplancton y con ellas realizar la identificación taxonómica y aislamiento de dinoflagelados. La detección de toxinas inicialmente se realizó utilizando como método exploratorio el bioensayo en ratón, se corroboró la presencia de las toxinas y se determinó su perfil con los métodos de HPLC-FD y LC-MS/MS, detectándose 15 toxinas lipofílicas, con valores máximos de 6.3  $\mu\text{g}$  de AO  $\text{kg}^{-1}$  de tejido de moluscos, 8.2  $\mu\text{g}$  de PTX  $\text{kg}^{-1}$ , 0.8  $\mu\text{g}$  de AZA  $\text{kg}^{-1}$ , 22.5  $\mu\text{g}$  de h-YTX  $\text{kg}^{-1}$ , 11.3  $\mu\text{g}$  de SPX  $\text{kg}^{-1}$ , 42.6  $\mu\text{g}$  de GYM  $\text{kg}^{-1}$  y 10.5  $\mu\text{g}$  de PnTXG  $\text{kg}^{-1}$ . A excepción del AO y sus análogos, las toxinas lipofílicas detectadas no son reguladas en México. La presencia de las iminas cíclicas fue constante durante el periodo monitoreado, aunque en bajas concentraciones. Los géneros *Prorocentrum* (abundancia máxima de 400  $\text{cel L}^{-1}$ ) y *Dinophysis* (abundancia máxima de 1,100  $\text{cel L}^{-1}$ ) fueron los más recurrentes. En el laboratorio se aislaron y se mantienen cultivos de *Amphidinium*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Alexandrium*, *Protoceratium*, *Gonyaulax*, *Alexandrium* y *Pentapharsodinium*. No se descarta la posibilidad de que alguna de estas especies sea responsable de la producción de las toxinas detectadas en los bivalvos.

## ABSTRACT

In the Bay of La Paz, harmful algal blooms have been reported where hydrophilic toxins such as saxitoxin and its analogues, as well as domoic acid and lipophilic toxins such as ciguatoxin and okadaic acid have been reported. The objective of this work was to identify harmful and toxic dinoflagellates that coexist with the bivalves, verifying if the molluscs accumulated those toxins. Reports related to okadaic acid are scarce, but the presence of dinoflagellates producers of this toxin, mainly species belonging to the genera *Prorocentrum* and *Dinophysis*, are common in the Bay of La Paz. Monthly monitoring of toxins and phytoplankton were carried out from January 2015 to January 2016. Five sites were selected in the southern bay where natural clam aggregations exist (*Megapitaria squalida*, *Dosinia ponderosa* and *Atrina maura*). Samples were taken in the water column to determine temperature, salinity and nutrients, to perform cellular counts. In addition, phytoplankton net samples were collected to perform taxonomic identification and isolation of dinoflagellates. The detection of toxins was initially performed using the mouse bioassay as an exploratory method. The presence of toxins was corroborated and their profile was determined with HPLC-FD and LC-MS / MS methods. These lipophilic toxins were detected with maximum values of 6.3 µg of OA kg<sup>-1</sup> of mollusc tissue, 8.2 µg of PTX kg<sup>-1</sup>, 0.8 µg of AZA kg<sup>-1</sup>, 22.5 µg of h-YTX kg<sup>-1</sup>, 11.3 µg of SPX kg<sup>-1</sup>, 42.6 µg of GYM kg<sup>-1</sup>, 10.5 µg PnTXG kg<sup>-1</sup>. With the exception of OA and its analogues, the lipophilic toxins detected are not regulated in Mexico. The presence of the cyclic imines was constant during the monitored period, albeit at low concentrations. The genera *Prorocentrum* (maximum abundance of 400 cel L<sup>-1</sup>) and *Dinophysis* (maximum abundance of 1100 cel L<sup>-1</sup>) were the most recurrent. In the laboratory cultures of *Amphidinium*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Alexandrium*, *Protoceratium*, *Gonyaulax*, *Alexandrium* and *Pentaparsodinium* were isolated and maintained. The possibility that one of these species is responsible for the toxins detected in bivalves exists.

# **1.-INTRODUCCIÓN**

## **1.1-Florecimientos Algales Nocivos**

Los Florecimientos Algales Nocivos (FAN), también llamados HABs por sus siglas en inglés Harmful Algal Blooms, son eventos donde se da la proliferación de microorganismos del fitoplancton, alcanzando densidades de millones de células por litro que pueden provocar cambios en la coloración del agua, tomando tonos amarillo, café, naranja, rojos o verdes y son llamados comúnmente “Mareas Rojas”, los principales grupos del fitoplancton responsables de estos son diatomeas, cianobacterias, dinoflagelados y rafidofíceas (Cortés-Altamirano, 1998; Hernández-Orozco & Gárate-Lizárraga, 2006).

Este trabajo está enfocado en el grupo de los dinoflagelados y las toxinas que producen. Según datos de la UNESCO (2017), se han reportado 95 especies de dinoflagelados tanto nocivos como tóxicos de las cuales, 12 pertenecen al orden Dinophysiales, 40 Gonyaulacales, 24 Gymnodiniales, 4 Peridinales, 11 Prorocentrales y 4 a la familia Amphidomataceae. Son 73 especies las que son consideradas como potencialmente tóxicas.

Los FAN pueden causar condiciones de hipoxia o anoxia en el medio marino debido a las altas densidades celulares, que al morir el material orgánico generado se oxida y disminuye el oxígeno disuelto. También los FAN impiden el paso de la radiación solar afectando principalmente a organismos fotosintéticos bentónicos (Ochoa, 2003), incluso pueden provocar daño físico en diversas especies de invertebrados y vertebrados, como por ejemplo la irritación de branquias y/o su taponamiento, provocando la muerte por asfixia del organismo (principalmente moluscos, crustáceos y peces de escama) (Smayda, 1997).

Pero los daños ocasionados por éste tipo de eventos no siempre están asociados a las altas densidades del fitoplancton, hay reportes que mencionan que con bajo número de células se puede presentar alta toxicidad en moluscos, la cual puede tener impacto en el humano, por ejemplo los brotes de daños gastrointestinales ocurridos en 1976 y 1977 en Japón (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980). Este tipo de intoxicación por lo general es provocada por dinoflagelados productores

de toxinas lipofílicas. Dichas toxinas se clasifican con base en la similitud de su estructura y propiedades químicas, en este caso el grado de solubilidad en compuestos orgánicos (Tabla 1). Bajo este criterio se han definido tres grupos: hidrofílicas, lipofílicas y anfifílicas (Ochoa, 2003; González-Rivera, 2009; Otero-Fuertes, 2012). Esta es la clasificación que se utilizó en el presente trabajo.

Tabla 1. Clasificación de las ficotoxinas marinas. Modificada de Alfonso-Méndez, 2008 y Otero-Fuertes, 2012.

<b>Grupo</b>	<b>Toxina</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>LP</b>
Toxinas paralizantes (PSP)	Saxitoxina (STX)	Hidrofílica	180 $\mu\text{g kg}^{-1}$
	Gonyautoxinas (GTX)		
	N-sulfocarbamoil-11		
	hidroxisulfatotoxinas (C)		
Toxinas diarreas (DSP)	Ácido okadaico (AO) Dinofisistoxinas (DTX)	Lipofílica	160 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Pectenotoxinas (PTX)	Pectenotoxinas (PTX)	Lipofílica	120 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Toxinas amnésicas (ASP)	Ácido domoico y derivados	Hidrofílica	30 $\text{mg kg}^{-1}$
Toxinas neurotóxicas no PSP	Ciguatoxina (CFP)	Lipofílica	5ng de CTX $\text{kg}^{-1}$
	Maitotoxina (MTX)		
	Brevetoxina (PbTX)		400-450 $\mu\text{g}$ de IC $\text{kg}^{-1}$
	Iminas cíclicas (IC)		
	Policavernosidos y gambierol		
Palitoxinas (PITX)	Palitoxinas (PITX)	Anfifílica	
	Ostreocina		
	Ovatatoxina		
Yessotoxinas (YTX)	Yessotoxinas (YTX)	Lipofílica	1 $\text{mg kg}^{-1}$
Azaspirácidos (AZA)	Azaspirácidos (AZA)	Lipofílica	160 $\mu\text{g kg}^{-1}$

**LP=Límite permisible**

La contaminación de los moluscos por ficotoxinas es un problema de salud pública mundial, por lo cual se han implementado programas de monitoreo que involucran muestreos de moluscos o análisis de muestras de agua para detectar especies tóxicas en el fitoplancton. En los últimos años se ha tratado de evitar el uso de los bioensayos, para lo cual se están empezando a utilizar muestreadores pasivos (resinas) con afinidad hidrofílica y lipofílica. Con esta técnica se realiza la acumulación de toxinas disueltas que son capturadas en las microesferas de las resinas, simulando la actividad de un bivalvo filtrador, este método ha probado ser eficaz y de bajo costo, permitiendo detectar toxinas en concentraciones por debajo de los niveles de regulación (Mackenzie *et al.*, 2004).

## **1.2-Toxinas lipofílicas**

Un número considerable de ficotoxinas son de naturaleza lipofílica, en el presente estudio se hace énfasis en las DSP, IC, PTX, YTX y AZA, pues se sabe que cuando se realizan extractos para la detección de AO se suele extraer otras toxinas lipofílicas (Yasumoto, 1978).

## **1.3-Toxinas Diarreicas**

### **1.3.1-Ácido okadaico (AO) y dinofisistoxinas (DTX)**

En el grupo de las toxinas diarreicas la principal ficotoxina responsable de los efectos tóxicos es el AO, el cual es un poliéter liposoluble, aislado e identificado en 1981 a partir de extractos de la esponja negra *Halichondria okadaii* así como de *H. melanodocia* (Tachibana *et al.*, 1981). El AO como otras ficotoxinas puede acumularse en los tejidos de moluscos bivalvos, ostras, mejillones y otros organismos que se alimentan de fitoplancton, incluyendo peces que subsecuentemente son consumidos por el humano, causando intoxicaciones. Las características de estas toxinas no son modificadas durante el proceso de cocción o congelamiento, tampoco alteran la apariencia de los organismos contaminados, por ende no es posible detectarlas a simple vista pues los signos que producen pueden ser fácilmente confundidos con gastroenteritis (Reguera *et al.*, 2000).

La inhibición de la actividad fosfatasa resulta en una hiperfosforilación que afectan la secreción de Na<sup>+</sup>, provoca la inflamación del intestino lo cual influye en la

permeabilidad de fluidos de las células intestinales, surgiendo de aquí su efecto diarreico (Valdiglesias *et al.*, 2013). Otros síntomas asociados son: náuseas, vómito y dolor abdominal, estos suelen presentarse en menos de una hora después de la ingestión del alimento contaminado y prevalecer hasta 72 h (Tubaro *et al.*, 2008), aunque el mecanismo de acción de estas toxinas es rápido por vía oral, no hay antecedentes de algún caso mortal por este padecimiento. Se han detectado más de 20 análogos del ácido okadaico, pero la mayoría son inhibidores de las proteínas fosfatasas y son considerablemente menos potentes que su precursor, el AO (Yanagi *et al.*, 1989; Nishiwaki *et al.*, 1990). No obstante los estudios realizados en ratones han revelado que la exposición crónica al AO puede favorecer cambios en la estructura celular y la formación de tumores cancerígenos (Fujiki & Suganuma, 1993; FAO, 2004; Paz-Pino, 2007; Valdiglesias, *et al.*, 2011). El límite máximo permisible en la NOM-242-SSA1-2009 para estas toxinas es de 160 µg kg<sup>-1</sup> de tejido de molusco (DOF, 2011).

El AO presenta algunos análogos que son conocidos como dinofisistoxinas (DTX), siendo los más importantes la DTX1 y DTX2, las cuales son sintetizadas directamente por algunos dinoflagelados, mientras que la DTX3 es producto del metabolismo de moluscos cuando ingieren AO, la DTX4 y DTX5 se han encontrado tanto en los dinoflagelados como en el tejido de los moluscos por lo cual no se conoce del todo su origen. El AO y las DTX son producidas por dinoflagelados del género *Dinophysis*, *Phalacroma* y *Prorocentrum* (Yasumoto *et al.*, 1980; Murakami, *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1989; Dickey *et al.*, 1990; Morton & Bomber, 1994; Holmes *et al.*, 1999; Alfonso-Méndez, 2008; Caillaud *et al.*, 2010). El primer reporte de una intoxicación DSP fue en Japón, cuando a finales de junio de 1976 al menos 42 personas que consumieron mejillones sufrieron de vómito y diarrea (Yasumoto, 1978).

Para la determinación de los efectos de las toxinas DSP, se han llevado a cabo bioensayos en rata alimentándolas con *Prorocentrum lima*, productor de AO y DTX, detectando signos como: diarrea, disnea, letargo, inflamación de las extremidades anteriores, edemas, congestión pulmonar, hemorragias y muerte. El

análisis histológico reveló daño en las células hepáticas, afectando su morfología y arreglo citoesquelético (González-Rivera, 2009).

#### **1.4-Pectenotoxinas (PTX)**

Además del AO también se creía que las PTX estaban involucradas en la intoxicación DSP, estos compuestos sintetizados por dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* fueron detectados por primera vez en el molusco *Patinopecten yessoensis* y se han logrado identificar 10 análogos (Draisci *et al.*, 2000; Ardilla de la Rosa-Carrillo, 2001). Su inclusión en la lista de las toxinas diarreas se debió a que coexisten con el AO y las DTX y también provocan la muerte de los ratones después de la inyección intraperitoneal, el principal efecto en los ratones es hepato-tóxico, aunque se ha reportado que tienen una baja toxicidad por vía oral. No se han confirmado intoxicaciones en humanos por PTX, mientras que en los bioensayos no inducen diarrea en los animales, siendo mucho menos tóxicas cuando se administran por vía oral que por inyección intraperitoneal (Alfonso *et al.*, 2016).

#### **1.5-Iminas cíclicas (IC)**

Las IC son un grupo de toxinas que se caracterizan por la presencia de un grupo imino como parte de su estructura cíclica, en algunas de ellas se ha documentado que la toxicidad disminuye cuando el grupo imino está reducido o destruido (Kong *et al.*, 2011). Las IC son consideradas toxinas de acción rápida, por los efectos neurotóxicos, letales en los ratones, al ser inyectados intraperitonealmente o por vía oral, aunque su toxicidad en humanos y su modo de acción continúan siendo estudiados. El grupo de las IC incluye a los espirolidos (SPX), gymnodiminas (GYM), pinnatoxinas (PnTX), pteriatoxinas (PtTX), espiroprorocentriminas y portiminas (Hellyer, 2014).

Los SPX son un grupo de iminas macrocíclicas que fueron detectadas en la glándula digestiva de bivalvos en Nueva Escocia en 1995, son producidos principalmente por *Alexandrium ostenfeldii*, este dinoflagelado tónico fue aislado en Islandia y descrito por Paulsen en 1904, inicialmente se le consideraba una especie



ártico-boreal, actualmente se reconoce que su distribución es cosmopolita (Gribble *et al.*, 2005; EFSA, 2010).

La producción de GYM se asocia principalmente a *Karenia selliformis*, esta toxina fue aislada por Seki y colaboradores en 1995 de la ostra *Tiostrea chilensis* de Nueva Zelanda y su estructura química fue caracterizada por medio de resonancia magnética nuclear. Actualmente estas toxinas se han detectado en los litorales de Túnez, África, Europa y costas norteamericanas, la ocurrencia de las GYM representa serias preocupaciones ya que en el estudio de Stirling, 2001, menciona que estas toxinas se presentan de manera recurrente en las costas de Nueva Zelanda y que además se han encontrado acumuladas en más de una especie de bivalvos (mejillones, pectinidos y abulones principalmente). La toxicidad en ratones varía dependiendo de la ruta de administración por vía oral es de 755  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mientras que por vía intraperitoneal es de 96  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Kong *et al.*, 2011).

Las PnTX, fueron descubiertas a partir de extractos de la glándula digestiva de *Pinna attenuata* (Zheng *et al.*, 1990), pero fue en *P. muricata* de donde se logró caracterizar el primer análogo PnTX A. Recientemente han sido identificadas en Australia, Nueva Zelanda y Japón. Al dinoflagelado al que se adjudica la producción de estas toxinas es a *Vulcanodinium rugosum* (Hellyer, 2014). Hernández-Becerril y colaboradores (2013), reportaron por primera vez a *V. rugosum* en el Pacífico tropical mexicano.

#### Espiro-prorocentriminas

Esta toxina fue aislada de una cepa bentónica de *Prorocentrum* sp., en Taiwan. No existen datos sobre su mecanismo de acción, pero se sabe que la dosis  $DL_{50}$  por vía intraperitoneal en ratones es de 2,500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Fonfría-Subirós, 2009).

#### Portiminas

Es una de las IC de reciente descubrimiento, aislada de *V. rugosum* es un éter policíclico que contiene un resto de imina cíclica. La  $DL_{50}$  en ratones por inyección intraperitoneal es de 1,570  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Selwood *et al.*, 2013). Hasta el momento son escasos los trabajos donde se reporta la presencia de IC para las costas mexicanas,

aunque se sabe de la presencia de las especies que las producen. Es necesario realizar más investigaciones para poder correlacionar la presencia de las toxinas con las especies de dinoflagelados.

### **1.6-Yessotoxinas (YTX)**

Las YTX fueron aisladas e identificadas en Bahía Mutsu, Japón en 1986 de la glándula digestiva de *Patinopecten yessoensis* después de un episodio de intoxicación. Además de Japón, las YTX han sido detectadas en España, Italia, norte del mar Adriático, Rusia, Nueva Zelanda, Chile y México (Draisci *et al.*, 2000; Ardilla de la Rosa- Carrillo, 2001; García-Mendoza *et al.*, 2014). Actualmente se han reportado más de 90 análogos (Miles *et al.*, 2005). Algunos análogos de las PTX y YTX son producto de la biotransformación en los moluscos (Draisci *et al.*, 2000). La producción de estas toxinas se asocia principalmente a las especies *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera*, en cuanto a su toxicidad se ha descrito una amplia gama de dosis letales (LD<sub>50</sub>), de 80 a 750 µg kg<sup>-1</sup>. No se tiene registro sobre sus efectos en humanos, sin embargo, en la Unión Europea éstas ya se encuentran reguladas y el límite permisible es de 1 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que el límite para otras toxinas lipofílicas es de 160 µg kg<sup>-1</sup> (Alfonso *et al.*, 2016).

### **1.7-Azaspirácidos (AZA)**

Los AZA, son producidos principalmente por *Azadinium spinosum*, están asociados a la intoxicación en humanos por consumo de mariscos, entre los síntomas que se tiene registro destacan: náuseas, vómito, diarrea y dolor estomacal (McMahon & Silke, 1996).

Tillmann y colaboradores en 2009, realizaron un cultivo axénico de *A. spinosum*, aislado de las costas de Escocia, la describieron como una especie pequeña que va de 12 a 16 µm de longitud, se definió la tabulación y de acuerdo con la descripción morfológica y el análisis filogenético no mostró ninguna relación con el orden Peridinales o Gonyaucales, ni con ninguno de los grupos presentes en la base de datos por lo cual se le asignó el nombre genérico de *Azadinium*, a partir de su cultivo se logró identificar la producción de AZA1 y AZA2. *A. spinosum* fue

reportada recientemente en litorales del Pacífico Mexicano (Hernández-Becerril *et al.*, 2012).

### 1.8-Planteamiento del problema

En la Bahía de La Paz (BAPAZ) B.C.S., han ocurrido florecimientos algales nocivos (FAN) de especies nocivas y tóxicas, durante el periodo de 1997 a 2008 se logró la detección de toxinas del tipo paralizante en 6 eventos donde la especie dominante fue *Gymnodinium catenatum*. El último evento registrado fue en 2007 y ha sido el único hasta el 2016 en el que se logró la detección de toxinas en el tejido de los moluscos: *Dosinia ponderosa*, *Periglypta multicostata*, *Megapitaria squalida*, *Megapitaria aurantiaca*, *Pinna rugosa* y *Modiolus capax*. En ninguno de ellos la cantidad de toxina superó el límite permisible de 80 µg de STXeq 100 g<sup>-1</sup> de tejido de moluscos, pero fue *P. rugosa* la que acumuló mayor concentración de la toxina (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009; Band-Schmidt *et al.*, 2010). Recientemente, en junio del 2017 se volvió a detectar un FAN de *G. catenatum* en la Bahía de La Paz, encontrándose nuevamente toxinas paralizantes en moluscos bivalvos por arriba del límite permisible para el consumo humano (COEPRIS, 2017).

Otro de los eventos en los que se registró la presencia de toxinas en la BAPAZ, ocurrió en 2006, en este FAN se observó una muerte masiva de peces, el análisis de las muestras de fitoplancton reveló que las diatomeas dominantes fueron: *Pseudo-nitzschia* ( $2.4 \times 10^6$  cel L<sup>-1</sup>), *Thalassiosira eccentrica* ( $2.3 \times 10^6$  cel L<sup>-1</sup>) y *Chaetoceros* spp. ( $9.65 \times 10^5$  cel L<sup>-1</sup>). Los autores identificaron un complejo de especies de diatomeas tóxicas conformado por *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudulenta* y *P. pungens*, además de determinar el contenido de ácido domoico (AD) tanto en columna de agua como en el tejido de la almeja chocolata *M. squalida* (550 µg kg<sup>-1</sup>) y la almeja blanca *D. ponderosa* (60 µg kg<sup>-1</sup>). No obstante, al realizar análisis en tejidos de peces no se detectó AD. Los resultados de la necropsia de los peces sugirieron que la causa de muerte en los peces fue por la asfixia probablemente causada por *T. eccentrica* y *Chaetoceros* spp. (López-Cortés *et al.*, 2015).

Son pocos eventos en los que ha detectado la presencia de toxinas en el tejido de los moluscos, aunque se sabe de la presencia de dinoflagelados productores de toxinas, tanto lipofílicas como hidrofílicas, siendo este último grupo del que se cuenta con más información.

Entre los reportes de especies productoras de toxinas lipofílicas esta el trabajo de Muciño-Márquez y colaboradores (2015), quienes analizaron la variación estacional de género *Prorocentrum* en dos granjas atuneras de la BAPAZ. El género *Prorocentrum* incluye 81 especies, 21 son consideradas formadoras de FAN y de estas 9 producen toxinas. Entre las especies tóxicas que reportaron los autores en zonas aledañas a las granjas de atún destacan: *P. lima*, *P. minimum* y *P. shikokuense*. Otros organismos relacionados con la producción de toxinas lipofílicas son los que se encuentran dentro del género *Dinophysis*, del cual hay pocos trabajos en la región, destacando el de Sánchez-Bravo, (2016), quien caracterizó la distribución espacial, temporal y estado fisiológico (alimentación) de *Dinophysis fortii* en la región de la Bahía de Todos Santos.

Por su naturaleza filtroalimentadora los moluscos bivalvos son uno de los principales vectores de las ficotoxinas hacia el humano, esto debido a que durante su alimentación pueden retener toxinas por diferentes periodos, dependiendo de la especie del molusco, el tipo de toxina y los procesos de biotransformación que ocurren durante la digestión, en algunos la eliminación de toxinas es rápida y ocurre en un lapso de semanas, pero en otros casos pueden prevalecer en los tejidos del organismo incluso por años (Otero-Fuertes, 2012). Un ejemplo de la acumulación de toxinas es el trabajo realizado por García-Mendoza y colaboradores (2014), presentan uno de los primeros reportes de la presencia de toxinas lipofílicas en cultivos de mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), en Baja California, con lo cual documentó uno de los primeros trabajos de este tipo para la península de Baja California.

Los FAN ocurren naturalmente en áreas costeras y tropicales. En los años 30, se incrementó la atención en estos eventos por parte de la comunidad científica y la sociedad, debido al reporte de episodios de intoxicación en humanos en

diversas áreas del mundo, siendo las principales razones por las que inicio el estudio de estos sucesos (Hallegraeff, 2004; Lawrence *et al.*, 2011).

Para el manejo de estos fenómenos en México existen leyes y regulaciones sanitarias que aseguran la calidad del agua en las zonas de cultivo así como la inocuidad alimentaria de los productos como se menciona en la NOM-242-SSA1-2009 (DOF, 2011), esta provee instrucciones de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de ficotoxinas marinas. No obstante los esfuerzos que se han hecho en Baja California Sur para monitorear a las especies formadoras de FAN, aún son pocos los estudios donde se han determinado las toxinas que se acumulan en moluscos bivalvos usados para el consumo humano.

### **1.9-Justificación**

Los moluscos bivalvos están entre los principales vectores de ficotoxinas hacia el humano, siendo la saxitoxina y sus análogos las toxinas más estudiadas. En contraste, las investigaciones enfocadas en las toxinas lipofílicas son escasas. El registro de dinoflagelados productores de toxinas DSP y otras toxinas lipofílicas, sugiere que probablemente estas toxinas se están acumulando en los bivalvos de la BAPAZ y la Ensenada de La Paz (ENPAZ). Por lo anterior, se decidió realizar un monitoreo de cinco sitios donde ocurren bivalvos que son consumidos cotidianamente por la población de la ciudad de La Paz.

La Paz es el municipio que concentra casi el 40% de la población de Baja California Sur, con 251,871 habitantes hasta el 2010 (INEGI, 2015). El consumo de mariscos frescos por parte de la comunidad local y los turistas es una práctica común, varias especies de bivalvos son extraídas en la BAPAZ y ENPAZ, entre estas destacan *Atrina maura* conocida comúnmente como hacha china, la almeja chocolata café *Megapitaria squalida* y la almeja blanca *Dosinia ponderosa*.

Debido a la importancia de estos organismos en el comercio local, el monitoreo se llevó en colaboración con la comunidad de pescadores de “El Manglito” y de la asociación civil Noroeste Sustentable, A.C. (NOS), quienes llevan a cabo actividades de monitoreo del repoblamiento natural de los bancos de callo de hacha *A. maura* y otras especies de bivalvos en la ENPAZ, además estan

interesados en dar seguimiento a posibles proliferaciones de fitoplancton tóxico en los sitios donde están asentándose los juveniles de *A. maura* y la consecuente acumulación de ficotoxinas en esta y otras especies de bivalvos.

## **2.-HIPÓTESIS**

En la Bahía de La Paz se ha reportado la presencia de dinoflagelados productores de toxinas DSP. Por ende, la realización de un monitoreo anual de muestras de agua y moluscos bivalvos, permitirá la identificación y aislamiento de dinoflagelados productores de toxinas lipofílicas y la detección de estas toxinas utilizando métodos analíticos, para determinar si existe una relación entre la presencia de los dinoflagelados y la producción de toxinas DSP.

## **3.-OBJETIVO GENERAL**

Identificar dinoflagelados nocivos y tóxicos que coexisten con los bivalvos *Megapitaria squalida*, *Dosinia ponderosa* y *Atrina maura*, distribuidos en cinco sitios al sur de la Bahía de La Paz, B.C.S., verificando si los moluscos presentan acumulación de toxinas, durante un ciclo anual.

## **4.-OBJETIVOS PARTICULARES**

-Aislar, identificar y cuantificar dinoflagelados tóxicos y/o nocivos en cinco estaciones donde existen bancos de moluscos bivalvos.

-Determinar la relación entre la abundancia de dinoflagelados y los nutrientes, salinidad y temperatura.

-Cuantificar parámetros físicos y químicos y micronutrientes que influyen en la proliferación del fitoplancton.

-Detectar la presencia de toxinas en la columna de agua mediante el uso de resinas.

-Detectar la presencia de toxinas en moluscos utilizando ensayos *in vivo* y métodos analíticos.

## 5.-MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1-Trabajo en campo

La toma de muestras se realizó en cinco estaciones del sur de la BAPAZ (Tabla 2), realizando muestreos mensuales de enero de 2015 a enero de 2016 (Figura 1).

Tabla 2. Localización de las estaciones de monitoreo de dinoflagelados, toxinas disueltas en la columna de agua y en moluscos bivalvos.

Número de estación	Ubicación geográfica	Profundidad Min/Max (m)
E1.-Rancho Los Pinos	24° 12.486´ N, 110° 31.510´ W	10/12
E2.-La Mezcalera	24° 10.654´ N, 110° 23.583´ W	10/15
E3.-El Mogote	24° 09.298´ N, 110° 20.851´ W	1/6
E4.-CICIMAR	24° 08.620´ N, 110° 20.465´ W	1/6
E5.-Balandra	24° 19.510´ N, 110° 19.550´ W	10/12

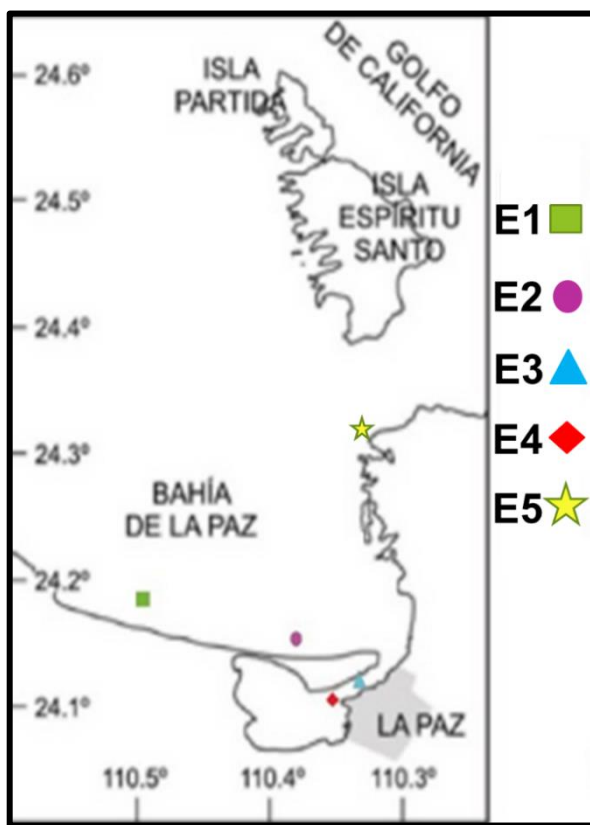


Figura 1. Ubicación geográfica de las cinco estaciones de muestreo.

## 5.2-Recolecta de los moluscos

Por medio de buceo con hookah, se recolectaron de 5 a 10 individuos de *M. squalida* esto en la E1, cuando fue posible en las estaciones E2 y E5 se recolectaron organismos de las especies *M. squalida* y *D. ponderosa* (dependiendo de la disponibilidad de los organismos), en las estaciones al interior de la ENPAZ (E3 y E4) se recolectaron al menos cinco individuos de *A. maura*. Los moluscos fueron colocados en hielo para transportarlos al laboratorio. En l

Figura 2 se muestran fotografías de la morfología de la concha de las tres especies analizadas.

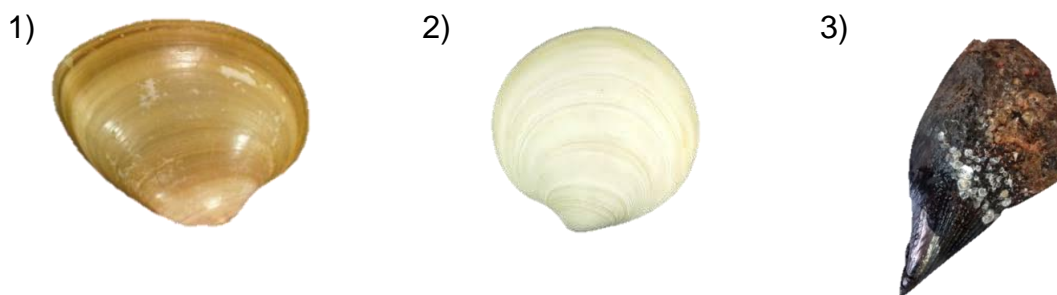


Figura 2. Especies de bivalvos analizados en el monitoreo de ficotoxinas durante el periodo 2015-2016 en el sur de la Bahía de La Paz: 1) *Megapitaria squalida*, 2) *Dosinia ponderosa* y en la Ensenada de La Paz, 3) *Atrina maura*.

## 5.3-Muestras de agua

En cada estación se midió la profundidad, con un cabo marcado cada metro, y una vez determinada la profundidad si ésta era mayor a 6 m, se tomaron muestras de agua en superficie y fondo con una botella Van-Dorn. Para cada muestra obtenida en campo se determinó; la temperatura *in situ* con un termómetro de cubeta y la salinidad con ayuda de un refractómetro (VEE GEE, modelo STX-30). Se tomaron muestras de agua en recipientes de 3 L para determinación de nutrientes, estos fueron almacenados en hielo para su transporte al laboratorio, también se tomaron muestras de agua en recipientes de 500 mL que se fijaron con lugol ácido al 1%, para llevar a cabo conteos celulares e identificación de especies de dinoflagelados.



Finalmente se tomaron muestras de redes con tamaño de poro de 10 y 20  $\mu\text{m}$  para la recolecta de fitoplancton, separando dos submuestras en frascos de cultivo de tejido de 250 mL, una fijada con lugol ácido al 1% para la identificación de especies y la segunda sin fijador, para aislar células de dinoflagelados vivos y establecer cultivos en el laboratorio.

#### **5.4-Trabajo en laboratorio**

#### **5.5-Aislamiento de especies con potencial tóxico**

Las muestras de fitoplancton vivo recolectadas con las redes de arrastre de 10 y 20  $\mu\text{m}$ , fueron tamizadas con un tamiz de 200  $\mu\text{m}$  esto para eliminar organismos zooplanctónicos y colocadas en botellas para cultivo celular de 250 mL, manteniéndolas a temperaturas entre 24 y 25 °C para su procesamiento en el laboratorio.

En el laboratorio las muestras se revisaron en un estereoscopio (Zeiss, modelo StemiSV6) y un microscopio óptico (LABOMED, modelo CXRII) para aislar células vivas de dinoflagelados y obtener cultivos monoclonales utilizando la técnica de aislamiento con capilar (Stein, 1973). Este método consiste en aislar células individuales con ayuda de una pipeta o capilar, se tomó una pequeña submuestra del frasco de 250 mL colocándola en un porta objetos y observándola al microscopio, una vez seleccionada la célula de interés, se succionó por capilaridad y se transfirió a un porta objetos excavado limpio donde se tenía una gota de medio de cultivo GSe modificado (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2016 ), cada célula se transfirió de 3 a 4 veces en diferentes gotas de medio de cultivo, con lo cual se realizó un lavado de la célula y finalmente se transfirió a placas con pocillos múltiples, primero en una placa de 96 pozos, una vez que la célula se multiplicó se transfirieron a placas de 48 y luego de 24 pozos para finalmente ser inoculadas en tubos con 50 mL con 25 mL de medio de cultivo GSe.

#### **5.6-Identificación y descripción de dinoflagelados**

La identificación y descripción de los dinoflagelados aislados en el muestreo se realizó en la Unidad de Ciencias de Agua del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en Cancún, Quintana Roo. Se analizaron 12 muestras de la

BAPAZ correspondientes a los meses de enero, febrero, junio de 2015 y enero de 2016. Las cuales fueron obtenidas con una red de arrastre de luz de malla de 10 y 20  $\mu\text{m}$  y fijadas con lugol en tubos de 50 mL. Además, se procesaron 15 muestras de los cultivos de dinoflagelados previamente aislados y que se mantienen en el cepario del CICIMAR.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio óptico (Zeiss, modelo: Axioimager A2) equipado con una cámara (AxioCam ICC1) con un módulo de epifluorescencia acoplado a una computadora. En él se realizó la toma de imágenes digitales para su fotodocumentación. Las muestras de dinoflagelados teçados se procesaron por medio de la técnica de tinción con el fluoróforo calcoflúor (Koneman & Allen, 2008). Los dinoflagelados desnudos se observaron con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) además estos también se analizaron con epifluorescencia (EPI), para ver la disposición del núcleo y la forma y número de cloroplastos en las células.

### **5.7-Cuantificación de especies de fitoplancton**

Se analizaron las muestras de agua de cada estación para identificar las especies de dinoflagelados que pudieran ser las responsables de la producción de toxinas. Las muestras se revisaron bajo un microscopio invertido marca Olympus, modelo: CK2 la identificación se realizó utilizando los criterios de Licea *et al.*, 1995; Delgado-Miranda, 2005; Esqueda-Lara & Hernández-Becerril, 2010 y Morquecho-Escamilla *et al.*, 2016.

La cuantificación del fitoplancton se realizó usando el método propuesto por Utermöhl (1958), que consiste en colocar la muestra de fitoplancton en cámaras de sedimentación, éstas se dejan reposar 24 h, para posteriormente analizarlas en el microscopio invertido. Las cámaras de sedimentación utilizadas fueron de 10, 25 y 50 mL, el volumen de las cámaras a utilizar se seleccionó dependiendo de la densidad celular encontrada en la muestra.

### **5.8-Extracción de toxinas PSP en la columna de agua**

Adicionalmente a la extracción de toxinas paralizantes en los tejidos de los moluscos, se buscó determinar la presencia de otras toxinas hidrofílicas en la

columna de agua. Las muestras de agua se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento, de ahí se tomó 1 ½ L de agua de mar para las estaciones localizadas en la parte sur de la BAPAZ (E1, E2 y E5), para las estaciones dentro de la ENPAZ se utilizó solamente 1 L, debido a que contenían mayor cantidad de material orgánico suspendido. El agua fue filtrada con una bomba de vacío eléctrica (GAST, modelo DOA-P704-AA), para concentrar las células de fitoplancton, utilizando filtros de fibra de vidrio Wathman GF/F de 47 mm, con tamaño de poro de 0.47 µm, estos fueron procesados siguiendo la metodología utilizada por Pérez-Cruz (2007) y Hernández-Sandoval (2010), la cual consiste en tomar los filtros GF/F donde se encuentra concentrado el material de la columna de agua y colocarlos individualmente en viales eppendorf con 1 mL de ácido acético 0.03 N. Posteriormente se sonicaron 3 veces por 5 min, el extracto obtenido se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm y el sobrenadante fue filtrado con acrodiscos de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro.

La detección de toxinas hidrofílicas en las muestras de la columna de agua se realizó por medio de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia (HPLC-FD) en el Laboratorio de Pigmentos del CIBNOR usando el método de Vidussi *et al.* (1996).

Para este análisis fue necesario realizar el proceso de derivatización, para lo cual se tomaron 150 µL de cada extracto y se mezcló con 37 µL de ácido clorhídrico 1.0 N. Esta mezcla se calentó por 15 min a 90 °C, para convertir las toxinas N-sulfocarbamatadas a sus toxinas carbamatadas correspondientes, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y finalmente se neutralizaron con 75 µL de acetato de sodio 1N y se almacenaron a -20 °C hasta ser analizadas.

### **5.9-Detección de toxinas disueltas en la columna de agua utilizando resinas**

En este trabajo se utilizaron resinas sintéticas DIAION HP20, las cuales son adsorbentes de tipo aromático que se fabrican en forma de perlas esféricas (250 µm), primeramente estas se sometieron a un proceso de activación el cual consiste en colocar la resina en metanol, seguido de esta se hidrató en agua MiliQ y se drenó

a través de un tamiz de 95  $\mu\text{m}$ , una vez hidratada la resina se colocó en contenedores como el que se observa en la Figura 3. Estos contenedores se dejaron sujetos a una boya en cada una de las estaciones para detectar toxinas hidrofílicas disueltas en el agua de mar durante 24 h. Transcurrido este periodo las resinas se llevaron al laboratorio de Pigmentos del CIBNOR para su análisis.



Figura 3. Contenedor de resina.  
Diseñado por: Cobos-Anaya.

#### **5.9.1-Extracción de toxinas hidrofílicas de los moluscos**

El proceso de extracción se realizó de manera individual para cada especie de molusco (*M. squalida*, *A. maura* y *D. ponderosa*). Se lavaron los moluscos con agua potable retirando la arena y cualquier otro material adherido a la parte externa de la concha, realizando a continuación la disección del tejido. El tejido obtenido se dejó escurrir, a continuación fue homogenizado en una licuadora convencional, posteriormente se pesó el tejido homogenizado y se tomaron 100 g, para llevar a cabo la extracción de toxinas hidrofílicas (Hollingworth & Wekell, 1990), utilizando la metodología de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales). Esta técnica consiste en colocar los 100 g de tejido en un vaso de precipitado y agregando 100 mL de ácido clorhídrico al 100%, esta mezcla fue colocada en agitación en una plancha de calentamiento, hasta que llegó al punto de ebullición y

se mantuvo constante por 5 min, una vez transcurrido este periodo se dejó enfriar por 15 min, seguido de esto se midió el pH el cual se ajustó a 3, la mezcla se colocó en un probeta y se aforó con agua acidulada, para finalmente colocarlos en una centrifuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5702R) para centrifugarse a 400 rpm, 7°C, por 10 min. El sobrenadante se extrajo con una jeringa de 10 mL, se filtró con acrodiscos de 0.45 µm y se almacenó en viales ámbar que fueron almacenados a 4°C hasta su análisis para los bioensayos en ratón (el cual fue únicamente usado como método exploratorio en el primer bimestre de 2015).

### **5.9.2-Extracción de toxinas lipofílicas de los moluscos**

De igual manera que el apartado anterior, los moluscos fueron lavados y desconchados, tomando 50 g del tejido homogenizado. Para ésta extracción se siguió la metodología de Yasumoto 1978, tomando el tejido y colocándolo en un matraz Erlenmeyer de 200 mL, se adicionaron 50 mL de acetona, dejándolo reposar por 24 h, trascurrido este tiempo la mezcla fue filtrada con una bomba de vacío manual (WELCH, modelo 2026), hasta recuperar la mayor cantidad del extracto líquido; seguido de esto se recuperó el tejido del molusco y se le agregaron otros 50 mL, se dejó reposar 2 h y se filtró nuevamente. Este procedimiento se repitió una vez más hasta obtener un extracto acetónico final de 150 mL, el cual se colocó en un rotaevaporador (IKA, modelo RV05), hasta que se eliminó todo el solvente y quedó únicamente el extracto sólido lipofílico, el cual fue re-suspendido con una solución de Tween 60 (solución usada como vehículo para la realización del bioensayo en ratón). Una vez re-suspendido el extracto, se filtró de igual forma a travez de acrodiscos y fue almacenado en viales ámbar a 4 °C.

### **5.9.3-Determinación de toxinas por Bioensayo en Ratón**

Una vez obtenidos los extractos líquidos (muestras de enero y febrero) se realizó un bioensayo en ratón como prueba exploratoria para detectar signos característicos de toxinas hidrofílicas o lipofílicas; este bioensayo se realizó en el laboratorio acreditado de cromatografía del CIBNOR, utilizando ratones machos albinos, de la cepa CD1, con un peso de  $20 \pm 2$  g a los que se les inyectaron los extractos. Se siguió la metodología sugerida por la AOAC (Hollingworth & Wekell,

1990), tomando 1 mL del extracto con jeringas para insulina de 1 mL. Este extracto fue inyectado vía intraperitoneal en los ratones, los cuales se colocaron, en contenedores individuales para observar su comportamiento por un periodo de 5 min, cada extracto se inyectó por triplicado. Todos los signos que mostraron los organismos se anotaron en una bitácora, para compararlos con los reportados para cada tipo de intoxicación.

Adicionalmente los extractos lipofílicos se enviaron al laboratorio del CEFAS (Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science) en Weymouth, Reino Unido para ser analizados por el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS).

#### **5.9.4-Determinación de nutrientes**

Las muestras de agua obtenidas con la botella van Dorn en cada estación se filtraron en el laboratorio con una bomba de vacío eléctrica a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 47 mm con tamaño de poro de 0.7  $\mu\text{m}$ , se realizó la determinación de nitritos ( $\text{NO}_2$ ), nitratos ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) y ortofosfatos ( $\text{PO}_4$ ) con la metodología estándar descrita por Strickland & Parsons (1972), utilizando un auto-analizador de iones de flujo continuo (Lachat Instruments, modelo Quick Chem, serie 8000). El análisis de cada uno de los nutrientes se realizó en corridas independientes.

#### **5.9.5-Análisis estadísticos**

Se aplicó estadística descriptiva en las variables analizadas. La distribución de cada variable se sometió a una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, al obtenerse que los datos no fueron normales, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se realizaron correlaciones para determinar si existía influencia efecto de los nutrientes, la temperatura y la salinidad sobre la abundancia de dinoflagelados. Los análisis se realizaron en el programa STATISTICA 10.

## **6.-RESULTADOS**

### **6.1-Aislamiento de especies con potencial tóxico**

Con las muestras de red de arrastre se logró el aislamiento de dinoflagelados de los géneros: *Alexandrium*, *Heterocapsa* y *Prorocentrum*.

### **6.2-Identificación y descripción de dinoflagelados en cultivo**

Con el trabajo de identificación realizado en el CICY se logró obtener 41 láminas con fotografías de especies, tanto de los organismos en cultivo como de las muestras obtenidas con la red de arrastre, logrando identificar al menos 38 especies, las imágenes de los organismos se encuentran en el ANEXO 2.

Además, fue posible corroborar algunas de las especies que actualmente se mantienen en el cepario de CICIMAR, así como corregir la identificación de otras en base a las características morfológicas observadas con la técnica de tinción con blanco de calcoflour y al microscopio óptico de alta resolución de la unidad de ciencias del agua del CICY.

Tabla 3. Cultivos que se mantienen en medio de cultivo Gse modificado, el cepario de dinoflagelados nocivos y tóxicos del CICIMAR. Se muestra la especie, división, clave de identificación, localidad, fecha de aislamiento y persona que realizó el aislamiento.

<b>Especie</b>	<b>Grupo</b>	<b>Clave</b>	<b>Localidad</b>	<b>Fecha</b>	<b>Aislador</b>
<i>Amphidinium carterae</i>	GYM	ACPAZ16	BAPAZ	28/04/16	I. Valencia
<i>Coolia (cf. malayensis)</i>	GON	CMPAZ16	BAPAZ	28/04/16	I. Valencia
<i>Coolia monotis</i>	GON	CMOPAZ16	BAPAZ	28/04/16	I. Valencia
<i>Gymnodinium impudicum</i>	GYM	GIBAC016-1	BACO	02/15	M. Zumaya
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GYM	GCBAPAZ16	BAPAZ	11/11/16	E. Hernández
<i>Gyrodinium sp.</i>	GYM	CICI-09	BAPAZ	28/04/16	I. Valencia
<i>Gyrodinium sp.</i>	GYM	CICI-06	BACO	25/08/16	C. Band
<i>Ostreopsis sp.</i>	GON	CICI-12	IG	15/03/16	C. Band
<i>Pentapharsodinium sp</i>	PER	CICI-03	BAPAZ	26/03/15	E. Hernández
<i>Prorocentrum rathymum</i>	PRO	PRPAZ	BAPAZ	26/07/15	I. Valencia
<i>Prorocentrum triestinum</i>	PRO	PTBACO-3	BACO	01/16	M. Zumaya
<i>Prorocentrum triestinum</i>	PRO	PTBACO-2	BACO	28/08/16	C. Band

**Abreviaciones:** GYM= Gymnodiniales, GON= Gonyaulacales, PER= Peridiniales, PRO= Prorocentrales. BACO= Bahía Concepción, IG= Isla Gaviotas y BAPAZ= Bahía de La Paz



### **6.3-Identificación de especies de fitoplancton**

El análisis de las muestras de fitoplancton se enfocó únicamente en la cuantificación e identificación de dinoflagelados.

Con las muestras de agua, obtenidas con la botella Van Dorn se identificaron a 72 especies pertenecientes a los géneros; *Alexandrium*, *Akashiwo*, *Azadinium*, *Balechina*, *Ceratium*, *Cochlodinium*, *Dinophysis*, *Goniodoma*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa*, *Phalacroma*, *Podolampas*, *Prorocentrum*, *Protoperidinium*, *Ostreopsis*, *Oxitoxum*, *Scripsiella* y *Zygabikodinium*. La lista completa de las especies se encuentra en el 11.1-Anexo 1.

### **6.4-Cuantificación de dinoflagelados**

Para la cuantificación de las especies se tomo una muestra mensual (n=1), y en las graficas se muestran las abundancias registradas en cada mes.

La E1 fue monitoreada desde el 30 de enero de 2015 hasta el 27 de julio de 2015 (Figura 4), en este sitio las especies de dinoflagelados recurrentes en el periodo analizado fueron: *Prorocentrum micans*, *Ceratium furca* y *Scripsiella* spp 1, las cuales pueden llegar a ser nocivas. De las especies tóxicas se identificó al género *Dinophysis*, aunque en bajas densidades (entre 40 a 80 cel L<sup>-1</sup>). La mínima abundancia total registrada ocurrió en julio con 120 cel L<sup>-1</sup> y la máxima fue en abril, con una abundancia total de 2,120 cel L<sup>-1</sup>.

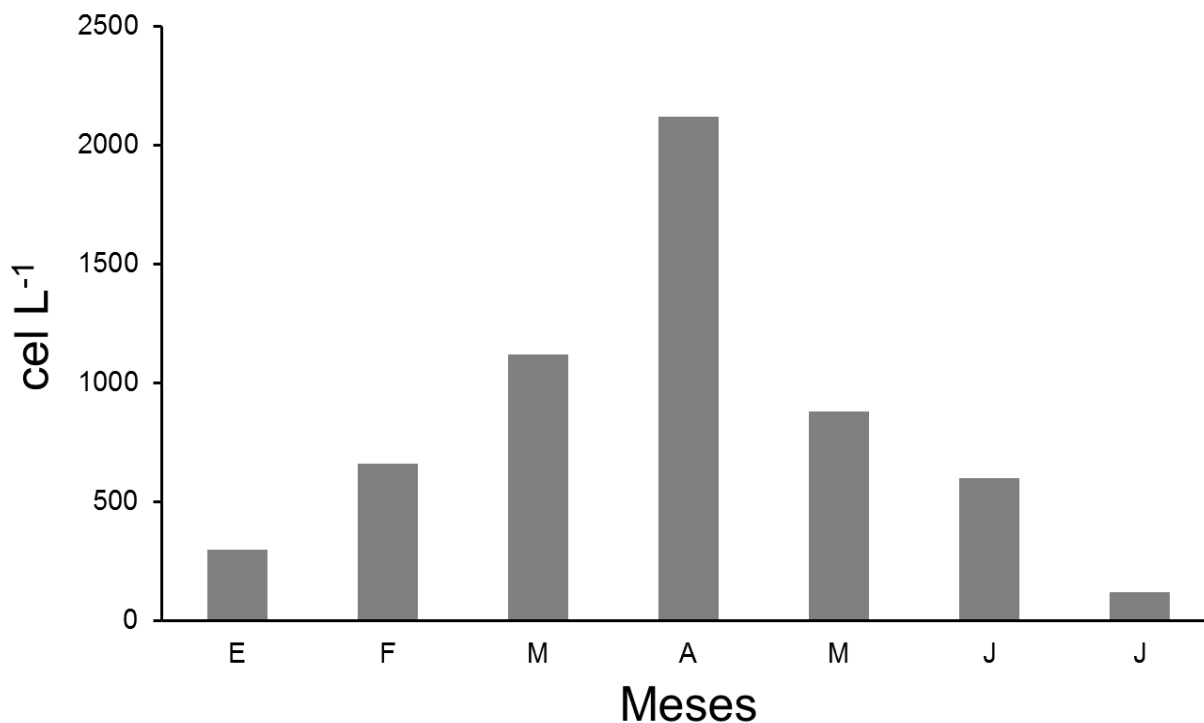


Figura 4. Abundancia total de dinoflagelados encontrados en la E1 durante el periodo enero-julio de 2015.

Para la E2 en el periodo de febrero de 2015 a enero de 2016 (Figura 5), las especies que se encontraron regularmente fueron *C. furca*, *P. micans*, *P. gracile*, *Gyrodinium spirale*, *Heterocapsa niei* y *Scropsiella* sp. 1. En cuanto a especies tóxicas encontramos a *Prorocentrum rhathymum* (con abundancia de 40 cel L<sup>-1</sup>) y a *Dinophysis caudata* (con máximos en abril de 1,100 cel L<sup>-1</sup>). En este sitio se observó que las máximas abundancias fueron en los meses con las temperaturas bajas (23 a 25 °C) con 8,300 cel L<sup>-1</sup>, 4,640 cel L<sup>-1</sup> y 5,520 cel L<sup>-1</sup> en febrero, marzo y mayo respectivamente, mientras que en los meses con menores abundancias fueron junio con 640 cel L<sup>-1</sup> y julio con 760 cel L<sup>-1</sup>, cuando las temperaturas fueron de 30 °C.

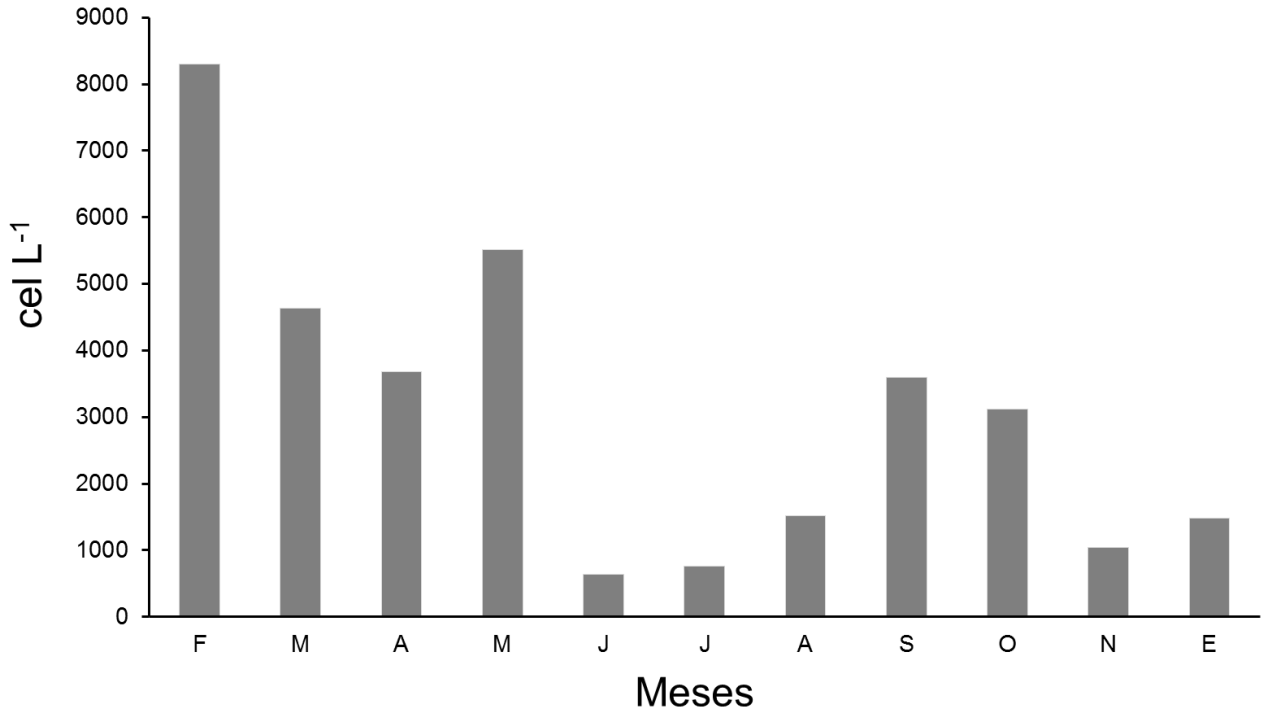


Figura 5. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E2 durante el periodo de febrero de 2015 a enero de 2016.

De enero a mayo de 2015 la abundancia total en la E3 osciló entre 1,760 y 2,720 cel L<sup>-1</sup> (Figura 6), esta estación se caracterizó por la presencia constante de *P. micans* y *P. gracile*, siendo esta última la de mayor abundancia en enero. El pico de mayor abundancia registrada se presentó en el mes de septiembre con de 6,000 cel L<sup>-1</sup>, mientras que la menor abundancia ocurrió en enero de 2016 con 200 cel L<sup>-1</sup>. De las especies tóxicas en la E3 se identificó a *Dinophysis caudata* (en febrero con máximos de 800 cel L<sup>-1</sup>) y *Prorocentrum lima* (en febrero con máximos de 400 cel L<sup>-1</sup>).

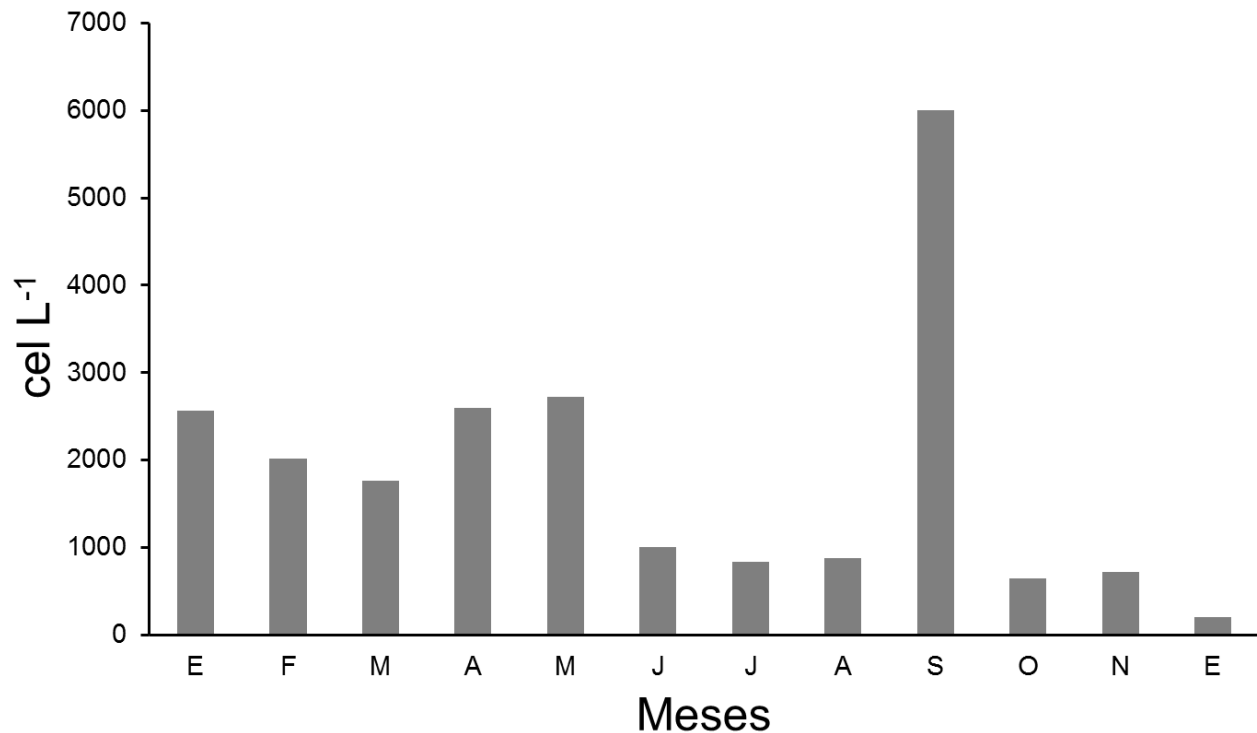


Figura 6. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E3 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016.

En la E4 *P. micans* y *P. gracile*, también fueron las más frecuentes, mientras que de las especies tóxicas se identificaron a *P. lima*, *P. rathymum* y los géneros *Dinophysis* y *Phalacroma*. En esta estación se presentó lo contrario a lo observado en las estaciones anteriores ya que las mayores abundancias se presentaron al inicio de verano: 1,920 cel L<sup>-1</sup> en mayo, 1,840 cel L<sup>-1</sup> en junio y 2,280 cel L<sup>-1</sup> en julio, mientras que las menores abundancias ocurrieron de agosto (440 cel L<sup>-1</sup>) de 2015 a enero de 2016 (40 cel L<sup>-1</sup>) (Figura 7).

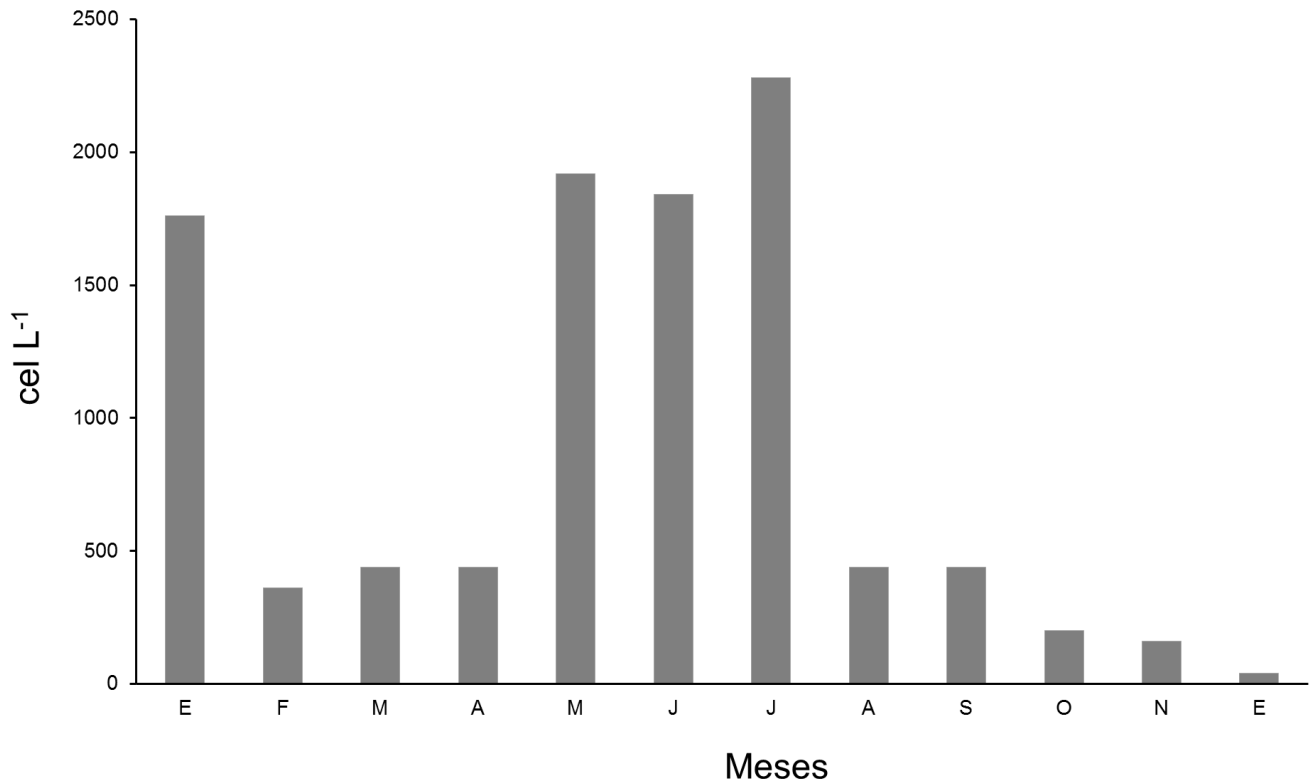


Figura 7. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E4 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016.

En la E5 las especies más comunes fueron *Scripsiella trochoidea* y *Gyrodinium spirale*, especies no tóxicas, aunque *S. trochoidea* es considerada como nociva. En esta estación la mayor abundancia total ocurrió en septiembre con 1,200 cel L<sup>-1</sup>, un mes después la abundancia se redujo a 320 cel L<sup>-1</sup>. De las especies tóxicas se logró identificar al dinoflagelado bentónico *P. rathymum*, presente en los 4 meses analizados con máximos en septiembre de 280 cel L<sup>-1</sup> (Figura 8).

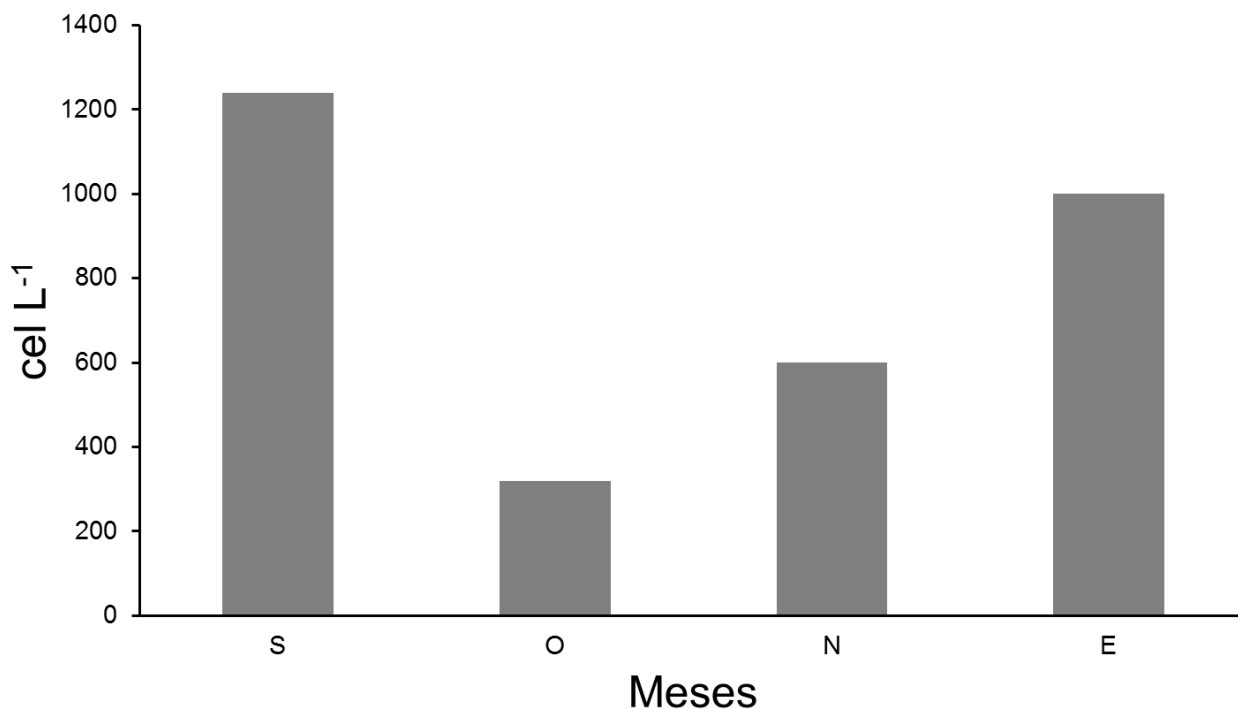


Figura 8. Abundancia total de dinoflagelados en muestras de la E5 durante el periodo septiembre de 2015 a enero de 2016.

### 6.5-Salinidad

En la E1 y la E2 la salinidad fue de 34 a 35 UPS en la mayor parte del monitoreo, solo en octubre se presentó un incremento a 37 UPS, disminuyendo a 33 en noviembre. La E3 y la E4 presentaron un comportamiento similar aunque la salinidad fue más alta en la mayoría de los casos (36 UPS) alcanzando máximos de 37 y 38 UPS esto en agosto en la E4, que es el sitio más interno de la ENPAZ. En la E5 la salinidad varió de 32.5 a 37 en un periodo de tres meses, cabe señalar que es el sitio más expuesto a la influencia de las corrientes pues esta ubicada cerca del canal de San Lorenzo (Figura 9).

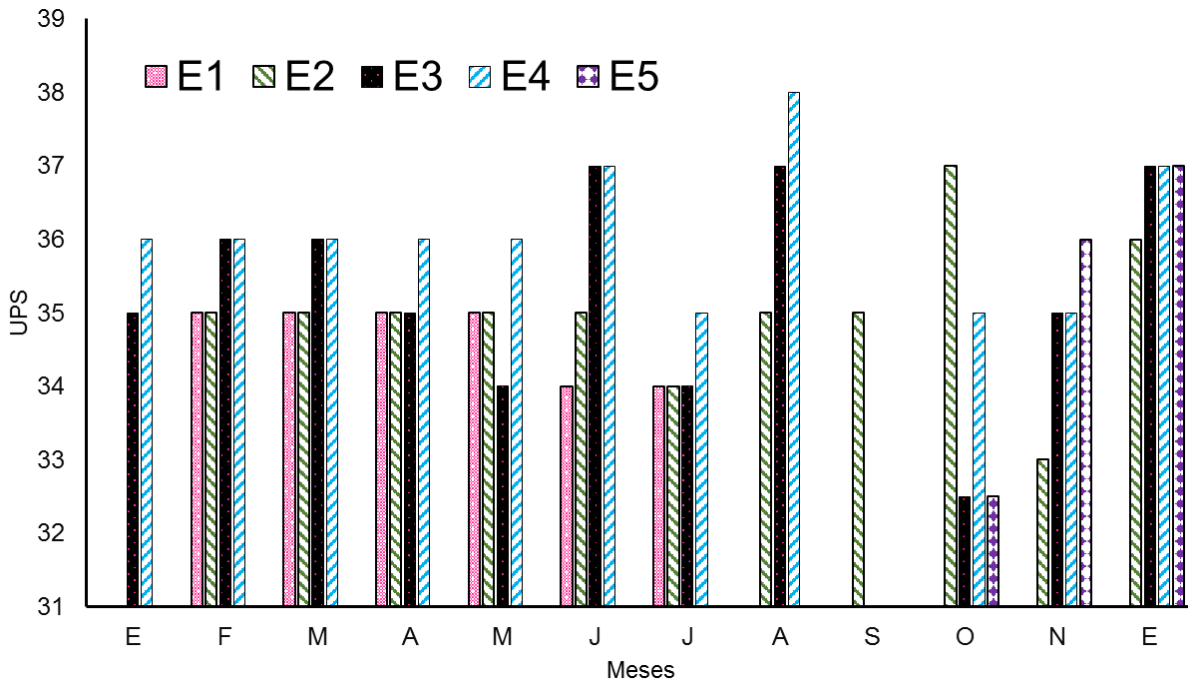


Figura 9. Variación mensual de la salinidad en las cinco estaciones del sur de la BAPAZ, durante el periodo de enero de 2015 a enero de 2016.

### 6.6-Temperatura

La temperatura registrada en la región sur de la Bahía de La Paz, mostró un marcado ciclo estacional, siendo en enero de 2015 cuando se presentó la temperatura más baja, en la E3 con 20 °C, en los meses de febrero a mayo se registraron temperaturas bajas de 23 (E1) a 26 (E3 y E4). A partir de mayo se observó un incremento térmico de 26 a 30°C, y en los meses de junio a septiembre la temperatura fue de 30 a 31°C. En octubre la temperatura empezó a disminuir a 27 y 28°C. Y finalmente, en los últimos meses de noviembre y enero nuevamente se encontraron temperaturas bajas de 21 a 24°C (Figura 10).

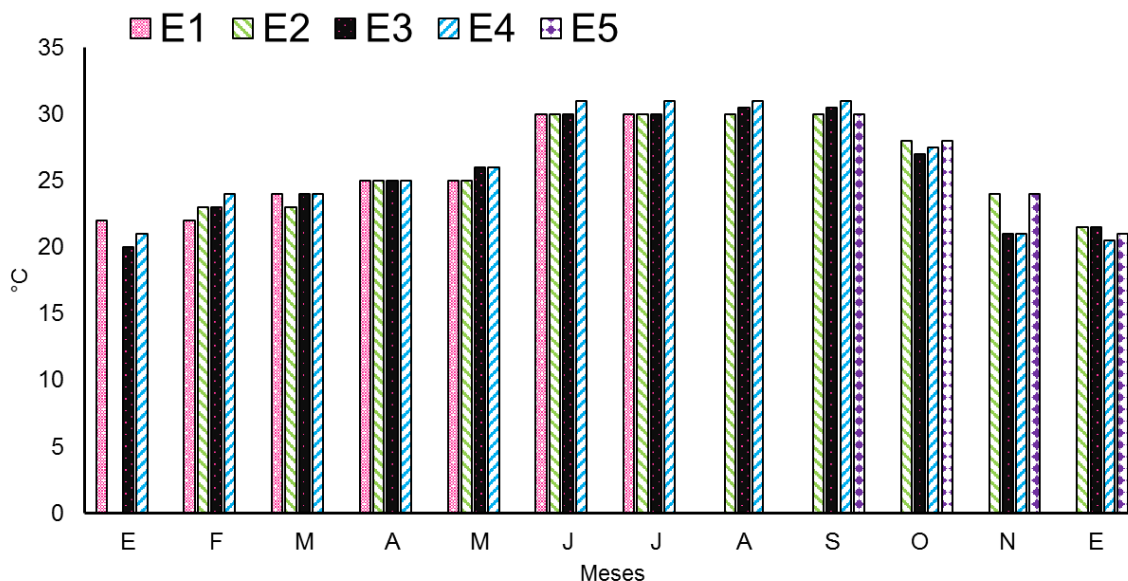


Figura 10. Variación mensual de la temperatura en las cinco estaciones del sur de la BAPAZ, durante el periodo de enero de 2015 a enero de 2016.

### 6.7-Determinación de nutrientes

Se realizó una sumatoria de los compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos), para obtener el nitrógeno total (N total), este valor se comparó con los fosfatos ( $PO_4$ ) y se determinó la proporción N:P.

En la Figura 11 se puede observar que en la E1 los valores más altos de N total fueron de  $2.02 \mu M$  y  $1.95 \mu M$  en la temporada de invierno, enero y febrero, mientras que los valores más bajos de  $PO_4$  ocurrieron en ese mismo periodo, con  $0.58 \mu M$  y  $0.81 \mu M$ , respectivamente. Fue en marzo cuando se registró el valor más bajo de N total, con una concentración de  $0.66 \mu M$ . La relación N:P también en enero y febrero fue alta, comparada con el periodo primavera-verano (marzo-junio de 2015) donde los  $PO_4$  fueron cercanos al mínimo registrado, reflejándose en la disminución de la razón N:P. En los meses siguientes se presentó un incremento gradual del N total, de  $0.90 \mu M$  a  $1.6 \mu M$ , de abril a junio de 2015. Sin embargo, a partir de marzo la concentración de  $PO_4$  fue mayor que el N total, alcanzando valores de  $2.25 \mu M$  de  $PO_4$ .



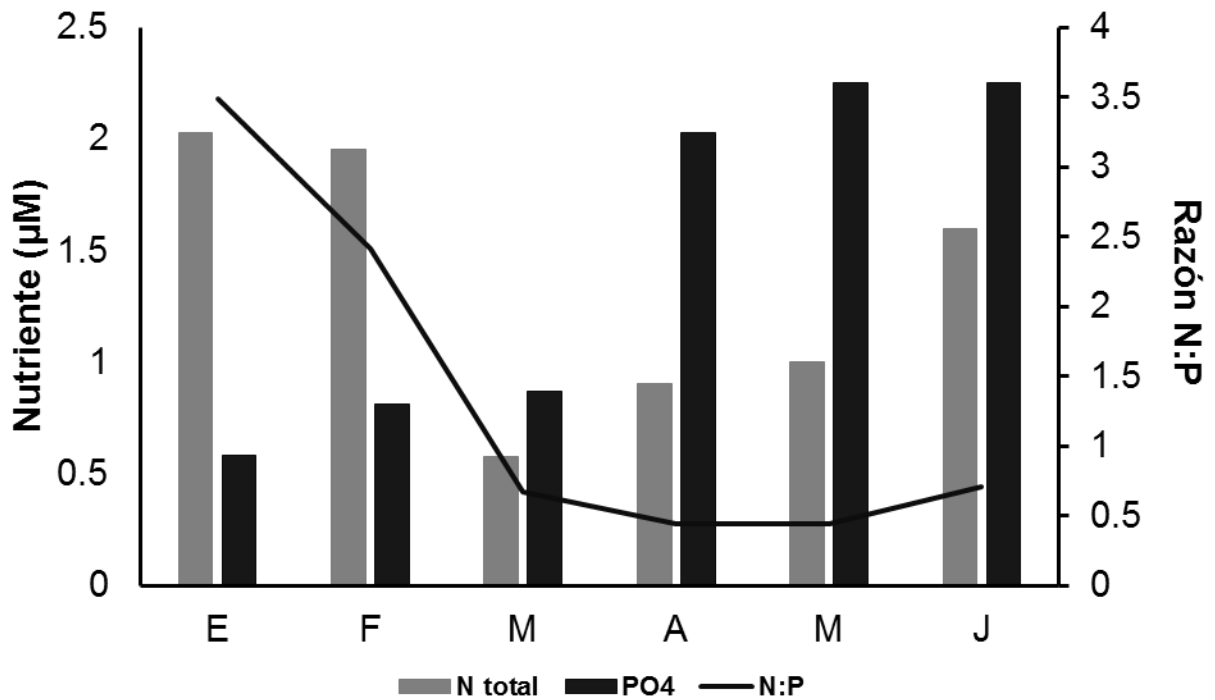


Figura 11. Concentración de N total, PO<sub>4</sub> y su relación N:P en la E1 durante el periodo de enero a junio de 2015.

En la E2 el N total se mantuvo entre 0.6 y 1.7 µM la mayor parte del monitoreo, con excepción de febrero, octubre y noviembre, cuando su concentración fue mayor a 3 µM (Figura 12). Los PO<sub>4</sub> fueron relativamente constantes durante todo el monitoreo, su valor mínimo ocurrió en mayo con 0.03 µM y el máximo en marzo con 0.88 µM. Por otra parte, la razón N:P mostró incrementos en mayo (19.3), julio (30) y octubre (13).

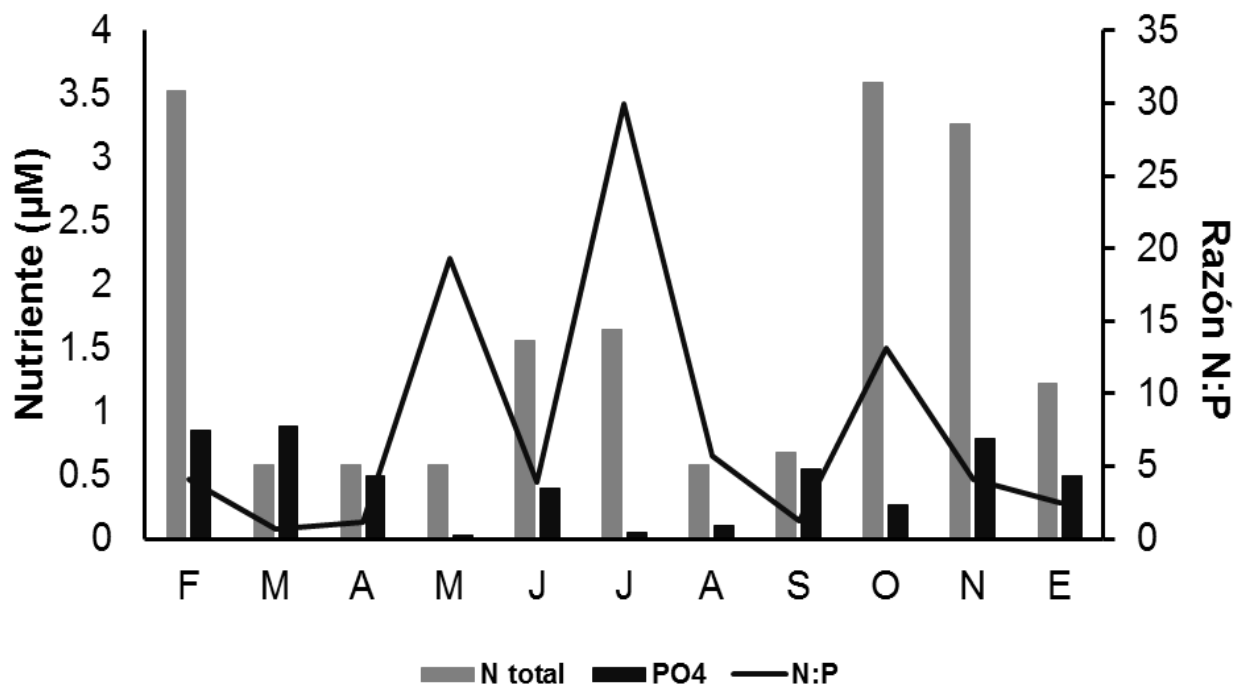


Figura 12. Concentración de N total, PO<sub>4</sub> y su relación N:P en la E2 durante el periodo febrero de 2015 a enero de 2016.

En la E3 se detectaron incrementos en el N total en febrero, junio, julio y noviembre de 2015, mientras que en el resto de los meses fue constante su concentración entre 0.5 y 1 µM (Figura 13). Una tendencia similar se observó con los PO<sub>4</sub>, los cuales durante todo el monitoreo oscilaron entre 0.23 y 0.79 µM, la proporción N:P en este sitio mostró algunos picos en febrero (4), junio (11) y noviembre (6).

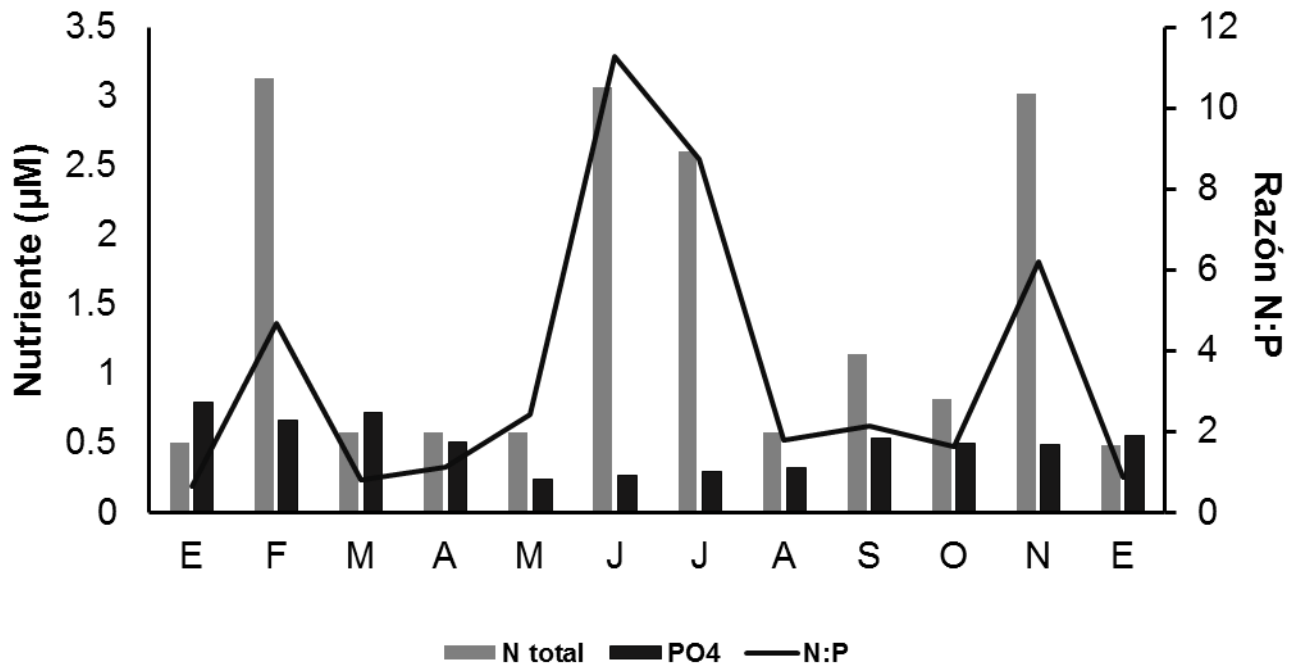


Figura 13. Concentración de N total, PO<sub>4</sub> y su relación N:P en la E3 durante el periodo enero de 2015 a enero de 2016.

En la E4 también en febrero de 2015 se registró una concentración de N total similar a la detectada en la E3, mientras que en julio, octubre y noviembre de 2015 y enero de 2016 estuvo entre 1.3 y 1.75 μM (Figura 14). Los PO<sub>4</sub> estuvieron en concentraciones de 0.12 y 0.7 μM. En esta estación la razón N:P se encontró en su óptimo en julio de 2015 (16), según la ecuación de Redfield, aunque en agosto esta proporción volvió a disminuir drásticamente a 2.3.

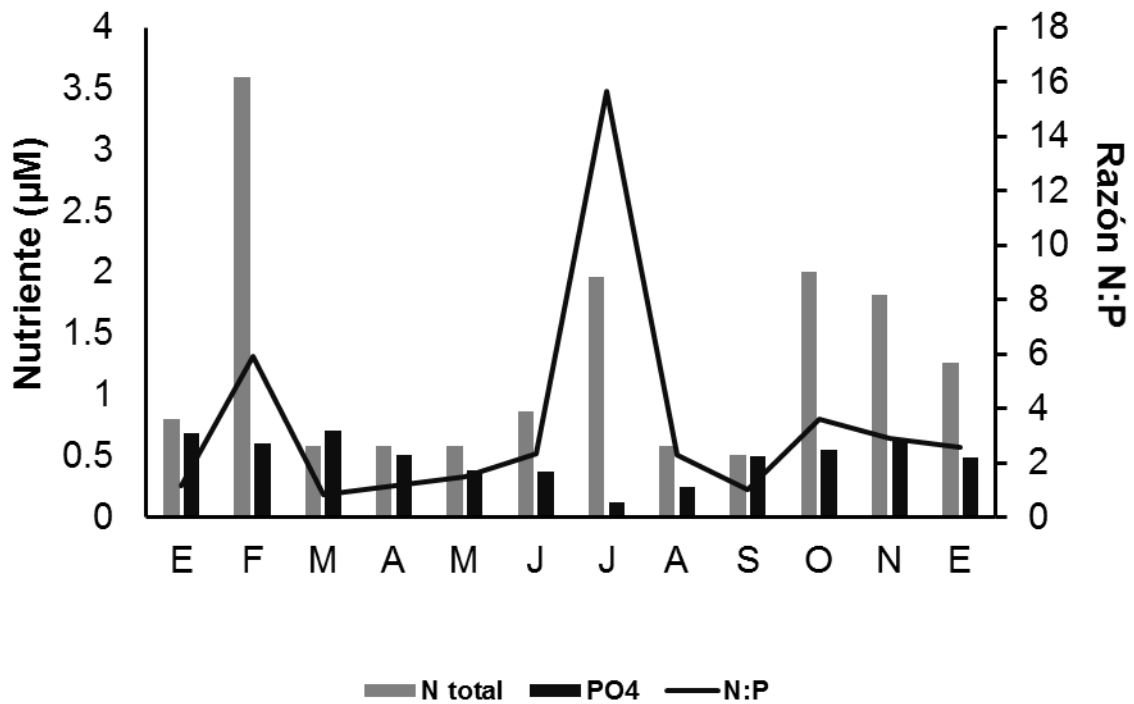


Figura 14. Concentración de N total, PO<sub>4</sub> y su relación N:P en la E4 durante el periodo enero de 2015 enero de 2016.

En la E5 durante los cuatro meses de monitoreo la concentración de N total se mantuvo constante con valores de 1.01 µM, excepto en noviembre cuando el N total aumento a 2.15 µM (Figura 15). Los PO<sub>4</sub> mostraron una tendencia similar con un máximo de 0.88 µM en el mismo mes, mientras que la razón N:P fue similar de septiembre a noviembre, aumentando en enero de 2016.

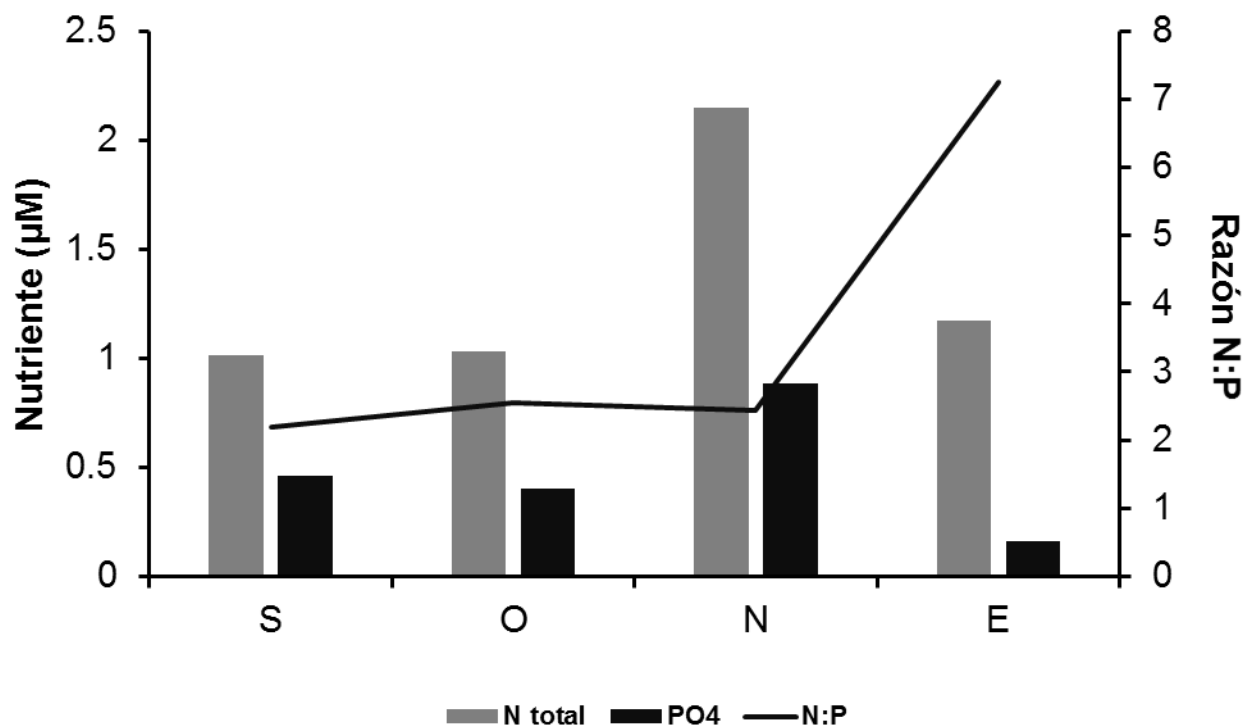


Figura 15. Concentración de N total, PO<sub>4</sub> y su relación N:P en la E5 durante el periodo septiembre de 2015 a enero de 2016.

### 6.8-Extracción de toxinas PSP en la columna de agua

En ninguna de las estaciones se detectaron toxinas hidrofílicas, esto coincidió con los resultados negativos de las resinas utilizadas para la captura pasiva de estas ficotoxinas, en los sitios donde se realizó la recolección de moluscos.

### 6.9-Detección de toxinas hidrofílicas de los moluscos

Los extractos para toxinas hidrofílicas de tejido de moluscos de los primeros tres meses de monitoreo que se analizaron por bioensayo en ratón no mostraron ningún signo de intoxicación, por ende, se asumieron como resultados negativos, este resultado fue corroborado con el método analítico de HPLC-FD.

#### 6.9.1-Detección de toxinas lipofílicas de los moluscos

Con los extractos de moluscos obtenidos con el método de Yasumoto, fue posible detectar 15 toxinas lipofílicas: ácido okadaico (AO) y su análogo DTX1, pectenotoxinas en sus formas PTX1, PTX2 y PTX11, yessotoxina y sus análogos

YTX, h-YTX, 45 OH-h-YTX así como los azaspirácidos en su forma AZA1, AZA2. Del grupo de las iminas cíclicas (IC) se detectaron: gymnodiminas GYM, pinnatoxinas PnTXG y sus análogos PnTXE, PnTXF, además del análogo SPX1 de los espirólidos.

En la E1 se analizó el tejido de los moluscos *D. ponderosa* y *M. squalida*, detectándose 6 toxinas lipofílicas: AO, DTX1, PTX2, SPX1, GYM y PnTX (Figura 16). En esta estación, las toxinas fueron detectadas a partir de marzo de 2015 aunque en muy bajas concentraciones, debido a ello este sitio sólo se monitoreo durante el primer semestre de 2015. En marzo las GYM presentaron una concentración de  $6.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido en *D. ponderosa*, mientras que en *M. squalida* la concentración fue de  $5.7 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido; en abril no se detectó la toxina, y en mayo *D. ponderosa* contenía  $10.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido, casi el doble de *M. squalida* que tuvo  $5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido. Finalmente en junio hubo un sutil incremento en el tejido de *D. ponderosa* ( $10.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido) mientras que en *M. squalida* no se detectaron GYM.

El AO total se presentó en cuatro meses, en marzo se detectó una concentración de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *D. ponderosa* y  $3.3 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *M. squalida*. En abril *D. ponderosa* presentó  $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido y *M. squalida*  $4.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido, en mayo la toxina aumentó a  $2.6 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *D. ponderosa* y a  $4.3 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *M. squalida*, en junio esta disminuyó a  $3.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *D. ponderosa* y  $3.4 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el tejido de *M. squalida* (los datos de *M. squalida* no se muestran en la gráfica).

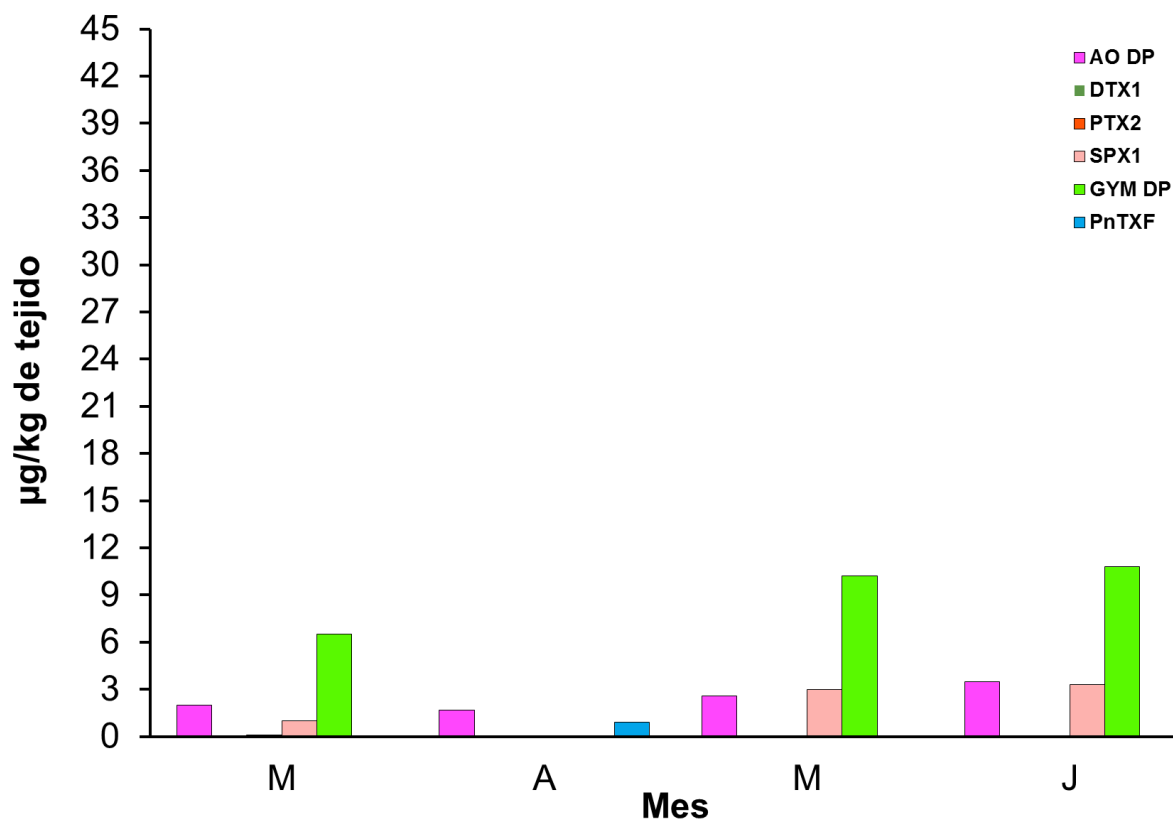


Figura 16. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en *Dosinia ponderosa* en la estación E1, durante el primer semestre de 2015.

En la E2 se detectaron 10 toxinas lipofílicas: AO, YTX, h-YTX, DTX1, AZA2, PTX2, SPX1, GYM, PnTX E y PnTX G (Figura 17), siendo la GYM la toxina de mayor concentración durante el periodo analizado. El AO y el SPX1 fueron recurrentes, aunque en concentraciones menores a las de GYM. La mínima cantidad de toxinas se detectó en los primeros meses del 2015, mientras que en el muestreo de enero de 2016 se presentó la mayor concentración de GYM con  $33.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  en los tejidos de *D. ponderosa*. En septiembre se logró obtener muestras de *D. ponderosa* y *M. squalida*, y ambas especies presentaron el mismo perfil de toxinas (AO, SPX-1, GYM, PnTX-E), aunque la GYM fue mayor en *D. ponderosa* ( $26.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido) que en *M. squalida* ( $15.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido).

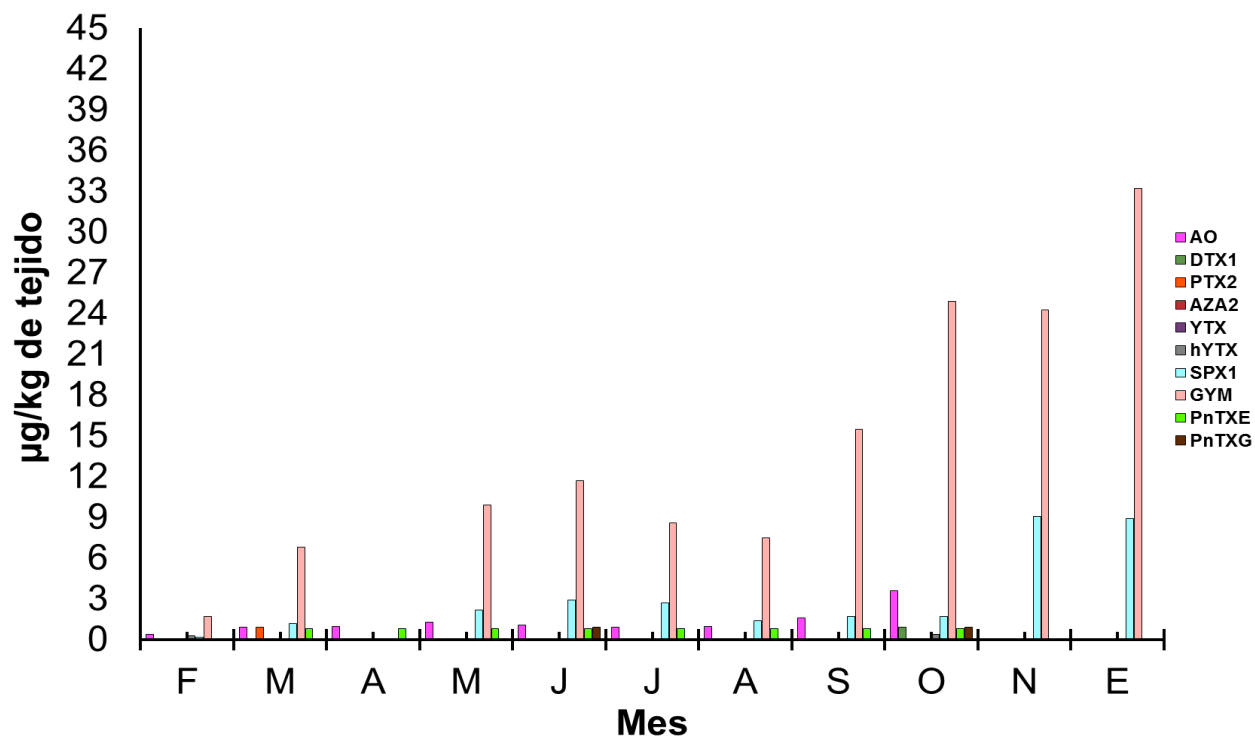


Figura 17. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en *Dosinia ponderosa* de la E2.

En la E3 se encontró el mayor número de toxinas lipofílicas en tejidos de *A. maura*, detectándose: AO, DTX1, PTX1, PTX2, PTX11, SPX1, GYM, PnTXE, PnTXF, PnTX G, YTX, h-YTX, 45 OH-h-YTX y AZA1, AZA2 (Figura 18). La presencia de las toxinas en este sitio fue constante durante todo el monitoreo, principalmente las PnTX y sus análogos, así como el AO, en otras toxinas como las GYM se observaron incrementos drásticos, como ocurrió de agosto a septiembre donde aumentaron de  $0.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  a  $12.6 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido, la PTX2 también tuvo un incremento abrupto entre febrero y marzo (de  $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$  a  $8.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). De abril a mayo también se observó esta tendencia con la h-YTX, incluso su máxima concentración se registró en junio con  $9.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido.



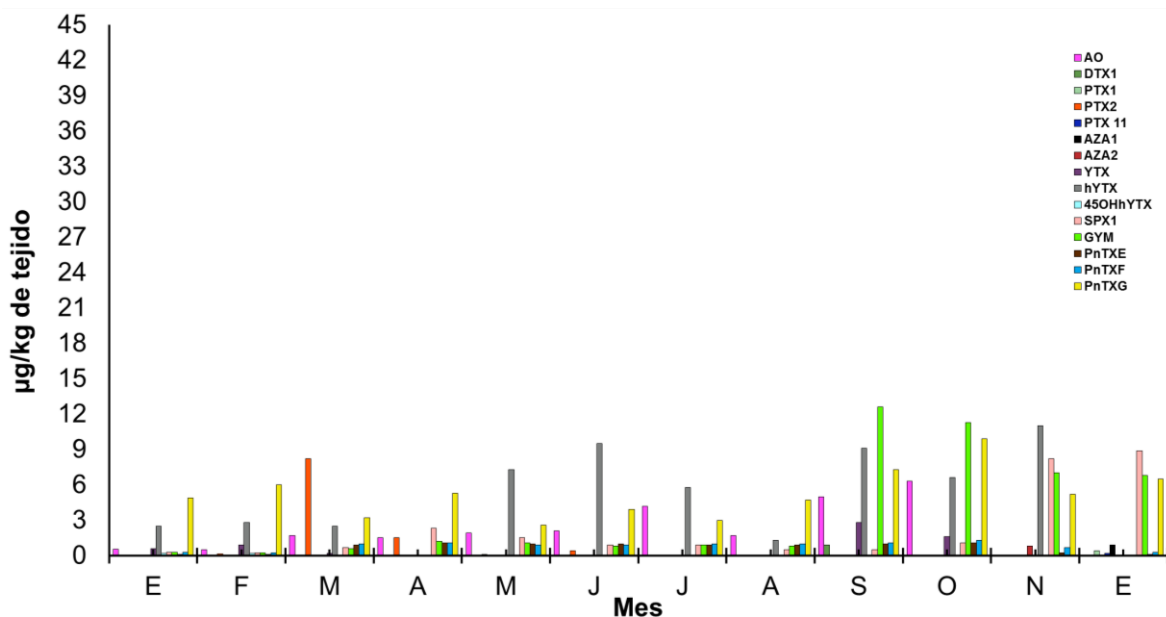


Figura 18. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en *Atrina maura* de la E3.

En la E4 fue posible detectar 12 toxinas lipofílicas: AO, DTX1, PTX2, SPX1, GYM, PnTXE, PnTXF, PnTX G, YTX, h-YTX, 45 OH-h-YTX y AZA2 (Figura 19). La h-YTX estuvo en todo el periodo analizado, siendo en junio cuando se alcanzó el máximo nivel con  $22.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido en *A. maura*, disminuyendo en julio y agosto e incrementándose nuevamente en septiembre y octubre a  $14.5$  y  $16.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. La PnTX G fue otra de las toxinas recurrentes en este sitio durante el monitoreo, registrándose valores mínimos en marzo de 2015 ( $3.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y máximos en enero de 2016 ( $10.13 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), además de esta IC se lograron detectar los análogos PnTX E y PnTX F.

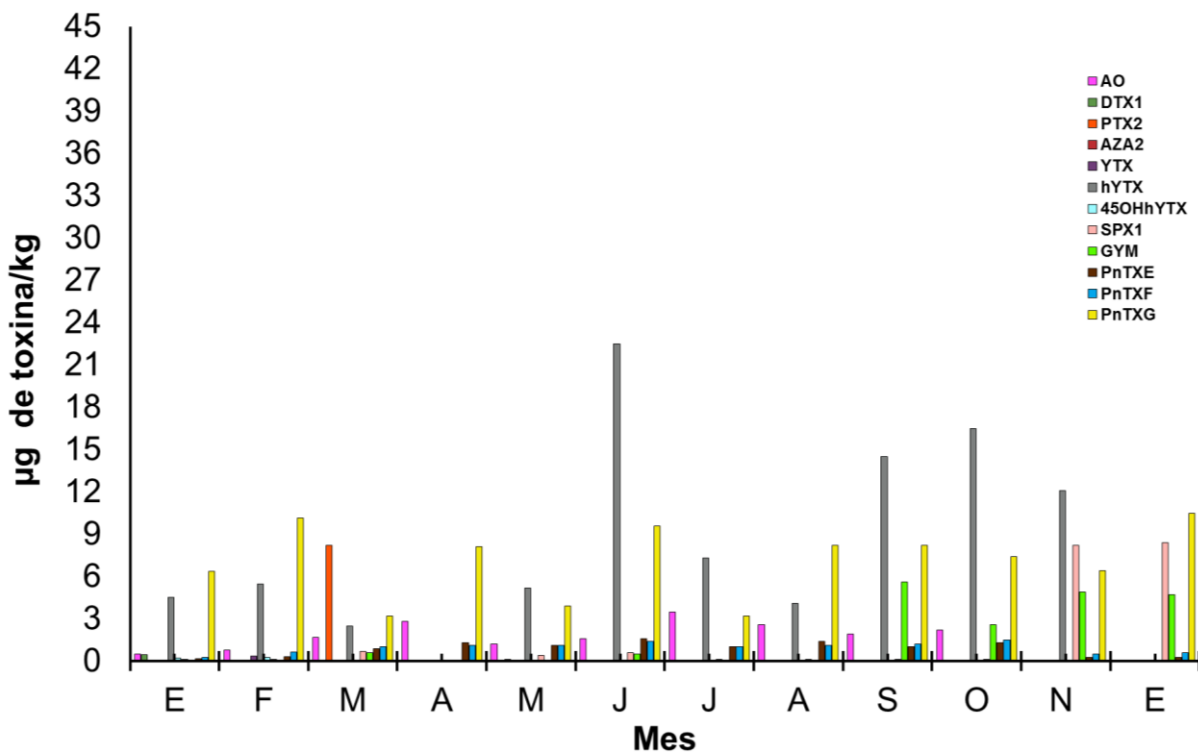


Figura 19. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en *Atrina maura* de la E4.

Durante los 4 meses que fue monitoreada la E5 se detectaron 4 toxinas lipofílicas en *D. ponderosa*: SPX1, PnTX E, PnTX G y GYM (Figura 20), siendo esta última la más abundante, con concentraciones superiores a  $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ , incluso en noviembre de 2015 fueron detectadas  $42.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

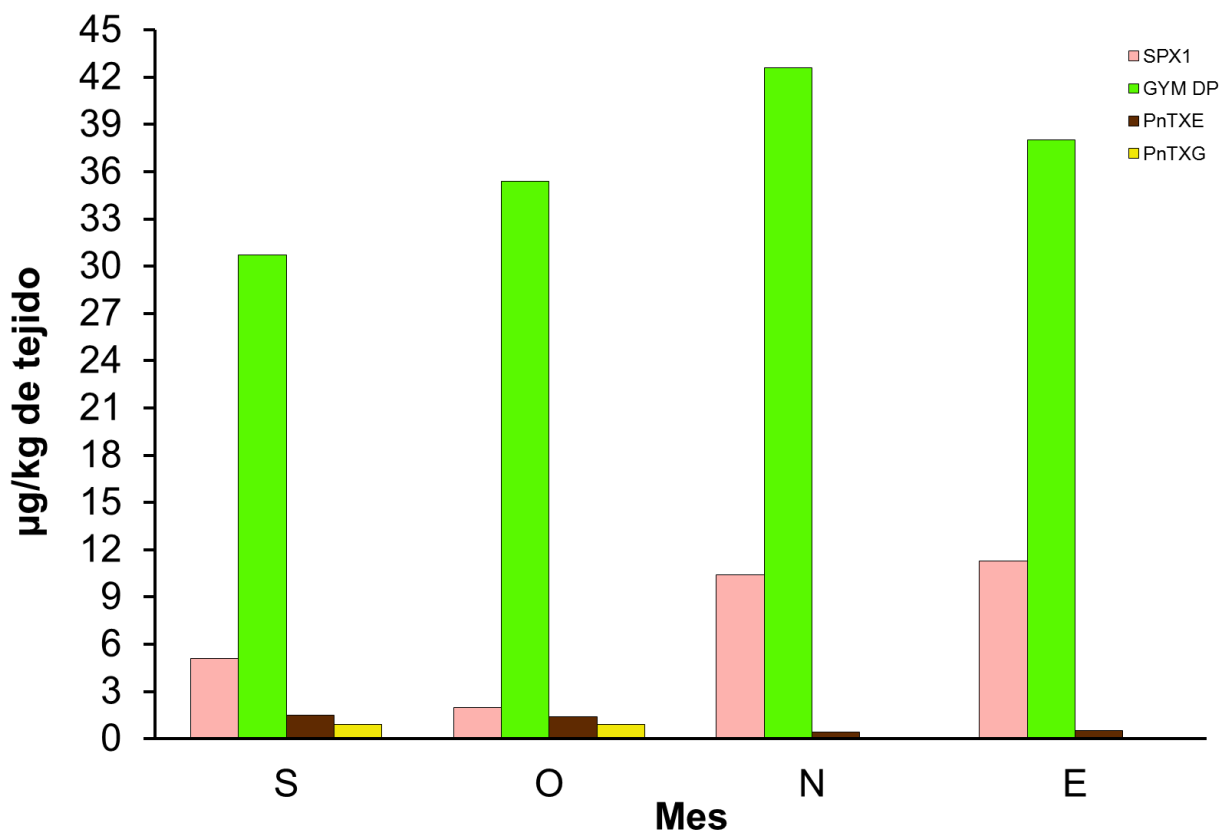


Figura 20. Perfil de toxinas lipofílicas detectadas en *Dosinia ponderosa* de la E5.

### 6.9.2-Determinación de toxinas por Bioensayo en Ratón

A continuación, se describen los resultados de los bioensayos en ratón realizados con los extractos de los meses de enero y febrero de 2015.

Tabla 4. Signos clínicos observados en los bioensayos en los meses de enero y febrero de 2015.

Bioensayos		
Estaciones	Enero de 2015	Febrero de 2015
E1	Diarrea leve y orina abundante	Diarrea mucoide
E2	NM	Letargo, signos de neurotoxicidad severa y cíclica como: problemas de locomoción, espasmos, agitación,

		manipulación del hocico y extensión de los cuartos traseros.
E3	Diarrea y orina abundante, problemas de locomoción, palidez en las extremidades y abdomen.	Letargo, signos de neurotoxicidad severa y cíclica; como problemas de locomoción, espasmos, agitación, manipulación del hocico, las patas traseras se extendían
E4	Problemas de locomoción, diarrea, palidez, ojos cerrados, bamboleo y tremor	Letargo, signos de neurotoxicidad severa y cíclica; problemas de locomoción, espasmos, agitación, manipulación del hocico

NM= No Muestreada. Todas las muestras se realizaron por triplicado, presentando los mismo signos clínicos pero en la estación 4 (E4) de enero de 2015 una de las réplicas del bioensayo murió, después de 24 h de ser inyectado. Los signos observados sugerían una intoxicación diarreica (AO y DTX) con el posible efecto de alguna otra toxina.

## 7.-DISCUSIÓN

### 7.1-Aislamiento de dinoflagelados con potencial tóxico

Durante el monitoreo se logró el aislamiento e identificación de 4 cepas de dinoflagelados: *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Prorocentrum rathymum*, *Prorocentrum micans* y *Heterocapsa niei*.

*A. pseudogonyaulax* fue reportado previamente en Bahía Concepción, B. C. S. por Góngora-González *et al.* (1999), esta especie produce GoniDOMINA A, un políter macrolido con propiedades antimicóticas (Murakami *et al.*, 1988; Mizuno *et al.*, 1998); esta propiedad ha hecho que este dinoflagelado sea considerado como una posible fuente de compuestos bioactivos con potencial farmacológico (Terra *et al.*, 2014). A la fecha no existen antecedentes que relacionen a la GoniDOMINA A con intoxicaciones en humanos, tampoco se sabe si tiene algún efecto en los moluscos bivalvos, aunque la LD<sub>50</sub> en bioensayo en ratón es de 1.2 mg kg<sup>-1</sup> a las 24

h y de 0.7 mg kg<sup>-1</sup> a las 48 h, ambas por inyección intraperitoneal (Terao *et al.*, 1989). La Goniodomina A, a mostrado actividad citotóxica en líneas celulares BE (2)-M17 de neuroblastoma humano, al incrementar el calcio intracelular y la despolarización de las células (España *et al.*, 2016). La cepa de *A. pseudogonyaulax* fue mantenida en cultivo por más de tres meses, desafortunadamente después de este periodo comenzó a decaer sin que se lograra recuperar, esto pudo deberse a que esta especie es mixotrófica, se ha documentado su capacidad para alimentarse de células de *Myrionecta rubra* y de *Heterocapsa triquetra* (Blossom *et al.*, 2012), por lo que al mantenerla como cultivo monoalgal en el laboratorio es posible que su capacidad autótrofa fue insuficiente para sus requerimientos energéticos y nutricionales.

Otra especie tóxica que fue aislada y se mantiene en cultivo en el cepario de CICIMAR es *P. rhathymum*, esta especie ha sido reportado en la BAPAZ (Gárate-Lizárraga & Martínez-López, 1997; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001; 2006; 2014; Gárate-Lizárraga & Muñetón-Gómez, 2008; Gárate-Lizárraga, 2012; Muciño-Márquez *et al.*, 2015). *P. rhathymum* es un dinoflagelado epibéntico de aguas tropicales y subtropicales, es reconocido como productor de AO (Caillaud *et al.*, 2010; An *et al.*, 2010). *P. rhathymum* suele ser confundido con *P. mexicanum*, no obstante caracteres tales como la ausencia de un poroide en *P. rhathymum*, una espina pequeña y delgada en el área periflagelar, su forma ovoide cuando es observado lateralmente, además de tener diferente habitat son algunas de las características por las cuales se reconocen como especies distintas (Cortés-Altamirano & Sierra-Beltrán, 2003; Cohen-Fernández *et al.* 2010).

Dos especies reconocidas como nocivas que lograron aislar y mantener en cultivo en laboratorio son: *P. micans* y *Heterocapsa niei*. *P. micans* es una especie que forma FAN, aunque es considerada una especie nociva se ha reportado que es capaz de producir sustancias que inhiben el crecimiento de las diatomeas. Por otra parte, *H. niei* ha sido identificada en muestras vivas colectadas en la BAPAZ y han formado florecimientos densos en estanques de cultivos (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2006).

## 7.2-Identificación y cuantificación de dinoflagelados tóxicos y/o nocivos

Diversos estudios han revelado la presencia de especies productoras de toxinas lipofílicas en el Golfo de California, incluyendo la BAPAZ, siendo los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis* los más recurrentes (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2001; Okolodkov & Gárate-Lizárraga, 2006), esto coincidió con lo observado durante el periodo del monitoreo, encontrando a *P. rathymum*, *P. lima*, *D. caudata*, *D. fortii* y *D. acuta*, especies consideradas como productoras de AO y DTX (Yasumoto *et al.*, 1980; Reguera *et al.*, 2000; Alfonso-Méndez, 2008; Caillaud *et al.*, 2010).

Entre los parámetros que se midieron para tratar de entender las variaciones en las abundancias en las 5 estaciones están la salinidad y la temperatura. La E1, E2 y E5 no mostraron variaciones significativas en ambos parámetros. La salinidad fue de  $34.9 \pm 1$ , valor inferior al promedio registrado para la zona, que es de 37 UPS (Cervantes-Duarte *et al.*, 2001), mientras que la temperatura promedio en 2015 fue de  $25.9 \pm 3^\circ\text{C}$ , Hernández-Sandoval (2010), menciona que la temperatura mínima fue en 2006 fue de  $19\text{-}24^\circ\text{C}$  en invierno y la máxima de  $29^\circ\text{C}$  en verano, pero al comparar los datos por estación se observó que las temperaturas en verano fueron superiores a estos valores promedio, ya que a partir de junio se encontraron temperaturas de  $30$  y  $31^\circ\text{C}$  y estas se mantuvieron hasta septiembre, el periodo de monitoreo coincidió con el evento de El Niño-2015, según el reporte de la INAPESCA (2015), el mayor calentamiento en la parte del Pacífico Sur, se dió en la segunda semana de mayo, pero fue hasta junio cuando esto fue notorio en el Golfo de California, logrando detectarse la entrada del agua proveniente del Pacífico central, reportando temperaturas de hasta  $33^\circ\text{C}$ .

De las estaciones monitoreadas la E1 fue de los sitios donde la abundancia de dinoflagelados fue baja, de  $2,120\text{ cel L}^{-1}$  y la E5 con un máximo de  $1,240\text{ cel L}^{-1}$ . Estas bajas abundancias podrían estar asociadas a una deficiencia en compuestos nitrogenados, en virtud de que la razón de N:P en estos fue baja, posiblemente debido a que fueron los sitios más expuestos a las corrientes de la BAPAZ, donde la renovación de los nutrientes es rápida y muy variable, principalmente debido a la influencia de el agua transicional (E1), la cual viaja de la parte norte a la parte sur

de la BAPAZ teniendo ligeros aportes en la ENPAZ y el agua del canal de San Lorenzo (E5), en donde la dirección es hacia el interior de la bahía (Álvarez-Arellano & Murillo-Jiménez, 1989).

En la E2 se registró la mayor abundancia de las cinco estaciones monitoreadas, con valores de 8,300 cel L<sup>-1</sup>, coincidiendo con valores superiores a los establecidos en la relación de Redfield para la razón N:P (hasta de 29.9 en junio de 2015). En este sitio los valores altos de compuestos nitrogenados se ven asociados a los procesos de acumulación de materia orgánica, que ocurren en la zona, además de material terrígeno transportado y depositado en la parte más somera por las corrientes marinas (Coria-Monter, 2009).

En la E3 se identificó a los dinoflagelados que podrían estar produciendo algunas de las toxinas lipofílicas que se detectaron en los bivalvos, particularmente en febrero de 2015 se cuantificó una densidad celular de 800 cel L<sup>-1</sup> de *D. caudata*, especie que produce AO, DTX y PTX (Reguera *et al.*, 2012). Aunque las densidades de *D. caudata* fueron bajas comparado con lo reportado por Sánchez-Bravo (2016), quien logró cuantificar 3,000 cel L<sup>-1</sup> de *D. fortii* en marzo de 2015 esto en Bahía de Todos Santos, B.C. Existen reportes que mencionan que un bajo número de células de *Dinophysis* son suficientes para provocar intoxicación en humanos, por ejemplo los brotes de daños gastrointestinales ocurridos en 1976 y 1977 en Japón donde se identificó a *D. fortii* como productor de toxinas (Yasumoto *et al.*, 1978, 1980). Desde entonces, las especies del género *Dinophysis* se han convertido en objetivo para la investigación y el monitoreo, ya que son microorganismos que escapan a la detección por métodos cuantitativos estándar debido a que su densidad celular típicamente baja (10-40 cel L<sup>-1</sup>) no logra ocasionar cambios en la coloración de la columna de agua (Reguera *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que son necesarias abundancias mayores a las 10, 000 cel L<sup>-1</sup> para que éste pueda ser considerado un FAN y que la producción de toxinas supere el límite permisible de 160 µg de AO kg<sup>-1</sup> (Escalera *et al.* 2012). Un punto importante a considerar sobre las especies del género *Dinophysis* es que estas pueden acumularse en capas delgadas en la columna de agua con abundancia

entre  $10^4$  y  $10^5$  cel  $L^{-1}$  (Moita *et al.*, 2006; Velo-Suárez *et al.*, 2008; Farrell *et al.*, 2012), la presencia de AO y PTX sugieren que esto pudo haber ocurrido durante este monitoreo. Para evitar un sesgo en el muestreo de especies que presentan esta distribución, se recomiendan muestrear varias profundidades para detectar los máximos de células de especies potencialmente tóxicas con una distribución vertical heterogénea (Escalera *et al.* 2012; García-Mendoza *et al.* 2014).

En esta estación (E3), durante enero, junio y noviembre, se registraron valores altos de N total, aunque sólo en enero el aumento en la densidad de células de *P. micans* ( $1,240$  cel  $L^{-1}$ ) coincidió con los valores elevados de N total. Los picos de N total, que se registraron de manera abrupta entre un periodo y otro, pueden deberse al transporte de agua que contiene material disuelto y en suspensión (Salinas-González, 2000), así como a procesos de denitrificación y redisolución de precipitados de fósforo que son resuspendidos a la columna de agua (Cervantes-Duarte & Guerrero-Godínez, 1987). Esto puede estar apoyado debido a que en el caso de la E3 y E4, son zonas con influencia del área de manglar de la cual se ha reportado su importancia ya que estos ecosistemas tienen gran aporte de detritus generado microbiológicamente, esto se ha comprobado realizando modelaciones demostrando que la biomasa bacteriana canaliza los elementos esenciales a través de la red trófica, proporcionando un aporte principalmente de nitrógeno y fósforo (Holguin *et al.*, 2001).

La E4 en cuatro de los 12 meses monitoreados se encontraron las mismas especies tóxicas identificadas en la E3, aunque en densidades menores. La razón de N:P mostró valores bajos, pero en julio se registró un valor de 15.6 el cual fue el más cercano al óptimo para el crecimiento del fitoplancton propuesto por Redfield (Redfield, 1958), este además se encontró relacionado con la mayor abundancia celular registrada en este mes ( $2,280$  cel  $L^{-1}$ ).

Otro factor que pudo ocasionar las diferencias en nutrientes y densidades celulares entre la E3 y E4 es que aunque son muy cercanas entre sí, están expuestas al agua proveniente de la parte sur de la BAPAZ, donde se tiene registrado que durante el flujo y reflujos de las corrientes de marea la intensidad de ésta va de



los 3 a los 8 cm s<sup>-1</sup> y en el caso de la corriente del Canal de San Lorenzo la intensidad puede ir de los 20 a los 25 cm s<sup>-1</sup> (Salinas-González *et al.*, 2003).

### **7.3-Detección de la presencia de toxinas en la columna de agua mediante el uso de resinas**

Durante el monitoreo de 2015-2016 se utilizó el método de detección de toxinas con resinas HP-20. Ésta técnica es conocida como muestreadores pasivos, su función es la acumulación de toxinas disueltas simulando la actividad de un bivalvo filtrador, este método ha probado ser eficaz y de bajo costo, permitiendo detectar toxinas en concentraciones por debajo de los niveles de regulación (Mackenzie *et al.*, 2004). Las resinas se han empleado en costas de Chile para detectar PTX, DTX y YTX (Pizarro *et al.*, 2006); Estados Unidos para ácido domoico (Lane *et al.*, 2010) y AO y DTX en España (Pizarro *et al.*, 2013). Por los antecedentes de FAN de *G. catenatum* en la BAPAZ, en este monitoreo se utilizaron para tratar de detectar toxinas hidrófilas, sin embargo no fueron detectadas en disolución en la columna de agua, coincidiendo con los resultados negativos del bioensayo en ratón de enero y febrero de 2015 y de HPLC-FD en los meses subsecuentes y la ausencia de células de *G. catenatum* en las muestras de fitoplancton. Solo durante el mes de noviembre y en la muestra tomada con red de arrastre se encontró a *G. catenatum*, con esta muestras nos fue posible obtener una cepa de esta especie, más no se registraron toxinas PSP ni en moluscos ni en resinas.

### **7.4-Detección de la presencia de toxinas en moluscos mediante ensayos *in vivo* y mediante dos métodos analíticos**

Durante el ciclo anual no se encontro evidencias de la presencia de algún FAN o proliferaciones celulares de alguna especie tóxica que sugirieran la acumulación de toxinas en los bivalvos. Los extractos hidrófilos y lipófilos obtenidos en el primer bimestre del monitoreo fueron analizados por bioensayos en ratón, resultando negativos para la detección de toxinas PSP en el bioensayo y por HLPC-FD. En contraste, los extractos lipófilos inyectados por vía intraperitoneal en los ratones revelaron signos que sugerían una posible intoxicación DSP pero que

por los efectos de neurotoxicidad que presentaban sugerían la acumulación de otras toxinas además del AO. El análisis de los extractos por LC-MS/MS, reveló la presencia de 15 toxinas lipofílicas, entre estas el AO, DTX, YTX, AZA y toxinas pertenecientes al grupo de las IC, las cuales se caracterizan por ocasionar la muerte rápida en los ratones, razón por la que son denominadas toxinas de acción rápida (Aune, 2008; Cembella & Krock, 2008). Las IC son compuestos que provocan signos característicos de neurotoxicidad que puede llegar a confundirse con signos de PSP (Fernández *et al.*, 2002), signos como la hiperactividad, piloerección, hiper extensión de la espalda, endurecimiento y arqueado de la cola hacia la cabeza, temblor progresivo a espasmos, parálisis y extensión de las extremidades traseras y dificultad respiratoria han sido descritos como característicos en ratones poco tiempo después de inyectarlos por vía intraperitoneal (Stivala *et al.*, 2015), coincidiendo con lo observado en los ratones de los bioensayos realizados en el laboratorio, tanto en los ratones que murieron como en los que se recuperaron 24 h después del bioensayo, por lo que se comprobó el efecto “todo o nada” que se ha reportado para las íminas cíclicas es decir, los ratones mueren al administrarles dosis letales de las toxinas pero si se les inyectan dosis subletales, aunque presentan signos de neurotoxicidad, 24 h sobreviven sin secuelas aparentes (Stivala *et al.*, 2015).

Algunos autores mencionan que estas sustancias son rápidamente absorbidas en la cavidad peritoneal, por lo cual provocan una rápida recuperación de los organismos, por ello sugieren que estos compuestos pueden ser excretados rápidamente y por ende la desintoxicación es rápida (Richard *et al.*, 2001; Munday *et al.*, 2004; Sunesen *et al.*, 2014; Stivala *et al.*, 2015).

En la E1 fue posible tomar muestras de dos especies de bivalvos, al respecto cabe destacar que aunque el monitoreo se hizo los primeros 6 meses del año, se detectaron concentraciones de toxinas que sugieren diferencias entre *D. ponderosa* y *M. squalida* y que dependiendo del tipo de toxina será la acumulación y capacidad de depuración de cada bivalvo.

En el caso de las GYM, *D. ponderosa* fue la especie que más acumuló esta IC, prácticamente el doble de lo que encontrado en el tejido de *M. squalida*, detectándose en mayo  $10.2 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido, mientras que en *M. squalida* únicamente se detectaron  $5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ , además con la toma de estas muestras es posible sugerir que al parecer existe una depuración más lenta en *D. ponderosa* puesto que en junio de 2015, la toxina se mantuvo casi en la misma concentración que el mes anterior ( $10.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), mientras que en *M. squalida* se logro detectar la depuración de las GYM de mayo a junio de este año. En contraste, en abril de 2015 el AO se acumuló más en *M. squalida*, casi el triple de lo que acumuló en *D. ponderosa* en el mismo periodo, mientras que en junio ambas especies contenían la misma concentración de AO. Dado el potencial diarreogénico del AO, es conveniente tener en cuenta este resultado en una especie de bivalvo que tradicionalmente es consumida completa, ya sea prácticamente al natural o sometida a algún grado de cocción.

La absorción de la toxina y la tasa de eliminación, se ven afectadas por factores como la temperatura y el pH de agua de mar, los cuales influyen en el crecimiento del fitoplancton y la capacidad del molusco para acumular las toxinas (Webb *et al.*, 2013). Otro punto a conciderar es el tamaño y la especie del bivalvo ya que de estos factores dependen las tasas de filtración de alimento, la cual afecta su capacidad de acumular y biotransformar toxinas (Wu *et al.*, 2015). En cuanto a las especies de dinoflagelados posibles responsables del perfil de toxinas detectado se puede mencionar a: *D. caudata* (AO, DTX y PTX) (Yasumoto *et al.*, 1980; Murakami, *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1989; Dickey *et al.*, 1990; Morton & Bomber, 1994; Holmes *et al.*, 1999; Alfonso-Méndez, 2008; Caillaud *et al.*, 2010) y un organismo el cual no fue posible identificar a nivel de especie y únicamente fue registrado como *Gymnodinium* sp. 1, el cual podría ser responsable de la producción de GYM (Seki *et al.*, 1995).

De las 10 toxinas detectadas en tejidos de *D. ponderosa* en la E2, las GYM fueron las de mayor concentración, coincidiendo con lo observado en la E1. En septiembre de 2015 se pudo analizar tejido de *D. ponderosa* y *M. squalida* donde

además de coincidir con el perfil de toxinas detectadas *D. ponderosa* casi duplicó la concentración de GYM con respecto a *M. squalida*. Además en este sitio se registró una de las concentraciones más altas de SPX1 ( $33.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). La producción de esta toxina se asocia a *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella *et al.*, 2000), durante el análisis de las muestras de fitoplancton de noviembre fue posible identificar a tal especie, aunque una baja densidad ( $120 \text{ cel L}^{-1}$ ).

Las toxinas detectadas en la E2 pueden deberse a la presencia de *D. caudata* y *P. rhathymum* (AO, DTX y PTX), *Gonyaulax spinifera* (YTX), *A. ostenfeldii* (SPX) y *Gymnodinium* sp. (GYM); mientras que del AZA y las PnTX que se sabe son producidos por *Azadinium spinosum* y *Vulcanodinium rugosum*, no fueron encontradas en las muestras de fitoplancton.

La E3 fue donde se detectó la mayor cantidad de toxinas lipofílicas en el tejido de *A. maura*, siendo las h-YTX, PnTX y sus análogos de los más recurrentes durante el monitoreo, mientras que el AO y las GYM mostraron incrementos drásticos en el verano. Como se puede observar las YTX y sus análogos, estuvieron presentes a lo largo de todo el monitoreo, sin embargo, los únicos meses donde se logró identificar al dinoflagelado que podría estar produciendo esta toxina fue en mayo ( $600 \text{ cel L}^{-1}$  de *G. spinifera*) y en junio ( $40 \text{ cel L}^{-1}$  de *G. spinifera*). Paz-Pino (2007) menciona que en algunos eventos donde se ha detectado YTX en los moluscos, no se ha logrado determinar al organismo productor, esto es debido a que después de que disminuye la abundancia del dinoflagelado, la toxina permanece durante un tiempo disuelta en el medio o a que el proceso de desintoxicación del molusco es muy lento, los principales vectores de la YTX son los pectinidos y mejillones, los cuales pueden acumular grandes cantidades de YTX. Se ha visto que incluso con bajas densidades celulares ( $1,103 \text{ cel L}^{-1}$ ) son suficientes para provocar la acumulación de cantidades importantes de toxina (Boni *et al.*, 2000).

Las YTX y sus análogos se encontraron recurrentemente en las estaciones de la ENPAZ, siendo en junio de 2015 en la E4 cuando se detectó la mayor cantidad de esta toxina en el callo de hacha *A. maura* con  $22.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Esta toxina y seis de sus análogos fueron reportados en cultivos de mejillón *Mytilus edulis* en Baja

California (García-Mendoza *et al.*, 2014), siendo el análogo más frecuente y de mayor concentración la h-YTX, con una concentración de hasta 1,080  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en junio de 2012. Como se puede observar en la BAPAZ las YTX estuvieron muy por debajo de este valor registrado al norte de la Península de Baja California, no obstante, coincidió el mes donde se detectaron los valores más altos en ambas regiones. En la Unión Europea las YTX se encuentran reguladas y el límite permisible es de 1  $\text{mg kg}^{-1}$ .

En la E4 se logró la detección de 12 toxinas lipofílicas, siendo la cantidad de PTX2 similar a lo detectado en la E3 en marzo de 2015, la PnTXG en la E4 estuvo ligeramente más concentrada y con tendencias similares a la E3, de la PnTX se encontraron análogos que dan indicios del proceso de su biotransformación en el callo de hacha *A. maura*, ya que los análogos PnTX E y PnTX F, se relacionaron inversamente en la mayoría del tiempo (aunque estadísticamente esta relación no fue significativa), al aumentar la concentración de las PnTX E, disminuyó la concentración de las PnTX F. Uno de los motivos a los que se puede deber esto es que se ha propuesto que las PnTx F y G son los precursores de todas las otras PnTX, así como de las pteriatoxinas las cuales son estructuralmente similares, esto basado en las observaciones realizadas en cultivos, ya que en distintas cepas de *V. rugosum* se han encontrado que estos son los análogos que producen en mayor cantidad. Algo que hay que tener en cuenta de las PnTX es que durante el bioensayo en ratón, su alta toxicidad se mantiene al ser ingerida vía oral a diferencia de las GYM y los SPX cuya toxicidad es 10 a 1000 veces menos potentes por vía oral en comparación con la inyección intraperitoneal (Munday *et al.*, 2004; 2012; Paz-Pino, 2007).

Otra de las toxinas frecuentes en ambas estaciones fue el AO siendo estos sitios donde los bioensayos en ratón dieron positivos (enero y febrero), pero fue en la E4 donde uno de los bioensayos causó la muerte del organismo a las 24 h. Al analizar los extractos del tejido de los moluscos por medio HPLC-MS/MS, la concentración de AO fue muy baja de 0.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en ambos meses. Un resultado como este podría considerarse un falso positivo para AO, tal como ha sido reportado

por otros autores que asocian la ocurrencia de falsos positivos para AO cuando en el extracto del molusco están presentes otras toxinas lipofílicas y el AO esta incluso en una concentración menor a la dosis letal (Campos-Saldivar, 2014).

Es importante considerar las implicaciones económicas que conlleva, por lo cual se puede sugerir un análisis puntual de la acumulación de toxinas en el músculo abductor de *A. maura*, ya que del callo de hacha sólo suele comercializarse y consumirse este tejido (callo), mientras que la almeja blanca y la almeja chocolate se consume prácticamente todo el organismo. Es posible que el callo concentre una cantidad aún menor de toxinas, ya que se ha documentado que los moluscos acumulan toxinas principalmente en la glándula digestiva, el manto, la gónada y el tejido de las branquias, observándose además una variación estacional de los niveles de toxinas en los diferentes tejidos (Shumway *et al.*, 1988; Matsushima *et al.* 2015), con estudios de este tipo puede ser posible determinar si los organismos de esta zona son aptos para el consumo humano.

Finalmente la E5 fue la estación con menor diversidad de toxinas comparado con las otras estaciones pero también fue donde las GYM alcanzaron la mayor concentración, siendo casi el doble de lo detectado en la E2, también en noviembre de 2015, anteriormente se han descrito los signos que provocan estas IC en los ratones las cuales al ser inyectadas intraperitonealmente en dosis letales a los organismos les provoca hiperactividad, después de unos minutos los movimientos se vuelven lentos y empiezan a dar pasos rodantes, dejando los cuartos traseros paralizados y extendidos (Munday *et al.*, 2004). Estos signos también concuerdan con los observados en los bioensayos (primer bimestre en la E3 y E4). En la E5 en noviembre de 2015 se detectó el pico máximo de GYM con  $42.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ; aunque no se realizó bioensayo con esta muestra, se puede sugerir que de haberlo realizado, posiblemente se hubieran observado los mismos signos detectados en los bioensayos del primer bimestre. Fue en noviembre cuando se registró una temperatura de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  y una salinidad de 36 UPS, al comparar los resultados con los obtenidos por García-Mendoza *et al.* (2014), la mayor concentración de GYM que detectaron fue de  $3.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , esta se encontró en muestras colectadas en el mes

de octubre de 2012, en Bahía de Todos Santos, B.C.; Al igual que en este trabajo no lograron identificar a la especie responsable de la producción de las GYM. Las GYM han sido aisladas de *Karenia selliformis* (Miles *et al.*, 2003) por ende, se considera a esta especie como una de las principales responsables de la producción de este tipo de toxinas.

Las dos estaciones de la ENPAZ (E3 y E4) tuvieron un mayor número de toxinas por especie de bivalvo que las de la BAPAZ (E1, E2 y E5), esto puede estar estrechamente relacionado con la dinámica oceanográfica en ambas zonas, ya que la circulación en la ensenada y las corrientes a las que está expuesta son de menor intensidad que las de la bahía (Obeso-Nieblas, 2003; Cervantes-Duarte *et al.*, 2001), esto podría estar favoreciendo la acumulación de mayores densidades celulares de dinoflagelados y por ende de las toxinas que estos producen, aumentando la diversidad de toxinas que se acumulan en los tejidos de los bivalvos.

Son pocos los estudios donde se ha analizado el perfil de toxinas lipofílicas acumuladas en tejidos de moluscos bivalvos, uno de los más recientes es el de Wu *et al.* (2015) quienes además de AO encontraron AZA1, PTX2, GYM y SPX1 en siete especies de bivalvos; esta combinación de toxinas fue moderada comparado con las 15 toxinas detectadas en los moluscos de México del presente trabajo. En las muestras de China *Mytilus edulis* mostró la mayor concentración de AO con 37.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mientras que la concentración más alta de esta toxina en el monitoreo en la BAPAZ no superó los 6.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en *A. maura* de la E3. En contraste, en *Crassostrea gigas* de China la GYM tuvo una concentración de 14.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , esta fue menor a lo detectado en los bivalvos de México (en este estudio, hasta 42.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en *D. ponderosa* de la E5).

Por otra parte el efecto combinado de las ficotoxinas lipofílicas es un tema que comenzó a estudiarse recientemente, al respecto se puede mencionar el análisis de la combinación de AO, DTX2 y YTX y su efecto sobre líneas celulares de neuroblastoma, donde se observó que la toxicidad del AO puede potenciarse, disminuyendo la viabilidad y proliferación celular, dependiendo de la concentración de toxina y el tiempo de incubación (Rodríguez *et al.*, 2015). También se ha

estudiado la combinación de AZA1/AO y YTX/AO y su efecto sobre células Caco-2 y HIEC, donde se observó un efecto antagónico, mientras que la combinación AZA1/YTX tuvo un efecto sinérgico (Ferron *et al.*, 2016). Los efectos combinados de la mayoría de las toxinas encontradas en la BAPAZ requieren ser estudiados a mayor detalle puesto que de manera individual fueron detectadas en concentraciones bajas.

Aunque las concentraciones de toxinas en ningún caso superaron el límite permisible (tomando como referencia lo establecido por la Unión Europea), estas se mantuvieron presentes en las 5 estaciones durante la mayor parte del monitoreo. Si bien no se han reportado efectos adversos en humanos, debido a los efectos negativos observados en los ratones, es necesario hacer énfasis en la necesidad de profundizar en el estudio de estas toxinas en México. Además de estudiar a las toxinas lipofílicas como un problema de salud pública, es conveniente visualizar a los dinoflagelados que los producen como posibles fuentes de compuestos con potencial biotecnológico, algo que en países de Europa está siendo abordado recientemente en la búsqueda de fármacos para su aplicación en padecimientos como Alzheimer y diversos tipos de cáncer (Malaguti *et al.*, 2002; Alfonso & Alfonso, 2008; Botana-López *et al.*, 2012; Andrade-Moreno & Sierra, 2014; Botana *et al.*, 2014; Shahsavari & Balle, 2015; Alfonso & Botana, 2016).

## **8.-CONCLUSIONES**

Se logró la identificación de especies productoras de toxinas DSP de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis*, aunque no fue posible establecer una correlación directa entre las densidades celulares de estos dinoflagelados en las muestras ambientales y las concentraciones de AO y DTX detectadas en los tejidos de los bivalvos.

Durante el monitoreo se logró el aislamiento de cuatro cepas de dinoflagelados: *Alexandrium pseudogonyaulax*, *Prorocentrum rhathymum*, *P. micans* y *Heterocapsa niei*. Adicionalmente, se apoyó en el aislamiento e identificación de cepas de *Coolia monotis*, *C. malayensis*, *G. catenatum*, *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera*, especies que podrán utilizarse



para estudios de laboratorio enfocados a las interacciones entre especies de dinoflagelados así como sus efectos en moluscos bivalvos.

Se identificaron 72 especies pertenecientes a los géneros; *Alexandrium*, *Akashiwo*, *Azadinium*, *Balechina*, *Ceratium*, *Cochlodinium*, *Dinophysis*, *Goniodoma*, *Gonyaulax*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium*, *Heterocapsa*, *Phalacroma*, *Podolampas*, *Prorocentrum*, *Protoberidinium*, *Ostreopsis*, *Oxitoxum*, *Scrippsiella* y *Zygabikodinium*, siendo los géneros *Ceratium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum* y *Protoberidinium* los que se presentaron de forma recurrente.

Los bioensayos en ratón con extractos de toxinas lipofílicas permitieron registrar signos de neurotoxicidad que pueden deberse a un efecto sinérgico de las toxinas acumuladas en los bivalvos.

El método de LC-MSMS permitió la detección de 15 toxinas lipofílicas en la Ensenada de La Paz (E3) es decir la que registró la mayor diversidad de toxinas por especie de bivalvo, mientras que en la Bahía de La Paz (E5) la concentración de toxinas por especie fue mayor.

Es importante resaltar que este es el primer reporte sobre la presencia de toxinas lipofílicas yessotoxinas (YTX), azaspirácidos (AZA), pententoxinas (PTX) e iminas cíclicas (IC) en bivalvos silvestres de la Bahía de La Paz, que son usados para consumo humano.

## **9.-RECOMENDACIONES**

En cuanto a la metodología que se utilizó para obtener fitoplancton vivo, sería recomendable que las muestras se obtengan de algún sustrato en el bentos (tunicados, macroalgas y pasto) ya que se observó que la mayor cantidad de dinoflagelados productores de toxinas lipofílicas se encontraron asociados al bentos (*Prorocentrum*, *Coolia*, *Amphidinium*).

Realizar el monitoreo de las estaciones con mayor frecuencia, posiblemente cada 15 días, en este periodo podría explicarse la dinámica del sistema así como establecer relaciones significativas entre las abundancia de dinoflagelados y variables ambientales.

Debido a la presencia recurrente de toxinas lipofílicas, se recomienda continuar con el monitoreo de las estaciones para detectar si en algún momento estas toxinas alcanzaran niveles altos, para lo cual el uso de resina pudiera ser la opción más factible.

Se sugiere realizar análisis de LC-MS/MS a partir de homogenizados exclusivamente del músculo abductor, a fin de descartar la presencia de ficotoxinas en el callo de hacha *A. maura*.

Aparentemente la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) tuvo mayor capacidad de retención del AO que la almeja blanca (*Dosinia ponderosa*), dado que ambas especies se consumen practicamente completas y la mayoría de las toxinas detectadas se desconoce su efecto tanto en los moluscos como en el humano, se recomienda realizar estudios para determinar el tiempo de eliminación, así como posibles procesos de biotransformación de las toxinas.

La realización de bioensayos en modelos animales e *in vitro* con estas toxinas, brindaría información novedosa acerca de su efecto crónico, en el caso de los moluscos para comprender los procesos de acumulación, biotransformación y depuración que están ocurriendo en las diferentes especies que son aprovechadas para consumo humano.

## **10.-BIBLIOGRAFÍA**

Alfonso, A. & C. Alfonso. 2008. Pharmacology and mechanism of action: Biological detection. 315-327. In: Botana, L.M. (Ed.) *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. United States of America.

Alfonso, A., M.R. Vieytes & L.M. Botana. 2016. Yessotoxin, a promising therapeutic tool. *Marine Drugs*, 14 (30): 14.

Alfonso-Méndez, M.C. 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España, 141p.

Álvarez-Arellano, A.D & J.M. Murillo-Jiménez. 1989. Cuerpos de agua inferidos a partir del registro micropaleontológico (Radiolaria), en sedimentos superficiales del fondo marino de la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento de Geología Marina. *Anuales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 16 (1): 135-146.

An, T., J. Winshell, G. Scorzetti, J.W. Fell & K.S. Rein. 2010. Identification of okadaic acid production in the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Florida Bay. *Toxicon*, 55: 1-7.

Andrade-Moreno, A & L.A. Sierra. 2014. Caracterización de la toxicidad por ácido okadaico en un modelo celular de hiperfosforilación de Tau. Facultad de farmacia, Departamento de Farmacología. Universidad de Complutense de Madrid. *Serie de congresos alumnos*, 6(4): 26-31.

Ardilla de la Rosa Carrillo, L.A. 2001. Estudios de los mecanismos de acción de ficotoxinas marinas. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España. 174 p.

Aune, T. 2008. Risk assessment of marine toxins. In: Botana, L.M. (Ed.) *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, 3-20. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Ratón.

Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, D.J. López-Cortés, E.J. Núñez-Vázquez & F.E. Hernández-Sandoval. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A review. *Marine Drugs*, 8(1): 1935-1961.

Blossom, H.E., N. Daugbjerg & P.J. Hansen. 2012. Toxic mucus traps: A novel mechanism that mediates prey uptake in the mixotrophic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax*. *Harmful Algae*, 17: 40-53.

Boni, L., A. Ceredi, F. Guerrini, A. Milandri, R. Pistocchi, R. Poletti & M. Pompei. 2000. Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridinales, dinophyta) in the North-Western Adriatic Sea (Italy). In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I. Bolch, C.J.

and Lewis, R.J. (Ed.), *Harmful Algal Blooms*, 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2001.

Botana, L.M., A. Alfonso, C. Vale, N. Vilariño, R. Rubiolo, E. Alonso & E. Cagide. 2014. The mechanistic complexities of phycotoxins: Toxicology of azaspiracids and yessotoxins. 8: 1-26. In: Fishbein, J.C. & J. Heilman (Eds.). *Advances in Molecular Toxicology*, Elsevier: Philadelphia, USA.

Botana-López, L.M., A. López & C. Vale-González. 2012. Use of gymodimine, analogues and derivatives for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases associated with Tau and  $\beta$ -amyloid. *Patent Application Publication*, 13.

Bustillos-Guzmán, J. J., Leyva-Valencia, I., Hernández-Sandoval, F. E., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D. J. & E. J. Núñez-Vázquez. 2016. Ficotoxinas en aguas del Golfo de California: Una revisión. 38-55. In: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortíz, A. & Núñez-Vázquez, E. J. (Eds.) *Florecimientos Algales nocivos en México*. CICESE.

Caillaud A., P. de la Iglesia, H.T. Darius, S. Pauillac, K. Aligizaki, S. Fraga, M. Chinain & J. Diogène. 2010. Update on methodologies available for ciguatera toxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Marine Drugs*, 8(6): 1838-1907.

Campos-Zaldívar, M. 2014. Toxinas del veneno diarreico de mariscos favorecen un ambiente tumorigénico en células gástricas epiteliales. Tesis de doctorado. Universidad de Chile. 68 p.

Cembella, A. & B. Krock. 2008. Cyclic Imine Toxins: Chemistry, biogeography, biosynthesis and pharmacology. 561-580. In: Botana, L.M. (Ed.) *Seafood and freshwater toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*. Boca Ratón.

Cembella, A., Lewis, N. & M. Quilliam. 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*, 39: 67–74.

Cervantes-Duarte, R & R. Guerrero-Godínez. 1987. Variación espacio-temporal de nutrientes de la Ensenada de La Paz, B.C.S., México. *Anuales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, B. C. S., México. 25 p.

Cervantes-Duarte, R., F. Aguirre-Bahena, A. Reyes-Salinas & J.E. Valdéz-Holguín. 2001. Caracterización hidrológica de una laguna costera de Baja California Sur, México. *CICIMAR Océánides*, 16: 93-105.

CIECC (Centro de Investigación y Estudio en Cambio Climático). 2017. Disponible en: [http://www.cambioclimaticoytecnologia.org/index.php?option=com\\_glossary&letter=F&id=263](http://www.cambioclimaticoytecnologia.org/index.php?option=com_glossary&letter=F&id=263)

Cohen-Fernández, E.J., F.F. Pedroche, M.R. Palacios, S.A. Hernández & E.M. Castillo. 2010. Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the Pacific coast of Mexico base on the parsimony analysis of fragment of LSU rDNA and SSU rDNA. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2: 29-37.

Coria-Monter, E. 2009. Efecto de algunos procesos hidrodinámicos sobre la distribución de la clorofila *a* en la Bahía de La Paz, B.C.S, México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de México, México, D.F., 75 p.

Cortés-Altamirano, R. & A.P. Sierra-Beltrán. 2003. Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rathymum* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 39: 221-225.

Cortés-Altamirano, R. 1998. Distribución y efecto de las mareas rojas en México. In: Las Mareas rojas. (Ed.). AGT, S.A. México. D.F. 161 p.

Curtis, H., N.S. Barnes, A. Schnek & G. Flores. 2007. Biología. 7ª edición. Panamericana. 1160 p.

Delgado-Miranda, G. 2005. Dinoflagelados bentónicos tóxicos asociados a la ciguatera: abundancia, toxicidad y relación con los factores ambientales en un área

de litoral noroccidental de Cuba. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Baja California Sur, México, 88 p.

Dickey, R.W., S.C. Bobzin, D.J. Faulkner, F.A. Bencsath & D. Andrzejewski. 1990. Identification of okadaic acid from a Caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*. *Toxicon*, 28 (4): 371-377.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2011. Productos y servicios: Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011)

Draisci, R., L. Lucentini & A. Mascioni. 2000. Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis. 289-324. In: Botana, L.M. (Ed.). *Seafood and freshwater toxins*, Pharmacology, Physiology and Detection. New York.

EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). 8(6): 39. Disponible en: [www.efsa.europa.eu](http://www.efsa.europa.eu)

Escalera, L., Y. Pazos, M.D. Doval & B. Reguera. 2012. A comparison of integrated and discrete depth sampling for monitoring toxic species of *Dinophysis*. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 106-113.

Espiña, B., E. Cagide, M.C. Louzao, N. Vilariño, M.R. Vieytes, Y. Takeda, M. Sasaki & L. M. Botana. 2016. Cytotoxicity of goniiodomin A and B in non contractile cells. *Toxicology Letters*, 250: 10-20.

Esqueda-Lara, K. & D.U. Hernández-Becerril. 2010. Dinoflagelados microplanctónicos marinos del Pacífico central de México (Isla Isabel, Nayarit y costas de Jalisco y Colima). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. 206 p.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2004. Marine Biotoxin. Roma. 287 p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5486e.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. Toxicity equivalency factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs. World Health Organization. Rome. 108 p.

Farrell, H., P. Gentien, L. Fernand, M. Lunven, B. Reguera, S. González-Gil & R. Raine. 2012. Scales characterising a high density thin layer of *Dinophysis acuta* Ehrenberg and its transport within a coastal jet. *Harmful Algae*, 15: 36-46.

Fernández, M.L., A. Míguez, E. Cacho, A. Martínez, J. Diogéne & T. Yasumoto. 2002. Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. 77-120. In: Sar, E. A., M. E. Ferrario & B. Reguera (Eds.). Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Madrid.

Fernández, P.L., A. Moreno-González, A. Portolés-Pérez, I. Lizasoain-Hernández, M.A. Moro Sánchez & J.C. Leza. 2009. Farmacología básica y clínica. Editorial Médica Panamericana, *Nutrición Hospitalaria*, 24 (2):243.

Fernández-Cañamero, M.L. 2007. Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España, 329 p.

Ferron, P.J., K. Dumazeau, J. F. Beaulieu, L.L. Hégarat & V. Fessard. 2016. Combined effects of lipophilic phycotoxins (Okadaic, Azaspiracid-1 and Yessotoxin) on human intestinal cells models. *Toxins*, 8: 1-13.

Fonfría-Subirós, E. 2009. Ficotoxinas marinas: método de detección en extracto de molusco. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España, 83 p.

Fujiki, H & M. Suganuma. 1993. Tumor promotion by inhibitor of protein phosphatases 1 and 2<sup>a</sup>: the okadaic acid class of compounds. *Advances in Cancer Research*, 61: 143-194.

Gago-Martínez, A.I., I. Ruppen-Cañas & J. Hungerford. 2012. Biotoxinas marinas: Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos. 31 p.

Gárate-Lizárraga & A. Martínez-López. 1997. Primer registro de una marea roja de *Prorocentrum mexicanum* (Prorocentraceae) en aguas del Golfo de California. *Revista de Biología Tropical*, 45: 1263-1271.

Gárate-Lizárraga, I. & M.S. Muñetón-Gómez. 2008. Bloom of *Peridinium quinquecorne* Abé in la Ensenada de La Paz, Gulf of California (july 2003). *Acta Botánica Mexicana*, 83: 33-47.

Gárate-Lizárraga, I. 2012. Proliferation of *Amphinium carterae* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) in Bahía de La Paz, Golfo de California. *CICIMAR Océánides*, 27(2): 37-49.

Gárate-Lizárraga, I., M.L. Hernández-Orozco, C.J. Band-Schmidt & G. Serrano-Casillas. 2001. Red tides along the coasts of Baja California Sur, México (1984 to 2001). *CICIMAR Océánides*, 16(2): 127-134.

Gárate-Lizárraga, I., M.S. Muñetón-Gómez & V. Maldonado-López. 2006. Florecimiento del dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la Isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Investigaciones Marinas*, 27(1):31-39.

Gárate-Lizárraga, I., R. González-Armas, G. Tiburcio-Pintos, C. Sánchez-García, G. Olvera-Guevara & P. Montero-Becerril. 2014. Fish die-offs along the southern coast of Baja California. *Harmful Algae News*, 48: 8-9.

Garay, E., R. Aznar, J. Lalucat & F. Ribas. 2006. Informe técnico sobre cepas de trabajo en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos. Sociedad Española de Microbiología, España. 4 p.

García-Mendoza, E., Y.A. Sánchez-Bravo, A. Turner, J. Blanco, A. O'Neil, J. Mancera-Flores, P. Pérez-Brunius, D. Rivas & A. Almazán-Becerril. 2014. Lipophilic



toxin in cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Baja California, Mexico. *Toxicon*, 90: 111-123.

Góngora-González, D.T., L. Morquecho-Escamilla & C.H. Lechuga-Devéze. 1999. Distribución vertical y asociaciones fitoplanctónicas en periodos de florecimientos nocivos en Bahía Concepción, B.C.S., México. 7. In: *X Reunión Nacional de la Sociedad de Planctología, A. C., III Reunión Internacional de Planctología*. Mazatlán, Sinaloa, México.

González-Rivera L. I. 2009. Estudio de la capacidad hepatocarcinogénica del extracto de toxinas diarreicas (DSP) del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) DODGE, en el modelo del hepatocito resistente en la rata Fischer 344. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 49 p.

Gribble, K.E., B.A. Keafer, M.A. Quilliam, A.D. Cembella, D.M. Kulis, A. Manahan & D.M. Anderson. 2005. Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep-Sea, Research II*, 52: 2745-2763.

Hakim, A.R. 2012. The potencial of heterotrophic microalgae (*Schizochytrium* sp.) as a source of DHA. *Squalen*, 7(1): 29-38.

Hallegraeff, G.M. 2004. Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on Harmful marine Microalgae. Hallegraeff G.M., D. Anderson & A.D. Cembella (Eds), UNESCO.

Hellyer, S.D. 2014. Mechanism of action of Pinnatoxins E, F and G. Tesis de doctorado. University of Otago, Dunedin. New Zealand. 231 p.

Hernández-Becerril, D.U., S.A. Barón-Campis & S. Escobar-Morales. 2012. Un nuevo registro de *Azadinium spinosum* (Dinoflagellata) en el Pacífico tropical Mexicano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3): 553-557.

Hernández-Orozco, M.L. & I. Gárate-Lizárraga. 2006. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomédica* 17:45-60.

Hernández-Sandoval, F.E. 2010. Efecto de la proporción N:P en el crecimiento y toxicidad de *Gymnodinium catenatum* de la Bahía de La Paz y Bahía de Mazatlán. Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 112 p.

Hernández-Sandoval, F.E., D.J. López-Cortés, C.J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, E.J. Núñez-Vázquez & J.J. Bustillos-Guzmán. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica* 19: 245-256.

Hernández-Becerril, D.U., Rodríguez-Palacio, M.C. & C. Lozano-Ramírez. 2013. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Botánica Marina*, 56(5-6): 535-540.

Holguin, G., P. Vázquez & Y. Bashan. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33: 265-278.

Hollingworth, T. & M.M. Wekell. 1990. Fish and other Marine Products 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological Method, Final Action. In Hellrich, K. (Ed). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th Edition) 881-882.

Holmes, M.J., S.L.M. Teo, F.C. Lee & H.W. Khoo. 1999. Persistent low concentrations of diarrhetic shellfish toxins in Green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: first record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. *Marine Ecology Progress Series*, 181:257-268.

INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca). 2015. Temperatura superficial marina del Pacífico Mexicano: Periodo 1 de mayo a 12 de septiembre. Dirección General de Investigación Pesquera del Pacífico. 11.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). Censo de Población y Vivienda 2010. Aguascalientes, México/DF: Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/>. Consultado en 2015.

Koneman, E.W. & S. Allen. 2008. Diagnostico microbiológico: Texto y atlas en color. (Ed). Médica panamericana. 1691 p.

Kong, K., Z. Moussa, C. Lee & D. Romo. 2011. Total synthesis of the spirocyclic imine marine toxin (–) Gymnodimine and unnatural C4-epimer. *National Institute of Health*, 133(49): 19844-19856.

Lagus, A., J. Suomela, G. Weithoff, K. Heikkila, H. Helminen & J. Sipura. 2004. Specie-specific differences in phytoplankton responses to N and P enrichments and the N:P ratios in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*, 26: 779-798.

Lane, J.Q., C.M. Roddam, G.W. Langlois & R.M. Kudela. 2010. Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California. *Limnology and Oceanography Methods*, 8: 645-660.

Lawrence, J., H. Loreal, H. Toyofuku, P. Hess, K. Iddya, & L. Ababouch. 2011. Technical paper: Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Italia, 99–108.

Lee, J.S., T. Igarashi, S. Fraga, E. Dahl, P. Hovgaard & T. Yasumoto. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology*, 1:147-152.

Licea, S., J.L. Moreno, H. Santoyo, & G. Figueroa. 1995. Dinoflageladas del Golfo de California. Universidad Autónoma de Baja California Sur. SEP-FOMES. PROMARCO. 165 p.

López-Cortés, D.J., E.J. Núñez-Vázquez, C.J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, F.E. Hernández-Sandoval & J.J. Bustillos-Guzmán. 2015. Mortalidad masiva de peces durante un florecimiento de diatomeas en La Bahía de La Paz, Golfo de California. *Hidrobiológica*, 25(1): 39-48.

Mackenzie, L., V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb & A. Selwood. 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon*, 44: 901-918.

Malaguti, C., P. Ciminiello, E. Fattorusso & G.P. Rossini. 2002. Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells. *Toxicology Vitro*, 16: 357-363.

Matsushima, R., H. Uchida, S. Nagai, R. Watanabe, M. Kamio, H. Nagai, M. Kaneniwa & T. Suzuki. 2015. Assimilation, accumulation, and metabolism of Dinophysistoxins (DTXs) and Pectenotoxins (PTXs) in the several tissues of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxins*, 7(12):5141-5154.

McMahon, T. & J. Silke. 1996. West coast of Ireland; winter toxicity of a unknown a etiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14: 2.

Miles, C.O., I.A. Samdal, J. Aasen, D.J. Jensen, M.A. Quilliam, D. Petersen, L.M. Briggs, A.L. Wilkins, F. Rise & J.M Cooney. 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*, 4, 1075–1091.

Milles, C.O., A.L. Wilkins, D.J. Stirling & A.L. Mac Kenzie. 2003. Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16): 4838-40.

Mizuno, K., N. Nakahata, E. Ito, M. Murakami, K. Yamaguchi & Y. Ozumi. 1998. Goniiodomin A. An antifungal polyether macrolide, increases the filamentous actin content of 1321N1 human astrocytoma cells. *Journal of Pharmacology*, 6: 645-648.

Moita, M.T., L. Sobrinho-Goncalvez, P.B. Oliveira, S. Palma & M. Falcao. 2006. A bloom of *Dinophysis acuta* in a thin layer off North-West Portugal. *African Journal of Marine Science*, 28: 265-269.

Morquecho-Escamilla, L., A. Reyes-Salinas & Y.B. Okolodkov. 2016. Guía Taxonómica Ilustrada de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR).

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. México. 147 p.

Morton, S. & J. Bomber. 1994. Maximizing okadaic acid content from *Prorocentrum hoffmannianum* Faust. *Journal of Applied Phycology*, 6: 41-44.

Muciño-Márquez, R.E., I. Gárate-Lizárraga & D.J. López-Cortés. 2015. Variación estacional del género *Prorocentrum* (Dinophyceae) en dos granjas atuneras en La Bahía De La Paz, México. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1):195-206.

Munday R., A.I. Selwood & L. Rhodes. 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon*, 60: 995–999.

Munday, R., N.R. Towers, L. Mackenzie, V. Beuzenberg, P.T. Holland, & C.O. Miles. 2004. Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon*, 44: 173–178.

Murakami Y., Y. Oshima & T. Yasumoto. 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48:69-72.

Murakami, M., K. Makabe, K. Yamaguchi & S. Konosu. 1988. Goniodomin A, a novel polyether macrolide from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogonyaulax*. *Tetrahedron Letters*, 10: 1149-1152.

Nishiwaki, S., H. Fujika & M. Suganuma. 1990. Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis*, 11: 1837-1841.

Obeso-Nieblas, M. 2003. Variabilidad espaciotemporal de las condiciones oceanográficas de la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Tesis de doctorado, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur. México, 337 p.

Ochoa, J.L. 2003. Mareas Rojas. Proliferaciones microalgales nocivas y biotoxinas marinas en México: Impacto en la salud pública, pesquerías, acuicultura y medio ambiente. Gobierno del Estado de B.C.S., SEP, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México. 84 p.

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

Otero-Fuertes, M.P. 2012. Desarrollo de técnicas de identificación detección y purificación de toxinas lipofílicas. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España, 144 p.

Paz-Pino, B. 2007. Producción de YTX por cultivos de *Protoceratium reticulatum*: variabilidad en el perfil de toxinas de diferentes cepas. Tesis doctoral. Universidad de Vigo, España, 53 p.

Pérez-Cruz, B. 2007. Tasa de depuración de toxinas paralíticas producidas por *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 86 p.

Pizarro, G., A. Moroño, B. Paz, J.M. Franco, Y. Pazos & B. Reguera. 2013. Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of *Dinophysis* toxins in shellfish. *Marine Drugs*, 11 (10): 3823-3845.

Pizarro, G., C. Alarcón, J. Franco, L. Escalera, B. Reguera, G. Vidal & L. Guzmán. 2006. Distribución espacial de *Dinophysis* spp., y detección de toxinas VDM disueltas en el agua, mediante sensores químicos (X Región). Informes preliminares. Cruceros. Centro de Instrucción y Capacitación Marítima 11, Fiordos. 59-79.

Redfield, A.C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Science*, 46: 205-221.

Reguera, B. & G. Pizarro. 2000. Planktonic dinoflagellates that contain polyether toxins of the old "DSP complex". 257-287. In: Botana, L.M. (Ed.). *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, New York, U.S.A.

Reguera, B., L. Velo-Suárez, R. Raine & G.P. Myung. 2012. Harmful *Dinophysis* species: a review. *Harmful Algae*, 14: 87-107.

Richard, D., E. Arsenault, A. Cembella & M. Quilliam. 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. 383–386. In: Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, C.J. Bolch & R.J. Lewis, (Eds). Harmful algal blooms 2000. Proceedings, 9th International Conference on Harmful Microalgae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Rodríguez L., V. González, A. Martínez, B. Paz, J. Lago, V. Cordeiro, L. Blanco, J. Vieites & A. Cabado. 2015. Occurrence of lipophilic marine toxins in shellfish from Galicia (NW of Spain) and synergies among them. *Marine Drugs*, 13:1666–1687.

Rossini, G.P. 2014. Toxins and biologically active compounds from microalgae: volumen 1, Origin, chemistry and detection. CRC Press, Taylor & Francis Group. 528 p.

Salinas-González, F. 2000. Mezcla turbulenta y transporte de masa en La Bahía y Ensenada de La Paz, B.C.S.: Experimentación y modelación numérica. Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 283 p.

Salinas-González, F., O. Zaytsev & V. Makarov. 2003. Formación de la estructura termohalina del agua de la Bahía de La Paz de verano a otoño. *Ciencias Marinas*, 29(1): 51-65.

Sánchez-Bravo, Y.A. 2016. Distribución espacio-temporal del dinoflagelado *Dinophysis fortii*, productor de toxinas lipofílicas en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. México. 119 p.

Seki, T., M. Satake, L. Mackenzie, H.F. Kaspar & T. Yasumoto. 1995. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Letters*, 36 (25): 7093-7096.

Selwood, A., A.L. Wilkins, R. Munday, F. Shi, L.L. Rhodes & P.T. Holland. 2013. Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Tetrahedron Letters*, 28; 4705-4707.

Shahsavari, A & T. Balle. 2015. From Shellfish Poisoning to Neuroscience. *Structure Previews*, 979-980.

Shumway, S., S. Sherman-Caswell & J. Hurst. 1988. Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *Journal of Shellfish Research*, 7, 643-652.

Smayda, T.J. 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnology Oceanography*, 42: 1132-1136.

Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University press. USA. 446 p.

Stirling, D.J. 2001. Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine. N. Z. J. *Marine and Freshwater Research*. 35, 851-857.

Stivala, C.E., E. Benoit, R. Aráoz, D. Servent, A. Novikov, J. Molgó & A. Zakarian. 2015. Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins. *Natural Product Reports*. 32: 411-435.

Strickland, J.D. & R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada Bulletin*, 167: 207-211.

Sunesen I., A.S. Lavigne, A. Goya & E.A. Sar. 2014. Episodios de toxicidad en moluscos de aguas marinas costeras de la provincia de Buenos Aires (Argentina) asociados a algas toxígenas (marzo de 2008-marzo de 2013). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 49 (3): 327-339.

Tachibana, K., P.J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van-Engen, J. Clardy, Y. Gopichand & F.J. Schmitz. 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society*, 103: 2469-2471.



Taylor, F.J. 1999. Charles Atwood Kofoid and his dinoflagellate tabulation system: an appraisal and evaluation of the phylogenetic value of tabulation. *Protist*, 150: 213-220.

Terao, K., E. Ito, M. Murakami & K. Yamaguchi. 1989. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-III. Morphological changes in the liver and thymus of male ICR mice induced by goniiodomin A, isolated from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogoniaulax*. *Toxicon*, 27: 269-271.

Terra, L., P.A. Abreu, V. L. Teixeira, I.C.P Paixão, R. Pereira, B. Leal, A.L. Lurenço, P.H. Rampelotto & H.C. Castro. 2014. Mycoses and antifungals: reviewing the basis of a current problema that still is a biotecnological target for marine products. *Frontiers in Marine Science*, 1: 1-12.

Tillmann, U., M. Elbracheter, B. Krock, U. John & A. Cembella. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. Nov. (Dinoohyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology*, 44(1): 63-79.

Tubaro A., E. Bandi, S. Sosa, M.R. Soranzo, V. De Ninis, T. Yasumoto & P. Lorenzon. 2008. Effects of yessotoxin (YTX) on the skeletal muscle: an update. *Food Additives & Contaminants*, 25: 1095-1100.

UNESCO. 2017. Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Moestrup, O., R. Akselmann, S. Fraga, M. Hoppenrath, M. Iwataki, J. Komárek, J. Larsen, N. Lundholm & A. Zingone. 2009. (Eds). Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab>

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitative phytoplankton-methodik- mitteilung international vereiningung fuer theoretische und angewandte. *Limnologie*, 5:567-596.

Valdiglesias, V., B. Laffon, E. Pásaro & J. Méndez. 2011. Evaluation of Okadaic Acid-Induced Genotoxicity in Human Cells Using the Micronucleus Test and  $\gamma$ H2AX Analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 74: 980-992.

Valdiglesias, V., M.V. Prego-Faraldo, E. Pásaro, J. Méndez & B. Laffon. 2013. Okadaic Acid: More than a Diarrhetic Toxin. *Marine Drugs*, 11: 4328-4349.

Velo-Suárez, L., S. González-Gil, P. Gentien, M. Lunven, C. Bechemin, L. Fernand, R. Raine & B. Reguera. 2008. Thin layers of *Pseudo-nitzschia* spp., and the fate of *Dinophysis acuminata* during an upwelling-downwelling cycle in a Galician Ria. *Limnology and Oceanography*, 53: 1816-1834.

Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailleau & J.C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophylla and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18: 2377–2382.

Webb, J.L., J. Vandenbor, B. Pirie, S.M.C. Robinson, S.F. Cross, S.R.M. Jones & C.M. Pearce. 2013. Effects of temperature, diet, and bivalve size on the ingestion of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) larvae by various filter-feeding shellfish. *Aquaculture*, 406: 9-17.

Williams, P.H. & S.C. Clarke. 1998. Why do microbes have toxins? *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84: 1-6.

Wu, H., J. Yao, M. Guo, Z. Tan, D. Zhou & Y. Zhai. 2015. Distribution of marine lipophilic toxins in shellfish products collected from the Chinese market. *Marine Drugs*, 13: 4281-4295.

Yanagi, T., M. Murata, K. Torigoe & T. Yasumoto. 1989. Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 525-529.

Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G.K. Matsumoto & J. Clardy. 1980. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41(6): 1019-1025.

Yasumoto, T., Y. Oshima & M. Yamaguchi. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44: 1249-1255.

Zheng S., F. Huang, S. Chen, X. Tan, J. Zuo & J. Peng. 1990. The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 9: 33-35.

## 11.-ANEXOS

### 11.1-Anexo 1

Especies identificadas en el sur de la Bahía de La Paz, durante en muestreo de 2015-2016.

<b>Gonyaulacales</b>	<b>Peridinales</b>	<b>Prorocentrales</b>	<b>Dinophysiales</b>	<b>Gymnodimiales</b>
<i>Alexandrium ostenfeldii</i> (*)	<i>Ostreopsis</i> spp.1	<i>Prorocentrum</i> spp.1	<i>Dinophysis</i> spp.1	<i>Akashiwo sanguineum</i>
<i>Ceratium</i> spp.1	<i>Heterocapsa</i> spp.1	<i>Prorocentrum</i> spp.2	<i>D. acuta</i> (*)	<i>Balechina</i> spp.1
<i>C. contrarium</i>	<i>Heterocapsa niei</i>	<i>P. gracile</i>	<i>D. caudata</i> (*)	<i>Cochlodinium</i> spp.1
<i>C. falciforme</i>	<i>Podolampas palmipes</i>	<i>P. lima</i> (*)	<i>D. fortii</i> (*)	<i>Gymnodinium</i> spp.1 (*)
<i>C. falcatum</i>	<i>Protoberidinium</i> spp.1	<i>P. compressum</i>	<i>Phalacroma</i> spp.1	<i>Gymnodinium</i> spp.2 (*)
<i>C. furca</i>	<i>Protoberidinium</i> spp.2	<i>P. micans</i>	<i>P. rotundatum</i> (*)	<i>G. gracile</i>
<i>C. fusus</i>	<i>P. brochii</i>	<i>P. rathymum</i> (*)		<i>G. herbaceum</i>
<i>C. kofoidii</i>	<i>P. cassum</i>	<i>P. sigmoide</i>		<i>Gyrodinium</i> spp.1
<i>C. longirostrum</i>	<i>P. claudicans</i>	<i>P. triestinum</i>		<i>Gyrodinium spirale</i>
<i>C. macroceros</i>	<i>P. compressum</i>	<i>P. vaginulum</i>		
Dinoflagelado 1	<i>P. conicum</i>			
<i>Goniodoma sphaericus</i>	<i>P.</i> (cf., <i>corniculum</i> )			
<i>Gonyaulax</i> spp1	<i>P. crassipes</i>			
<i>Gonyaulax spinifera</i> (*)	<i>P. depressum</i>			
<i>G. digitale</i>	<i>P.</i> (cf., <i>divergens</i> )			
<i>Oxytoxum scolopax</i>	<i>P. globulum</i>			
	<i>P. grani</i>			
	<i>P. grande</i>			
	<i>P. latispinum</i>			
	<i>P. minusculum</i>			
	<i>P. pellicidum</i>			
	<i>P. punctulatum</i>			
	<i>P. quinquecorne</i>			
	<i>P. stenii</i>			
	<i>P. tuba</i>			
	<i>Scrippsiella</i> spp.1			
	<i>Scrippsiella</i> spp.2			
	<i>S. trochoidea</i>			
	<i>Zygabikodinium</i> spp.1			

\*Especies de dinoflagelados potencialmente productores de toxinas lipofílicas.

<b>Amphidomataceae</b>
------------------------

Azadinium spp.1 (*)
---------------------

## **11.2-Anexo 2**

A continuación se muestran las imágenes y descripción de algunas de las especies presentes de forma recurrente durante el muestreo.

### ***Prorocentrum micans***

Es un dinoflagelado tecado, marino con forma de vida planctónico, considerada como una especie cosmopolita tanto de aguas frías como tropicales. El organismo observado en la Figura 21, fue obtenido de la BAPAZ. Esta especie se puede encontrar como células solitarias de talla media, la forma de su teca es ovalada y asimétrica en comparación a otras especies, su forma varía llegando a encontrar células piriformes, forma de lágrimas o de corazón, comprimidos lateralmente. La superficie de la teca está recubierta por numerosos poros (Pr), que también son llamados poro tricocistos, los cuales siguen un patrón (PPr), en el cual se observa que presenta poros muy pequeños y densos y además poros de mayor tamaño localizados en los márgenes formando hileras transversales. Los bordes redondeados por lo general no presentan diferencia entre el largo y el ancho de la célula, en la parte posterior se diferencia en que su terminación es en forma puntiaguda, no prolongada, además que se puede observar el poro oral (PO) del cual surge una espina apical (EA) muy desarrollada.

Dimensiones: 36.13  $\mu\text{m}$  de largo, 24.11  $\mu\text{m}$  de ancho y 6.7  $\mu\text{m}$  largo de la espina apical

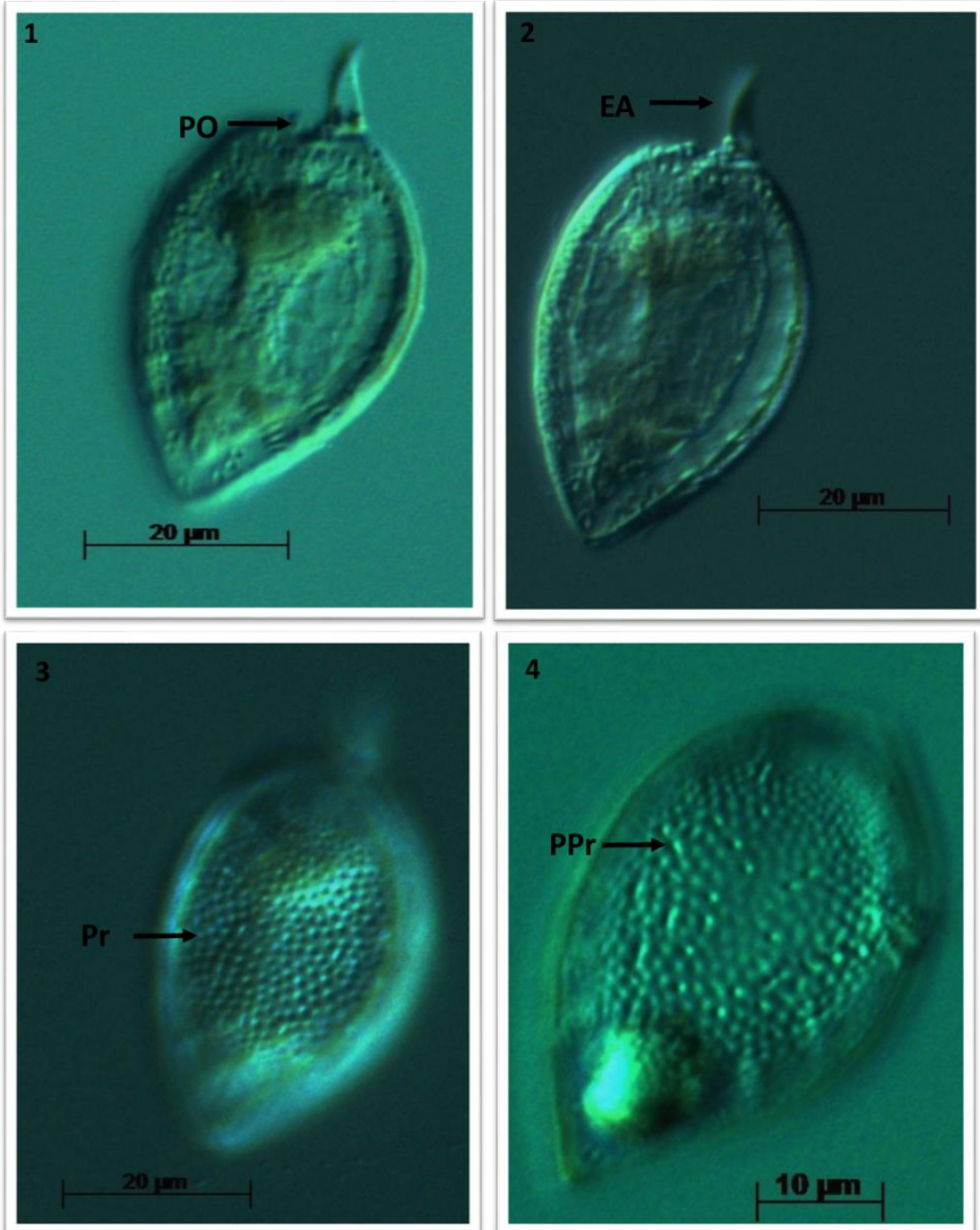


Figura 21.- Micrografías de *Prorocentrum micans*. Imágenes observadas a 40x con DIC. Poro oral (PO), espina apical (EA), poros (Pr), patrón de poros (PPr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Prorocentrum gracile***

Este organismo marino de forma de vida planctónico, también fue colectado en la BAPAZ (Figura 22). Suele encontrarse como células individuales, de talla mediana, son células piriformes y puntiagudas, los bordes de estos organismos, no son tan redondeados como en *P. micans*, solo es un poco redondeada en la parte anterior y con una terminación puntiaguda en la parte posterior y sus bordes son cóncavos. En la superficie de su teca se pueden observar numerosos poros (Pr) pequeños y también es posible observar poros de mayor tamaño en los márgenes de las valvas formando hileras transversales. En la parte anterior se localiza el poro oral (PO) el cual es marcado, pero poco profundo, de este surge la espina antapical (EA), esta es más delgada y larga.

Dimensiones: 56.73  $\mu\text{m}$  de largo, 14.7  $\mu\text{m}$  de ancho, 11.9  $\mu\text{m}$  largo de la espina.

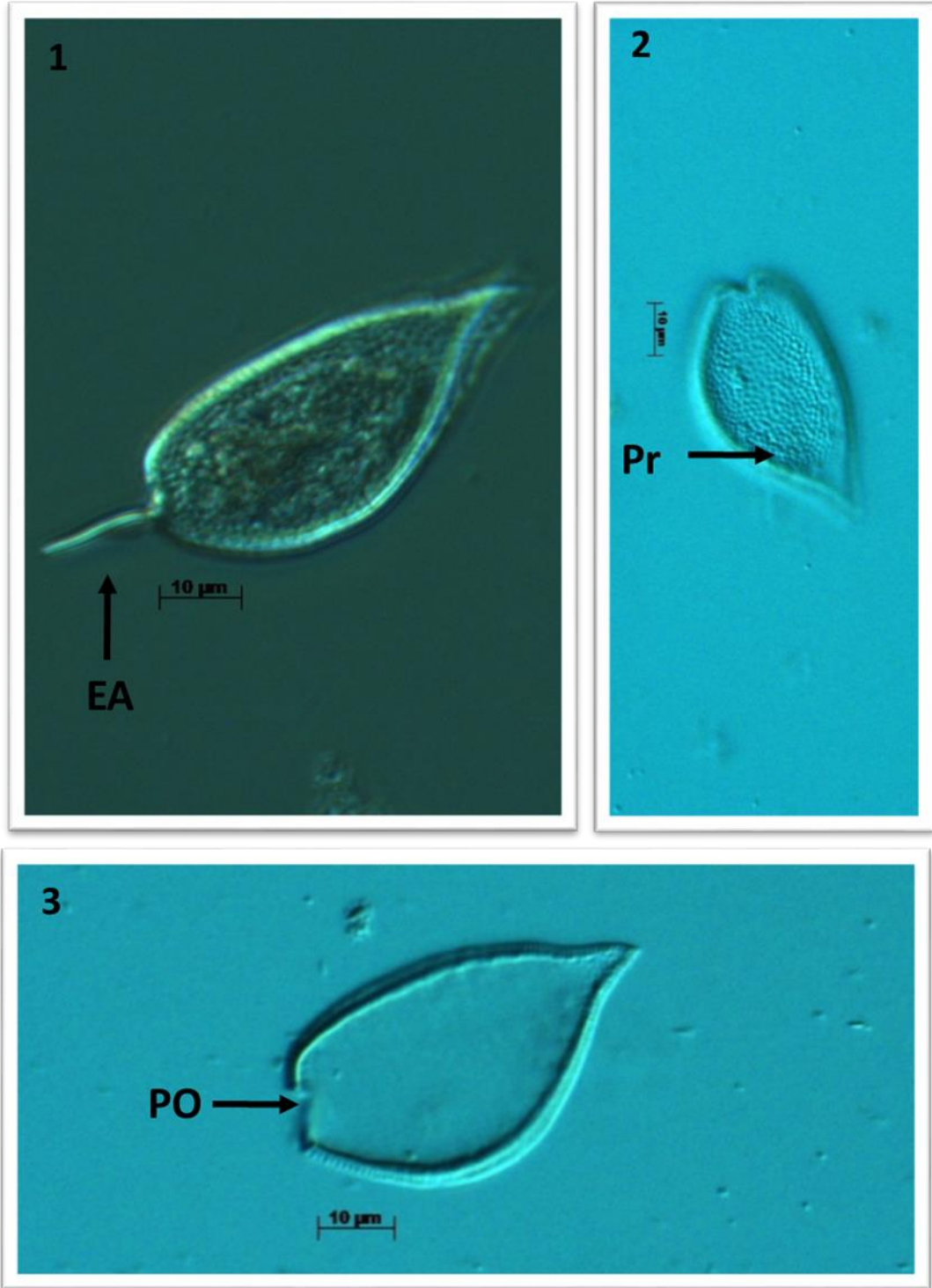


Figura 22. Micrografías de *Prorocentrum gracile*. 1 y 3) observas a 40x con DIC. 2) observada a 20x con DIC. Poro oral (PO), espina apical (EA), poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.



### ***Prorocentrum compressum***

Es una especie marina, bentónica, fue aislada del interior de la ENPAZ (Figura 23). Las células de esta especie son totalmente redondeadas, comprimidas en vista lateral, en su parte anterior presentan un pequeño poro oral (PO), pero no tiene espina. Sin embargo en algunos organismos es posible observar pequeñas denticulaciones asimétricas, como en este caso que se logra diferenciar una pequeña aleta translúcida (A). En la parte anterior cerca del poro oral, es posible encontrar a la célula recubierta de un mucílago (Mg) recubriendo toda la parte externa de la teca, la cual presenta un patrón de poros pequeños, distribuidos en líneas rectas (PPr1), localizadas en la periferia de la célula. La principal característica para identificar esta especie es la forma y una línea recta de poros (PPr2) que se localizan en la parte lateral del poro oral. Esta especie es fotosintética y presenta algunos cloroplastos (CL) de gran tamaño, además es posible distinguir el núcleo (N) de la célula el cual se localiza en la parte posterior.

Dimensiones: 30  $\mu\text{m}$  de largo y 26  $\mu\text{m}$  de ancho.

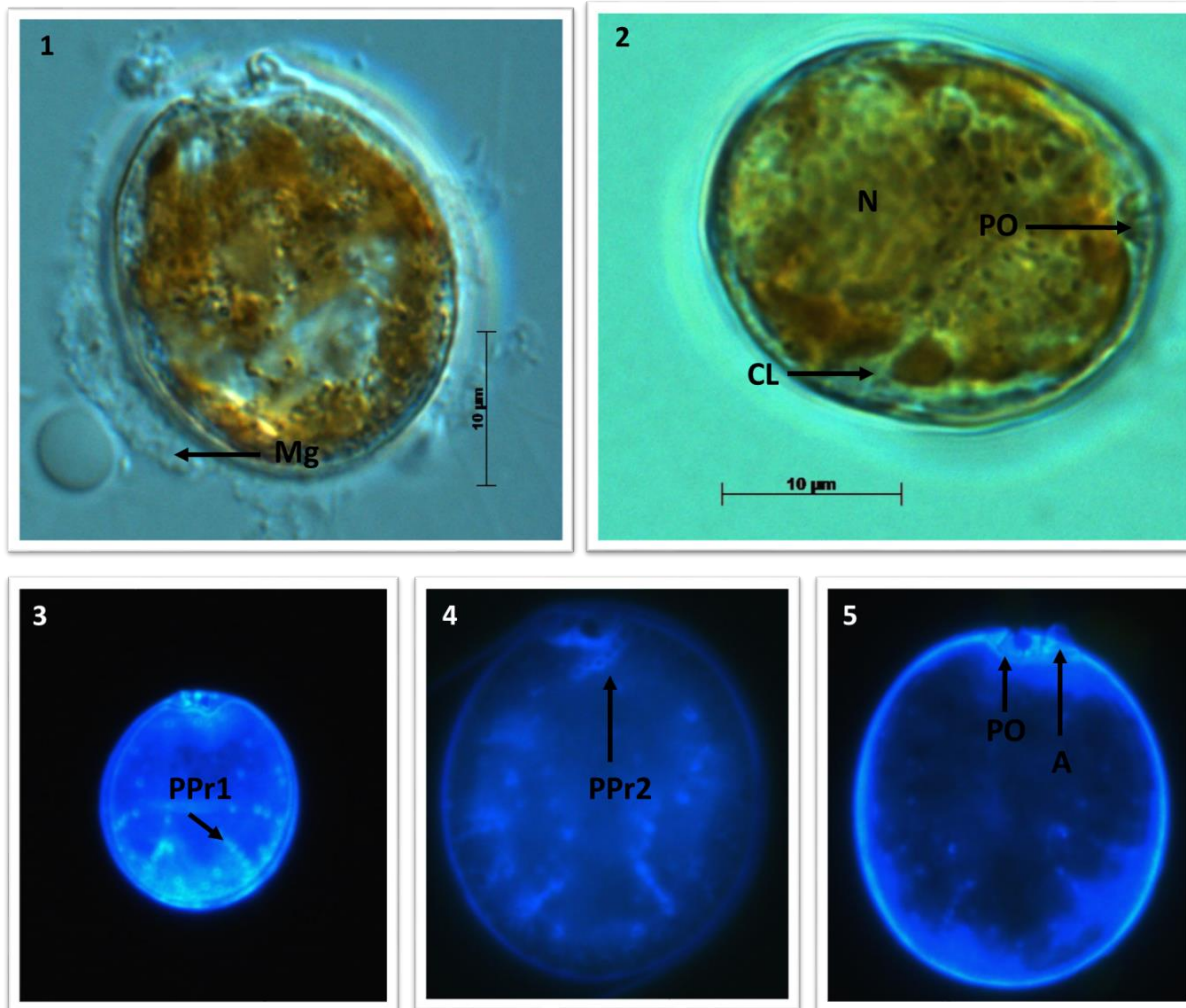


Figura 23.- Micrografías de *Prorocentrum compressum*. 1 y 2) observas a 100x con DIC. 3) observada a 20x con EPI. 4 y 5) observadas a 100x con EPI. Musílago (Mg), Poro oral (PO), cloroplasto (CL), núcleo (N), patrón de poros 1 (PPr1), patrón de poros 2 (PPr2), aleta (A). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

## ***Amphidinium carterae***

Es un dinoflagelado bentónico o endosimbionte desnudo, las células son aplanadas dorsoventralmente, con o sin cloroplastos. En la Figura 24 se pueden observar células vivas de *A. carterae* una cepa aislada de la ENPAZ. Esta especie presenta células elipsoidales, muy pequeñas, su pequeño epicono (EC) triangular o en forma de media luna es muy característico del este género. En la parte inferior de la célula se puede observar el cíngulo (C), donde se encuentra el flagelo transversal (FT) y finalmente, en la parte posterior de la célula se encuentra el hipocono (HC) el cual es de mayor tamaño en comparación con el E. En la parte posterior de la célula se encuentra un notorio pirenoide notorio (Py), el cual está situado en la región ventral de la célula. En este caso es un organismo fotosintético ya que se logran observar los cloroplastos.

Dimensiones: 12.74  $\mu\text{m}$  de largo y 8.69  $\mu\text{m}$  de ancho

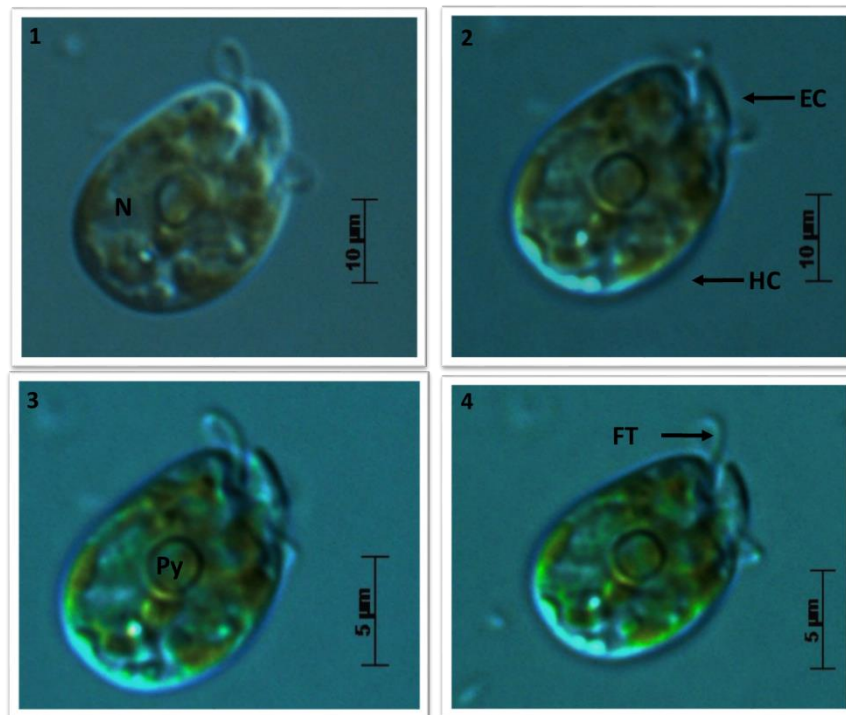


Figura 24.- Micrografías de *Amphidinium carterae*. Imágenes observadas a 100x con DIC. Núcleo (N), epicono (EC), hipocono (HC), pirenoide (PY), flagelo transversal (FT). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Cucumeridinium* sp.**

Este es un nuevo género descrito en el 2015 por Gómez y colaboradores, el cual anteriormente se consideraba dentro del género *Balechina*.

En la Figura 25, se observan los organismos obtenidos con una red de arrastre en la BAPAZ. Esta especie se presentó de manera constante, siempre en células individuales. Presenta un núcleo (N) grande en la parte central de la célula, abarcando parte del epicono (EC) y el hipocono (HC). En su parte dorsal es posible ver de una forma clara el cíngulo (C) el cual es profundo además, tiene algunas vacuolas (V), pero no presenta cloroplastos. Otra característica importante es que en la superficie de la célula se pueden observar estrías (ES) delgadas que corren de forma paralela a lo largo del cuerpo del organismo.

Dimensiones: Largo 76.18  $\mu\text{m}$ , ancho 45.94  $\mu\text{m}$  y longitud del núcleo 32.78  $\mu\text{m}$ .

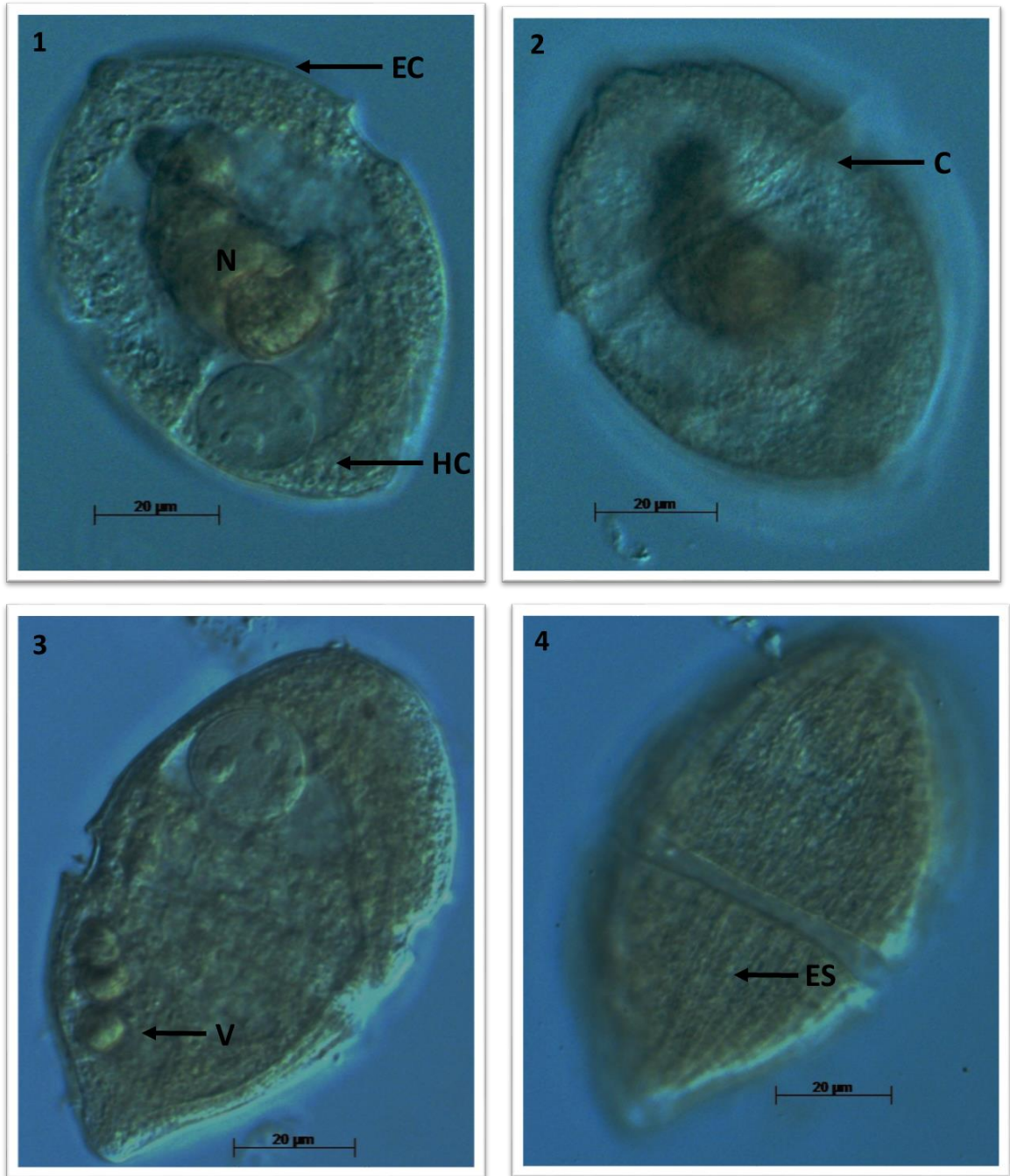


Figura 25.- Micrografías de *Cucumeridinium* sp. Observadas a 40x con DIC. Epicono (EC), núcleo (N), hipocono (HC), cíngulo (C), vacuolas (V), estrías (ES). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Pentapharsodinium sp.***

Este organismo presenta una epiteca (ET) cónica y una hipoteca (HT) redondeada. La tabulación de las células vegetativas es Po (complejo del poro apical), X (placa pre-apical), 4' (placas apicales), 3a (placas anteriores intercalares), 7'' (placas pre-cingulares), 5c (placas cingulares), 5s (placas sulcales), 5''' (placas post-cingulares), 2'''' (placas antapicales). La identificación morfológica de esta cepa se basó principalmente en la placa 1', ya que la forma de ésta es una de las que más se conserva. Cuenta con 3 placas intercalares de tamaño similar, localizadas en la parte posterior de la célula, las 7 placas pre-cingulares que también son de tamaño similar, el cingulo (C) es muy marcado y está conformado por 5 placas de las cuales la 1c, es muy delgada y es considerada una placa de transición. Las 5 placas pos-cingulares son grandes y de tamaño similar y se puede observar que el sulco está conformado por varias placas de menor tamaño, donde en este caso la que más sobresale es la placa sulcal posterior (Sp). En el organismo identificado es posible observar los cloroplastos (CL) y una vacuola (V) (Figura 26).

Dimensiones: Largo 28.13 µm y ancho 26.71 µm.

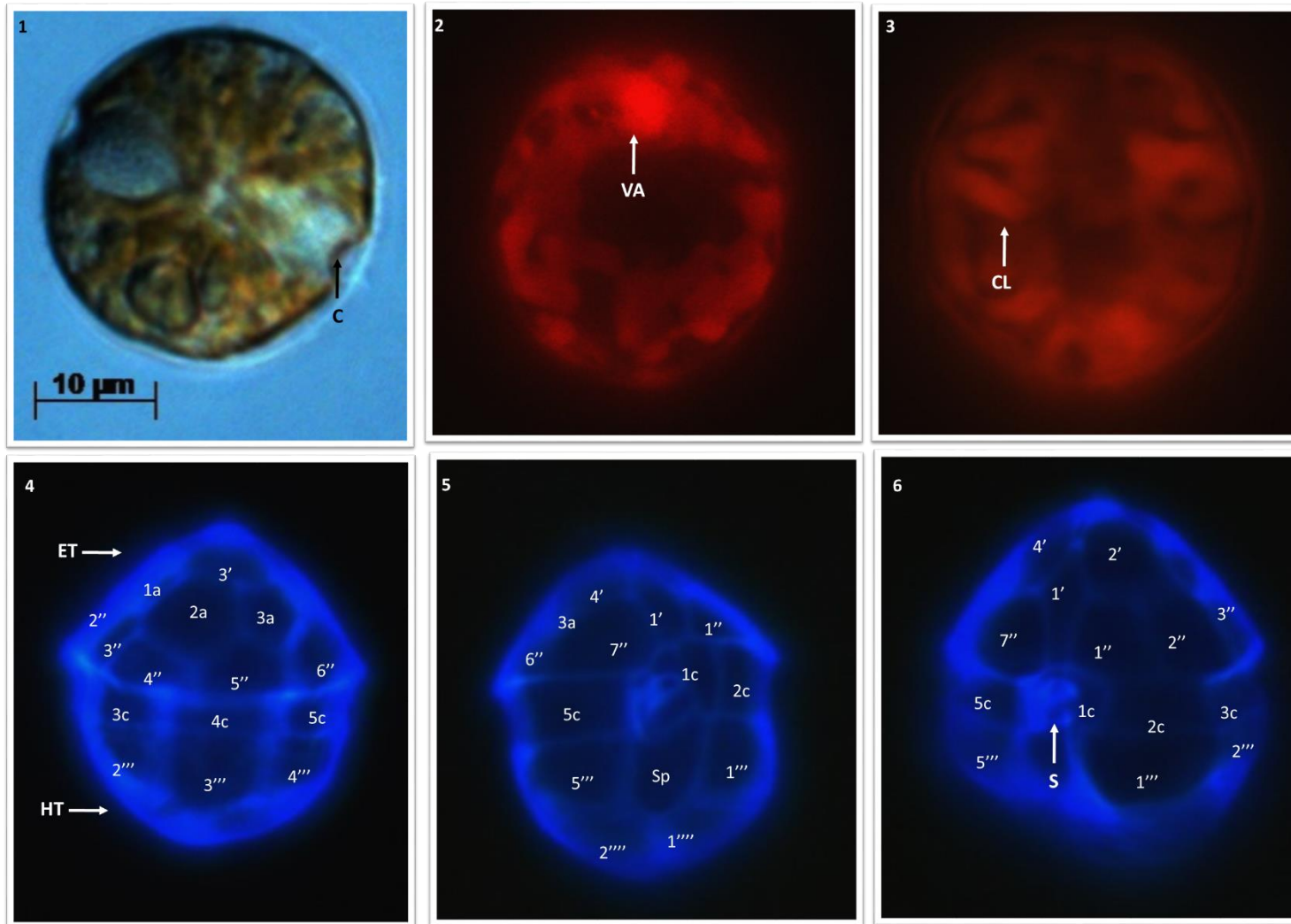


Figura 26.- Micrografías de *Pentapharsodinium* sp.1) observada a 100x con DIC. 2-6) observadas a 100x con EPI. Cíngulo (C), vacuola (VA), cloroplastos (CL), epiteca (ET), hipoteca (HT), placa sulcal posterior (Sp), sulcus (S). Placas apicales (1' - 4'), placas anteriores intercalares (1a - 3a), placas pre-cingulares (1'' - 7''), placas cingulares (1c-5c), placas sulcales (1s-5s), placas post-cingulares (1''' - 5'''), placas antapicales (1'''' - 2'''). 1, 2 y 3). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro. 4, 5 y 6). Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril.

### ***Coolia monotis***

Son organismos bentónicos, en esta especie una característica distintiva es la forma y el tamaño del poro oral (Po), el cual es amplio y de forma curva, localizado en la parte apical de la célula, la epiteca es de menor tamaño en comparación con la hipoteca. La fórmula tecal es  $Po, 3', 7'', 6c, 6s, 5''', 2''''$ . El cíngulo (C) es marcado y presenta los aletas cingulares (Ac) muy notorias, las cuales se extienden hasta la parte del sulcus (S), formando dos prolongaciones. En las células en su estado vegetativo es posible observar el núcleo (N) y la presencia de numerosos cloroplastos (CL) de forma discoidal, ya que se trata de organismos fotosintéticos. *C. monotis* se recolectó en muestras de la ENPAZ (Figura 27).

Dimensiones: Largo 21  $\mu\text{m}$  y ancho 24.5  $\mu\text{m}$ .



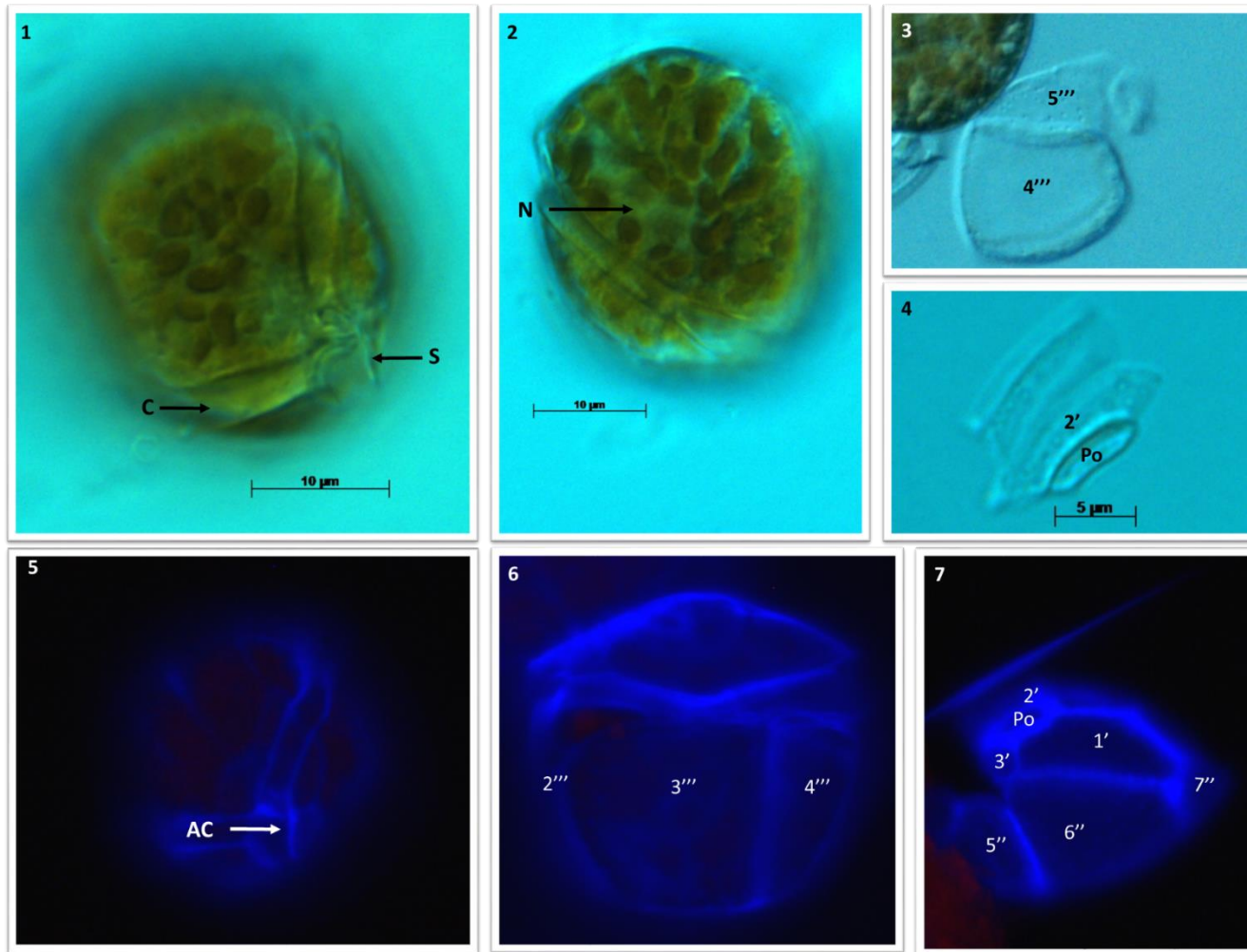


Figura 27.- Micrograffías de *Coolia monotis*. 1-4) observadas a 100x con DIC. 5-7) observadas a 100x con EPI. Cingulo (C), núcleo (N), poro oral (Po), aleta cingular (AC). Placas apicales (1'-3'), placas pre-cingulares (1'''- 7'''), placas post-cingulares (1'''- 5'''). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Coolia malayensis***

Es un dinoflagelado de hábitat bentónico tecado, la superficie de las placas que la conforman, se encuentran recubiertas por pequeños poros. Su fórmula tecal es poro oral (Po), 3', 7'', 6c, s, 5''' La epiteca localizada en la parte anterior de la célula y separada por el cíngulo (C) es de menor tamaño en comparación con la hipoteca. En la parte de la hipoteca se localiza el núcleo. Una de las características que diferencia a esta especie de *C. monotis* es que tiene una aleta sulcal (AS), la cual se puede observar que tiene un borde redondeado, localizada en la hipoteca. Otra de las diferencias de *C. malayensis* es el tamaño del poro oral, el cual es delgado y no es tan marcado como en el caso de *C. monotis*. *C. malayensis* presenta gran número de cloroplastos (CL), en este caso fue posible observar tanto el número como la forma de estos utilizando la microscopía de EPI (Figura 28).

Dimensiones: Largo 23.4  $\mu\text{m}$  y ancho 25.23  $\mu\text{m}$ .

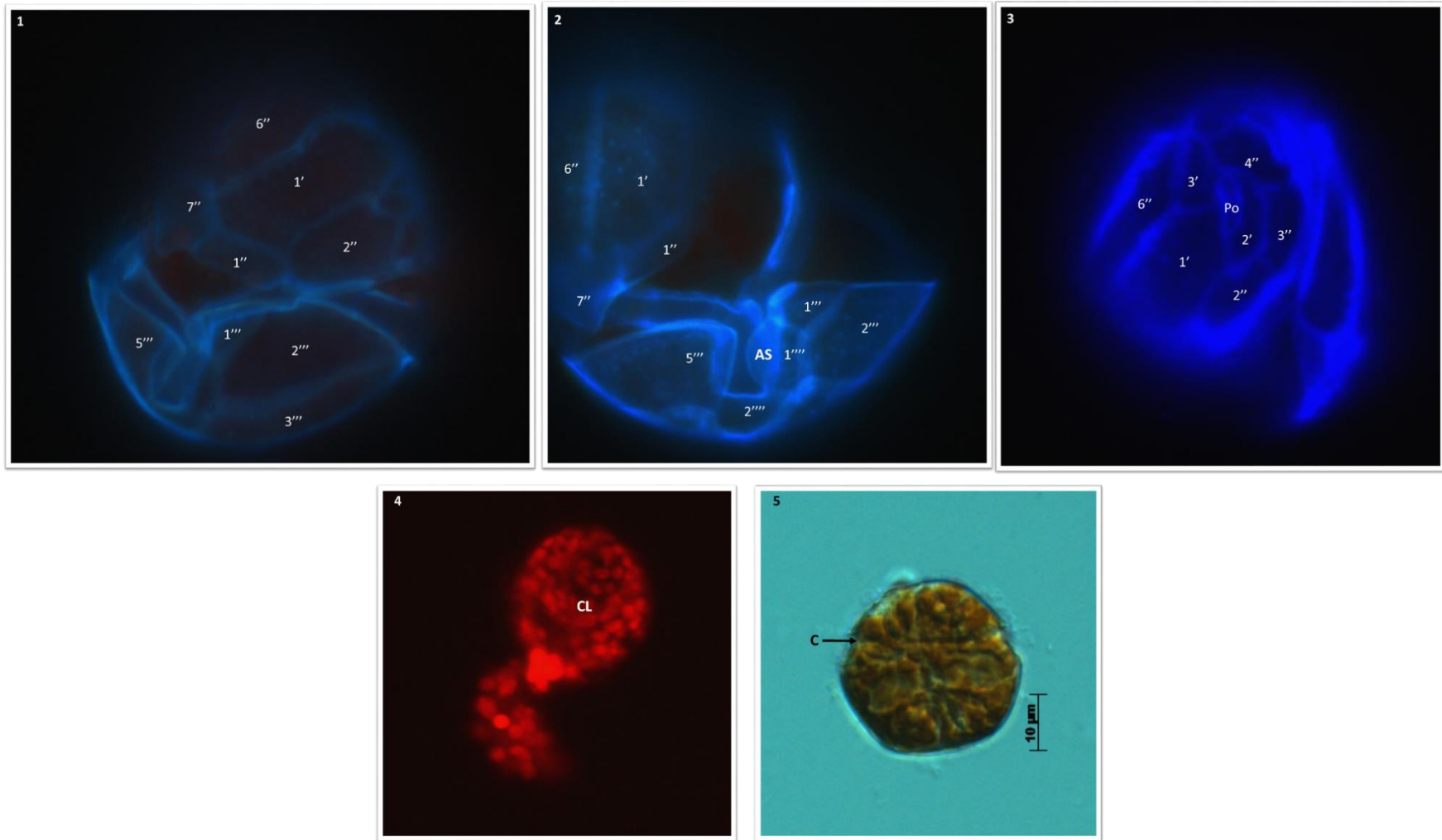


Figura 28.- Micrografías de *Coolia malayensis*. 1-4) observadas a 100x con EPI. 5) observada a 100x con DIC. Poro oral (Po), aleta sulcal (AS). Placas apicales (1'-3'), placas pre-cingulares (1''- 7''), cingulares (1c – 6c), placas post-cingulares (1'''- 5'''). 1 y 2) Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril. 3, 4 y 5) Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

A continuación se muestran las imágenes de algunas las especies tóxicas identificadas.

### ***Prorocentrum rhathymum***

Se muestran los organismos de la cepa CICI 02, pertenecientes a *P. rhathymum*, en la Figura 29 se observa que son células de forma ovalada, con la parte central un poco más ensanchada. La parte anterior de la célula se diferencia ya que presenta un poro oral (PO) del cual surge una pequeña y delgada espina apical (EA). En la parte anterior de la célula también es posible identificar un gran núcleo (N) redondeado, así como un gran número de cloroplastos (CL) y poros (Pr) en toda la superficie de las valvas que forman la teca. Se ha reportado que estos poros son aproximadamente 100 por placa, arreglados en filas radiales, que son más notorios en la parte posterior de la célula, pero la parte central de la placa parece ser que ésta desprovista de poros. En la mayoría de los ejemplares obtenidos del cultivo fue posible observar un mucílago (Mg) rodeando a la célula. En las células vivas es posible observar dos flagelos que salen del poro oral. Ésta especie es considerada como productora de toxinas DSP.

Dimensiones: 29.83  $\mu\text{m}$  de largo y 20.72  $\mu\text{m}$  de ancho.

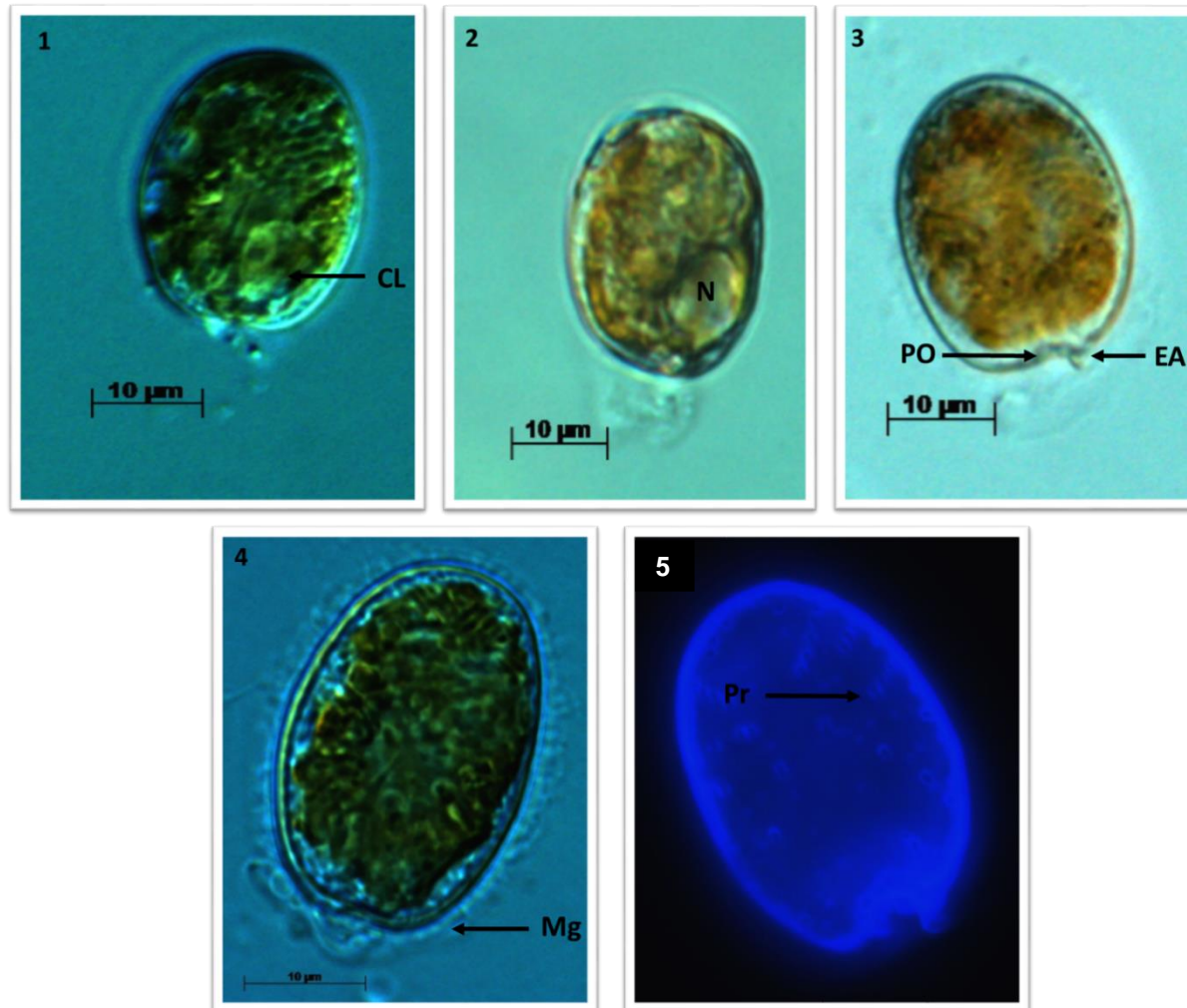


Figura 29.- Micrografías de *Prorocentrum rathymum*. 1, 2 y 3) observadas a 40x con DIC. 4) observada a 100x con DIC. 5) observada a 100x con EPI. Cloroplastos (CL), núcleo (N), poro oral (PO), espina apical (EA), mucílago (Mg), patrón de poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Dinophysis caudata***

Son células grandes, que se caracterizan por presentar una prolongación (P) en la parte final de la hipoteca, tal prolongación es la que la distingue de las otras especies del género *Dinophysis*. Además cuenta con otras ornamentaciones, en la epiteca tiene un par de aletas cingulares (AC) multirradiadas que delimitan el cíngulo (C) en su parte anterior y posterior, dos aletas sulcales, la aleta sulcal (AS) izquierda que se extiende desde la parte posterior de la epiteca hasta el inicio de la prolongación que se encuentra en la hipoteca y esta sostenida por tres radios (R1, R2 y R3). La aleta sulcal derecha es más pequeña llegando por lo general hasta el R2. Esta especie es común encontrarla en pares. La superficie de la célula se encuentra recubierta por numerosos poros (Pr) y dentro de la célula se puede ver los plastos (PI). Esta es una especie productoras de toxinas DSP (Figura 30).

Dimensiones: 101.51  $\mu\text{m}$  largo, 48.52  $\mu\text{m}$  ancho, 37.95  $\mu\text{m}$  la prolongacion de la hipoteca, 4.3  $\mu\text{m}$  ancho del cíngulo y 14.24  $\mu\text{m}$  ancho de la aleta cingular

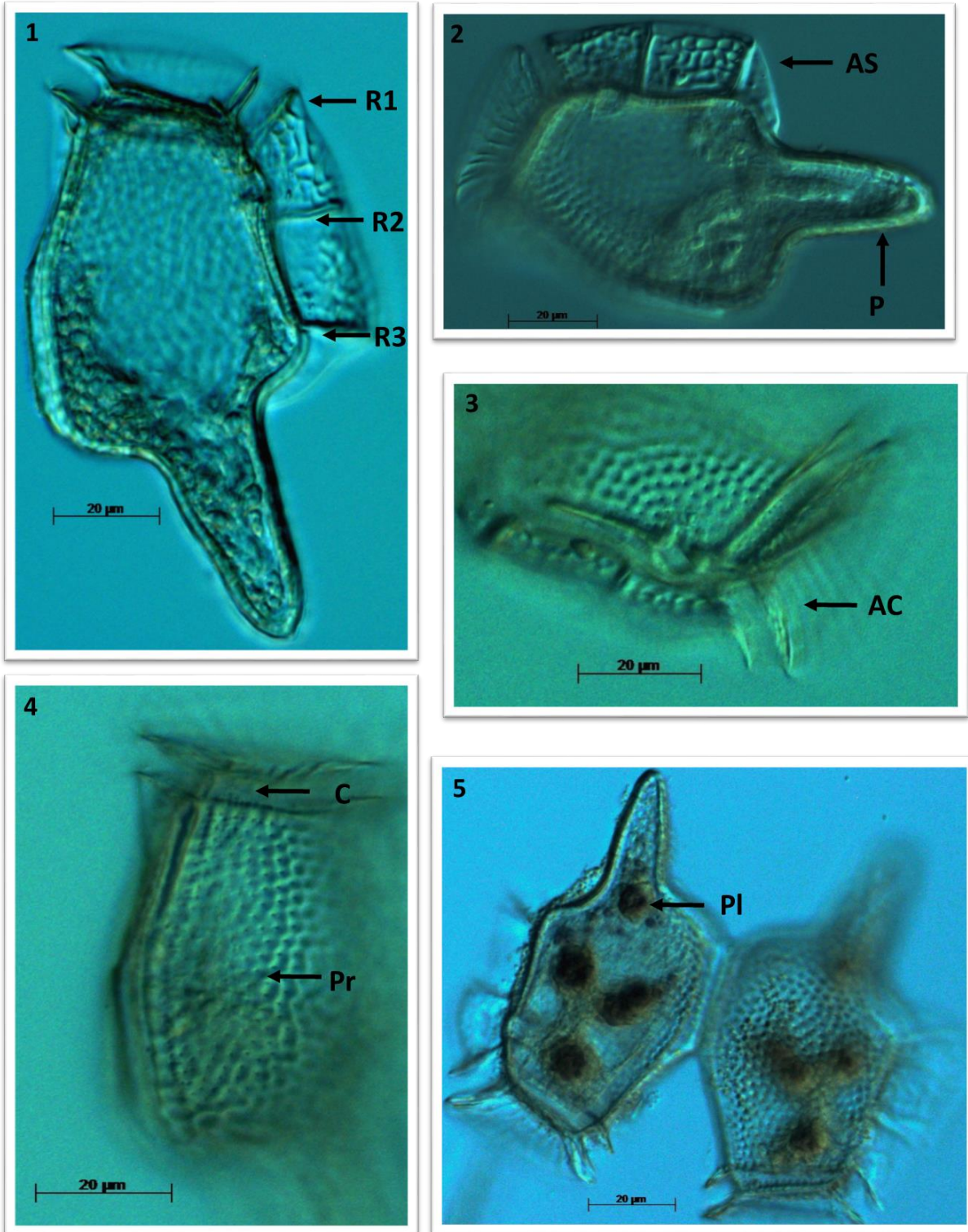


Figura 30.- Micrografías de *Dinophysis caudata*. 1, 2 y 5) observadas a 20x con DIC. 3 y 4) observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), aleta sulcal (AS), prolongación (P), aleta cingular (AC), cíngulo (C), poros (Pr), plastos (Pl). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

## ***Dinophysis tripos***

Esta especie es posible encontrarla en tallas cerca de las 100  $\mu\text{m}$  (Figura 31), *D. tripos* y *D. caudata* pueden estar coexistiendo y llegar a causar confusión, la principal diferencia entre estas dos especies es que *D. tripos* cuenta con dos prolongaciones en la parte posterior de célula y además su aleta sulcal derecha, de igual forma esta soportada por tres radios, pero ésta es más corta ya que solo llega a cubrir la mitad del largo de la hipoteca (HT). Esta especie también se puede encontrar en pares, aunque es más común ver las células individuales. La epiteca (ET) de estos organismos está muy reducida, el cíngulo se encuentra en la parte anterior de la célula, separando a la ET de la HT, la cual en este caso es de mayor tamaño, son células comprimidas lateralmente y es común encontrarlas nadando en esta vista. La identificación de las especies de este género se basa principalmente en la talla, forma y ornamentaciones. La superficie de la teca está cubierta en su totalidad por poros. Esta especie también es considerada como productora de toxinas DSP.

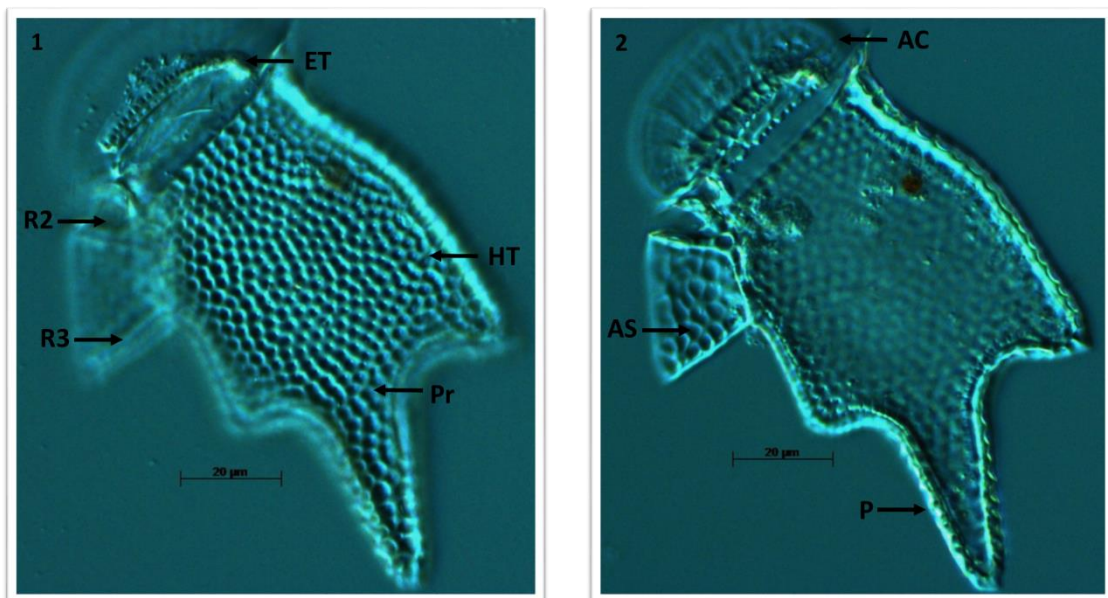


Figura 31.- Micrografías de *Dinophysis tripos*. Imágenes observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), epiteca (ET), hipoteca (HT), poros (Pr), aleta cingular (AC), aleta sulcal (AS), prolongación (P). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.



## *Dinophysis acuminata*

Las células de *D. acuminata* son de pequeñas a medianas, su forma es ovalada o elíptica, tiene su aleta sulcal (AS) bien desarrollada extendiéndose un poco más allá del punto medio del largo de la célula y sostenida por 3 radios (R1, R2 y R3). Toda la superficie de la teca se encuentra recubierta por poros (Pr), en la parte anterior del cíngulo (C) se encuentra la epiteca (ET), la cual no sobresale, debido a que esta muy reducida en comparación con la hipoteca (HT). Al igual que la mayoría de las especies del género *Dinophysis*, esta especie también es considerada como productora de toxinas DSP (Figura 32).

Dimensiones: 58.66  $\mu\text{m}$  largo, 31.20  $\mu\text{m}$  ancho, 9.37  $\mu\text{m}$  largo del R1, 10.57  $\mu\text{m}$  largo del R2 y 11.72  $\mu\text{m}$  largo del R3.

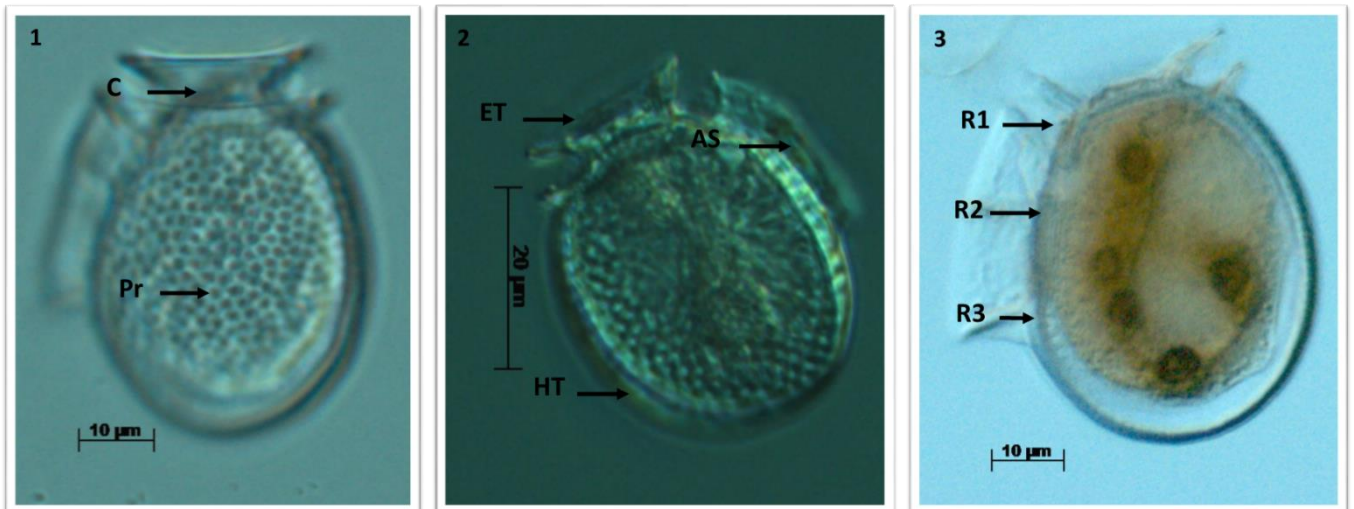


Figura 32.- Micrografías de *Dinophysis acuminata*. Observadas a 40x con DIC. Cíngulo (C), poros (Pr), epiteca (ET), aleta sulcal (AS), hipoteca (HT), radios (R1, R2 y R3). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

### ***Phalacroma rotundata***

En las imágenes se puede observar que son células redondeadas un poco ovaladas, recubiertas por una teca con poros (Pr) en su superficie. En la parte lateral de la célula se presentan dos aletas cingulares lisas y angostas una anterior y otra posterior. La aleta sulcal (AS) izquierda se encuentra sostenida por tres radios. Este organismo presenta una epiteca (ET) pequeña que sobresale por arriba del cingulo (C) y es más redondeada que la hipoteca (HT) (Figura 33).

Dimensiones: 43.32  $\mu\text{m}$  de largo, 36.56  $\mu\text{m}$  de ancho, 3.66  $\mu\text{m}$  de largo del R1, 6.27  $\mu\text{m}$  del R2 y 10.8  $\mu\text{m}$  del R3.

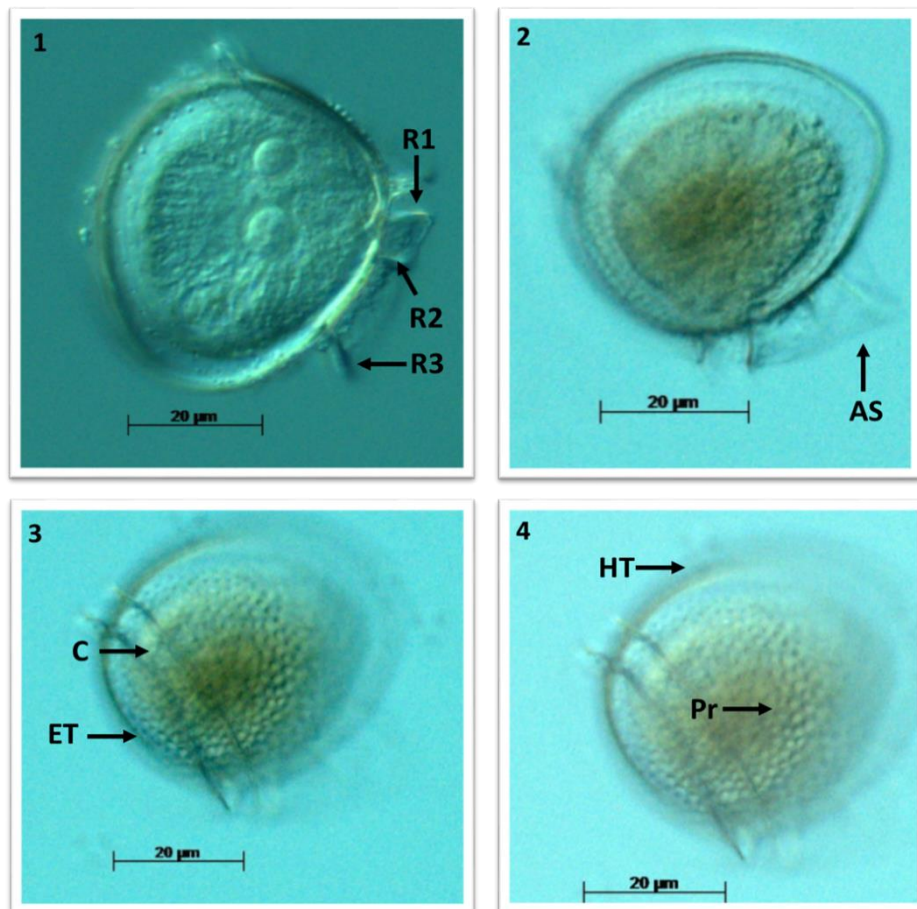


Figura 33.- Micrografías de *Phalacroma rotundata*. Observadas a 40x con DIC. Radios (R1, R2 y R3), aleta sulcal (AS), cingulo (C), epiteca (ET), hipoteca (HT), poros (Pr). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

Además se muestran dos de las cepas aisladas en Bahía Concepción que también se lograron fotodocumentar:

### ***Gyrodinium sp.***

En la Figura 34 se encuentran organismos del cultivo de la cepa CICI 06 (aislado en Bahía Concepción). El organismo presenta un núcleo (N) de gran tamaño localizado en el hipocono, numerosos cloroplastos (CL) de forma ovalados, la forma de estos se puede observar en la Figura 34-1 y 34-2 donde las células se observaron con epifluorescencia, estos se encuentran recubriendo la mayor parte de la célula. En la parte ventral del organismo se puede observar el sulcus (S) y el cíngulo este es ascendente en forma de "Z" (Figura 34.2). En la parte dorsal de la célula también es posible observar el cíngulo (C), profundo dentro del cual corre el flagelo transversal (FT) y se mueve de forma ondulatoria, el cíngulo se encuentra dividiendo a la célula claramente en un epicono (EC) pequeño esto en comparación a la longitud total de la células y tiene una terminación en forma redondeada y finalmente el hipocono (HC) es alargado y de mayor tamaño, representando más de la mitad de la longitud total de la célula.

Dimensiones: Largo 29.22  $\mu\text{m}$ , ancho 19.83  $\mu\text{m}$ , diámetro del núcleo 18.13  $\mu\text{m}$  y ancho del cíngulo 5.49  $\mu\text{m}$ .

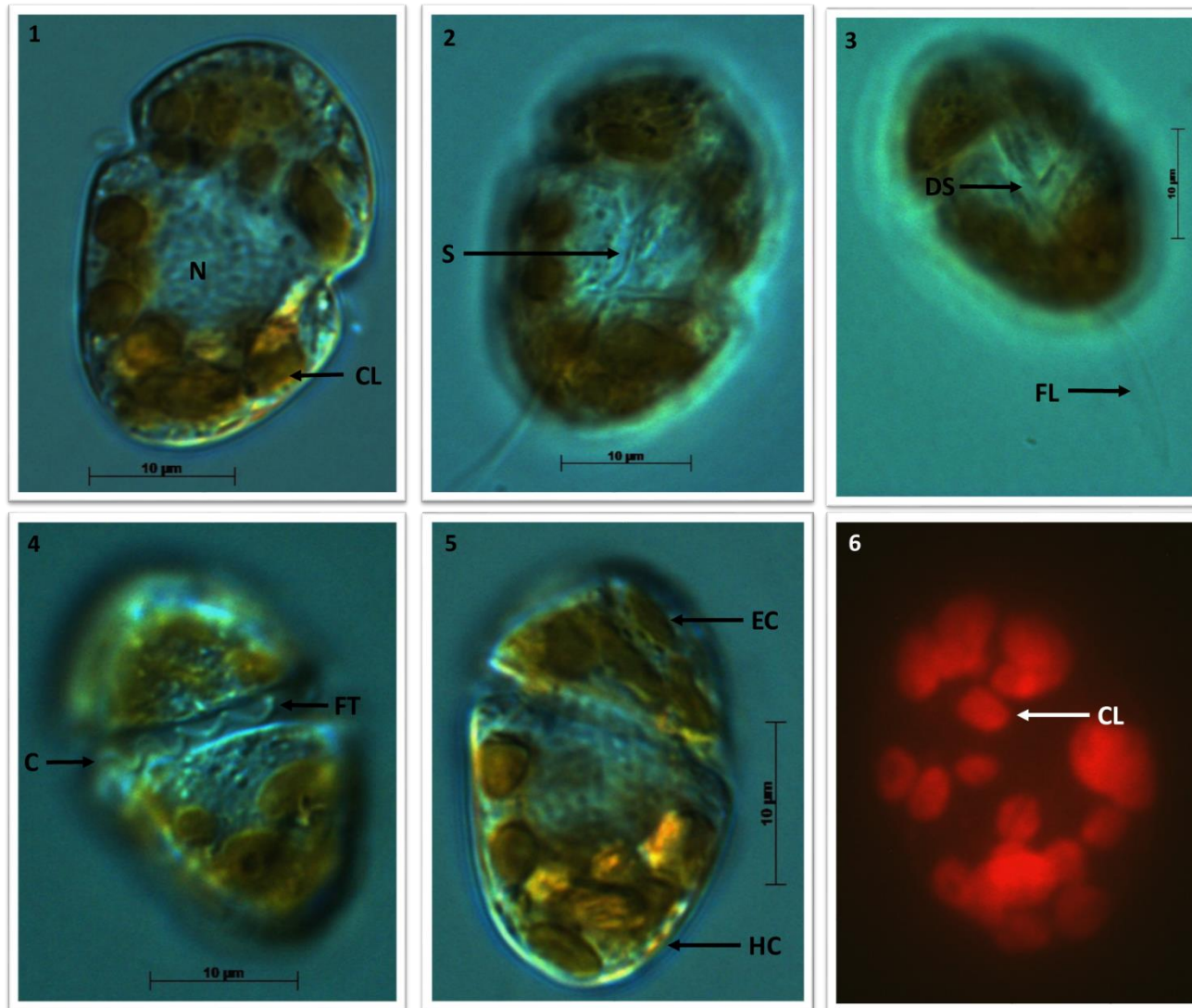


Figura 34.- Micrografía de *Gymnodinium* sp. Observadas a 100x con DIC. Núcleo (N), cloroplastos (CL), sulcus (S), cingulo (C), flagelo transversal (FT), epicono (EC), hipocono (HC), cloroplastos (CL). Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.

## ***Gymnodinium impudicum***

En los cultivos de la cepa BACO 13 se observaron células vegetativas individuales, en cadenas de dos (CD2) y cuatro (CD4) con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC). La morfología de éstas cambiaba, ya que como se observa en la Figura 35-1, las células de los extremos de la cadena el epicono (EP) se ve reducido y redondeado mientras que el hipocono (HC), es más ancho y cuadrangular, por su parte las dos células internas de la cadena se ven más cuadrangulares y comprimidas. En la Figura 35-2 se presentan una cadena de dos células donde es posible distinguir los eyespot (EP), situados en la hipoteca. En la Figura 35-3 se observa una cadena de cuatro células utilizando la técnica de epifluorescencia (EPI) con la cual fue posible diferenciar los cloroplastos (CL). Con la cadena de dos células presentada en la Figura 35-4, se pueden diferenciar claramente el epicono (EC), el cíngulo (C) con su flagelo transversal (FL) y el hipocono (HC). Por ultimo en algunas células individuales se observó una pérdida del cíngulo (C) y los flagelos (F) ya no eran notorios, pero si se observó un gran núcleo (N) al centro de la célula, lo cual pudo deberse a un proceso de enquistamiento.

Dimensiones; Largo 18.92  $\mu\text{m}$ , ancho 15.54  $\mu\text{m}$ .

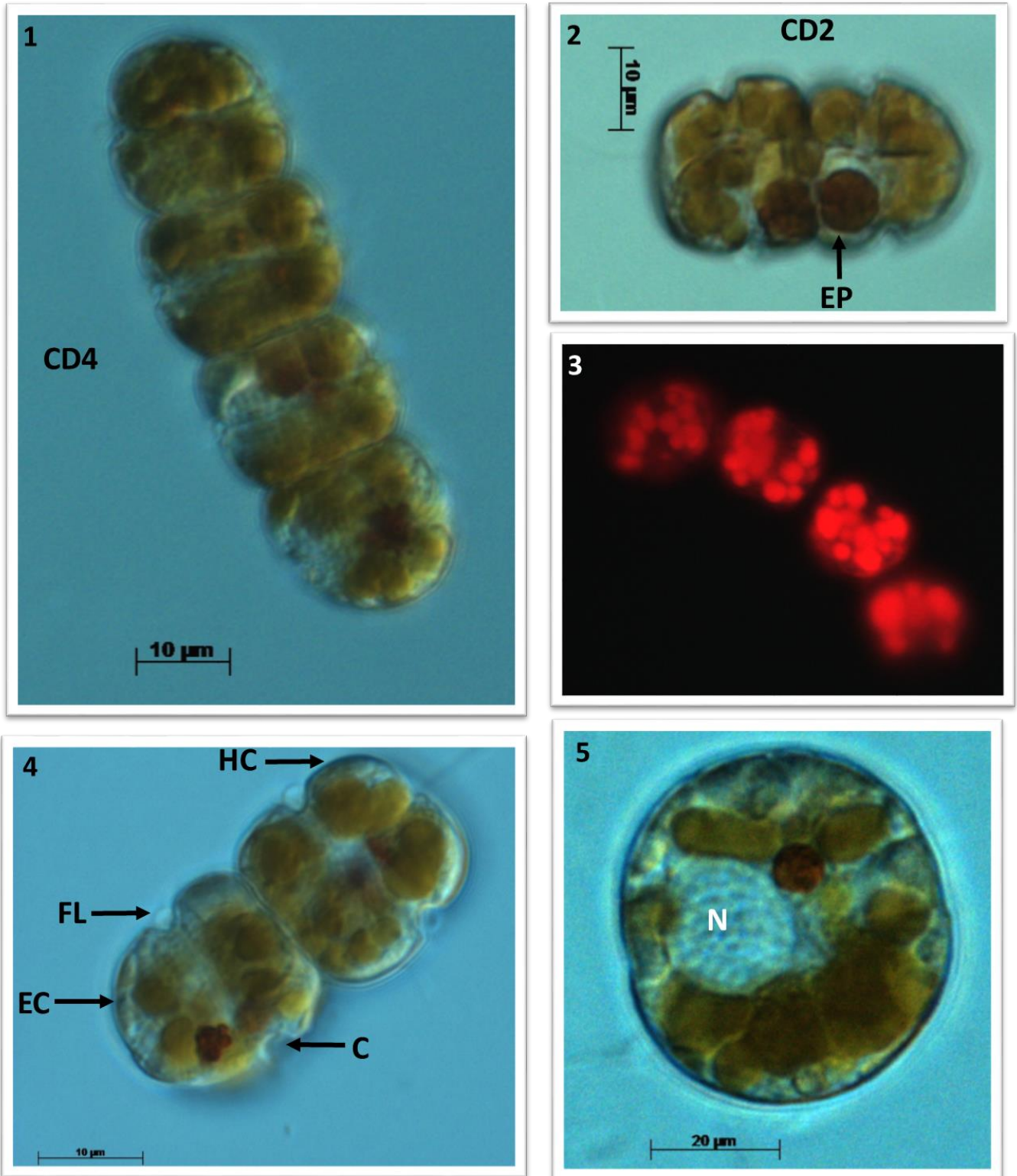


Figura 35.- Micrografías de *Gymnodinium impudicum*. 1 y 2) observadas a 40x con DIC. 3) observada a 40x con EPI. 4 y 5) observadas a 100x con DIC. Cadenas de 2 y 4 células (CD2 y CD4), eyespot (EP), epicono (EC), flagelo transversal (FT), cíngulo (C), hipocono (HC), núcleo (N). 1, 2 y 4 Imágenes tomadas por: Almazán-Becerril. 3 y 5) Imágenes tomadas por: Hernández-Castro.