



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Unidad Académica Mazatlán
Universidad Nacional Autónoma de México



**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA DE
Gymnodinium catenatum Graham, 1943 (CULTIVO, MEDIO DE
CULTIVO Y CÉLULAS) EN POSTLARVAS DE *Litopenaeus*
vannamei Boone, 1931**

TESIS

**Que para obtener el grado académico
de Maestro en Ciencias**

P r e s e n t a:

Ing. Ruth Arely Pazos Mandujano

Director de Tesis:

Dra. Rosalba Alonso Rodríguez

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Miguel Betancourt Lozano

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dr. Domenico Voltolina

Dr. Faustino Rodríguez Romero

Mazatlán, Sinaloa, Enero de 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios, por estar siempre iluminando mi camino y dirigiendo mis pasos.

A mis padres.

A ti mamá por tu amor y fortaleza que nos transmites y a ti papá por tu confianza, y por ser el apoyo más importante en mi vida.

A ustedes hermanos.

A ti hermano por tu nobleza y gran corazón, y por mostrarnos deseos de superación, empeño y ganas de salir adelante, y a ti hermana por estar siempre conmigo desde el primer momento y por compartir juntas etapas inolvidables de nuestras vidas. A los dos por esta a mi lado y por existir.

Y a toda mi familia y amigos por formar parte de mi vida y de mi pensamiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM), por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado, así como permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme otorgado una beca para estudios de Maestría en Ciencias en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM) U. A Mazatlán.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECyT) del Estado de Sinaloa, por apoyarme con una Beca para Terminación de Tesis de Maestría.

A la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez por su dirección, por compartir sus conocimientos, por su tiempo, confianza y apoyo para concluir este trabajo.

Al Dr. Miguel Betancourt Lozano por compartir su experiencia profesional, por sus consejos y asesorías, y por su grandioso apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr. Domenico Voltolina por brindarme su gran conocimiento y sus valiosas aportaciones y sugerencias para realizar este trabajo, además de su gran cordialidad.

Al Dr. Roberto Arreguín y al Dr. Faustino Rodríguez por aceptar formar parte en la orientación y desarrollo de este trabajo y por su tiempo y disposición para compartir sus conocimientos y experiencias profesionales.

Al Dr. Jeffrey Van de Riet por su ayuda en la realización de los análisis de toxinas.

A la Dra. Luz María de la Parra por su asesoramiento y disponibilidad para apoyar este trabajo, así como al laboratorio de Ecotoxicología del CIAD Mazatlán por hacer uso de sus instalaciones.

A la M. en C. Judith González y al laboratorio de producción de postlarvas de camarón Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. por su apoyo en la donación de las postlarvas para realizar los experimentos.

Al Ing. Carlos Urías por su desinteresada ayuda en la obtención de postlarvas para los experimentos.

Al Ing. Gilberto Acosta por su incondicional apoyo técnico, ayuda y compañía en la parte experimental y durante el desarrollo y terminación de este trabajo.

A las M. en C. Gladys Martínez y Elizabeth Frausto por su apoyo en el mantenimiento y escalamiento del cultivo del dinoflagelado, además por su disponibilidad y buenos ratos.

Al M. en C. Jesús Manuel Quintero por apoyarme compartiendo sus conocimientos, por su ayuda durante la etapa experimental de este trabajo y sobre todo por su amistad.

A la Ing. Zinthia Bieaney Salazar Martínez por su participación y ayuda en el laboratorio y por su amistad.

Al Mat. Germán Ramírez, por su tiempo, disponibilidad y ayuda en aclarar dudas.

A la Sra. Clara Ramírez por su eficiente apoyo en la obtención de bibliografía.

A mis padres el Sr. Jesús A. Pazos y la Sra. Adriana Mandujano, por ser mi fortaleza y mi ejemplo a seguir, además de ser las personas más importante de mi vida.

A mis hermanos Grisel Adriana y Jesús Alberto por su apoyo y compañía durante los experimentos, a las Sras. Aurora (mamá Lola) y Teresa, a mis tíos, René, Jaime, Jesús Francisco y Rosario (mamá Kiro), y a toda mi familia porque directa o indirectamente contribuyeron en la realización y terminación de este trabajo.

A mi gran amiga M. en C. Sara Bojórquez por sus consejos, recomendaciones, ayuda y principalmente por todos los momentos compartidos además de su amistad.

A otra de mis grandes amigas M. en C. Carolina Bojórquez por ayudarme desinteresadamente en el cuidado de las postlarvas y por su confianza e invaluable amistad.

A los que fueron mis compañeros de laboratorio y de maestría: Karen Brito, Magdalena Bergez, Cristina Osuna, Daniel Olvera, Perla Mellado, Gladys, Jeannette, Any, Vicia, Ambar, Tomasa y Jorge.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para que este trabajo llegara a su fin.

Gracias a todos

ÍNDICE

Contenido:	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Toxinas paralizantes en crustáceos.....	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	12
5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	13
6. OBJETIVOS.....	14
6.1 Objetivo General.....	14
6.2 Objetivos Específicos.....	14
7. METODOLOGÍA.....	15
7.1 Origen de la cepa.....	15
7.2 Cultivo de dinoflagelados.....	15
7.3 Aclimatación de postlarvas.....	15
7.4 Diseño experimental.....	16
7.5 Recolección de muestras.....	17
7.6 Determinación de toxinas.....	18
7.6.1 Extracción de toxinas.....	18
7.6.2 Determinación de toxinas en cultivo, medio de cultivo y células.....	19
7.6.3 Determinación de toxinas en postlarvas de <i>L. vannamei</i>	22
7.7 Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	22

8. RESULTADOS.....	24
8.1 Experimento.....	24
8.2 Determinación de toxinas.....	25
8.2.1 Determinación de toxinas en cultivo, medio de cultivo y células.....	25
8.2.2 Determinación de toxinas en postlarvas de <i>L. vannamei</i>	27
8.3 Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	28
9. DISCUSIONES.....	30
10. CONCLUSIONES.....	40
11. RECOMENDACIONES.....	41
12. LITERATURA CITADA.....	42
ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido:	Pág.
Figura 1. Estructura química de las toxinas paralizantes (Hernández-Sandoval <i>et al.</i> , 2009).....	5
Figura 2. Concentración Letal Media (CL ₅₀) obtenida a 8, 14 y 24 h, para los tratamientos CTV y MC expresada en concentración celular y de toxinas.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido:	Pág.
Tabla 1. Mortalidad (%) de postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones de los tratamientos (CTV, MC y CE) durante 24 horas.....	24
Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones (Cél/L) para el tratamiento CTV durante 24 horas.	24
Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestas a diferentes concentraciones (Cél/L) para el tratamiento MC durante 24 horas.....	25
Tabla 4. Porcentaje molar de cada toxina en los tratamientos CTV, MC y CE correspondientes al cultivo de <i>G. catenatum</i> (cepa GCMQ-2).....	26
Tabla 5. Concentración y composición de toxinas en los tratamientos CTV, MC y CE empleadas en el experimento.....	26
Tabla 6. Concentración de TPs para los tratamientos CTV, MC y CE de acuerdo a la mortalidad (%) y a las concentraciones basadas en número de células empleadas en el experimento.....	27
Tabla 7. Determinación de saxitoxina por prueba ELISA en postlarvas.	27
Tabla 8. Concentración Letal Media (CL ₅₀) de acuerdo a concentración celular y de toxinas para postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el tratamiento CTV a 8, 14 y 24 h.....	29
Tabla 9. Concentración Letal Media (CL ₅₀) de acuerdo a concentración celular y de toxinas para postlarvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> en el tratamiento MC a 8,14 y 24 h.....	29
Tabla 10. Concentración celular de TPs (µg STXeq/Cél) en cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i>	33

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la concentración letal media (CL_{50}) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* para postlarvas (PL) de *Litopenaeus vannamei*, realizando experimentos de exposición aguda durante 24 horas a siete concentraciones de los siguientes tres tratamientos: cultivo (CTV), medio de cultivo (MC) y células (CE), y se analizaron las toxinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La biomasa del dinoflagelado se obtuvo por medio del cultivo de una cepa aislada de la bahía de Mazatlán (GCMQ-2), la cual fue crecida en medio de cultivo GSe y en condiciones controladas de laboratorio (salinidad 35, ciclos de luz obscuridad 12:12 hrs, $75 \mu E / m^2 / s$ de flujo de fotones y temperatura de $23 \text{ }^\circ C$). El perfil tóxico del cultivo de *G. catenatum* determinado por HPLC se integró por las toxinas STX, NeoSTX, GTX2, GTX3, C1 y C2, con una toxicidad de $3.54 \times 10^{-4} \mu g \text{ STXeq/Cél}$ para el tratamiento CTV, $3.54 \times 10^{-4} \mu g \text{ STXeq/Cél}$ para el tratamiento MC y $7.26 \times 10^{-6} \mu g \text{ STXeq/Cél}$ para el tratamiento CE. Se obtuvo una CL_{50} de $2.84 \times 10^2 \mu g \text{ STXeq/mL}$ ($8.01 \times 10^5 \text{ Cél/L}$) para el tratamiento CTV y $3.00 \times 10^2 \mu g \text{ STXeq/mL}$ ($8.47 \times 10^5 \text{ Cél/L}$) para el tratamiento MC; para el caso de la exposición a células (CE) no se logró calcular la CL_{50} ya que los resultados indicaron que la mayor concentración de exposición a este tratamiento produjo un porcentaje de mortalidad inferior al 5%, mientras que para el tratamiento con cultivo y medio de cultivo, el porcentaje de mortalidad fue de 100% para ambos casos a esa misma concentración. Por medio del inmunoensayo ELISA, se determinó concentración de saxitoxinas en postlarvas expuestas a los tratamientos CTV y MC, la cual resultó de $1.10 \mu g \text{ STXeq/g}$ de PL para ambos tratamientos. En base a los resultados de los análisis de HPLC, la prueba ELISA y de la determinación de la CL_{50} , se confirma que las postlarvas de camarón expuestas al dinoflagelado *G. catenatum* mueren en función de la concentración de toxinas paralizantes de tipo hidrosoluble, y que la exposición directa es la principal causa de mortalidad.

ABSTRACT

The median lethal concentration (LC_{50}) of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on postlarvae (PL) *Litopenaeus vannamei* was evaluated by experiments of acute exposure (24 h) to seven concentrations of three treatments: culture (CTV), medium (MC) and cells (CE). Toxins were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Dinoflagellate biomass was obtained growing in GSe culture medium a strain isolated from the Mazatlan Bay (GCMQ-2) under controlled laboratory conditions (salinity 35, dark light cycles 12:12 h, $75 \mu E / m^2 / s$ photoflux and $23 \text{ }^\circ C$). The toxic profile of *G. catenatum* cultures determined by HPLC was integrated by STX, NeoSTX, GTX2, GTX3, C1 and C2 toxins; results of toxicity were $3.54 \times 10^{-4} \mu g \text{ STXeq/Cell}$ for CTV treatment, $3.54 \times 10^{-4} \mu g \text{ STXeq/Cell}$ for MC treatment and $7.26 \times 10^{-6} \mu g \text{ STXeq/Cell}$ for CE treatment. LC_{50} obtained were $2.84 \times 10^2 \mu g \text{ STXeq/mL}$ ($8.01 \times 10^5 \text{ cell/L}$) for CTV treatment and $3.00 \times 10^2 \mu g \text{ STXeq/mL}$ ($8.47 \times 10^5 \text{ cell/L}$) for MC treatment; LC_{50} for exposure to cells in CE treatment could not be estimated because the highest exposure ($2.00 \times 10^6 \text{ cells/L}$) gave $< 5\%$ mortality while in the treatments with culture and with culture medium, the mortality was 100% at the same concentration. Using the ELISA assay, toxin concentration was 1.10 g STXeq/g of PL and it was determined in postlarvae exposed to treatments CTV and MC. Based on the results of the liquid chromatography analysis, ELISA and determination of the LC_{50} , it was confirmed that mortality of shrimp postlarvae by the dinoflagellate *G. catenatum* exposure depends on the concentration of hydrosoluble paralytic toxins, and that the direct exposure is the main reason of mortality.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la industria del cultivo de camarón se ha expandido a lo largo de las costas tropicales y subtropicales, la producción mundial del camarón cultivado ha aumentado de 213,600 toneladas en 1985 a 3,399,105 toneladas en 2011. Se estima que entre 1 y 1,5 millones de hectáreas de terreno a lo largo de las costas del mundo, están cubiertas por granjas camaroneras (FAO, 2011).

En la actualidad, el cultivo de camarón en México es la principal industria acuícola del país (130,000 toneladas producidas en 2008) y los líderes de esta producción son los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit. Sinaloa es actualmente el estado con mayor cantidad de granjas camaroneras, se encuentran más de 502 granjas camaroneras y laboratorios, y la producción supera las 34,000 toneladas al año (Ponce-Palafox *et al.*, 2011; SAGARPA-CONAPESCA, 2011).

En Sinaloa, la mayoría de las actividades de cultivo de camarón son de monocultivo semi-intensivo con uno o dos ciclos por año. Por lo general, las granjas se abastecen de agua de fuentes naturales, principalmente de sistemas lagunares o directamente del mar. En vista de la falta de pre-tratamiento de esta agua, un alto porcentaje de organismos planctónicos provenientes de los cuerpos de agua de abastecimiento, pueden introducirse en los estanques de cultivo desde el momento en que estos se inundan, al inicio de un nuevo ciclo de cultivo (Páez-Osuna, 2001b; Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Existe una relación entre la cantidad y calidad del fitoplancton y el desarrollo del camarón en estanques semi-intensivos. Por este motivo, se estimula el crecimiento fitoplanctónico por medio de la aplicación de fertilizantes inorgánicos. Sin embargo, estas prácticas convierten los estanques de cultivo en ambientes eutróficos, por lo cual en ocasiones se desarrollan especies nocivas, cuyas concentraciones pueden alcanzar

hasta 3.0×10^9 Cél/L durante los florecimientos, que afectan el buen desarrollo del camarón (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a).

Aproximadamente 300, de todas las especies de microalgas existentes se pueden presentar ocasionalmente en concentraciones tan elevadas que causan un cambio de color en la superficie del mar, en las denominadas “mareas rojas” (Gerssen *et al.*, 2010). La palabra “floración” o “florecimiento” se emplea para indicar el crecimiento explosivo de cualquiera de estos organismos, cuyo color conferido al agua varía, dependiendo de los pigmentos de los organismos presentes. Aunque la mayoría de estos eventos son inocuos o incluso benéficos, se conocen actualmente, más de 135 especies fitoplanctónicas que pueden dar lugar a Florecimientos Algales Nocivos (FANs), que provocan daños a organismos o ecosistemas; 65 de estas especies pueden producir potentes toxinas (IOC-UNESCO, 2011).

Los FANs pueden formarse por especies productoras y no productoras de toxinas. No todas las especies nocivas producen toxinas, y existen algunas cuyas proliferaciones pueden ocasionar la muerte de organismos en el medio marino sin la producción de toxinas, ya que cuando están presentes en concentraciones elevadas pueden causar una disminución del contenido de oxígeno disuelto en el agua o dañar mecánicamente las branquias de los peces. Entre las principales especies formadoras de los FANs que causan importantes impactos sobre la salud humana, el medio ambiente, el turismo y la acuicultura, se encuentran representantes de los dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias (Assadi *et al.*, 2007; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011).

Las microalgas son el alimento natural de moluscos bivalvos filtradores, de ciertos peces herbívoros y de larvas de diferentes organismos marinos, como moluscos y crustáceos, que a su vez son recursos marinos para los seres humanos. Sin embargo, son muchos los casos de floraciones de

algas que han sido asociadas a severas intoxicaciones y muerte de seres humanos, mamíferos marinos, peces, crustáceos y aves (Suárez y Guzmán, 1998; FAO, 2005; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011).

Entre los efectos negativos de los FANs, destacan las intoxicaciones por consumo de mariscos o peces que contienen biotoxinas, como las paralizantes (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning), diarreicas (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning), amnésicas (ASP, Amnesic Shellfish Poisoning), neurotóxicas (NSP-Neurotoxic Shellfish Poisoning) y de Intoxicación por Ciguatera (CFP, Ciguatera Fish Poisoning). Aparte de los mencionados, otros efectos negativos de estas toxinas son la muerte masiva de organismos marinos, incluidos los de cultivo y el deterioro de la calidad de las aguas (Gerssen *et al.*, 2010).

Se ha documentado la presencia de los FANs en los estanques de cultivo; los ambientes eutróficos resultan muy favorables para la proliferación de especies tóxicas como *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, *Dinophysis* spp., *Pseudonitzschia pungens*, *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium mikimotoi*, provocando pérdidas económicas a la industria del cultivo de peces y del camarón (Páez-Osuna, 2001a; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a).

Las biotoxinas algales son metabolitos secundarios que varían en estructura, composición atómica, y actividad funcional, que son producidos por microorganismos marinos (algas) y son venenosos para otros organismos (Granéli y Turner, 2006).

El impacto de las toxinas producidas por microalgas en acuicultura puede ocurrir de dos maneras: 1) por ingestión de fitoplancton tóxico por parte de los organismos en cultivo; 2) por el contacto (absorción a través de membranas) de los organismos en cultivo con la toxina disuelta en el

agua después de la lisis celular del organismo toxigénico (Ochoa *et al.*, 2004).

La exposición crónica a estos compuestos puede provocar efectos letales o sub-letales en organismos en el medio natural o en cultivo. Algunos de los efectos son: anormalidades en los hábitos alimenticios, comportamiento extraño, disfunciones fisiológicas, reducción de tallas, crecimiento y reproducción, aumento de susceptibilidad a enfermedades, inmunosupresión, patologías de índole tóxico y desarrollo de tumores (Landsberg, 2002; Ochoa *et al.*, 2004).

Algunas especies de dinoflagelados producen toxinas muy potentes, que pueden ser transferidas en la trama alimenticia y afectar a la salud humana, ocasionando parálisis, diarreas muy severas, irritación en ojos y vías respiratorias, amnesia y diversos síntomas neurológicos, que en algunos casos son irreversibles o fatales (Batoréu *et al.*, 2005; Morquecho, 2008a).

Las toxinas paralizantes (TPs) son potentes neurotoxinas hidrosolubles, son alcaloides de bajo peso molecular que constituyen un grupo de compuestos estrechamente relacionados derivados de la saxitoxina, se acumulan en los mariscos al ingerir las algas que las producen (Batoréu *et al.*, 2005; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2006; Kwong *et al.*, 2006; Campás *et al.*, 2007; Wang, 2008; Jester *et al.*, 2009). La ingestión de estos mariscos contaminados causa en el ser humano EPM (Envenenamiento Paralizante por consumo de Mariscos). Los síntomas de esta intoxicación, pueden presentarse como un entumecimiento o picazón leve hasta la parálisis respiratoria, que en casos fatales ocurre entre dos y doce horas después de la ingestión (Rojas *et al.*, 2002; FAO, 2005; Campás *et al.*, 2007; Botana, 2009).

Las TP's son compuestos tóxicos producidos por algunas especies de dinoflagelados y cianobacterias que, de acuerdo a su estructura química pueden ser clasificadas o divididas en: 1) carbamato (STX, neoSTX) y las gonyautoxinas (GTX1-4), 2) N-sulfo-carbamoil (GTX5-6, C1-4), 3) decarbamoil (dc-) (dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1-4) y 4) compuestos de desoxidecarbamoil (do-) (doSTX, doneoSTX y doGTX1) (Figura 1).

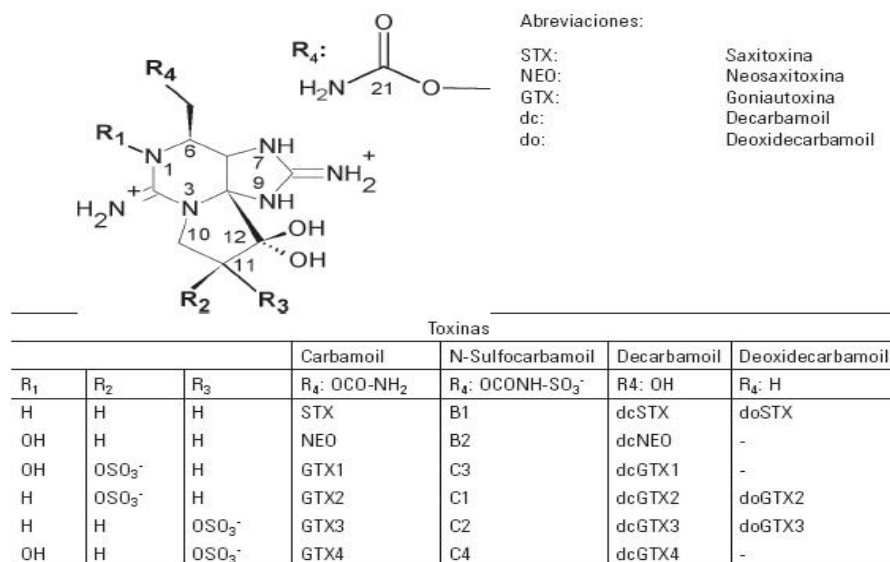


Figura 1. Estructura química de las toxinas paralizantes (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009).

Se han identificado al menos 21 derivados hidrofílicos que son fuente de envenenamiento de tipo EPM, principalmente a partir de los dinoflagelados *Alexandrium* spp., *G. catenatum*, y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* y de mariscos que se alimentan de algas tóxicas (FAO, 2005; Wang, 2008; Clemente *et al.*, 2009; Kalaitzis *et al.*, 2009; Botana, 2009). Recientemente se ha documentado que el dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* produce una nueva subclase de toxinas paralizantes, las cuales contienen en la cadena lateral, una fracción hidrofóbica formada por un hidroxibenzoato en lugar del grupo carbamoil (toxinas GC) (Vale, 2008a).

La saxitoxina es la principal toxina paralizante, pertenece a la familia de neurotoxinas y es una de las más potentes toxinas conocidas, bloquea el

movimiento del ión sodio a través de la membrana celular nerviosa, paralizando el flujo del impulso nervioso (Rojas *et al.*, 2002; Gerssen *et al.*, 2010), lo cual daña el funcionamiento celular, inhibe las señales eléctricas, la actividad nerviosa y la comunicación sináptica, causando los síntomas de EPM (Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006; Kwong *et al.*, 2006; Botana, 2009).

Los métodos usados para determinar TPs en organismos marinos son biológicos, entre los cuales se encuentra el bioensayo en ratón, los inmunoenzimáticos como la prueba ELISA y químicos como la cromatografía líquida de alta resolución (Rojas *et al.*, 2002). El método más efectivo para confirmar y determinar el perfil de la toxina en organismos afectados es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Sullivan *et al.*, 1985; Campás *et al.*, 2007; Botana, 2009; Reis-Costa *et al.*, 2009; Garet *et al.*, 2010).

Se han documentado eventos de mortandad de camarón en Sinaloa en 1999, 2001 y 2003, asociados a la presencia del dinoflagelado *G. catenatum* que produce toxinas paralizantes, las cuales tienen la característica de producirse y contenerse dentro de la célula (intracelulares), pero además por ser hidrofílicas, pueden encontrarse disueltas en el agua (toxinas extracelulares) afectando a una gran variedad de organismos como peces, mamíferos marinos e invertebrados como moluscos y crustáceos entre otros (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004, 2005, 2006).

Este trabajo se realizó con el fin de determinar la concentración letal media para postlarvas de camarón por exposición a toxinas hidrofílicas producidas por *G. catenatum*, comparar las liberadas al medio con respecto a las toxinas contenidas en la célula y verificar si ambas corresponden al mismo perfil tóxico.

2. ANTECEDENTES

En 1927, investigadores de la Universidad de California observaron un florecimiento de dinoflagelados alrededor de un lecho de mejillones, y documentaron que la gente sufrió parálisis y murió después de comer los mejillones. Los investigadores sospecharon que el dinoflagelado encontrado (*Alexandrium catenella*) era venenoso, ya que el agua extraída de ellos y de los mejillones mataban ratones de la misma manera (Schantz *et al.*, 1957). La causa del envenenamiento paralizante por moluscos (EPM), es la ingestión de moluscos bivalvos contaminados con uno o más derivados de las toxinas paralizantes. La incidencia de EPM en humanos, hasta 2002, eran 2,235 casos de intoxicación registrados, principalmente en Norteamérica (Batoréu *et al.*, 2005).

Durante los últimos años, los informes de los FANs y la presencia de *G. catenatum* en varias bahías a lo largo de la costa del Pacífico ha aumentado (Band-Schmidt *et al.*, 2010). En México, uno de los primeros casos de intoxicación por consumo de moluscos documentados ocurrió en Mazatlán, Sinaloa en 1979 (Mee *et al.*, 1986). La primera EPM atribuida a *G. catenatum* se produjo desde la costa de Sonora al estado de Jalisco en 1979, durante este evento se produjeron tres muertes y 19 intoxicaciones humanas por mariscos, las víctimas más afectadas fueron entre cinco y 14 años de edad (De la Garza-Aguilar, 1983; Mee *et al.*, 1986). A la fecha este tipo de envenenamiento es uno de los más peligrosos en México, causando un porcentaje aproximado del 72% de los brotes de envenenamiento por alimentos marinos que han ocurrido en la última década en México.

Tres de estos eventos representan 87% de los casos de envenenamiento registrados (460 individuos intoxicados, 32 muertes), y las áreas más afectadas fueron Mazatlán, Guerrero y Oaxaca. Por otra parte, un gran número de organismos marinos (peces y tortugas) también son afectados por los brotes de EPM (Saldate-Castañeda *et al.*, 1991; Ronsón-Paulín, 1999; Cortés-Lara, 2002).

Gárate-Lizárraga *et al.* (2006), en un estudio para conocer el perfil de toxinas paralizantes en muestras de fitoplancton de Bahía Concepción, México, en el cual determinaron un perfil de nueve toxinas de este tipo (STX, neoSTX, GTX2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, B1, C1, C2), observaron también que en todas la muestras de fitoplancton donde se encontraba *G. catenatum* estaban presentes al menos algunas de estas nueve toxinas.

2.1 Toxinas paralizantes en crustáceos

La mayoría de los estudios que se han realizado a escala global sobre toxicidad de toxinas paralizantes se han enfocado hacia los efectos y cuantificación de toxinas en organismos marinos como moluscos, peces y aves, además de estudiar las toxinas contenidas en las microalgas productoras (Blanco *et al.*, 2003; Shumway *et al.*, 2003; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004).

En cuanto a crustáceos, son pocos los estudios realizados y la gran mayoría se limita a investigaciones realizadas mediante experimentos en laboratorio y sólo en algunas especies de crustáceos. En Taiwán, las toxinas paralizantes producidas por el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* (*Gonyaulax tamarensis*) causó mortandad de *Penaeus monodon* en 1989 (Su *et al.*, 1993).

Sephton *et al.* (2007), determinaron la concentración y contribución individual de toxinas paralizantes (perfil de las toxinas), en el contenido total de toxinas en muestras de fitoplancton, zooplancton, salmón, bivalvos y langostas obtenidas de la Isla Grand Manan, en la bahía de Fundy (Canadá), durante un florecimiento de *Alexandrium fundyense*. Los niveles de toxinas paralizantes en langostas se presentaron arriba de los límites regulatorios (80 µg STXeq/100 g) y fueron detectados en hepatopáncreas (447.26 µg STXeq/100 g), estómago (85.21 µg STXeq/100 g), y con bajos niveles (<16 µg STXeq/100 g) en la cola, gónadas y branquias.

En el sur de Sinaloa se presentaron eventos de mortandad de nauplios en laboratorios de producción de postlarvas, durante los meses de febrero a mayo de 1997, especulándose una toxicidad procedente del suministro de agua junto con la aparición de mareas rojas producidas por *Ceratium dens*, *Pseudonitzschia* spp. y *G. catenatum*; se realizó un extracto con nauplios y se hizo un bioensayo en ratones, en los cuales se observaron síntomas de intoxicación pero no la muerte, con cierta recuperación después de una hora del inicio de la exposición intraperitoneal (Cortés-Altamirano y Alonso-Rodríguez, 1997).

Durante los meses de febrero y mayo de 2001, se presentó otra serie de eventos de mortandad de nauplios y de camarón adulto en laboratorios de producción de larvas de camarón, estanques de cultivo y la zona de playa. La mortandad coincidió con una serie de mareas rojas de *G. catenatum* en la costa de Sinaloa (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b).

Pérez-Linares *et al.* (2008) efectuaron un estudio para explorar el efecto de las toxinas paralizantes de los mariscos (EPM) producidas por *G. catenatum*, en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a través de una exposición aguda intramuscular de extractos de toxina a diferentes dosis, el camarón mostró un comportamiento anormal cuando fueron inyectadas dosis mayores de 0.22 µg/g STXeq, la muerte se observó a dosis mayores de 1.1 µg/g STXeq, mientras que a dosis más bajas se presentaron parálisis de pereiópodos, desequilibrio y espasmos abdominales.

En otra investigación se examinaron y verificaron los efectos tóxicos en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas durante 48 horas, a *G. catenatum* (cepa GCCV 6) y *Karenia brevis* (cepa KBTX 3) a diferentes concentraciones (10^3 , 10^4 y 10^6 Cél/L). Los resultados indicaron que la glándula gástrica y el músculo fueron más susceptibles a retener estas

toxinas y también mostraron una capacidad lenta de depuración/transformación.

Ensayos de toxicidad aguda demostraron buenas tasas de supervivencia del camarón con bajas densidades de dinoflagelados (10^3 Cél/L), mientras que a densidades mayores ($>10^4$ Cél/L) se observó comportamiento anormal (letargia, parálisis de pereiópodos, espasmos abdominales y movimientos irregulares de antenas y pleópodos) y muerte (Pérez-Linares *et al.*, 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las toxinas paralizantes producidas por el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* han ocasionado la muerte de una gran variedad de organismos en el medio natural y causan mortandad de peces y postlarvas de camarón en sistemas de cultivo.

No se conoce la proporción de la cantidad de las toxinas hidrofílicas liberadas por *G. catenatum* al medio con respecto a las toxinas contenidas en la célula, o si existen diferencias en el perfil tóxico. Tampoco se conoce la concentración letal media de estas toxinas sobre postlarvas de camarón.

4. JUSTIFICACIÓN

Muchas de las mareas rojas tóxicas que producen EPM en México han sido registradas en el Pacífico mexicano y son producidas por *G. catenatum* (Rojas *et al.*, 2002; Band-Schmidt *et al.*, 2006). El camarón está expuesto a la toxicidad de este dinoflagelado durante los ciclos de siembra y cosecha (primavera-verano, verano-otoño) debido a que los periodos de inicio (primer ciclo entre febrero y marzo; segundo ciclo entre junio y agosto) coinciden con los periodos de mayor frecuencia de FANs de *G. catenatum*, que ocurren principalmente de febrero a mayo, desaparecen entre junio y octubre, para presentarse nuevamente durante el invierno (Cortés-Altamirano y Núñez-Pastén, 1992).

Para explicar eventos de mortandad de camarón en el medio natural y en sistemas de cultivo en presencia del dinoflagelado tóxico *G. catenatum*, se requiere conocer la concentración letal media y si el efecto se debe a la exposición directa a estas toxinas.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En experimentos de exposición aguda de postlarvas de camarón a toxinas paralizantes producidas por el dinoflagelado *G. catenatum*, se espera que las postlarvas mueran en respuesta a la concentración de toxinas paralizantes de tipo hidrofílico, resultando una concentración letal media menor en las postlarvas expuestas al cultivo (CTV) y al medio de cultivo (MC) con respecto a las células (CE).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* en postlarvas de camarón *L. vannamei*, estimando la concentración letal media (CL₅₀) y analizando la concentración de toxinas y el perfil tóxico en tres tratamientos: cultivo (CTV), medio de cultivo (MC) y células (CE), así como en el tejido de postlarvas expuestas a siete concentraciones del dinoflagelado durante 24 h.

6.2 Objetivos específicos

- Comparar la toxicidad resultante de los tres tratamientos.
- Determinar la concentración de toxinas y perfiles tóxicos en los tres tratamientos.
- Determinar la concentración de saxitoxina en las postlarvas expuestas.
- Estimar la Concentración Letal Media (CL₅₀), expresándola en concentración celular (Cél/L) y concentración de toxinas (µg STXeq/mL).

7. METODOLOGÍA

7.1 Origen de la cepa

La cepa de *Gymnodinium catenatum*, nativa de la bahía de Mazatlán con clave GCMQ-2, se obtuvo de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La cepa se aisló y estableció en el año 2000 a partir de la germinación de quistes (Morquecho, 2008b).

7.2 Cultivo del dinoflagelado

La cepa de *Gymnodinium catenatum* se mantuvo en condiciones de 12:12 h luz/obscuridad a temperatura de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ para su aclimatación, y posteriormente se inoculó en tubos de 20 mL con medio líquido GSe enriquecido con selenio preparado de acuerdo a Doblin *et al.* (1999).

Una vez que el inóculo incrementó su densidad se transfirió a matraces de 125 mL, colocando el mismo volumen de medio de cultivo (50:50 v:v), dejando dos tercios del volumen del matraz libre. Cuando nuevamente el matraz adquirió color, se transfirió a un matraz de mayor volumen, siguiendo la proporción 50% inóculo 50% medio de cultivo hasta completar 4 L (Martínez-Tecuapacho, 2009).

Las condiciones de cultivo fueron, salinidad de 35‰, con ciclos de luz obscuridad 12:12 h, flujo de fotones de $75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ a 23°C .

7.3 Aclimatación de postlarvas

El experimento se realizó con postlarvas de *L. vannamei* de 28 días de edad (PL₂₈) provenientes de los laboratorios de producción de postlarvas Maricultura del Pacífico S.A. de C.V. y Aquapacific S.A de C.V.

A su llegada al laboratorio, las postlarvas (PL₂₀) se mantuvieron durante uno ó dos días en las condiciones de recepción (30°C , pH 7-8, salinidad 30‰) en acuarios de 40 L de capacidad. Las condiciones requeridas para

conservar las condiciones del dinoflagelados y llevar a cabo el experimento fueron: temperatura 23°C, pH entre 7 y 8, salinidad 35‰ y fotoperiodo 12:12 horas, usando agua de mar filtrada y esterilizada (pre-filtro, carbón activado, UV) y aireación. Durante la aclimatación, se realizó un recambio de agua cada 24 horas.

La temperatura y la salinidad se ajustaron a una tasa de 1°C y 1‰ por día hasta alcanzar la temperatura de 23°C y salinidad 35‰. Una vez alcanzadas las condiciones adecuadas, los organismos se mantuvieron en estas condiciones al menos durante cinco días antes de los ensayos.

7.4 Diseño experimental

Se realizaron experimentos preliminares, con el objeto de determinar las concentraciones nominales a utilizarse en el experimento definitivo.

En todos los experimentos se consideraron 2 tipos de blancos de prueba con repeticiones, uno con agua de mar y medio de cultivo no utilizado previamente para el cultivo de *G. catenatum* (BCO MC) y el otro solamente agua de mar filtrada (BCO SW), colocando la misma cantidad de organismos (10) que en los demás recipientes de prueba.

Durante todos los experimentos, los organismos fueron alimentados con alimento comercial balanceado micro-encapsulado (proteína 40%, grasa 4%, fibra 4%), suministrado dos veces al día, de la misma manera que durante el periodo de aclimatación. El volumen de trabajo en cada recipiente de prueba fue de 1 L, sin recambio de agua.

Las concentraciones de exposición para los experimentos preliminares se calcularon con base a resultados de experimentos previos (datos no presentados) y de acuerdo a la bibliografía (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Pérez-Linares *et al.*, 2009). Para el experimento definitivo se usaron las concentraciones determinadas en las

pruebas preliminares y en algunas pruebas adicionales con concentraciones mayores.

Para los experimentos se utilizaron recipientes de polietilentereftalato (PET) transparentes de 2 L. Inicialmente los recipientes se lavaron únicamente con agua corriente y se llenaron con agua de mar, manteniéndolos durante 3 días previos al día del experimento, posteriormente se enjuagaron con agua de mar filtrada (filtro de grava y arena y carbón activado 1-5 μm) y tratada con luz ultravioleta. Los cultivos del dinoflagelado se utilizaron en su fase de crecimiento exponencial (día 14) determinada a partir de la curva de crecimiento. Las concentraciones se determinaron mediante conteos directos al microscopio antes de iniciar el experimento, con el fin de definir las cantidades de cultivo requeridas para cada recipiente de prueba.

Para el desarrollo del experimento, se utilizaron un total de 630 postlarvas divididas entre los tres tratamientos, las cuales fueron expuestas durante 24 horas a un intervalo de siete concentraciones, entre 5.0×10^5 y 2.0×10^6 Cél/L (Tabla 5).

La mortalidad de las postlarvas se determinó en cada recipiente de prueba después de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 14 y 24 h a partir del inicio del experimento. Los organismos muertos fueron retirados en cada observación, se consideró que una postlarva estaba muerta cuando se mostró inmóvil y no reaccionó al contacto con una varilla de vidrio (Chin y Chen, 1987).

7.5 Recolección de muestras

Para realizar la determinación de toxinas, se obtuvieron muestras del cultivo de *G. catenatum* utilizado para el experimento y de postlarvas expuestas a los tratamientos.

Durante y al final del experimento, las postlarvas fueron extraídas de los recipientes de prueba utilizando unas pinzas de terminación plana (Millipore). Una vez recuperadas de los recipientes se enjuagaron con agua de mar, se colocaron en bolsas plásticas para conservarlas y se almacenaron en congelación (-18°C) hasta su análisis.

Para separar las células del cultivo, se filtraron 100 mL de cultivo con un filtro GF/F utilizando un equipo de filtración (Glass Microanalysis Holder) obteniendo las muestras de células (retenidas en el filtro) y de medio de cultivo. Al finalizar la filtración, el filtro se envolvió en papel aluminio para su conservación y el medio de cultivo se colocó en un frasco de plástico, ambos se colocaron en congelación (-18°C) hasta su análisis.

7.6 Determinación de toxinas

El contenido de toxinas de las postlarvas se determinó con una prueba ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) realizada con un kit comercial (Abraxis LLC, USA, 52255B). Para las células, cultivo completo y medio de cultivo se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) (Van de Riet *et al.*, 2009).

7.6.1 Extracción de toxinas

Para la extracción de toxinas, se aplicó la técnica de Lawrence *et al.* (2005). Se añadieron 3 mL de ácido acético al 1% a las muestras de postlarvas, células y cultivo. Después de añadir el ácido, las muestras de *L. vannamei* (0.5 g) se maceraron con una varilla de vidrio y se mezclaron durante un minuto en vortex, este procedimiento también se realizó con el filtro GF/F para la muestra de células (100 mL). En el caso de las muestras de cultivo (muestras líquidas, 0.5 mL), se añadió el ácido acético y se mezclaron en vortex.

Todas las muestras se colocaron en un baño María (100°C) por 5 min y enseguida se colocaron en un baño frío por 5 min, después se centrifugaron durante 10 minutos a 4500 rpm.

Una vez terminada la centrifugación de las muestras, se separó el sobrenadante en un tubo de prueba de 15 mL (1er. extracto). Nuevamente se añadieron 3 mL de ácido acético (1%) al residuo sólido de cada muestra y se repitió la centrifugación (10 min. 4500 rpm), para llevar a cabo una segunda extracción. La solución sobrenadante se recuperó en el mismo tubo del 1er. extracto y se aforó a 10 mL con agua grado Milli-Q. Las fracciones de muestra designadas para análisis en HPLC se filtraron en acrodiscos de 0.45 µm de poro y se analizaron de acuerdo al método descrito por Van de Riet *et al.* (2009).

7.6.2 Determinación de toxinas en cultivo, medio de cultivo y células

Los análisis en HPLC se hicieron en el laboratorio de la Agencia de Inspección Química Alimentaria de Canadá. Se siguió el procedimiento de acuerdo al método descrito por Van de Riet *et al.* (2009), el cual ha sido validado internacionalmente por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). En esta técnica una parte del extracto filtrado es separado empleando columnas y soluciones reguladoras para el análisis de toxinas. Los límites de detección y cuantificación de este método son 0.03 y 0.10 mg STXeq/L, respectivamente (Van de Riet *et al.* 2009).

El método determina la concentración individual de TPs, así como la toxicidad total de la muestra, expresada como equivalentes de STX, la cual se obtiene con la sumatoria de las concentraciones individuales de cada una de las TPs presentes en la muestra.

Las toxinas son derivatizadas por oxidación post-columna (PCOX) de los analitos a 85°C con ácido fosfórico, y una solución buffer de ácido

periódico; los derivados se detectan por fluorescencia mediante el uso de un detector de fluorescencia (Agilent 1200 FLD).

Para llevar a cabo el método anterior, se utilizó un sistema de cromatografía líquida (Agilent 1200 Series Quaternary Pump) empleando las mismas condiciones y especificaciones del método descrito por Van de Riet *et al.* (2009) y se realizó mediante el siguiente procedimiento:

Para el análisis de gonyautoxinas (GTX) y STX, se utilizó una columna C-18 (Agilent Zorbax Bonus RP, 3.5 μm , 4.6X150 mm) ajustando a la columna una temperatura de entre 30-40°C. Para la fase móvil se utilizaron dos solventes, uno con heptano sulfonato 11 mM y H_3PO_4 5.5 mM (solvente A) y otro (solvente B) con heptano sulfonato 11 mM, H_3PO_4 16.5 mM y acetonitrilo (11.5%). Las soluciones fueron ajustadas a pH 7.1 con NH_4OH .

Para la determinación de las toxinas N-sulfo-carbamoil (GTX1, C2, C3 y C4) se empleó una columna C-8 (Thermo Beta Basic 8.5 μm , 4.6X250 μm) y temperatura de 20°C. Para la fase móvil se utilizaron también dos solventes, uno con tetrabutilamonio fosfato 2 mM ajustado a pH 5.8 con NH_4OH al 1% (solvente A), y otro con tetrabutilamonio fosfato 2 mM, ajustándolas a pH 5.8 con 4% de acetonitrilo (MeCN) (solvente B).

Para la derivatización post-columna se utilizó una solución oxidante de ácido peroxofosfórico (H_3PO_5 , 100 mM) y ácido periódico (H_5IO_6 , 5 mM) y se acidificó con ácido nítrico (HNO_3 , 0.75 M), la derivatización se realizó a temperatura de 85°C y la detección de fluorescencia se determinó a 330 nm de excitación y 309 nm de emisión.

Todos los disolventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico, además todas las soluciones y los extractos de las muestras fueron previamente filtrados con membranas de nylon (0.2 μm) antes de usarse.

Para la determinación de GTX y STX, el volumen de inyección en el equipo fue de 10 µL y para la determinación de las toxinas N-sulfo-carbamol, se realizó otra inyección de 5 µL. La columna se mantuvo a una temperatura de 20°C con un flujo de 0.8 mL/min para la fase móvil y 0.4 mL/min para las soluciones oxidantes y el ácido.

Las concentraciones de las toxinas se determinaron por comparación del área del pico de cada toxina con los de los patrones previamente calibrados y la determinación de los perfiles de acuerdo al tiempo de retención de cada componente.

Los cálculos de toxinas paralizantes (mg STXeq/L), se realizaron tomando como referencia a la respuesta de fluorescencia de concentraciones conocidas de las soluciones certificadas de calibración, que fueron utilizadas para preparar la curva de calibración, las cuales fueron obtenidas del National Research Council of Canadá (NRC Certified Reference Material Program) (Anexo 2), siguiendo la siguiente fórmula:

$$(\text{mg STXeq/L}) = \sum(\mu\text{M} \cdot 0.3722 \cdot (\text{Fvol}/\text{Ext.vol}) \cdot 2 \cdot \text{ReTX})$$

Donde:

µM = µMol/L, concentración en el extracto

0.3722 = mg STX/ µMol

Fvol = volumen final del extracto

Ext. Vol = volumen del extracto crudo utilizado

2 = factor de dilución de la extracción

ReTx= toxicidad del analito en relación a la STX (Anexo 1).

Las concentraciones de toxinas paralizantes para los tratamientos fueron expresadas en µg STXeq/mL y µg STXeq/Cél, con la finalidad de poder comparar los resultados entre ambos tratamientos, a pesar que el

tratamiento MC no contiene células la respuesta se debe a las toxinas liberadas por esa cantidad de células durante la duración del cultivo.

Para expresar las concentraciones en $\mu\text{g STXeq/Cél}$, se dividió la concentración de toxinas resultante de cada tratamiento entre el número de células de acuerdo a las concentraciones de exposición (Cél/L).

7.6.3 Determinación de toxinas en postlarvas

La prueba ELISA es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. La aparición de color permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Por medio de la prueba ELISA, se analizaron muestras de postlarvas de *L. vannamei* expuestas tanto al cultivo de *G. catenatum*, como al medio de cultivo libre de células, tomando como base una concentración celular de $8.00 \times 10^5 \text{ Cél/L}$, con el objeto de detectar y determinar la concentración de saxitoxina en las postlarvas.

Las concentraciones de saxitoxina en las muestras se calcularon utilizando la ecuación de la recta de calibración ($Y = 0.851e^{-4.9018X}$). Esta prueba se llevó a cabo de acuerdo al instructivo (Anexo 3).

7.7 Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀)

Se obtuvieron las estimaciones de la concentración letal media (CL₅₀) de un total de 210 postlarvas (PL₂₈, por tratamiento) a 8, 14 y 24 horas para los tratamientos CTV y MC, a través de un análisis Probit (TOXICOLOGIST ver 1.0, Inglaterra, 1990), registrando en el programa de computo el número de postlarvas muertas y las concentraciones del tóxico (basadas en número de células) a las cuales fueron expuestas. Dicho programa genera una línea de ajuste entre el logaritmo de las

concentraciones empleadas y el porcentaje de mortalidad, se calcula también la concentración que causa el 50% de mortalidad para un tiempo dado, así como los límites de confianza (95%).

Para establecer si la CL_{50} a 24 h para los tratamientos CTV y MC son estadísticamente diferentes, se llevó a cabo una prueba de comparación usando el método proporcionado por la APHA-AWWA-WPCF (1989).

8. RESULTADOS

8.1 Experimento

Durante el experimento no se registraron muertes en los blancos, y la mayor mortalidad fue con CTV, con la cual, después de 24 horas de exposición el porcentaje de mortalidad fue de 100% para la mayor concentración celular (2.00×10^6 Cél/L) y varió en paralelo con el aumento de las concentraciones restantes entre el 13.3 y el 96.6%. El tratamiento MC presentó resultados similares sin diferencias significativas y no se encontró un efecto en el caso del tratamiento CE (Tabla 1).

Tabla 1. Mortalidad (%) de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas a diferentes concentraciones de los tratamientos (CTV, MC y CE) durante 24 horas.

[] Cél/L	Tratamiento CTV		Tratamiento MC		Tratamiento CE	
	Mortalidad	D.E	Mortalidad	D.E	Mortalidad	D.E
5.00×10^5	13.3	0.4	10.0	0.0	0.0	0.0
6.29×10^5	46.6	0.4	36.6	1.0	0.0	0.0
7.93×10^5	46.6	0.9	46.6	0.4	0.0	0.0
9.99×10^5	83.3	0.4	80.0	0.8	3.3	0.0
1.25×10^6	93.3	0.2	83.3	0.4	3.3	0.4
1.58×10^6	96.6	0.4	96.6	0.4	0.0	0.4
2.00×10^6	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0

En CTV, los primeros efectos tóxicos se observaron una hora después del inicio del experimento para las concentraciones de 9.99×10^5 , 1.25×10^6 , 1.58×10^6 y 2.00×10^6 Cél/L, con porcentajes de mortalidad de 83.3, 93.3, 96.6 y 100% respectivamente al final del experimento (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas a diferentes concentraciones (Cél/L) para el tratamiento CTV durante 24 horas.

Tiempo (h)	Concentración (Cél/L)						
	5.00×10^5	6.29×10^5	7.93×10^5	9.99×10^5	1.25×10^6	1.58×10^6	2.00×10^6
0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0
0.75	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	10	3.3	3.3	10
2	0	0	0	23.3	16.6	9.9	23.3
4	0	0	0	23.3	19.9	16.6	39.9
8	3.3	10	16.6	39.9	36.6	39.9	59.9
14	13.3	26.6	23.3	46.6	59.9	66.6	79.9
24	13.3	46.6	46.6	83.3	93.3	96.6	100

De la misma forma que para el tratamiento CTV el 100% de mortalidad para el tratamiento Medio de Cultivo (MC), ocurrió a las 24 horas para la mayor concentración (toxinas liberadas por 2.00×10^6 Cél/L). En las concentraciones restantes, los porcentajes de mortalidad a las 24 h fueron desde el 13.3% hasta 96.6% de acuerdo con la concentración del tóxico (Tabla 1).

El primer efecto letal que se observó en este tratamiento ocurrió después de dos horas de exposición para las concentraciones de toxinas producidas por 1.25×10^6 , 1.58×10^6 y 2.00×10^6 Cél/L, con porcentajes de mortalidad que aumentaron conforme al tiempo de 3.3, 16.6 y 23.3% hasta 83.3, 96.6 y 100% respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* expuestas a diferentes concentraciones (Cél/L) para el tratamiento MC durante 24 horas.

Tiempo (h)	Concentración (Cél/L)						
	5.00×10^5	6.29×10^5	7.93×10^5	9.99×10^5	1.25×10^6	1.58×10^6	2.00×10^6
0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0
0.75	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	3.3	16.6	23.3
4	0	0	3.3	13.3	16.6	33.2	33.3
8	0	3.3	13.3	29.9	36.6	73.2	56.6
14	0	9.9	19.9	49.9	66.6	89.8	83.2
24	10	36.6	46.6	80.0	83.3	96.6	100

En el tratamiento Células (CE), la supervivencia fue del 100% en todos los casos, con la excepción de las concentraciones 1.25×10^6 y 1.58×10^6 Cél/L, con las cuales la mortalidad resultó de 3.3%, siendo estas concentraciones menores que la concentración más alta empleada en este experimento (2.00×10^6 Cél/L) (Tabla 1).

8.2 Determinación de toxinas

8.2.1 Determinación de toxinas en cultivo, medio de cultivo y células

Se identificaron toxinas del tipo carbamatos y N-sulfocarbamatos y sobresalieron entre estas STX y NeoSTX, además del análogo C2. Los

tratamientos CTV y MC presentaron la misma concentración y perfil tóxico (Tabla 4), mientras que para el tratamiento CE se determinó un perfil tóxico compuesto por STX, NeoSTX, GTX2, GTX3, C1 y C2 (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Porcentaje molar de cada toxina en los tratamientos CTV, MC y CE correspondientes al cultivo de *G. catenatum* (cepa GCMQ-2).

TRATAMIENTO	STX	NeoSTX	GTX2	GTX3	C1	C2
CTV	76.07	19.65	-	-	-	4.28
MC	76.07	19.65	-	-	-	4.28
CE	12.40	9.28	5.76	0.08	2.79	70.00

La concentración total determinada para los tratamientos fue de 7.26×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$ ($21,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STXeq/mL}$) para el tratamiento CE y 354×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$ ($1,020,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STXeq/mL}$) para los tratamientos CTV y MC (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración y composición de toxinas en los tratamientos CTV, MC y CE empleadas en el experimento.

Toxina	CTV		MC		CE	
	$\mu\text{g STXeq/mL}$	$\mu\text{g STXeq/Cél}$	$\mu\text{g STXeq/mL}$	$\mu\text{g STXeq/Cél}$	$\mu\text{g STXeq/mL}$	$\mu\text{g STXeq/Cél}$
GTX3	-	-	-	-	1.73×10^{-4}	6.12×10^{-8}
GTX2	-	-	-	-	1.21×10^{-3}	4.30×10^{-7}
NEO	2.00×10^{-1}	6.44×10^{-5}	2.00×10^{-1}	6.44×10^{-5}	1.95×10^{-3}	6.93×10^{-7}
STX	7.74×10^{-1}	2.75×10^{-4}	7.74×10^{-1}	2.75×10^{-4}	2.60×10^{-3}	9.22×10^{-7}
C1	-	-	-	-	5.87×10^{-4}	2.80×10^{-7}
C2	4.35×10^{-2}	1.54×10^{-5}	4.35×10^{-2}	1.54×10^{-5}	1.45×10^{-2}	5.15×10^{-6}
Total	$\Sigma=1,020,000 \times 10^{-6}$	$\Sigma=354 \times 10^{-6}$	$\Sigma=1,020,000 \times 10^{-6}$	$\Sigma=354 \times 10^{-6}$	$\Sigma=21,000 \times 10^{-6}$	$\Sigma=7.26 \times 10^{-6}$

Las concentraciones de toxinas determinadas para cada una de las concentraciones que fueron asignadas en base a número de células, y que se utilizaron en los tres tratamientos durante el experimento, se

presentan en la tabla 6. Para CTV en la concentración menor, donde se presentó una mortalidad de 13.3%, la determinación de toxinas fue de 177 $\mu\text{g STXeq/mL}$ y para la mayor concentración con 100% de mortalidad fue de 708 $\mu\text{g STXeq/mL}$. Los niveles de toxinas determinados para las concentraciones de exposición en MC fueron iguales a los encontrados en CTV, aunque se registraron algunas discrepancias en los porcentajes de mortalidad (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de TPs para los tratamientos CTV, MC y CE de acuerdo a la mortalidad (%) y a las concentraciones basadas en número de células empleadas en el experimento.

[] Cél/L	CTV		MC		CE	
	Mortalidad	$\mu\text{g STXeq/MI}$	Mortalidad	$\mu\text{g STXeq/mL}$	Mortalidad	$\mu\text{g STXeq/mL}$
5.00×10^5	13.3	177.0	10.0	177.0	0.0	3.6
6.29×10^5	46.6	222.7	36.6	222.7	0.0	4.6
7.93×10^5	46.6	280.7	46.6	280.7	0.0	5.8
9.99×10^5	83.3	353.6	80.0	353.6	3.3	7.3
1.25×10^6	93.3	442.5	83.3	442.5	3.3	9.1
1.58×10^6	96.6	559.3	96.6	559.3	0.0	11.5
2.00×10^6	100.0	708.0	100.0	708.0	0.0	14.5

8.2.2 Determinación de toxinas en postlarvas

La concentración de toxinas determinada para las postlarvas de *L. vannamei* expuestas durante 24 h tanto al cultivo de *G. catenatum* con 8.00×10^5 Cél/L ($177 \mu\text{g STXeq/mL}$) (CTV) como al medio de cultivo con la misma concentración celular pero libre de células (MC), fue la misma para los dos tratamientos (Tabla 7).

Tabla 7. Determinación de saxitoxina por prueba ELISA en postlarvas.

Tratamiento	$\mu\text{g STXeq/g de PL}$
CTV	1.10
MC	1.10

8.3 Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀)

En la figura 2 se observan los valores de las CL₅₀ en las postlarvas de *L. vannamei* para 8, 14 y 24 h, para los tratamientos CTV y MC tomando como referencia la concentración celular y la concentración de toxinas.

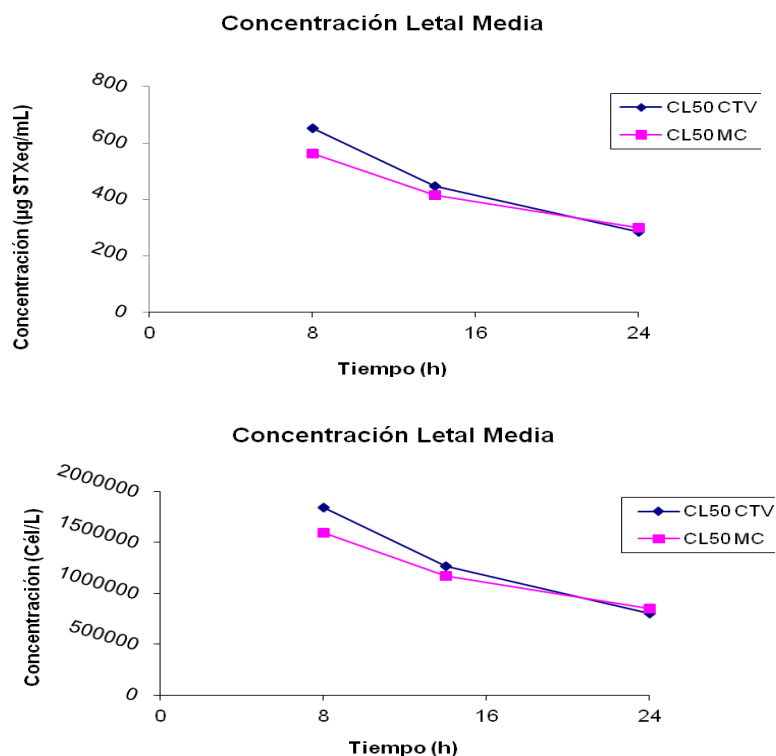


Figura 2. Concentración Letal Media (CL₅₀) obtenida a 8, 14 y 24 h, para los tratamientos CTV y MC expresada en concentración celular y de toxinas.

Con los resultados del experimento, los cuales fueron basados en número de células, en el tratamiento CTV los valores que se calcularon para la CL₅₀ a las 8 h resultó de 18.40×10^5 Cél/L y para 14 h fue de 12.60×10^5 Cél/L. La CL₅₀ al final del experimento (24 h) fue de 8.01×10^5 Cél/L (Tabla 8 y Figura 2).

La CL₅₀ determinada por HPLC a las 24 horas fue de 2.84×10^2 µg STXeq/mL (Tabla 8). La CL₅₀ a 24 h para el tratamiento CTV es 36.5% menor con respecto a la calculada para un tiempo de 14 h y 43.5% menor en comparación con la CL₅₀ para 8h.

Tabla 8. Concentración Letal Media (CL₅₀) de acuerdo a concentración celular y de toxinas para postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en el tratamiento CTV a 8,14 y 24 h.

Tiempo (h)	CL ₅₀					
	Concentración celular (Cél/L)	Límite de confianza (95%)		HPLC µg STXeq/mL	Límite de confianza (95%)	
		Inf.	Sup.		Inf.	Sup.
8	18.40X10 ⁵	15.20X10 ⁵	26.20X10 ⁵	6.52X10 ²	5.38X10 ²	9.27X10 ²
14	12.60X10 ⁵	11.10X10 ⁵	14.80X10 ⁵	4.47X10 ²	3.93X10 ²	5.24X10 ²
24	8.01X10 ⁵	7.18X10 ⁵	8.81X10 ⁵	2.84X10 ²	2.54X10 ²	3.12X10 ²

Para el tratamiento MC, la estimación de la CL₅₀ calculada fue de 15.90X10⁵, 11.70X10⁵ y 8.47X10⁵ Cél/L, para 8, 14 y 24 h de exposición (Tabla 9, Figura 2).

Tomando como referencia la CL₅₀ a 24 h estimada para el tratamiento MC, de acuerdo a la tabla 9, se estima que existe una reducción de 27.6% en la CL₅₀ con respecto a la calculada para las 14 h y una reducción del 46.7% en comparación con la calculada a las 8 h. La CL₅₀ determinada por HPLC a las 24 horas fue de 3.00X10² µg STXeq/mL (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración Letal Media (CL₅₀) de acuerdo a concentración celular y de toxinas para postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en el tratamiento MC a 8,14 y 24 h.

Tiempo (h)	CL ₅₀					
	Concentración celular (Cél/L)	Límite de confianza (95%)		HPLC µg STXeq/mL	Límite de confianza (95%)	
		Inf.	Sup.		Inf.	Sup.
8	15.90X10 ⁵	13.90X10 ⁵	19.50X10 ⁵	5.63X10 ²	4.92X10 ²	6.90X10 ²
14	11.70X10 ⁵	10.50X10 ⁵	13.00X10 ⁵	4.14X10 ²	3.71X10 ²	4.60X10 ²
24	8.47X10 ⁵	7.67X10 ⁵	9.28X10 ⁵	3.00X10 ²	2.72X10 ²	3.29X10 ²

Para el tratamiento CE, no se pudo obtener una concentración letal media, debido a que las concentraciones utilizadas en el experimento (Tabla 1), para este tratamiento, no fueron letales para los organismos de prueba.

El resultado de la prueba de comparación mostró que no hay diferencias significativas entre las CL₅₀ calculadas para los tratamientos CTV y MC.

9. DISCUSIONES

Existen diversos estudios en donde se han encontrado grandes diferencias en la respuesta a la exposición de algas tóxicas por parte de organismos. Algunos sufren mortandad, mientras que otros son capaces de ingerirlas y utilizarlas sin sufrir efectos negativos aparentes (Turner y Tester, 1997). La mortalidad fue mayor en los tratamientos CTV y MC, lo cual indica que las postlarvas de *L. vannamei* mueren en función de la concentración de toxinas de tipo PSP hidrosolubles, producidas por el dinoflagelado *G. catenatum* (cepa GCMQ-2).

En el tratamiento CE, la supervivencia fue del 100% en la mayoría de los casos, con la excepción de algunas concentraciones en las cuales la mortalidad resultó de 3.3%, que puede ser atribuida al canibalismo, que es característico entre estos organismos (FAO, 2005), además de la probable ingestión de células por parte de las postlarvas.

Según Palomares-García *et al.* (2006), en un trabajo realizado para conocer el efecto solo de células de *G. catenatum* sobre el copépodo *Acartia clausi*, dedujeron que tales organismos, al igual que en este trabajo (tratamiento CE), no mostraron mortalidad a la exposición, a pesar de que los copépodos consumieron las células.

Por otro lado, Pérez Linares *et al.* (2009), en un experimento similar a este estudio, exponiendo postlarvas de *L. vannamei* (PL₂₈) a diferentes densidades celulares (10^3 , 10^4 y 10^6 Cél/L) de *G. catenatum*, registraron mortalidad (30%) y efectos tóxicos, a diferencia de los datos obtenidos en este trabajo para la exposición a células (CE) en la que no se presentaron muertes. Esto probablemente puede atribuirse al diferente origen de la cepa (cepa GCCV 6), para la cual estudios anteriores documentaron concentraciones mayores a las determinadas en la cepa de este estudio (3.00×10^{-6} y 31.00×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$ a los 17 y 22 días de crecimiento respectivamente, Band-Schmidt *et al.*, 2005). Posibles motivos

adicionales pueden ser diferencias en las condiciones de los organismos expuestos y/o al diseño experimental (tiempo de exposición, número de organismos, etc.).

Las mortalidades de postlarvas registradas en este trabajo se presentaron en los tratamientos CTV y MC, en los cuales se utilizó la fracción acuosa (medio de cultivo) del cultivo de *G. catenatum*. Esto se puede atribuir a que este dinoflagelado puede producir alrededor de 31 toxinas hidrofílicas (Wiese *et al.*, 2010) por lo que, en un cultivo se espera encontrar la mayor toxicidad en el medio de cultivo.

Poco se sabe sobre los efectos de la exposición directa a la fase disuelta de estas toxinas así como de los posibles efectos subletales a través de este tipo de exposición en los organismos, sin embargo Lefebvre *et al.* (2004) observaron anomalías morfológicas y déficit en la actividad locomotora en larvas de peces (*Danio rerio*) expuestas a diferentes concentraciones de TPs disueltas (229,000 y 481,000 µg STXeq/mL).

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la mortandad de postlarvas de *L. vannamei* expuestas a TPs disueltas, son consistentes con registros previos con la misma especie de camarón y dinoflagelado tóxico, pero con camarones de diferente edad (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b; Frausto-Sotelo, 2009; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011).

Cortés-Altamirano y Alonso-Rodríguez (1997), han documentado eventos de muerte masiva de nauplios en laboratorios de producción de postlarvas del sur de Sinaloa, donde se especuló una toxicidad procedente del suministro de agua. En vista de la aparición de mareas rojas producidas por *Ceratium dens*, *Pseudonitzschia* spp. y *G. catenatum*, la razón de esta mortandad probablemente sea debido a la presencia de toxinas de tipo PSP.

Otro argumento para lo mencionado, es otra serie de eventos en donde se observó mortandad de nauplios y de camarón adulto (*L. vannamei*) en laboratorios de producción de larvas de camarón, estanques de cultivo y el área de playa de la misma zona, ya que la mortandad coincidió con una serie de FAN's de *G. catenatum* (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b).

Tradicionalmente, los estudios de toxicidad generada por microalgas se han enfocado por una parte, a la cuantificación de niveles de toxinas contenidas dentro de las células del fitoplancton de interés. En el caso de las toxinas paralizantes (TPs), comúnmente las investigaciones realizadas se encuentran enfocadas a los niveles de toxinas y a los efectos del consumo de células tóxicas por parte de los organismos. Por otro lado, para poder evaluar los riesgos que representan las microalgas tóxicas para los organismos marinos es necesario conocer las posibles rutas de exposición (Lefebvre *et al.*, 2008). En este estudio, la mayor fuente de riesgo es la exposición a la fracción disuelta del cultivo de *G. catenatum*, ya que la mortandad se registró en los tratamientos CTV y MC.

Los métodos de cromatografía líquida de alta resolución son ampliamente usados para cuantificar toxinas de tipo PSP presentes en muestras de mariscos, pero además pueden servir para identificar perfiles de toxinas en las muestras (Botana, 2009). En el caso de este estudio, la diferencia en la composición y concentración de toxinas de los tratamientos CTV y MC con respecto a CE, puede ser explicada considerando la solubilidad de las toxinas producidas por *G. catenatum*, ya que estas toxinas al ser liberadas pueden ser acumuladas y concentradas en el medio acuoso donde se encuentra suspendido el dinoflagelado (Reis-Costa *et al.*, 2010; Lefebvre *et al.*, 2008).

Existen escasos estudios sobre la concentración y composición de toxinas tanto producidas, contenidas en la célula y liberadas al medio por el

dinoflagelado *G. catenatum*, así como las acumuladas en los tejidos de los organismos expuestos. De acuerdo a los resultados de este estudio, una célula de este dinoflagelado, en su fase de crecimiento exponencial (14 días), contiene 7.26×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$ y hasta ese momento de su ciclo de vida ha liberado una cantidad de toxinas hidrofílicas al medio circundante, equivalente a 354×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$.

La concentración celular de toxinas en este estudio muestra un resultado menor con respecto a cepas originarias de Singapur y Brasil (Proença *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2002), y con respecto a la misma cepa (GCMQ-2) analizada por Martínez-Tecuapacho (2009) (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración celular de TPs ($\mu\text{g STXeq/Cél}$) en cepas de *Gymnodinium catenatum*.

Cepa	Origen	Concentración ($\mu\text{g STXeq/Cél}$)	Referencia
-	Brasil	28.00×10^{-6}	Proença <i>et al.</i> , 2001
SGC1	Singapur	23.30×10^{-6}	Holmes <i>et al.</i> , 2002
SGC1	Singapur	24.20×10^{-6}	Holmes <i>et al.</i> , 2002
GCMQ-2	Sinaloa, Méx.	11.80×10^{-6}	Martínez-Tecuapacho, 2009
GCMQ-2	Sinaloa, Méx.	7.26×10^{-6}	Este estudio

-= No especificada

Garate-Lizárraga *et al.* (2005), realizaron un estudio para comparar la concentración y perfiles tóxicos en condiciones de cultivo de cepas mexicanas de *G. catenatum* aisladas de tres bahías del Golfo de California; los resultados mostraron que la concentración total de las diferentes cepas fue variable con niveles que van desde 9.40×10^{-6} hasta 23.90×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$. De acuerdo a estos resultados, en este estudio la cepa mostró menor concentración, aunque permaneció dentro del mismo orden de magnitud del nivel de contenido de toxinas detectado para las cepas del Golfo de California.

Se han presentado efectos tóxicos en organismos en el medio natural a niveles de concentración celular de 0.29×10^{-6} a 5.31×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$,

señalándose mortandad de larvas de camarón en cultivo, asociadas a mareas rojas de *G. catenatum* (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004).

Algunos autores mencionan que las cepas de *G. catenatum* producen diferentes toxinas y concentraciones de las mismas, dependiendo de las condiciones del cultivo, la fase de crecimiento y el origen de las mismas. Esto puede cambiar el perfil tóxico dificultando la caracterización de las cepas (FAO, 2005; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2006).

De acuerdo a las condiciones de cultivo usadas en este estudio, las células de *G. catenatum* (GCMQ-2) producen saxitoxina (STX) y cinco de sus análogos (NeoSTX, GTX2, GTX3, C1, C2). Gárate-Lizárraga *et al.* (2005), en un estudio realizado para comparar los perfiles de toxinas paralizantes en cepas de *Gymnodinium catenatum* aisladas de diferentes localidades, determinaron que una cepa (GCMV-1) aislada de la bahía Mazatlán fue la única en la que se encontró STX, por HPLC, además de los derivados NeoSTX, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5, GTX2, y C2.

Según Martínez-Tecuapacho (2009), en un estudio realizado para conocer el efecto de dos medios de cultivo en el crecimiento y la toxicidad del dinoflagelado *G. catenatum* en dos cepas (GCMQ-2 y GCMV-4) aisladas de la bahía de Mazatlán, cultivadas en diferentes medios de cultivo, señaló que el perfil de toxinas se integró principalmente por: STX, NeoSTX, GTX 2, GTX 3, GTX 5, GTX 6, C1, C2, C3, C4 y dcSTX, argumentó también que la composición y concentración de estas toxinas varió durante el ciclo de crecimiento; la cepa GCMV-4 produjo NeoSXT, GTX2, GTX3, GTX5, GTX6, C1 y C2, mientras que el perfil de la cepa GCMQ-2 (misma cepa utilizada en este estudio) se compone de STX, GTX2, GTX3, GTX5, dcSTX y C1, C2.

Los resultados anteriores son consistentes con los de este trabajo, a excepción de que no se detectaron los análogos GTX5 y dcSTX, pero si el análogo NeoSTX. Esto probablemente puede ser atribuido a que se trata de la misma cepa y la composición de toxinas podría estar en función con las condiciones de cultivo y la fase de crecimiento principalmente, como ya se mencionó (Band-Schmidt *et al.*, 2006).

No existe suficiente información disponible sobre la determinación de la composición de toxinas disueltas en el medio acuoso donde se encuentra suspendido el dinoflagelado *G. catenatum*, ya sea en el medio natural o en cultivos con condiciones controladas. Sin embargo Reis-Costa *et al.* (2010), determinó un perfil tóxico por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) en muestras obtenidas de agua de mar durante un florecimiento de este dinoflagelado; el perfil consistió en C1, C2, GTX1, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y dcNEO. Todas estas variaciones en la composición de las toxinas, pueden ser explicadas también a causa de la variación en las diferentes condiciones usadas en los procedimientos de extracción de estas toxinas, tratamiento de muestras y análisis de las mismas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Pérez Linares *et al.*, 2009).

Usando la prueba ELISA, Reis-Costa *et al.* (2010) detectaron en muestras de agua de mar tomadas durante un FAN de *G. catenatum* niveles intracelulares de TPs de 3.40×10^{-6} a 398×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/mL}$ y niveles extracelulares de 200×10^{-6} a 1100×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/mL}$, coincidiendo los niveles más altos para la fracción extracelular con una abundancia máxima de células presentes en las zonas de muestreo de 2.50×10^4 Cél/L. Esos datos son menores en cuanto a la concentración de toxinas determinadas en este estudio, ya la concentración de toxinas determinada para el tratamiento CE (que contiene la fracción intracelular de toxinas en el cultivo) fue de $21,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STXeq/mL}$ ó 7.26×10^{-6} $\mu\text{g STXeq/Cél}$ y

para los tratamientos CTV y MC $1,020,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STXeq/mL}$ (fracción extracelular).

La razón de esta diferencia probablemente se deba a que las muestras empleadas son de diferente origen, es decir, en este estudio se analizaron muestras provenientes de un cultivo de *G. catenatum* bajo condiciones controladas, en el cual las toxinas liberadas son acumuladas y en el otro, las muestras fueron tomadas directamente del medio natural. Otras razones pueden ser la fase de crecimiento y las condiciones del cultivo, además de la diferencia del método de determinación de las toxinas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2006). Sin embargo, el presente estudio es consistente con el trabajo realizado por Reis-Costa *et al.* (2010), en el que la concentración extracelular de TPs es mayor que los niveles de concentración intracelular, además existen otros estudios relacionados con este, en donde se ha empleado la prueba ELISA para determinar TPs intracelular y extracelularmente, producidas por el dinoflagelado *G. catenatum* en el medio natural, presentando una amplia variación en los niveles de toxinas determinados, lo cual puede ser explicado debido a que las toxinas intracelulares pueden ser liberadas en el agua de mar o medio de cultivo circundante por su solubilidad o por la liberación de toxinas a causa de la lisis celular, lo que plantea un riesgo para la fauna marina a través de la absorción directa de las toxinas disueltas en el agua por parte de los organismos (Lefebvre *et al.*, 2008; Reis-Costa *et al.*, 2010).

En la actualidad se conoce relativamente poco sobre las diferencias en producción de toxinas y sus niveles de referencia tanto en cultivos (condiciones controladas) como en poblaciones silvestres de *G. catenatum* (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Lefebvre *et al.*, 2008; Martínez-Tecuapacho, 2009; Reis-Costa *et al.*, 2010).

De acuerdo al experimento realizado en el presente estudio, exponiendo postlarvas de *L. vannamei* a toxinas producidas por *G. catenatum*, la concentración de saxitoxina detectada por prueba ELISA fue de $1,100,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STX/g de PL}$, tanto para las postlarvas expuestas al cultivo como al cultivo libre de células. En un estudio similar (45 días de exposición) pero empleando HPLC para la detección de TPs en postlarvas expuestas a células, Pérez Linares *et al.* (2009) no encontraron saxitoxina, aunque encontraron los derivados NeoSTX ($600,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STX/g de PL}$), dcSTX ($70,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STX/g de PL}$), GTX2,3 ($400,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STX/g de PL}$) y GTX1,4 ($750,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STX/g de PL}$). Esta diferencia puede ser atribuida a diferentes causas como por ejemplo, el origen de la cepa empleada, las condiciones de aclimatación y de cultivo, el tiempo de exposición, así como el tipo de exposición de las toxinas a las postlarvas y principalmente al método por el cual fueron analizadas tales toxinas, debido a que los métodos se basan en distintos principios, ya que la prueba ELISA es un método bioquímico y HPLC es un método fisicoquímico.

Reis-Costa *et al.* (2009), en un estudio realizado para comparar la determinación de TPs en muestras de mariscos a través de cinco métodos distintos, determinó al igual que en este estudio, que los valores cuantificados de TPs a través de ELISA fueron bajos. Esto también fue documentado anteriormente para muestras de fitoplancton y agua de mar (Lefebvre *et al.*, 2008). Esto probablemente pueda deberse a que la prueba ELISA no es un método apropiado para la determinación de la concentración total de TPs en muestras cuando se trata de una composición de varios derivados diferentes a la saxitoxina. Sin embargo, su alta sensibilidad para STX lo hace útil en la investigación científica en particular para la detección de bajos niveles en agua de mar (Lefebvre *et al.*, 2008; Reis-Costa *et al.*, 2009).

La precisión de la prueba ELISA depende en gran medida del perfil tóxico y en consecuencia de la reactividad cruzada con otros derivados por que la especificidad de los anticuerpos no puede cubrir una amplia gama de toxinas diferentes. La prueba sobreestima la concentración de STX, pero subestima la concentración total de PSP (Granéli *et al.*, 1990; Botana, 2009). De cualquier forma, diversos autores proponen que la prueba ELISA podría utilizarse preferentemente como una prueba de rápida detección y/o monitoreo para las toxinas de tipo PSP en moluscos y otras muestras marinas.

En este estudio por medio de los efectos letales observados durante el experimento y la determinación de las CL_{50} , el tratamiento CTV pareciera ser el más tóxico de los tres tratamientos empleados, aunque de acuerdo al método proporcionado por la APHA-AWWA-WPCF (1989), se comprobó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las CL_{50} a 24 h entre los tratamientos CTV y MC. Esto puede ser atribuido a que la mayor cantidad de toxinas se encuentran en la fracción acuosa del cultivo, sin embargo, debe tomarse en cuenta que el tratamiento CTV además de medio de cultivo contiene células, las cuales podrían haber estado liberando toxinas durante el transcurso del experimento aumentando la concentración y así lograr ser más tóxico que el tratamiento MC.

El tratamiento CE no resultó tóxico, esto probablemente pueda deberse a que las células de *G. catenatum* liberan al medio cantidades limitadas de toxinas durante el tiempo experimental para provocar la muerte de las postlarvas, otra posible explicación puede ser que al estar las toxinas contenidas dentro de la célula, no se encuentran disponibles para entrar en contacto con las postlarvas y ocasionar su muerte (Reis-Costa *et al.*, 2010). Sin embargo, el 3% de mortalidad que se presentó en algunas concentraciones experimentales, puede ser atribuido a que las postlarvas durante el experimento, consumieran células y así, tanto las toxinas

hidrofílicas como las lipofílicas, contenidas dentro de la célula, provocaran su muerte, ya que las toxinas lipofílicas también se unen fuertemente a los canales de sodio y por su naturaleza podrían aumentar su potencial de bioacumulación en los organismos marinos, además representan una contribución importante a los perfiles tóxicos (Negri *et al.*, 2007; Vale, 2008b; Vale *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos muestran una variación en la CL_{50} entre los tratamientos CTV y MC; para el tratamiento MC, la CL_{50} calculada para 8 y 14 h, fue menor en comparación con el tratamiento CTV para las mismas horas. Esto probablemente puede deberse a las siguientes razones:

Muerte celular. El tratamiento CTV, además de medio de cultivo, contiene células, por tal motivo la muerte celular ocurrida en el transcurso del experimento, pudo haber ocasionado un aumento en la toxicidad para este tratamiento al final del experimento, debido a que muchas de las especies que normalmente producen toxinas intracelulares, cuando ocurre la lisis celular, las toxinas son liberadas (Landsberg, 2002).

Manejo de células. Al tamizar el cultivo, para separar las células del medio acuoso y poder obtener el tratamiento MC (libre de células), las células probablemente pudieron haberse maltratado y romperse durante el proceso, liberando toxinas contenidas dentro de la célula y así aumentar la toxicidad del medio acuoso del cultivo.

Alimentación con células. Las postlarvas expuestas en el tratamiento CTV, en el transcurso del experimento pudieron haber ingerido células para alimentarse y de esta manera contribuir a aumentar la toxicidad, ya que los organismos se encuentran directamente expuestos a las células de microalgas y sus toxinas por beberlas o ingerirlas a través de los diversos modos de alimentación (Landsberg, 2002); sin embargo en el tratamiento con células (CE) en este estudio, no se registró mortalidad.

10. CONCLUSIONES

Debido a que la mortalidad de las postlarvas varió en función de la concentración de toxinas de tipo hidrosoluble presentes en el medio, quedó comprobada la hipótesis de trabajo planteada.

El resultado de este trabajo indica que el orden de toxicidad fue CTV=MC>CE.

Las concentraciones de toxinas determinadas por HPLC para los tratamientos CTV, MC y CE fueron $1,020,000 \times 10^{-6}$, $1,020,000 \times 10^{-6}$ y $21,000 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g STXeq/mL}$, respectivamente.

Los tratamientos CTV y MC presentaron el mismo perfil, el cual está compuesto por las toxinas STX, NeoSTX, GTX2, GTX3, C1 y C2, entre las cuales las de mayor potencia son STX y NeoSTX.

La concentración de saxitoxina determinada por medio de la prueba ELISA en postlarvas expuestas a los tratamientos CTV y MC fue igual ($1.10 \mu\text{g STXeq/g}$ de PL).

La CL_{50} a 24 h expresada en número de células a la cual se expusieron las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* fueron 8.01×10^5 y 8.47×10^5 Cél/L, para CTV y MC respectivamente. La CL_{50} determinada por HPLC y expresada en unidades de masa para el tratamiento CTV fue de $2.84 \times 10^2 \mu\text{g STXeq/mL}$ y para el tratamiento MC de $3.00 \times 10^2 \mu\text{g STXeq/mL}$.

Entre las CL_{50} a 24 h determinadas para CTV y MC, no se encontraron diferencias significativas.

11. RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en este estudio a través de los experimentos realizados, de acuerdo al límite máximo permisible de saxitoxina (80 µg/100g de mariscos) conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-242-SSA1-2009), se puede decir que en base a la concentración determinada por medio de la prueba ELISA para *L. vannamei* (1.10 µg STXeq/g), el consumo de 72.72 g de camarón (postlarva) expuesto a una concentración de 177 µg STXeq/mL, podría representar un riesgo para la salud humana. Sin embargo, tomando en cuenta la dosis que puede ocasionar síntomas leves de EPM en los seres humanos (120-304 µg/persona) la cual ha sido anteriormente establecida para proteger a las personas más susceptibles (niños, ancianos, enfermos), con el consumo de una cantidad 109.10 g de postlarva de camarón intoxicado con estas toxinas y a esta concentración, se alcanzarían los niveles necesarios para que una persona pudiera presentar síntomas de intoxicación (FAO, 2005).

Es importante tener información suficiente sobre los efectos causados por una determinada cantidad de células con potencial tóxico, para generar sistemas de alerta basados en el número de células, con aplicación local o regional.

Es necesario considerar, al momento de seleccionar el método de determinación de TPs, el propósito para el cual se desea contar con estos resultados, ya que las técnicas de detección que se empleen pueden afectar profundamente la cuantificación de los niveles de toxina.

12. LITERATURA CITADA

Alonso-Rodríguez R., Páez-Osuna F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 219, 317-336.

Alonso-Rodríguez R., Páez-Osuna F., Gárate-Lizárraga I. 2004a. El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa, México. 147 p.

Alonso-Rodríguez R., Gárate-Lizárraga I., Luckas B., Reinhardt K., Bustillos-Guzmán J. 2004b. Mortalidad de larvas de camarón en cultivo en Sinaloa, México, asociado a mareas rojas de *Gymnodinium catenatum* Pp: 54 55. En: XIII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología. Nuevo Vallarta, Jalisco. México.

AOAC. 2005. Official Method 2005.06, Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish: prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. Official Methods of Analysis of AOAC International.

APHA-AWWA-WPCF. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 17th ed. Washington D.C. 1193 p.

Assadi C., Tasso V., García Carrascosa M. 2007. Una revisión del impacto económico de las proliferaciones algales nocivas (PAN_s) sobre cultivos marinos y estrategias de mitigación. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Tomo I. Vigo, España. 137 p.

Band-Schmidt C. J., Bustillos-Guzmán J., Gárate-Lizárraga I., Lechuga-Devéze C. H., Reinhardt K., Luckas B. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahia Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae* 4, 21-31.

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

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

Batoréu M. C., Dias E., Pereira P., Franca S. 2005. Risk of human exposure to paralytic toxins of algal origin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 401-406.

Blanco J., Reyero M. I., Franco J. 2003. Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 42, 777-784.

Botana L. M. 2009. Seafood and freshwater toxins, pharmacology, physiology and detection. Second ed. CRC Press, New York. 941 p.

Campás M., Prieto-Simón B., Jean-Louis M. 2007. Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. *Talanta* 72, 884-895.

Chin T. S., Chen J. C. 1987. Acute toxicity of ammonia to larvae of the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 66, 247-253.

Clemente Z., Busato R. H., Oliveira R. C., Cestari M. M., Ramsdorf W. A., Magalhaes V. F., Wosiack A. C., Silva de Assis H. C. 2009. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicon* 55, 396-406.

Cortés-Altamirano R., Núñez-Pasten A. 1992. Doce años (1979-1990) de registros de mareas rojas en la bahía de Mazatlán, Sinaloa. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nac. Autón. México*, 19(1): 113-121.

Cortés-Altamirano R., Alonso-Rodríguez R. 1997. Mareas rojas durante 1977 en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Ciencias del Mar UAS* 15, 31-37.

Cortés-Lara M. C. 2002. Informe del fenómeno de marea roja en Bahía Banderas Jalisco-Nayarit, octubre-noviembre 2001. *Revista Biomedica* 13, 73-75.

De la Garza-Aguilar J. 1983. Intoxicación alimentaria por ingestión de mariscos contaminados. *Salud Pública Mexico* 25, 145-50.

Doblin M. A., Blackburn S. I., Hallegraef G. M. 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros* cf. *tenuissimus* (Bacillariophyta). *Journal of Plankton Research* 21: 1153-1169.

FAO. 2005. Alimentación y nutrición. Biotoxinas marinas. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) <http://www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm>.

Consulta: noviembre 2009.

FAO. 2011. Fisheries and Aquaculture Department. Global Aquaculture Production. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). <http://www.fao.org/fishery/statistics>. Consulta: junio 2011.

Frausto Sotelo E. D. 2009. Evaluación experimental de tres arcillas para el control de florecimientos algales nocivos ocasionados por los dinoflagelados tóxicos *Cochlodinium polykrikoides* (margalef, 1961) y *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) y su utilidad en la camaronicultura. ICMYL, UNAM. Tesis de Maestría.

Gárate-Lizárraga I., Bustillos-Guzmán J., Alonso-Rodríguez R., Luckas B. 2004. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. Marine Pollution Bulletin 48, 378-402.

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

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

Garet E., González-Fernández A., Lago J., Vieites J. M., Cabado A. G. 2010. Comparative evaluation of enzyme-linked immunoassay and reference methods for the detection of shellfish hydrophilic toxins in

several presentations of seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1410-1415.

Gerssen A., Pol-Hofstad I. E., Poelman M., Mulder P. P. J., Van den Top H. J., Boer J. 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins* 2, 878-904.

Granéli E., Sundstrom B., Edler L., Anderson D. 1990. Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York. 551 p.

Granéli E., Turner J. T. 2006. Ecology of harmful algae. *Ecological Studies Series*, Vol. 189. Springer, New York 413 p.

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

Hernández-Sandoval F. E., López-Cortés D. J., Band-Schmidt C. J., Gárate-Lizárraga I., Núñez-Vázquez E. J., Bustillos-Guzmán J. J. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica* 19 (3): 245-256.

Holmes M. J., Bolch C. J., Green D. H., Cembella A. D., Ming T. S. L. 2002. Singapore isolates of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) produce a unique profile of paralytic shellfish toxins. *Journal of Phycology* 38, 96-106.

IOC-UNESCO. 2011. Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. <http://www.marinespecies.org/hab/index.php>. Consulta: junio 2011.

Jester R. J., Baugh K. A., Lefebvre K. A. 2009. Presence of *Alexandrium catenella* and paralytic shellfish toxins in finfish, shellfish and rock crabs in Monterey Bay, California, USA. *Marine Biology* 156, 493-504.

Kalaitzis J. A., Chau R., Kohli G. S., Murray S. A., Neilan B. A. 2009. Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants. *Toxicon* 56, 244-258.

Kwong R. W. M., Wang W. X., Lam P. K. S., Yu P. K. N. 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates. *Aquatic Toxicology* 1, 82-91.

Landsberg J. H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10 (2): 113-390.

Lawrence J. E., Niedzwiedek B., Menard C. 2005. Quantitative Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *Journal of AOAC International* 88 (6): 1714-1732.

Lefebvre K. A., Trainer V. L., Scholz N. L. 2004. Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquatic Toxicology* 66, 159-170.

Lefebvre K. A., Bill B. D., Erickson A., Baugh K. A., O'Rourke L., Costa P. R., Nance S. Trainer V. L. 2008. Characterization of intracellular and extracellular saxitoxin levels in both field and cultured *Alexandrium* spp. samples from Sequim Bay, Washington. *Marine Drugs* 6, 103-116.

Martínez Tecuapacho G. A. 2009. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y la toxicidad del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*

Graham, aislado de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan. Tesis de Licenciatura, 63 pp.

Mee L. D., Espinosa M., Díaz G. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. Marine Environmental Research 19, 17-92.

Morquecho L. 2008a. Marea roja: dinoflagelados marinos tóxicos. Ciencia y tecnología para el desarrollo tecnológico. Foro consultivo científico y tecnológico. <http://www.foroconsultivo.org.mx/noticias/8.pdf>.
Consulta: marzo 2009.

Morquecho L. 2008b. Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.
<http://www.cibnor.gob.mx/eplant1.php?pagID=colecciones/codimar/codimar>). Consulta: junio 2009.

National Research Council Institute for Marine Biosciences. (2006). Certificate of Analysis, NRC Certified Reference Materials Program Bulletin, Halifax, NS, Canada.

Negri A. P., Bolch C. J., Geier S., Green D. H., Park T., Blackburn S. I., 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. Harmful Algae 6, 774-780.

Núñez-Vázquez E. J., Gárate-Lizarraga I., Band-Schmidt C. J., Cordero-Tapia A., Lopez-Cortes D. J., Hernandez S. F. E., Heredia-Tapia A., Bustillos-Guzman J. J. 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. J. Environ. Biol. 32, 413-423.

Ochoa J. L., Pérez-Linares J., Rodríguez-Jaramillo C., Núñez-Vázquez E. 2004. Impacto de cianobacterias tóxicas en el cultivo de camarón blanco en México. *Panorama Acuícola*, 10 (1): 34-36.

Páez-Osuna F., 2001a. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management* 28 (1): 131-140.

Páez-Osuna F., 2001b. *Camaronicultura y medio ambiente*. 1ra. Edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 451 p.

Páez-Osuna F., Gracia A., Flores-Verdugo F., Lyle-Fritch L. P., Alonso-Rodríguez R., Roque A., Ruíz-Fernández C. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* 46, 806-815.

Palomares-García R., Bustillos-Guzmán J., Band-Schmidt C. J., López-Cortés D., Luckas B. 2006. Effect of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on the grazing, egg production, and hatching success of the copepod *Acartia clausi*. *Ciencias Marinas* 32 (1B), 111-119.

Pérez-Linares J., Ochoa J. L., Gago-Martínez A. 2008. Effect of PSP toxin in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *Journal of Food Science* 73 (4), 69-73.

Pérez-Linares J., Ochoa J. L., Gago-Martínez A. 2009. Retention and tissue of PSP and NSP toxins in shrimp: is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population?. *Toxicon* 43, 185-195.

Ponce-Palafox J. T., Ruiz-Luna A., Castillo-Vargasmachuca S., García-Ulloa M., Arredondo-Figueroa J. L. 2011. Technical, economic and

environmental analysis of semi-intensive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming in Sonora, Sinaloa and Nayarit states, at the east coast of the Gulf of California, México. *Ocean & Coastal Management* 54, 507-513.

Proença L. A., Tamanaha M. S., Souza N. P., 2001. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in southern Brazilian waters: occurrence, pigments and toxins. *Atlantica* 23, 59-65.

Quilliam M. A. 2004. Supplemental Information for PSP CRMs, NRC Certified Reference Materials Program, Canadá.

<http://www.labservice.it/Downloads/Public/Info/info-PSPtoxin-supplemental.pdf>. Consulta: septiembre 2011.

Reis-Costa P., Baugh A. K., Wright B., Raymond R., Shelly L. N., Tatarenkova N., Etheridge S. M., Lefebvre K. A. 2009. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska. *Toxicon* 54, 313-320.

Reis-Costa P., Botelho M. J., Lefebvre K. A. 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia* 655, 89-97.

Rojas A. L., Chang Y. I., Barbera S. A. 2002. Determinación de saxitoxina y sus derivados en moluscos bivalvos: Evaluación y optimización del uso de cromatografía líquida de alta resolución con previa oxidación. *Zootecnia Tropical* 20 (4), 501-513.

Ronsón-Paulín J. A. 1999. Análisis retrospectivo y posibles causas de mareas rojas tóxicas en el litoral del sureste mexicano (Guerrero, Oaxaca, Chiapas). *Ciencias del Mar*. 9, 40-56.

SAGARPA-CONAPESCA. 2006. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2006. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Pesca. Mazatlán. 219 p.

SAGARPA-CONAPESCA. 2011. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2010. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comisión Nacional de Pesca.

http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2010.

Consulta: julio 2011.

Saldade-Castañeda O., Vázquez-Castellanos J. L., Galván J., Sánchez-Anguiano A., Nazar A. 1991. Intoxicación por toxina paralizante de molusco en Oaxaca. Salud Pública Mex. 33, 240-7.

Schantz E. J., Mold J., Stanger D., Shavel J., Riel F., Bowden J., Lynch J., Wyler R., Riegel B., Sommer H. 1957. Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. J. Am. Chem. Soc. 79, 5230-5235.

Sephton D. H, Haya K., Martin J. L, LeGresley M. M, Page, F.H. 2007. Paralytic shellfish toxin in zooplankton, mussels, lobster and caged Atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island, in the Bay of Fundy. Harmful Algae 6, 745-758.

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

Su H. M., Liao I. C., Chiang Y. M., 1993 Mass mortality of prawn caused by *Alexandrium tamarense* blooming in a culture pond in southern Taiwan. In: Smayda T. J., Shimizu Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, New York, pp. 329-333.

Suárez B., Guzmán L. 1998. Suárez B, Guzmán L. Mareas Rojas y Toxinas Marinas, Floraciones de algas nocivas. Universidad de Chile, I Instituto de Fomento Pesquero y Universidad de Magallanes Santiago de Chile. 77 pp..

Sullivan J., Wekell M., Kentala L. 1985. Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. *Journal of Food Science* 50, 26-29.

Turner J. T., Tester P. A. 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazer, and pelagic food webs. *Limnology and Oceanography* 42, 1203-1214.

Vale P. 2008a. Fate of benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1190, 191-197.

Vale P. 2008b. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195, 85-93.

Vale P., Rangel I., Silva B., Coelho P., Vilar A. 2009. Atypical profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Luanda and Mussulo bays, Angola. *Toxicon* 53, 176-183.

Van de Riet J. M., Gibs R. S., Chou F. W., Muggah P. M., Rourke W. A., Burns G. 2009. Liquid chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops, and oysters: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International* 92 (6): 1960-1704.

Wang D. Z. 2008. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs* 6, 349-371.

Wiese M., D'Agostino P. M., Mihali T. K., Moffitt M. C., Neilan B. A., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8, 2185-2211.

ANEXOS

Anexo 1. Toxicidad Relativa de toxinas de tipo PSP (Quilliam, 2004).

Toxina	Toxicidad Relativa
STX	1.0000
GTX1	0.9940
GTX2	0.3592
GTX3	0.6379
GTX4	0.7261
GTX5	0.0644
Neo	0.9243
dcSTX	0.5131
dcGTX2	0.1538
dcGTX3	0.3766
C3	0.0133
C1	0.0060
C2	0.0963
C4	0.0576

Anexo 2. Material de referencia certificado (NRC Certified Reference Material Program).

Estándar Certificado	Toxina
NRC CRM-GTX1&4	GTX4 GTX1
NRC CRM-dcGTX2&3	dcGTX3 dcGTX2
NRC CRM-GTX5	GTX5
NRC CRM-GTX2&3	GTX3 GTX2
NRC CRM-NEO	NEO
NRC CRM-dcSTX	dcSTX
NRC CRM-STX	STX
NRC CRM-C1&2	C1 C2

NRC= National Research council Canada

Anexo 3. Instrucciones para el uso de la prueba ELISA (Abraxis LLC, USA, código 52255B)

Contenido del kit:

1. Placa micro titulación cubierta con un segundo anticuerpo.
2. Estándares (6): 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 ng/mL.
3. Solución anticuerpo (rabbit anti-saxitoxin), 6 mL.
4. Saxitoxina-HRP conjugada, 6 mL.
5. Diluyente de muestras concentrado (10X), 2 X 25 mL.
6. Solución de lavado concentrado (5), 100 mL.
7. Solución de color (TMB), 12 mL.
8. Solución stop, 12 mL.

Se añadieron 50 μ L de las soluciones estándar y las muestras (extractos de muestras de postlarvas) en los pozos de las tiras de prueba de la placa, según el esquema de trabajo dado. Para el caso de los estándares se usaron duplicados y para las muestras triplicados; se añadió sucesivamente 50 μ L de la solución de enzima conjugada a los pozos individuales usando una pipeta multi-canal.

Enseguida se añadió 50 μ L de solución de anticuerpo a cada uno de los pozos individuales usando una pipeta multi-canal, la placa se cubrió con parafilm y se mezcló el contenido moviendo la placa en un movimiento rápido circular sobre la mesa de trabajo durante aproximadamente 30 segundos. Enseguida la placa fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación, la placa se lavó cuatro veces con la solución de lavado, utilizando un volumen de 300 μ L para cada pocillo y para cada lavado.

Al terminar el lavado de la placa, se añadieron 100 μ L de solución de sustrato (solución de color) a los pocillos y nuevamente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y después de este tiempo, se añadieron 100 μ L de solución "stop" a los pocillos en el mismo orden de la solución de color.

Finalmente la absorbancia fue leída a 450 nm con un lector de microplacas de ELISA (Labsystems Multiskan Ascent), después de 15 minutos de haber adicionado la solución stop.

*Debido a que la prueba ELISA para analizar toxinas de tipo PSP presenta la siguiente reactividad cruzada: STX 100%, dcSTX 29%, GTX2,3 23%, GTX5 23%, GTX1,2 2.0%, dcGTX2,3 1.4%, NeoSTX 1.3%, GTX1,4 <0.2%, la concentración de toxinas por este método están referidas como concentraciones de saxitoxina (μ g STX/mL), y en este estudio se expresan como μ g STXeq/g de PL.