



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Especies formadoras de Florecimientos Algales Nocivos en el Sistema Arrecifal Veracruzano, con énfasis en el género *Pseudonitzschia*; cultivo, identificación y análisis de toxinas

T E S I S

P R E S E N T A:

Vanessa Herrera Pérez

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Lorena María Durán Riveroll

Asesor interno: Biol. Angélica Elaine González Schaff



Ciudad de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos Institucionales

Finalizo este trabajo con mucha felicidad y orgullo, ya que logré superar retos que yo misma me puse, sin embargo nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de personas que dedicaron parte de su tiempo y de las instituciones que facilitaron e hicieron posible que se cumplieran mis objetivos. Por ello mis más sinceros agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma Mater y a la Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, por ofrecerme sus instalaciones, que permitieron formarme como profesionista. Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por permitirme conocer a personas excepcionales que participaron en la motivación de mi trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. Lorena María Durán Riveroll, por ser una extraordinaria guía y motivación en mi formación académica, por brindarme su amistad y por sus valiosos consejos profesionales y personales.

A mi asesora interna, la Biol. Angélica Elaine González Shaff, por transmitirme su amor al plancton y por ser un impulso para seguir con mis inspiraciones. Por ser una persona inigualable, la más noble y virtuosa.

A mis sinodales, quienes mostraron su disposición para apoyarme a enriquecer mi trabajo, con las sugerencias y correcciones pertinentes.

Al curso emblemático de la RedFAN “Introducción al estudio de los Florecimientos Algales Nocivos”, 2017, por el apoyo económico que hizo posible mi asistencia y por mostrarme un panorama más amplio y por impulsar el interés sobre el estudio de estos fenómenos.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona, Técnico Académico Titular B, del Departamento de Biología Evolutiva del Taller de Biogeografía y Sistemática de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, por asesorarme de la manera más paciente y comprensible para lograr la obtención de las amplificaciones por PCR y su purificación, así como también en la orientación

para el manejo de software para el análisis de las secuencias. Para ella toda mi lealtad.

Al Dr. Fernando García Hernández a cargo de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, por el procesamiento y observación de mis diatomeas en microscopía electrónica.

A la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga a cargo del Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, por su disponibilidad para brindar sus servicios a mi trabajo.

Al Dr. Arturo Picones Medina, responsable del Laboratorio Nacional de Canalopatías del Instituto de Fisiología Celular, División Neurociencias, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme acceso a su equipo para facilitar la observación de mis cultivos.

Al Dr. Píndaro Díaz Jaimes, Investigador Titular B y al M. en C. Adán Fernando Mar Silva del Laboratorio de Genética de Organismos Acuáticos, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo su apoyo y conocimientos para la parte molecular de esta tesis; extracción y adquisición de cebadores, así como el diseño para los específicos y la amplificación.

Al Dr. Sergio Licea Durán, Investigador Asociado C del Laboratorio de Fitoplancton y Productividad, en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por auxiliarme en la identificación óptica del género, así como por prestar sus microscopios para facilitar el aislamiento de las células.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, Técnico Académico Titular B del Laboratorio de Biología Molecular y de la Salud, del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, por llevar a cabo la preparación, purificación y secuenciación de mis muestras.

Al Dr. Fernando González Farías, responsable del Laboratorio de Química Ambiental y al Dr. Martín López Hernández, Técnico Académico Titular B del

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirnos a mis compañeros y a mí hacer uso de su laboratorio y su equipo.

Al Dr. José A. Aké Castillo Investigador Titular C del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, Universidad Veracruzana, al Dr. Yuri Okolodkov, Investigador Titular C, Laboratorio de Botánica Marina y Planctología del Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías, Universidad Veracruzana y la Dra. Martha E. Ferrario, de la Universidad de La Plata, Argentina, por ayudarme en la identificación específica de mis diatomeas por medio de fotografías con ME.

Al Dr. Ernesto García Mendoza, y a la técnica analista, M.C. Yaireb Alejandra Sánchez Bravo, responsables del Laboratorio FICOTOX del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, por el procesamiento y análisis de toxinas.

A la Dra. A. Lourdes Castillo Granada responsable del Laboratorio de Espectroscopia en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México y del Proyecto PAPIME PE206115, por el apoyo en la preparación y el análisis de los tejidos de moluscos por Espectroscopia en el Infrarrojo, así como en la interpretación de los espectros obtenidos.

A la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez del Laboratorio de Biotoxinas Marinas, del ICMYL-UNAM, de la Unidad Académica Mazatlán, por facilitarme tejidos de moluscos contaminados con AD para su análisis.

Agradecimientos personales

A mi madre, Elvira Pérez Terán, por creer siempre en mí, por entender mi amor a la ciencia y a la vida, por su apoyo incondicional y por su motivación a seguir mis sueños. A mi padre, Joel Herrera Soto, por siempre desear lo mejor para mi porvenir.

A mi hermana Yoselin Herrera Pérez, por brindarme su amistad y a mis padres por obsequiarme una compañera de por vida.

A Moisés Paredes Juárez, por además de brindarme todo su cariño, apoyo y comprensión, me ayudó a esclarecer mis ideas, porque siempre desde un punto crítico, aportó conocimientos para enriquecer mi trabajo. Por ser una magnífica compañía.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Acuática de la FES Zaragoza, Brian, Dulce, Sandy y Milly, por tan bonita y divertida convivencia en el laboratorio como en las prácticas de campo.

A mis compañeros del ICMYL, Hugo, Andrea, Octavio y Leo, por ser un buen equipo de trabajo, por su solidaridad, apoyo y por el interés que cada uno prestó a mi trabajo.

A todas las personas que formaron parte de esta trayectoria académica, a mis profesores, por compartir sus pasiones e intereses sobre esta carrera tan maravillosa, a mis amigos, por su empatía, por todas las travesías dentro y fuera del salón de clases, y sobre todo en las prácticas de campo, que se volvieron inolvidables. Por todas las enseñanzas de vida que siempre formaran parte de mí. Hasta pronto futuros colegas.

¡El mar!, el inmenso desierto en el que el hombre no está nunca solo, pues siente estremecerse la vida en torno suyo. El mar es el vehículo de una sobrenatural y prodigiosa existencia; es movimiento y amor; es el infinito viviente.

Fue por el mar por lo que comenzó el globo, y quién sabe si no terminará por él.

-J. Verne-

Contenido

Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	vii
Resumen	ix
1 Introducción.....	1
2 Marco teórico	3
2.1 El plancton en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano	3
2.2 Generalidades del ácido domoico	7
2.3 Importancia del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	10
3 Zona de estudio: características del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano	19
4 Hipótesis	24
5 Objetivo general	24
6 Objetivos particulares.....	24
7 Materiales y métodos	25
7.1 Trabajo de campo	25
7.2 Trabajo de laboratorio	26
8 Resultados	37
8.1 Taxones potencialmente formadores de FAN y dinámica de <i>Pseudo-nitzschia</i>	37
8.2 Factores fisicoquímicos y cuantificación de nutrientes en el PNSAV	39
8.3 Análisis por espectroscopia de infrarrojo de moluscos potencialmente tóxicos.....	44
8.4 Identificación de los aislados del género <i>Pseudo-nitzschia</i> por morfometría	53
8.5 Microscopía electrónica.....	56
8.6 Identificación de las especies por métodos moleculares.....	60
8.7 Deformaciones de la valva	64
8.8 Curvas de crecimiento, tasa de crecimiento y tiempo de división	65
8.9 Diatomeas del género <i>Minidiscus</i>	72
8.10 Experimento con distintas concentraciones de nutrientes	73
8.11 Toxicidad de los aislados	80
9 Discusión de resultados	81
9.1 Factores fisicoquímicos.....	81
9.2 Riesgo de un sistema impactado con nutrientes de origen urbano y con taxa formadores de FAN.....	87
9.3 Análisis por espectrometría de infrarrojo de moluscos potencialmente tóxicos.....	88
9.4 Identificación morfológica de los aislados en cultivo	89
9.5 Identificación molecular de los aislados en cultivo	91
9.6 Deformaciones en las frústulas de las células	93
9.7 Curvas de crecimiento.....	94
9.8 Sobre la diatomea céntrica del género <i>Minidiscus</i>	95
9.9 Experimento con diferentes concentraciones de nitratos	96
10 Conclusiones y sugerencias	100

11	Literatura citada.....	103
12	Anexos	123
12.1	Protocolo para extracción de ADN.....	123
12.1	Matriz de distancias genéticas	124
12.2	Diferencias en la composición de los nucleótidos entre cepas.	125

Lista de abreviaturas

AD	Ácido domoico
ADNr	ADN ribosomal
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico
ANDEVA	Análisis de varianza
AO	Ácido okadaico
ASP	Intoxicación amnésica por consumo de mariscos (<i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>)
AZA	Azaspirácido
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BTX	Brevetoxinas
CFP	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado
CICESE	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
CNS	Sistema nervioso central
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio (<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>)
DH₂O	Agua destilada
DSP	Intoxicación diarreica por consumo de moluscos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAN o HAB	Florecimientos Algales Nocivos o <i>Harmful Algal Blooms</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
ITS	Región espaciadora interna transcrita
KA	Ácido kaínico
MEB o SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
MET o TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRC CRM-ASP	<i>National Research Council, Canada, Certified Reference Material for Amnesic Shellfish Poisoning</i>
NSP	Intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos
LANABIO	Laboratorio Nacional de Biodiversidad
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a un detector de masas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PNSAV	Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano
PSP	Intoxicación paralizante por consumo de moluscos (<i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>)
PTX	Pectenotoxinas
RF	Región fundamental
RH	Región de la huella dactilar
STX	Saxitoxina
TFA	Ácido trifluoroacético
TDS	Sólidos totales disueltos
YTX	Yessotoxinas
UNAM	Universidad Autónoma de México
UV	Ultravioleta. Se hace referencia a la técnica espectroscópica

Índice de figuras

Figura 1. Estructura molecular del ácido domoico y algunos de sus isómeros.....	8
Figura 2. Estructuras químicas del ácido domoico, ácido kaínico y glutamato.	8
Figura 3. Estructura de una diatomea penada.....	13
Figura 4. Estructura de la frústula de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.....	14
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	17
Figura 6. Plano de ubicación del polígono 49, PNSAV. Se han marcado en rojo los sitios en donde se aislaron las células para los cultivos.....	20
Figura 7. Taxa no tóxicas identificadas dentro del PNSAV, de septiembre 2016 a mayo 2017.....	37
Figura 8. Taxa potencialmente tóxicos dentro del PNSAV, de septiembre 2016 a mayo 2017.....	38
Figura 9. Dinámica de las abundancias de <i>Pseudo-nitzschia</i> comparada con las abundancias de otros organismos fitoplanctónicos dentro del PNSAV durante septiembre 2016 a mayo 2017.	38
Figura 10. Abundancias relativas de <i>Pseudo-nitzschia</i> y otros organismos fitoplanctónicos identificados dentro del PNSAV durante septiembre de 2016 a mayo de 2017.....	39
Figura 11. Variabilidad de la temperatura del agua de mar por mes en el PNSAV de septiembre de 2016 a mayo de 2017.	39
Figura 12. Relación inversamente proporcional del oxígeno disuelto y la temperatura mensual en el PNSAV, de septiembre de 2016 a mayo de 2017.....	40
Figura 13. Variabilidad de la salinidad (ups), CTV (mS), sólidos disueltos totales (SDT, ppm) por mes en el PNSAV, de septiembre de 2016 a mayo de 2017.	41
Figura 14. Variación del pH de septiembre de 2016 a mayo de 2017 en el PNSAV.	42
Figura 15. Concentración de nutrientes (nitritos y nitratos) dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.....	43
Figura 16. Concentración de fosfatos dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.	43
Figura 17. Relación entre nitratos y abundancias de <i>Pseudo-nitzschia</i> dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.....	44
Figura 18. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de las muestras de tejidos de moluscos de septiembre de 2016	46
Figura 19. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de las muestras de tejidos de moluscos de mayo de 2017.	47
Figura 20. Espectros donde se comparan las muestras de septiembre de 2016 y mayo de 2017.....	48
Figura 21. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de la muestras de tejidos de molusco utilizados para la detección de AD.....	49

Figura 22. Espectros donde se compran las muestras de septiembre de 2016 y los tejidos utilizados para la detección de ácido domoico.	50
Figura 23. Espectros donde se comparan las muestras de mayo de 2017, y los tejidos utilizados para la detección de AD.	51
Figura 24. Espectros donde se comparan las muestras de septiembre de 2016, mayo de 2017 y los tejidos utilizados para la detección de ácido domoico.	52
Figura 25. Aislado 4C. Forma y estructura de la valva.	57
Figura 26. Aislado 5E. Forma y estructura de la valva.	58
Figura 27. Aislado 5A. Forma y estructura de la valva.	58
Figura 28. Aislado 8C. Forma y estructura de la valva.	59
Figura 29. Aislado 6D. Forma y estructura de la valva.	59
Figura 30. Gel de electroforesis 1% de la extracción de ADNr de los cinco aislados cultivados.	61
Figura 31. Gel de agarosa al 1.5%, en el que se observan los productos de amplificación de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4.	62
Figura 32. Gel de agarosa al 1.5%. Productos de amplificación de PCR con los cebadores específicos Pnizsch-R y Pnizsch-F.	62
Figura 33. Árbol realizado con el método de Unión de Vecinos (<i>Neighbor Joining</i>) basado en la región ITS1-5.85-ITS2, de los aislados obtenidos en este trabajo (PNSAV_Isla Santiagoullo, _Isla Verde) y las secuencias del GenBank de diferentes países.	64
Figura 34. Deformación de la frústula después de la reproducción sexual.	65
Figura 35. Curva de crecimiento del aislado 4C.	66
Figura 36. Curva de crecimiento del aislado 5E.	66
Figura 37. Curva de crecimiento del aislado 5A.	67
Figura 38. Curva de crecimiento del aislado 8C.	67
Figura 39. Curva de crecimiento del aislado 6D.	68
Figura 40. Curvas de crecimiento de los cinco aislados.	68
Figura 41. Tasa de crecimiento de los aislados cultivados de <i>Pseudo-nitzschia</i> . 70	
Figura 42. Tiempo de división de los aislados cultivados de <i>Pseudo-nitzschia</i>	71
Figura 43. Densidad celular máxima de los aislados cultivados de <i>Pseudo-nitzschia</i>	72
Figura 44. Diatomea del género <i>Miniduscus</i> sp. Forma y estructura de la valva..	73
Figura 45. Curva de crecimiento del aislado 8C con la concentración de nitratos aumentada.	74
Figura 46. Curva de crecimiento del aislado 8C con la concentración de nitratos reducida.	74
Figura 47. Curva de crecimiento del aislado 8C sin modificar el medio de cultivo (control).	75
Figura 48. Curvas de crecimiento del aislado 8C con diferentes concentraciones de nitrato.	75

Figura 49. Curvas de crecimiento del aislado 8C y del control del experimento...	76
Figura 50. Tasa de crecimiento de los aislados bajo diferentes concentraciones de nitratos.	77
Figura 51. Tiempo de división de los aislados con diferentes concentraciones de nitratos.	78
Figura 52. Densidad celular máxima de los aislados con diferentes concentraciones de nitratos.....	79

Índice de tablas

Tabla 1. Principales intoxicaciones y sintomatología causadas por fitoplancton productor de toxinas marinas.	6
Tabla 2. Especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i> reportadas como potencialmente tóxicas.	11
Tabla 3. Problemas ambientales encontrados para el PNSAV y división por categorías.....	23
Tabla 4. Sitios en donde se obtuvieron las muestras para el establecimiento del cultivo.	26
Tabla 5. Preparación de soluciones stock.	28
Tabla 6. Preparación para la solución madre de nutrientes.	28
Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción y del programa para la amplificación.....	31
Tabla 8. Lista de cepas utilizadas para la elaboración del árbol.	32
Tabla 9. Concentraciones de nitratos utilizadas para el experimento.	34
Tabla 10. Células por mililitro, mililitros y células totales de cada aislado y del experimento.....	35
Tabla 11. Transiciones utilizadas para la detección del ácido domoico.	36
Tabla 12. Lugar de donde fueron aisladas las células de <i>Pseudo-nitzschia</i> dentro del PNSAV, para su posterior análisis.....	53
Tabla 13. Taxonomía del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	53
Tabla 14. Características morfométricas del aislado 4C <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	54
Tabla 15. Características morfométricas del aislado 5E <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	54
Tabla 16. Características morfométricas del aislado 5A <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	55
Tabla 17. Características morfométricas del aislado 8C <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	55
Tabla 18. Características morfométricas del aislado 6D <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	56
Tabla 19. Máximos y mínimos de las características morfométricas de los cinco aislados.	56
Tabla 20. Concentración en ng μL^{-1} del ADN extraído e índices de pureza.	60
Tabla 21. Homologías en GenBank, a partir de la amplificación de la región ITS-5.85-ITS2 de ADNr nuclear de acuerdo al BLAST.	63
Tabla 22. Promedio y desviación estándar de los datos de crecimiento de los cinco aislados.	69
Tabla 23. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la tasa de crecimiento de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.	69
Tabla 24. Pruebas estadísticas para la comparación de medias del tiempo de división de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.	70
Tabla 25. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la densidad celular máxima de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.	71
Tabla 26. Taxonomía del género <i>Minidiscus</i>	73

Tabla 27. Promedio y desviación estándar de los datos de crecimiento del experimento con diferentes concentraciones de nitratos.	76
Tabla 28. Promedio y desviación estándar de los datos de crecimiento del experimento con diferentes concentraciones de nitratos.	76
Tabla 29. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la tasa de crecimiento de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.....	77
Tabla 30. Pruebas estadísticas para la comparación de medias del tiempo de división de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.	78
Tabla 31. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la densidad celular máxima de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.....	79
Tabla 32. Distancias genéticas en la región ITS1-5.85-ITS2 de diferentes cepas de <i>P. brasiliiana</i>	124
Tabla 33. Composición de nucleótidos de diferentes ubicaciones obtenidas de la región ITS1-5.85-ITS2 (en pares de bases) en <i>P. brasiliiana</i> y <i>P. americana</i> . Las bases que se muestran son las que tuvieron variaciones comparadas con KM386875.1_ <i>P. brasiliiana</i> _China.	125

Resumen

Las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* tienen la capacidad de formar florecimientos algales nocivos (FAN), los cuales pueden tener impactos negativos en el medio por su alta densidad, o bien porque algunas especies producen una potente neurotoxina, el ácido domoico (AD), que perjudica al ecosistema, a la salud pública y al desarrollo socioeconómico de la zona impactada. El Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) es afectado por las descargas de aguas residuales, que aumentan la concentración de compuestos inorgánicos en el mar, y esto ha sido señalado como una posible causa del crecimiento poblacional del género. En este trabajo se identificaron siete taxones diferentes dentro del PNSAV, reportados como potenciales formadores de FAN. Se obtuvieron abundancias de *Pseudo-nitzschia*, y se observó su dominancia en ciertas temporadas del año. También se reportan los datos de los parámetros fisicoquímicos dentro de la zona. Se realizaron extracciones de tejidos de bivalvos que fueron analizados por Espectroscopia de Infrarrojo para determinar si se encontraban contaminados por ácido domoico. Se aislaron células de *Pseudo-nitzschia*, para establecer cinco cultivos, y se llevó a cabo la identificación taxonómica morfológica por microscopía electrónica de barrido y de transmisión, logrando por este medio reconocer que todos los aislados pertenecían al complejo *P. americana*. Para la determinación específica se utilizaron métodos moleculares con cebadores específicos de la región ITS1-5.85-IT2, identificando así cuatro de los cinco aislados, que pertenecían a la especie *P. brasiliiana*. Durante el transcurso de los cultivos se realizaron las curvas de crecimiento y se evaluó su potencial tóxico por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS). Con uno de los aislados se realizó un experimento con diferentes tratamientos, modificando las concentraciones de nitratos. No se detectó AD en ningún cultivo, sin embargo, el aislado con el que experimento se adaptó a los diferentes regímenes de los tratamientos. Debido a que dentro del PNSAV se encuentra fitoplancton potencialmente formador de FAN y a que en este ecosistema se descargan constantemente aguas residuales, presenta el riesgo de ser impactado por eventos de FAN, entre ellos de *Pseudo-nitzschia*. Por este motivo es esencial su correcta determinación taxonómica y realizar estudios

sobre los factores que desencadenan la producción de toxinas. También se sugiere mejorar las medidas preventivas, hacer más eficiente el trabajo de las plantas de tratamiento de aguas residuales, fortalecer el monitoreo y las regulaciones para salvaguardar el ecosistema, la salud humana y evitar las pérdidas económicas. A nuestro conocimiento, dentro del PNSAV no existe ningún estudio sobre el potencial tóxico de *Pseudo-nitzschia*, por lo que este estudio sería el primero de su tipo.



1 Introducción

Los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) son el resultado del incremento masivo en el número de células fitoplanctónicas, lo que puede generar un impacto negativo sobre el ecosistema y la salud (Smayda, 1997; Band-Schmidt *et al.*, 2011). Estos eventos ocurren de manera natural, sin embargo, se ha observado un aumento tanto en frecuencia como en duración, por lo que actualmente su estudio ha cobrado un enorme interés mundial (Hallegraeff, 1993). La investigación sobre los FAN incluye el estudio de las toxinas que producen algunas especies y que han sido relacionadas directamente con afectaciones ecológicas, intoxicaciones humanas y problemas económicos. Aunado a lo anterior, también se ha registrado un aumento en el número de especies y cada vez se conocen más toxinas asociadas, las cuales representan un riesgo potencial para nuestro país.

Las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* son abundantes dentro del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) (García-Mendoza *et al.*, 2016) y su relación con la producción de la neurotoxina ácido domoico (AD), responsable de intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP por sus siglas en inglés, *Amnesic Shellfish Poisoning*), es bien conocida (Alvarez-Falconí, 2009).

Los florecimientos algales y la producción de toxinas se han asociado con diferentes factores ambientales, como eventos de surgencias, tormentas invernales y eutrofización, sin embargo, no se conoce con exactitud qué promueve su formación y su mantenimiento (Smayda, 1997; Herrera-Silveira *et al.*, 2004); asimismo se sabe que las condiciones suelen ser específicas de cada especie y lugar geográfico, por lo que en este trabajo se evaluó que afectaciones tiene las abundancias de *Pseudo-nitzschia* en relación con los nitratos dentro del PNSAV. En condiciones de laboratorio, se establecieron cultivos para posteriormente realizar un experimento con diferentes concentraciones de nitratos y se analizó su crecimiento poblacional y la producción de toxina.

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento sobre el desarrollo de los eventos de FAN presentes en el PNSAV, con hincapié en el género *Pseudo-*



nitzschia. Incluye, de manera general, información sobre el género, su abundancia y los métodos más empleados para la determinación taxonómica y la detección de sus toxinas.



2 Marco teórico

2.1 El plancton en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

2.1.1 Qué es el plancton

El plancton está formado por un conjunto de microorganismos adaptados a pasar parte o todo su ciclo de vida suspendidos en la columna de agua, ya que, aunque poseen flagelos o varios mecanismos que pueden alterar su flotabilidad, se encuentran limitados a los movimientos de las corrientes de agua (Wetzel, 2001; Hays *et al.*, 2005).

La comunidad planctónica se distingue de diferentes maneras, principalmente de acuerdo a dos categorías funcionales: el fitoplancton, está constituido por individuos que en su mayoría son autotróficos, y el zooplancton, constituido por organismos heterotróficos. El fitoplancton es comúnmente conocido como el “pasto del mar” porque se le considera la base la red trófica tradicional (Werlinger *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2009). El zooplancton es el consumidor primario, y se ubica en el segundo nivel trófico (Giraldo *et al.*, 2007).

El fitoplancton representa menos del 1% de la biomasa fotosintética mundial, pero es responsable de más del 45% de la producción primaria neta anual (Field *et al.*, 1998; Ramanan *et al.*, 2016), lo que lo convierte en una de las principales fuentes de materia orgánica y energía; es un regulador gaseoso y participa en los ciclos biogeoquímicos, por lo que se considera uno de los indicadores más importantes del potencial productivo y de los cambios en el ecosistema, debido a sus cortos ciclos de vida y su sensibilidad a los contaminantes (Loa *et al.*, 1994; Field *et al.*, 1998; Landa *et al.*, 2016;). Su tamaño varía entre 0.2 y 200 μm (Lampert *et al.*, 1997); es un grupo polifilético, en el cual los grupos más diversos y dominantes lo conforman las diatomeas y los dinoflagelados (Licea-Durán *et al.*, 1995).

2.1.2 Importancia de los Florecimientos Algales Nocivos

Cuando hay un aumento en la densidad celular de las poblaciones de fitoplancton de manera exponencial, ocurren los fenómenos llamados Florecimientos Algales Nocivos (FAN o HAB por sus siglas en inglés, *Harmful Algal Blooms*). Estos eventos



pueden cambiar el color del agua, por lo que son comúnmente conocidos como “mareas rojas”, sin embargo, no todos los florecimientos algales son rojos; su color depende de los pigmentos presentes en las microalgas (amarillos, cafés, anaranjados, verdes, etc.), o bien pueden no generar cambio de color (Anderson *et al.*, 2001; Hernández-Orozco *et al.*, 2006). Los FAN son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural, aunque recientemente se ha observado un incremento en su frecuencia, duración, distribución geográfica, intensidad y toxicidad (Hallegraeff, 1993). Aparentemente, existen diferentes factores que promueven el crecimiento de un grupo específico de organismos formadores de FAN, como la variabilidad hidrodinámica natural, la disponibilidad de luz, el aumento en la concentración de nutrientes, los patrones fisiológicos y de comportamiento, y los procesos de cambio climático (Dale *et al.*, 2006; Hallegraeff, 2010), que han asociado los procesos de eutroficación y los eventos de surgencia como las principales causas para los cambios en la hidrodinámica del ecosistema y la expansión temporal y geográfica de los FAN. También se reconocen otros factores, como las descargas de aguas de lastre, las cuales facilitan la invasión de especies por acción y efecto de las corrientes marinas, ya que pueden transportar a los organismos formadores de FAN a la línea de costa (Dickman *et al.*, 1999; Smayda, 2007; Heisler *et al.*, 2008; Aké-Castillo *et al.*, 2014).

Los FAN son percibidos como dañinos debido a que son tan densas las poblaciones algales que pueden afectar gravemente a otros organismos acuáticos, ya sea por anoxia en el medio y taponamiento de branquias o por la producción de toxinas. Algunas especies nocivas ejercen un efecto importante incluso a bajas densidades, aun sin llegar a formar florecimientos visibles (Anderson *et al.*, 2001; Hernández-Orozco & Gárate-Lizárraga, 2006; Herrera *et al.*, 2008), y las toxinas además pueden ser transferidas a través de la red trófica. Éstas se acumulan en diversos órganos de moluscos, crustáceos y/o peces, los cuales, al ser consumidos por otros organismos, incluyendo a los seres humanos, provocan intoxicaciones que pueden llevar a la muerte. Los daños que causan estos eventos no son únicamente en el ecosistema o en la salud; también afectan a las actividades productivas como la



pesca, la acuicultura e indirectamente, al turismo (Hallegraeff, 1995; Mancera *et al.*, 2010), ya que causan pérdidas económicas importantes y que en algunos casos han alcanzado los 300,000 USD día⁻¹ (Llewellyn *et al.*, 2006). En este contexto, resulta esencial la detección, el monitoreo y la regulación de dichas especies productoras de toxinas para salvaguardar la salud humana y evitar o controlar las pérdidas económicas.

Los FAN suelen ser monoespecíficos, aunque en algunos casos son una mezcla de individuos que pueden pertenecer a diferentes especies (Pettersson *et al.*, 2012; Rodríguez-Gómez, 2013). Se han reconocido aproximadamente 300 especies de microalgas formadoras de florecimientos algales, de las cuales unas 75 son capaces de producir poderosas toxinas (Hallegraeff, 1995; Smayda, 1997; Wang *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2008). Dentro de este conjunto, los dinoflagelados son el grupo con el mayor potencial biológico, ya que se han identificado aproximadamente 60 especies productoras de toxinas y otros compuestos bioactivos, hidrofílicos y liposolubles (Zaccaroni *et al.*, 2008). En contraste, en el grupo de las diatomeas son pocas las especies toxigénicas, y la mayoría pertenecen al género *Pseudo-nitzschia*. Los organismos de este género han causado la muerte de aves y mamíferos marinos, e inclusive intoxicaciones y muertes humanas (Bates *et al.*, 2006). Otras diatomeas reportadas como productoras de toxinas son *Nitzschia navis-varingica* y *Amphora coffeaeformis* (Bates, 2000; Lundholm *et al.*, 2004). También algunas cianofíceas marinas han sido reconocidas como potencialmente toxigénicas, y entre ellas se encuentran algunas especies del género *Trichodesmium* (Aké-Castillo, 2011; Aké-Castillo *et al.*, 2014).

2.1.3 Ficotoxinas

Las toxinas producidas por el fitoplancton, también llamadas ficotoxinas, son un grupo grande y diverso de compuestos químicos con diferentes estructuras y mecanismos de acción (Botana *et al.*, 1996). Su importancia radica en que pueden bioacumularse, y en algunos casos ser biotransformadas por los organismos marinos que las consumen, como moluscos o peces, que posteriormente son utilizados para consumo humano. Debido a sus importantes efectos sobre la salud



pública, las toxinas marinas se han clasificado históricamente en función de los síntomas clínicos que causan (Tabla 1), pero la clasificación más reciente, aceptada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), se basa en su estructura química. Se clasifican en ácido domoico (AD), ácido okadaico (AO), azaspirácido (AZA), brevetoxinas (BTX), iminas cíclicas, pectenotoxinas (PTX), saxitoxina (STX), yessotoxinas (YTX) (Andersen *et al.*, 2004; Toyofuku, 2006) y la lista aumenta cada año, con las llamadas “toxinas emergentes”.

Tabla 1. Principales intoxicaciones y sintomatologías causadas por fitoplancton productor de toxinas marinas.

Tomada de (Hernández-Orozco & Gárate-Lizárraga, 2006).

Intoxicación	Síntomas generales	Organismos productores
Intoxicación paralizante por consumo de moluscos (PSP)	Sensación de hormigueo, entumecimiento de cara, cuello, manos, náuseas, vómito y muerte por paro respiratorio.	<i>Alexandrium</i> spp. <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i> Algunos géneros de cianobacterias
Intoxicación diarreica por consumo de moluscos (DSP)	Diarrea, náuseas. La exposición crónica promueve la formación de tumores digestivos.	<i>Dinophysis</i> spp. <i>Prorocentrum</i> spp.
Intoxicación amnésica por consumo de moluscos (ASP)	Síntomas gastrointestinales como: vómito, diarrea y calambres. Neurológicos: desorientación náuseas, vértigo, confusión y pérdida de la memoria.	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp. <i>Amphora coffaeiformis</i> <i>Nitzschia navis-varingica</i>
Intoxicación neurotóxica por consumo de moluscos (NSP)	Escalofríos, dolor de cabeza, debilidad muscular, náuseas, vómito y muerte por paro respiratorio.	<i>Karenia</i> spp.
Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado (CFP)	Náuseas, entumecimiento y temblor de las manos y pies, vómito y muerte por fallas respiratorias.	<i>Gambierdiscus</i> spp. <i>Ostreopsis</i> spp. <i>Coolia</i> spp.

Estas toxinas afectan principalmente dos propiedades esenciales de las células: la primera es la permeabilidad de las membranas celulares, esto es, la propiedad fisiológica de permitir el paso selectivo de iones de importancia (sodio, potasio, calcio), ciertos nutrientes y agua. La segunda es la intercomunicación entre las células en vertebrados al unirse con alta afinidad a los sitios receptores presentes en proteínas de membrana (receptores y canales iónicos) o a enzimas del citosol, alterando en todos los casos su funcionamiento normal (Suárez-Isla *et al.*, 1992).



Por estos motivos, la mayoría de los países han establecido límites regulatorios para estos compuestos tóxicos.

2.2 Generalidades del ácido domoico

El ácido domoico (AD) es un aminoácido no proteico, que contiene tres grupos carboxilo; presenta ocho isómeros (ácidos isodoméricos A, B, C, D, E, F, G y H) y el diastereoisómero C5' (Figura 1). Es soluble en agua, altamente afín a los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA), por ser análogo estructural del glutamato o ácido glutámico ácido y al ácido kaínico (AK) (Figura 2), que es el neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central (CNS), y que controla casi un tercio de toda la actividad sináptica (Wright *et al.*, 1995; Holland *et al.*, 2005; Trainer *et al.*, 2008).

La activación neuronal es controlada de manera normal por la reabsorción o inactivación del glutamato por enzimas específicas. Sin embargo, la carencia de un sistema de remoción para el AD conlleva a un proceso patológico por el cual las neuronas son sobreactivadas, lo que causa un incremento en los niveles del ion calcio (Ca^{2+}) (Costa *et al.*, 2010), y por consiguiente, la despolarización de la célula, además de provocar reacciones secundarias como la liberación de óxido nítrico (NO), lo que agrava la muerte neuronal por excitotoxicidad (Nijjar *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2005). Se ha estudiado que esta neurodegeneración en lobos marinos causa daños permanentes a la memoria espacial, alteración que puede ocurrir también en humanos (Bohbot *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2015). La exposición crónica a bajas dosis también representa un riesgo ya que conduce a daño renal, déficit cognitivo y deterioro del desarrollo fetal (Hays *et al.*, 2005; Lefebvre *et al.*, 2017).

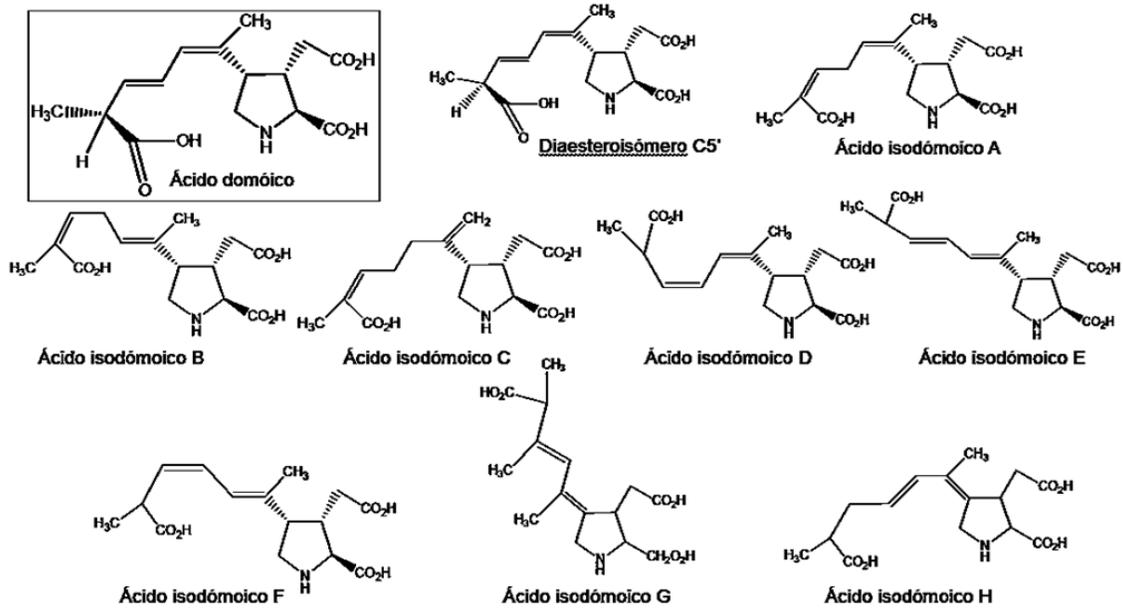


Figura 1. Estructura molecular del ácido domoico y algunos de sus isómeros. Modificado de (Munday *et al.*, 2008), con el software ChemDraw Ultra 12.0.

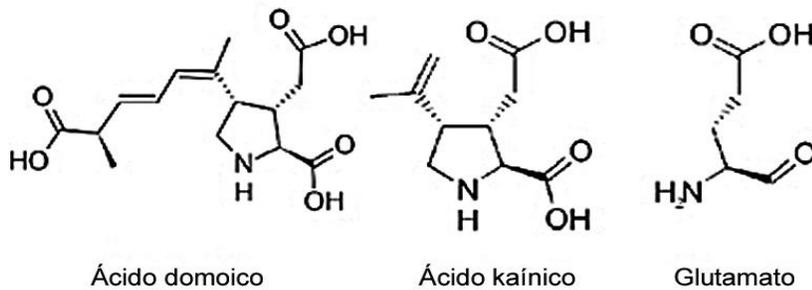


Figura 2. Estructuras químicas del ácido domoico, ácido kaínico y glutamato. Modificado de (Quilliam, 2003; Jeffery *et al.*, 2004).

2.2.1 Intoxicación por ácido domoico

En el verano de 1961 se encontraron pájaros regurgitando anchoas y muriendo en las calles de California; este evento inspiró a Alfred Hitchcock para la creación de la película “*The Birds*” (Allen, 2016). Décadas más tarde, en 1991, ocurrió una intoxicación en la misma área, la cual afectó a decenas de pelícanos; para este año ya se habían estudiado los síntomas de la intoxicación por AD y por lo tanto fue posible identificarla. Una investigación más profunda sobre el evento de 1961,



finalmente asoció aquel evento con la intoxicación reciente. Posteriormente, se examinó el contenido estomacal en muestras de zooplancton de 1961. Estos organismos se habían alimentado de diatomeas, y a su vez fueron alimento de tortugas marinas, algunos peces y aves. Los hallazgos hicieron posible la reconstrucción de la flora de la región en aquella época, y así se logró identificar que el alimento del zooplancton era representado en 79% por células del género *Pseudo-nitzschia*, lo que llevó a documentar el primer registro de intoxicación amnésica en ese año (Work *et al.*, 1993; Bargu *et al.*, 2012).

Originalmente, el AD fue descubierto en 1958 en Japón, como un producto de la macroalga *Chondria armata* (Rhodophyta), la cual es llamada “domoi”, por lo que a su contenido ácido se le denominó ácido domoico. En la isla Tokunoshima esta alga es un producto tradicional utilizado como antihelmíntico intestinal, pero hasta entonces nunca se había descrito que produjera daño alguno, posiblemente por su baja concentración (Alvarez-Falconí, 2009). Sin embargo, ésta no fue la fuente de AD en el incidente reportado en 1987 en la isla Príncipe *Edward*; en esta isla canadiense ocurrió la primera intoxicación humana por la ingestión de mejillones azules (*Mytilus edulis*), los cuales eran cultivados en un sitio cercano donde había ocurrido un florecimiento de *P. pungens*, la cual fue encontrada en el contenido intestinal de los mejillones.

El consumo de este bivalvo causó la intoxicación aguda de más de 100 personas, de las cuales diecinueve tuvieron que ser hospitalizadas; de ellas, doce requirieron cuidados intensivos y tres fallecieron. Los síntomas que presentaron fueron náuseas y vómitos (76%), dolores abdominales (50%), diarrea (42%) y pérdida de la memoria anterógrada o bien la dificultad para recordar información nueva (25%), que en algunos casos fue crónica, además de otros síntomas como secreciones respiratorias profusas, inestabilidad de la presión sanguínea, convulsiones, disturbios en la visión, castaño involuntario de los dientes y coma (Alvarez-Falconí, 2009). El período de latencia, desde la ingesta hasta la aparición de la intoxicación, fue de entre quince minutos a 38 horas, con un promedio de cinco horas. Deben considerarse otros factores que podrían haber modificado el tiempo de inicio de los



síntomas, como el alimento que acompañaba al contaminado, la cantidad ingerida, la concentración de la toxina en el mejillón, la bebida, el estado previo del estómago, el peso, la edad y la presencia de algún posible factor de riesgo. La toxina no daña a los mejillones, pero se concentra en las vísceras, particularmente en el hepatopáncreas. Su presencia en los alimentos no puede ser percibida por los consumidores porque no altera las características del molusco como el color, olor, sabor, tamaño o forma, además de que es termoestable (Grimmelt *et al.*, 1990).

Frente a ello, las autoridades de salud establecieron los límites tolerables; en México se encuentran en la Norma Oficial NOM-242-SSA1-2005 que regula que no lleguen productos al mercado como alimento si las concentraciones de AD exceden de 30 mg kg⁻¹ en el hepatopáncreas y las vísceras de cangrejo, o de 20 mg kg⁻¹ en bivalvos (Frescos, 2005).

Existen varios métodos para identificar la presencia de ácido domoico: métodos biológicos, como el bioensayo en ratón (por inyección intraperitoneal) y métodos químicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con extracción clorhídrica y metanólica, acoplada a un detector de luz ultravioleta (UV) o de masas (MS). Estos últimos son los métodos oficiales aprobado por la AOAC en el año 2000 y utilizados en todo el mundo (William, 1980).

2.3 Importancia del género *Pseudo-nitzschia*

El género *Pseudo-nitzschia* corresponde a diatomeas marinas de hábitat cosmopolita. En este género se encuentra la mayor parte de las especies productoras de ácido domoico, neurotoxina que, a partir de la intoxicación en Canadá en 1987, atrajo gran interés entre los investigadores, debido al riesgo que representa para la salud humana y de otros organismos. Se han registrado cientos de eventos de FAN causados por *Pseudo-nitzschia* alrededor del mundo: en Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Argentina, Dinamarca, Escocia, Irlanda, Francia, España, Italia, Túnez, Marruecos, Corea, Vietnam y Nueva Zelanda (Skov *et al.*, 1997; Rhodes, 1998; Akallal *et al.*, 2000; Bates *et al.*, 2000; Kotaki *et al.*, 2000; Sarno, 2000; Cho *et al.*, 2002; Fehling *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2004;



Badylak *et al.*, 2006; Nezan *et al.*, 2006; Almandoz *et al.*, 2007; Bogan *et al.*, 2007; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2007; Altamirano *et al.*, 2008; Isabel *et al.*, 2009), en los cuales, además de la afectación a los humanos, también ha causado la muerte de peces, aves y mamíferos marinos (Bates & Trainer, 2006). En el evento de 1991, en la Costa Oeste de los Estados Unidos de Norteamérica, se registró la muerte de pelícanos que se alimentaron de anchovetas cuyo contenido estomacal reveló la presencia de *P. australis* y altas concentraciones de AD, y en 1997 en el Golfo de California, murieron 766 aves y 67 mamíferos marinos a través del consumo de sardina con un alto contenido de *P. australis* en sus vísceras (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2009).

Se han descrito 50 especies pertenecientes a este género de las cuales se han reportado 24 como productoras de AD (Guiry, 2013; Dao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Ajani *et al.*, 2018) (Tabla 2).

Tabla 2. Especies del género *Pseudo-nitzschia* reportadas como potencialmente tóxicas.

Especie	Referencias sobre su toxicidad	Lugar
1. <i>P. abrensis</i> Pérez-Aicua & Orive	(Teng <i>et al.</i> , 2016)	Malasia
2. <i>P. australis</i> Frenguelli	(Fritz <i>et al.</i> , 1992; Garrison <i>et al.</i> , 1992)	Bahía de Monterrey, California
3. <i>P. batesiana</i> H.C.Lim, S.T.Teng, C.P.Leaw & P.T.Lim	(Teng <i>et al.</i> , 2016)	Malasia
4. <i>P. brasiliiana</i> Lundholm, Hasle y G.A. Fryxell	(Sahraoui <i>et al.</i> , 2011)	Mar Mediterráneo, Túnez
5. <i>P. caciiantha</i> Lundholm, Moestrup & Hasle	(Dao <i>et al.</i> , 2014)	Aislada de la bahía NHA Phu, Vietnam
6. <i>P. calliantha</i> Lundholm, Moestrup y Hasle	(Martin <i>et al.</i> , 1990)	Bahía de Fundy, EUA
7. <i>P. circumpora</i> H.C.Lim, C.P.Leaw & P.T.Lim	(Lim <i>et al.</i> , 2013)	Estrecho de Malacca, Malasia
8. <i>P. cuspidata</i> (Hasle) Hasle	(Bill <i>et al.</i> , 2005)	Washington, EUA
9. <i>P. delicatissima</i> (Cleve) Heiden	(Smith, 1991)	Golfo de San Lorenzo, Canadá
10. <i>P. fraudulentata</i> (Cleve) Hasle	(Rhodes, 1998)	Korea
11. <i>P. fukuyoi</i> H.C.Lim, S.T.Teng, Leaw & P.T. Lim	(Dao <i>et al.</i> , 2015)	Aislada de Vietnam
12. <i>P. galaxiae</i> Lundholm y Moestrup	(Cerino <i>et al.</i> , 2005)	Golfo de Nápoles, Italia
13. <i>P. granii</i> (Hasle) Hasle	(Trick <i>et al.</i> , 2010)	Estación del Océano Papa (50° N, 145° W)
14. <i>P. kodamae</i> S.T. Teng, H.C. Lim, C.P. Leaw & P.T. Lim	(Teng <i>et al.</i> , 2014)	Estrecho de Malaca, Malasia



15. <i>P. lundholmiae</i> H.C.Lim, S.T.Teng, C.P.Leaw & P.T.Lim	(Teng <i>et al.</i> , 2016)	Malasia
16. <i>P. multiseries</i> (Hasle) Hasle	(Bates, 1998)	Isla Príncipe Edward, Canadá
17. <i>P. multistriata</i> (Takano) Takano	(Rhodes <i>et al.</i> , 2000)	Nueva Zelanda
18. <i>P. seriata</i> (P.T. Cleve) H. Perag.	(Lundholm <i>et al.</i> , 1994)	Canadá
19. <i>P. subfraudelenta</i>	(Teng <i>et al.</i> , 2016)	Malasia
20. <i>P. simulans</i> Li, Huang & Xu	(Li <i>et al.</i> , 2017)	Costas de China
21. <i>P. plurisecta</i> Orive y Pérez- Aicua	(Fernandes <i>et al.</i> , 2014)	Golfo de Maine, EUA
22. <i>P. pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle	(Lundholm <i>et al.</i> , 1997)	Dinamarca
23. <i>P. pungens</i> (P.T. Cleve) Hasle	(Rhodes <i>et al.</i> , 1996)	Aislada de Nueva Zelanda
24. <i>P. turgidula</i> (Hustedt) Hasle	(Rhodes <i>et al.</i> , 1996)	Aislada de Nueva Zelanda

2.3.1 Características del género *Pseudo-nitzschia*

Las diatomeas de este género son penadas y exclusivas de ambientes marinos. Como el resto de las diatomeas, poseen una pared celular o frústula, de ácido silícico (SiOH₄). Esta frústula está compuesta por dos valvas que se ajustan una dentro de la otra; la hipoteca es la valva más pequeña y sus bordes caben dentro de la epiteca (Hasle *et al.*, 1996; Tomas, 1997; Hasle, 2002) (Figura 3).

El género pertenece a la subclase Bacillariophycidae, la cual se caracteriza por tener una hendidura, llamada rafe, que corre a lo largo de cada una de las valvas, el cual es reforzado dentro de una celda por puentes de sílice o fíbulas (Amato *et al.*, 2007). En algunas especies, el rafe es interrumpido por un interespacio central. Las interestrías están separadas por estrías, estas se encuentran perforadas por los poroides (Amato *et al.*, 2008; Trainer *et al.*, 2008).

El género fue descrito por Cleve (1883), quien utilizó como lectotipo a *P. seriata*; son células fusiformes con extremos atenuados gradualmente; la valva está aplanada o suavemente curvada, no ondulada, con rafe extremadamente excéntrico y no elevado por encima del nivel de ésta; las paredes del canal del rafe no tienen poroides, ni conopea. La valva es estriada con varias filas de poroides circulares cubiertos por oclusiones perforadas (himen). Las células forman colonias escalonadas por la superposición de los extremos valvales, o bien por una fracción



del eje apical, con desplazamiento de toda la colonia, y de esta manera se distingue del género *Nitzschia* (Figura 4) (Hasle, 1994).

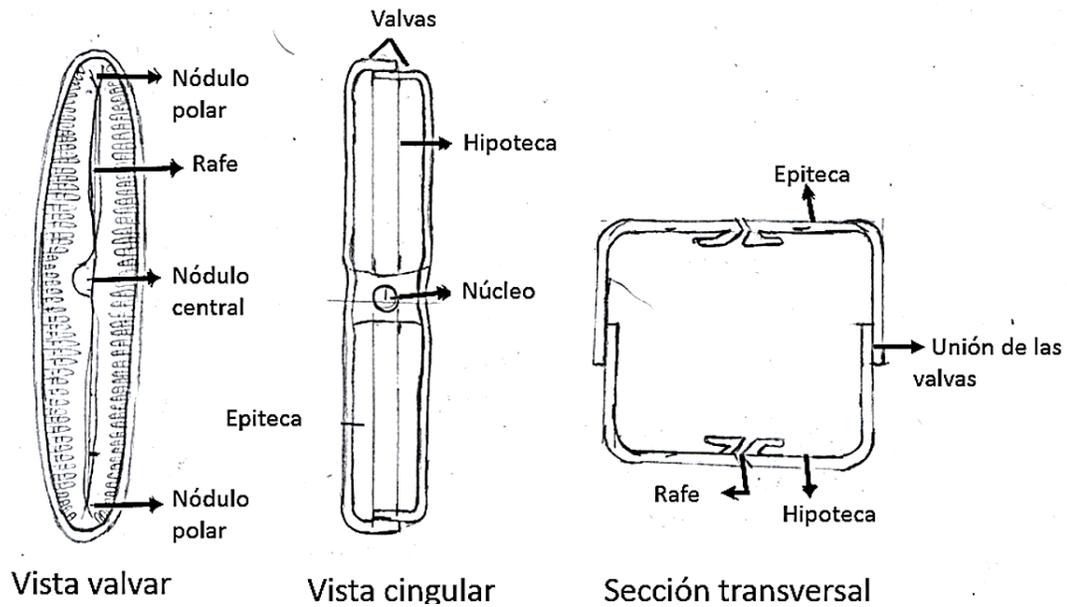
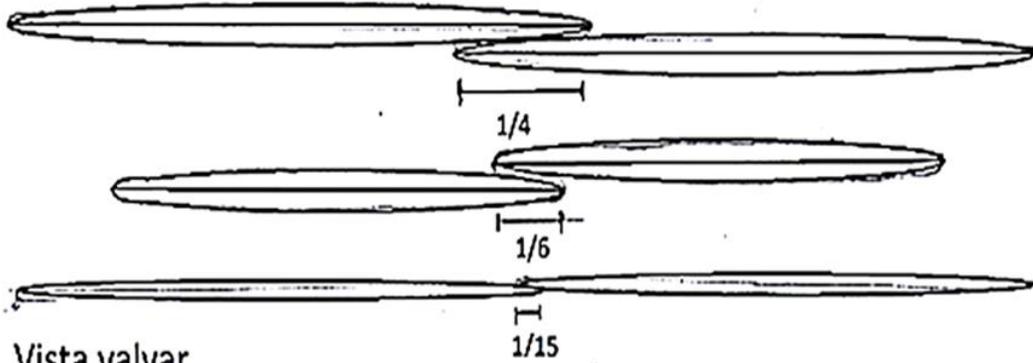


Figura 3. Estructura de una diatomea penada.
Tomado de (Neelesh, 2016).

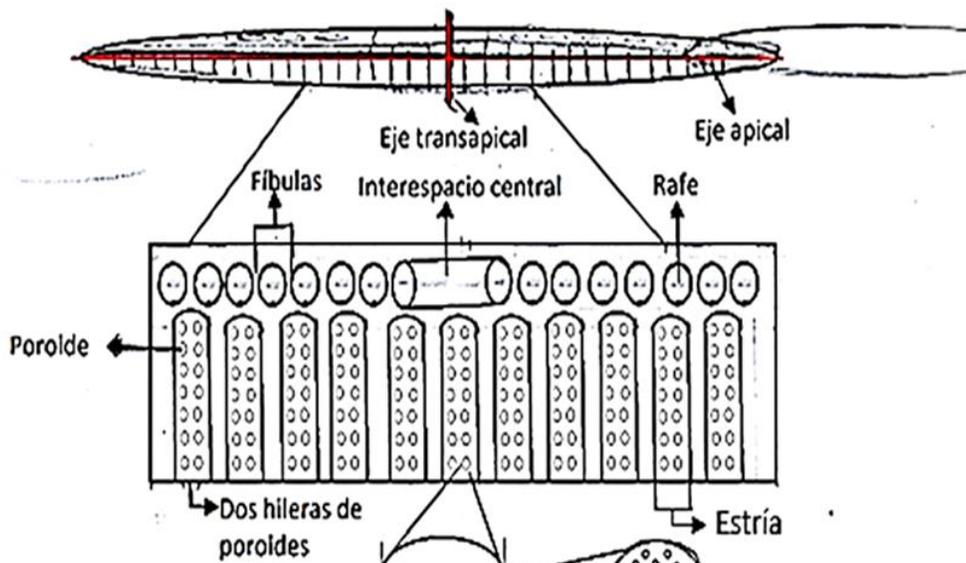


Vista cingular

Superposición de los extremos celulares



Vista valvar



Vista transversal



Figura 4. Estructura de la frústula de *Pseudo-nitzschia* sp. Se muestran las tres diferentes vistas de la valva. Modificado de (Thessen, 2007; Lelong et al., 2012).



2.3.2 Identificación

La biodiversidad del fitoplancton eucariótico se ha estimado principalmente con base en sus características morfológicas. Los principales caracteres diagnósticos para identificación de las especies del género *Pseudo-nitzschia* están establecidos en la morfología detallada o ultraestructura de la frústula y de las medidas morfométricas que solo son distinguibles a través de microscopía electrónica (Teng *et al.*, 2013). De cualquier manera, sigue siendo un desafío determinar algunas especies, como lo son las pseudocrípticas y crípticas, ya que las primeras muestran diferencias morfológicas poco distinguibles, solo se detectan mediante un examen muy detallado y las segundas son morfológicamente idénticas aunque genéticamente diferentes (Mann *et al.*, 2007). Es muy común que se presente este fenómeno en el género (Orsini *et al.*, 2004a; Lundholm *et al.*, 2006; Amato *et al.*, 2007; Isabel *et al.*, 2009). Una manera de categorizar las especies es separándolas en dos grupos distintos, en función del ancho de la valva o eje transapical; *P. seriata*, contiene un eje transapical mayor a 3 μm y *P. delicatissima* con eje menor a 3 μm (Hasle, 1997). Estos grupos a su vez se dividen en complejos de especies que se parecen morfológicamente. Dentro del último se distinguen tres subgrupos: el complejo *P. americana*, *P. delicatissima* y *P. pseudodelicatissima* (Teng *et al.*, 2013). En el “complejo americana” se incluyen tres especies pseudo-crípticas, *P. americana*, *P. brasiliana* y *P. linea*, siendo las características de las bandas importantes para su taxonomía (Lundholm *et al.*, 2002).

La complejidad taxonómica de este género puede ser una barrera importante para la detección temprana y mitigación de los FAN. La correcta asignación de especies proporciona la posibilidad de comprender mejor sus relaciones ecológicas (Trainer *et al.*, 2012; Teng *et al.*, 2013) y por ello es necesario combinar caracteres morfológicos y moleculares para estudiar su taxonomía; además se recomienda añadir estudios de apareamiento. El uso de herramientas moleculares ha resultado en un incremento en las especies descritas y en modificaciones de las especies anteriormente conocidas (Trainer *et al.*, 2012).



La primera revisión que detalla el uso de sondas moleculares como herramientas para auxiliar en la identificación de especies formadoras de FAN fue presentada por Anderson en 1995 (Anderson, 1995). Desde ese momento, el uso de criterios moleculares para caracterizar y detectar especies formadoras de FAN ha aumentado (Scholin *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 2008). En la actualidad existe un gran número de técnicas disponibles. En el ADN ribosomal (ADNr) se encuentran varios marcadores ampliamente utilizados, ya que éste no depende del estado fisiológico ni de la expresión de otros genes en los organismos; tienen dominios altamente variables y conservados entre especies, por lo que son elementos valiosos en estudios taxonómicos y filogenéticos. Esta es una de las atractivas ventajas de explotar técnicas moleculares, ya que proveen marcadores que permiten identificar con alta sensibilidad (Herrera *et al.*, 2008; Sepulveda, 2008), como la subunidad grande del gen ribosomal (LSU), las regiones espaciadoras (ITS), y el gen 5.8S del ADNr y la subunidad grande de RuBisCo (Lundholm *et al.*, 2002; Orsini *et al.*, 2004a; Lundholm *et al.*, 2006; Amato *et al.*, 2007).

2.3.1 Ciclo de vida

Como la mayoría de las diatomeas, las especies penadas tienen un ciclo de vida complejo. Una reproducción asexual en donde se conduce a una reducción progresiva en el tamaño del eje apical, sin cambios significativos en los ejes transapical y perivalvar (Amato *et al.*, 2005; Chepurnov *et al.*, 2005). El tamaño original se recupera después de la reproducción sexual (Garcés *et al.*, 2001), la cual implica meiosis y la formación de dos tipos de gametos opuestos (son especies heterotálicas), que morfológicamente son idénticos, pero conductualmente diferentes. Los gametos se denominan como “masculino”, que es el gameto activo y “femenino”, que es el gameto pasivo (Davidovich *et al.*, 1998). La fusión de estos conduce a la formación de dos cigotos, llamados auxoesporas, y en estas células comienza la elongación para producir una célula de tamaño máximo y con nuevas frústulas, que al ser liberadas representan la parte inicial de la reproducción vegetativa del ciclo de vida (Figura 5) (Vyverman, 2004; Amato *et al.*, 2005; Chepurnov *et al.*, 2005).

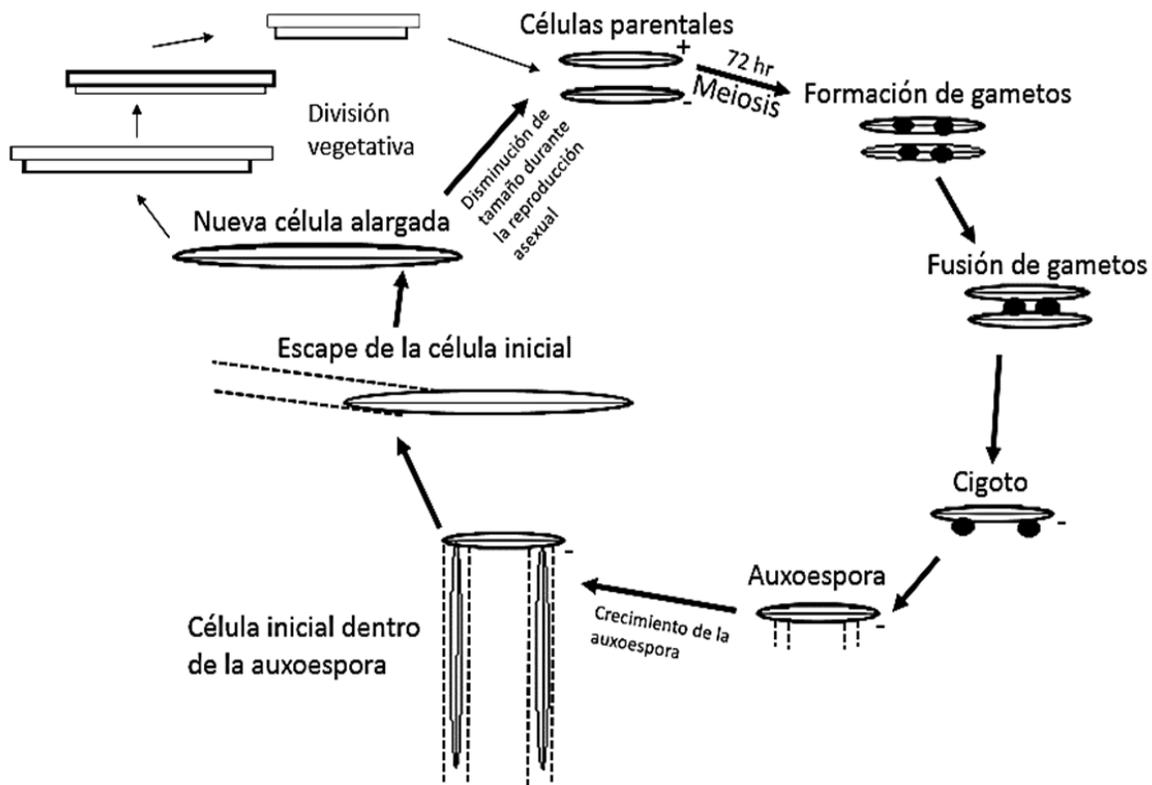


Figura 5. Ciclo de vida de *Pseudo-nitzschia* sp.

La reproducción sexual se lleva a cabo para restaurar el tamaño de la célula, después de la disminución del tamaño en la reproducción asexual (división celular vegetativa). Modificado de (Lelong *et al.*, 2012).

2.3.2 Factores que afectan el crecimiento de *Pseudo-nitzschia* y la producción de toxina

Son numerosos los factores ambientales y las condiciones fisiológicas que promueven el crecimiento poblacional del género *Pseudo-nitzschia* y la producción de AD, en consecuencia, las condiciones favorables siguen siendo poco claras y se caracterizan por tendencias generales y amplias (Parsons *et al.*, 1999; Trainer *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2004; Marchetti *et al.*, 2004), por ello se complica el pronóstico en la aparición de un FAN o de un brote tóxico. Aunque existen trabajos en campo que relacionan factores ambientales con los FAN, son muy pocos por la gran dinámica que presenta el medio marino. Frente a esto se ha optado por el estudio experimental en condiciones de laboratorio (Bates, 1998; Hiltz *et al.*, 2000; Fehling



et al., 2005; Santiago-Morales *et al.*, 2011), llamados estudios autoecológicos, ya que estos permiten controlar la mayor parte de variables para conocer las afectaciones que se tienen al cambiar algún factor, así como entender los ciclos de vida. La acumulación de conocimiento ha sido tal que existe evidencia de que la producción de AD está asociada a un estrés fisiológico, ya sea por limitación en la disponibilidad de macronutrientes (Bates *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1996) y/o micronutrientes (Rue *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2005); a la forma de nitrógeno disponible para crecimiento (Howard *et al.*, 2007; Cochlan *et al.*, 2008), al pH elevado (Lundholm *et al.*, 2004) y a temperaturas e irradiancias (Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011).

Se ha observado en el campo que en algunas especies como *P. australis* (Shipe *et al.*, 2008), la fertilización con nutrientes durante eventos de surgencia ha promovido el desarrollo de florecimientos en el área costera del centro de California (Scholin *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2006; Trainer *et al.*, 2009a) y en el norte de Baja California (García-Mendoza *et al.*, 2009). Algunos florecimientos de *P. calliantha* parecieron ser inducidos por la escorrentía agrícola poco después de un fuerte evento de lluvia (Spatharis *et al.*, 2007). Un análisis de la dinámica de *P. delicatissima* y *P. pseudodelicatissima*, y los parámetros ambientales en Canadá, mostraron una fuerte relación entre la cantidad nitratos y nitritos (NO_3 y NO_2) con los florecimientos de estas especies (Kaczmariska *et al.*, 2008). En cultivos se ha observado que un pre-requisito para el crecimiento celular y la producción de la toxina es que existan concentraciones no limitantes de nitrógeno (Bates, 1998; Kudela *et al.*, 2002). Lo anterior puede deberse a que el nitrógeno se requiere para la síntesis de aminoácidos, y por lo tanto cumple una función en el crecimiento y la división celular, así como para la producción de AD (Bates *et al.*, 1991; Lelong *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios son incluso contradictorios en función de la especie y la región (Cusack *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2002; Kaczmariska *et al.*, 2007; Quijano-Scheggia *et al.*, 2008), es por ello que para tener una información más precisa sobre el inicio, la magnitud y la disminución de los FAN de *Pseudo-nitzschia* se requiere de enfoques que detecten relaciones específicas en cada sitio.



2.3.3 El género *Pseudo-nitzschia* en el estado de Veracruz

El puerto de Veracruz ha sido impactado por especies formadoras de FAN debido al incremento de la concentración de compuestos inorgánicos (Aké-Castillo *et al.*, 2010). La incidencia de estos fenómenos también ha aumentado en el PNSAV, en donde se han reportado especies potencialmente toxigénicas, tanto de cianobacterias como de dinoflagelados y diatomeas. De estas últimas se han reportado representantes del género *Pseudo-nitzschia* (García-Mendoza *et al.*, 2016), a la fecha se han realizado estudios sobre su taxonomía y dinámica estacional (Okolodkov *et al.*, 2009), así como de su diversidad y morfología (Parsons *et al.*, 2012b). Okolodkov y colaboradores (2015), reportaron abundancias de hasta 7.13×10^5 cél L⁻¹, las cuales superan los lineamientos de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), en donde se establece que el límite máximo permisible en agua de mar es de 5×10^4 cél L⁻¹ (COFEPRIS, 2016). Además, durante los años 2011 y 2012 se reportaron florecimientos dentro de la zona de especies pertenecientes al género (Rodríguez-Gómez, 2013).

En el Golfo de México se han reportado por lo menos 18 especies del género (Lelong *et al.*, 2012), de las cuales, dentro del parque, se han identificado siete especies productoras de toxina: *P. brasiliana*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* y *P. cf. subcurvata*, lo que señala riesgo potencial a la salud (Parsons *et al.*, 2012a), aunque es necesario realizar estudios toxicológicos para comprobar la toxigenicidad de las especies del PSNAV.

3 Zona de estudio: características del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

3.1.1 Localización y límites

El Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) se localiza al centro del Golfo de México, en el litoral del estado de Veracruz de Ignacio de la Llave, frente a los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado. Está conformado por un polígono con una superficie total de 65,516 ha (Diario Oficial de la Federación,



1992). Es el sistema arrecifal más extenso del Golfo y el primer Parque Marino, decretado el 24 de agosto de 1992.

Este parque incluye veintiocho formaciones arrecifales de tipo plataforma: Anegada de Afuera, Topatillo, Santiaguillo, Anegadilla, Cabezo, De Enmedio, Rizo, Periférico, Chopas, Sargazo, Punta Coyol, La Palma, Polo, Blanca, Giote, Ingenieros, Sacrificios, Mersey, Pájaros, Verde, Bajo Paducah, Anegada de Adentro, Blanquilla, Galleguilla, Gallega, Punta Gorda, Punta Brava y Hornos. Dentro de estos arrecifes se ubican dos zonas núcleo: "Blanca", con una superficie de 401.36 ha y "Santiaguillo", con una superficie de 712.64 ha (Diario Oficial de la Federación, 1992). El conjunto de arrecifes coralinos está dividido de manera natural por la desembocadura del Río Jamapa, limitados al norte por el río La Antigua y al sur por el río Papaloapan (Lara *et al.*, 1992).

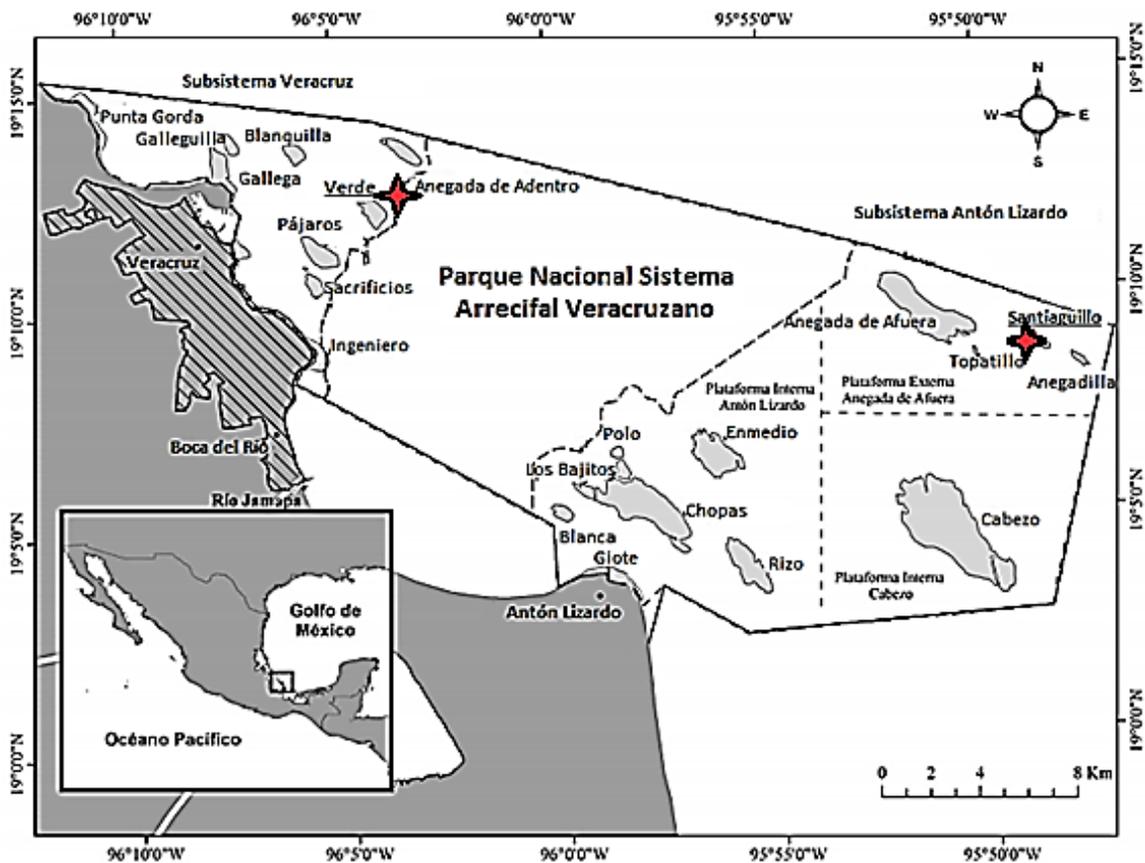


Figura 6. Plano de ubicación del polígono 49, PNSAV. Se han marcado en rojo los sitios en donde se aislaron las células para los cultivos. Tomado de (Aguilera, 2012).



3.1.2 Clima

Con base en el sistema de clasificación climática de Köppen, modificado por Enriqueta García (García-Amaro, 2004), el tipo de clima de la zona costera terrestre frente al PNSAV corresponde a la categoría cálido-húmedo ($Aw''wi$), y presenta varias temporadas de eventos climáticos: de noviembre a abril es la “temporada de secas”, con registros mínimos de precipitación de 10 mm; de junio a octubre se presenta la “temporada de lluvias”, caracterizada por precipitaciones con registros máximos de 500 mm en el mes de septiembre. Una tercera temporada es la de frentes fríos (septiembre a mayo), que originan los eventos de “norte”, en los cuales las ráfagas de viento en la línea de costa pueden superar los 100 km h^{-1} y generar oleaje por arriba de los tres metros de altura (CONAGUA, 2017).

La temperatura media normal anual es de 24.8°C , y la media mínima normal anual es de 19.7°C , la cual se presenta durante el mes de enero. La media de precipitación normal anual es de 1,701 mm, y son julio y agosto los meses más lluviosos del año (CONAGUA, 2017).

3.1.3 Importancia

El PSNAV es un área natural protegida con el objetivo de asegurar el equilibrio y la continuidad de sus procesos ecológicos, salvaguardar la diversidad genética de las especies existentes, asegurar el aprovechamiento racional de los recursos, y proporcionar un campo propicio para la investigación científica y el estudio del ecosistema y su equilibrio. Está incluido en el polígono 49, una de las setenta áreas de alta biodiversidad que son contempladas por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Representa también un potencial científico, económico, educativo, pesquero, histórico, turístico y cultural (Diario Oficial de la Federación, 1992), y a su vez es amortiguador de fuertes fenómenos meteorológicos como huracanes y “nortes” (Reyna-González *et al.*, 2014). Es regulador de los ciclos biogeoquímicos, productor de oxígeno y captador de dióxido de carbono a través de la fijación de carbonato de calcio, servicio de gran importancia ante el cambio climático.



3.1.4 Problemática del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

El impacto de las actividades humanas en el PNSAV ha sido de tal magnitud, que el grado de perturbación en el área es considerable (Tunnell Jr, 1992; Horta-Puga *et al.*, 2007; Horta-Puga *et al.*, 2009); estas actividades han ocasionado daños ecológicos en los arrecifes. Ortiz en 2012, determinó que el PNSAV presenta por lo menos 17 diferentes problemas ambientales (Tabla 3) (Ortiz-Lozano, 2012).

Veracruz es uno de los centros marítimo-portuarios más importantes de México, por lo que se vierten altos niveles de contaminantes como hidrocarburos (Horta-Puga & Tello-Musi, 2009) y metales pesados. Además, la explotación irracional de sus recursos, la falta de planeación y de aplicación de políticas adecuadas de desarrollo turístico y pesquero, las descargas de aguas residuales municipales, industriales y agropecuarias, así como la deforestación en la zona continental adyacente, favorecen un aumento de la cantidad de sólidos que son arrastrados a las grandes cuencas hidrológicas (lo que representa el 33% del escurrimiento a nivel nacional) ((INEGI), 2012), como el Río Papaloapan, Río La Antigua y el Río Jamapa que desembocan en el PNSAV, lo que provoca un incremento en las concentraciones de nutrientes. Estos compuestos inorgánicos disponibles en el medio marino benefician la presencia de microorganismos fotosintéticos y favorecen su rápido crecimiento poblacional, lo que ocasiona florecimientos algales (Aké-Castillo *et al.*, 2014). Por estos motivos, es necesario consolidar el programa de monitoreo para contar con la información científica que permita iniciar las gestiones encaminadas a inducir que las aguas urbanas e industriales servidas sean tratadas de manera adecuada.

En el PNSAV, la actividad pesquera es la más importante, sin embargo, el valor de la pesca tiene una baja repercusión en el PIB estatal, lo que indica que básicamente esta actividad es de autoconsumo y comercio local. La pesca es principalmente artesanal, con el uso de redes y líneas, que son de baja selectividad (Jiménez, 2006). Una de las localidades de importancia por su intensa actividad pesquera es la localidad de Antón Lizardo, perteneciente al municipio de Alvarado, en donde se ha observado que los habitantes venden su producto a expendio de la misma



población o a restaurantes aledaños, por lo cual estos no pasan por un monitoreo de salubridad.

Tabla 3. Problemas ambientales encontrados para el PNSAV y división por categorías (Ortiz-Lozano, 2012).

Categoría	Problemática ambiental
Daño físico directo al arrecife	Sedimentación de las estructuras arrecifales Reducción del área arrecifal Ruptura y fragmentación parcial de corales Muerte de coral Destrucción de pastos marinos
Impacto en las pesquerías	Desaparición de especies ornamentales de peces Pérdida de áreas de almejas Decremento en la talla de captura de peces comerciales
Cambios en la estructura de comunidades biológicas	Dominancia de algas Invasión de especies exóticas
Procesos de contaminación	Contaminación por agroquímicos Contaminación por coliformes fecales Contaminación por residuos industriales Contaminación generada por productos derivados de aceites y petróleo Contaminación por materia orgánica Contaminación por metales pesados Contaminación por residuos sólidos



4 Hipótesis

Si dentro del PNSAV se encuentran especies formadoras de FAN, y es *Pseudo-nitzschia* un género recurrente y además el sistema está impactado frecuentemente por la descarga de compuestos inorgánicos, entonces lo anterior representa un riesgo por la potencial formación de FAN y la consecuente liberación de toxinas, como el ácido domoico, por lo que es necesario mejorar los programas de monitoreo.

Si los compuestos nitrogenados (como los nitratos) favorecen la síntesis de aminoácidos, entonces *Pseudo-nitzschia* en condiciones de laboratorio, su crecimiento y la producción de toxina mostrará una relación con la cantidad de nitratos en el medio de cultivo.

5 Objetivo general

Identificar los taxones potencialmente formadores de FAN que se encuentran dentro del PNSAV, así como demostrar la presencia del género *Pseudo-nitzschia*, para posteriormente establecer cultivos, realizar su identificación taxonómica morfológica y molecular, y determinar su toxicidad.

6 Objetivos particulares

- Identificar la composición fitoplanctónica formadora de FAN en el medio, mediante la determinación taxonómica por microscopía óptica.
- Conocer la dominancia de *Pseudo-nitzschia* dentro de la comunidad fitoplanctónica, durante el periodo de muestreo, por medio de las abundancias relativas del género.
- Conocer la calidad ambiental del sitio de muestreo, a través de la medición *in situ* de parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno, salinidad, sólidos disueltos, pH), para describir las variaciones estacionales.
- Calcular la concentración de nutrientes en el medio durante el periodo de muestreo, para relacionarla con las abundancias de *Pseudo-nitzschia*.



- Analizar por espectroscopia de infrarrojo los grupos funcionales de extracciones de tejidos de bivalvos de la zona de estudio, con el fin de identificar si hay presencia de AD.
- Establecer cultivos monoclonales del género en condiciones de laboratorio, mediante el aislamiento y lavado de las células.
- Realizar la identificación específica de las células cultivadas por microscopía electrónica de transmisión y de barrido, y por métodos moleculares.
- Evaluar el crecimiento de los aislados a través del análisis de sus tasas de crecimiento, tiempo de división y la densidad máxima, así como demostrar su capacidad para producir AD mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas (LC-MS).
- Comparar el crecimiento de los aislados y la producción de AD con diferentes concentraciones de nitratos en condiciones de laboratorio.

7 Materiales y métodos

7.1 Trabajo de campo

7.1.1 Recolecta de fitoplancton, registro de parámetros fisicoquímicos y nutrientes.

Se realizaron muestreos bimensuales a lo largo de 8 meses (septiembre 2016 a mayo 2017), sobre el PNSAV, en la isla Santiaguillo.

Se adquirieron las muestras fitoplanctónicas a través de arrastres superficiales y horizontales, con una red de cono reducido de 80 μm de malla y 30 cm de boca, durante un minuto a una velocidad de 1 m seg^{-1} . Después fueron fijadas en frascos de plástico de 50 mL con formol al 4% (Ferrario *et al.*, 1995).

Simultáneamente, se georreferenció el sitio con un GPS (Garmin eTrex, modelo Venture Cx), y se registraron los parámetros fisicoquímicos como: pH, (Thermo Scientific Orion Star, modelo A120); oxígeno disuelto (Hanna Instruments modelo HI 9142); salinidad (Tracer Pocket Tester, modelo 1749), turbidez con disco de Secchi, y temperatura superficial del mar con un termómetro de mercurio.



Se obtuvo una muestra de agua de 500 mL en una botella transparente para el análisis de nutrientes (Cervantes, 1984; Rice *et al.*, 2012), además de bivalvos sin concha, que fueron obtenidos dentro de la zona de estudio, se colocaron en frascos y fueron fijados con formol al 4%. Ambas muestras fueron transportadas en una hielera para ser conservados a 4°C, para su posterior análisis (Mondello *et al.*, 1996).

7.1.2 Toma de muestras para el establecimiento de cultivos

Las muestras para el cultivo de organismos del género *Pseudo-nitzschia* se tomaron en dos sitios diferentes: uno al sur (Santiaguillo) y otro al norte (Isla Verde) dentro del PNSAV (Figura 6 y Tabla 4).

Tabla 4. Sitios en donde se obtuvieron las muestras para el establecimiento del cultivo.

	Santiaguillo	Isla verde
Coordenadas	19°08'60.2"N 95°48'64.2"W	19°11'56.71"N 96°49' 89"W
Fecha	27-octubre-2017	19-octubre-2107
Toma de la muestra	Arrastre horizontal y superficial (30 cm) con una red de luz de malla de 80 µm. Botella toma muestra Van Dorn, con capacidad de 3L, superficial.	Arrastre vertical (8 m) con red de cono reducido con luz de malla de 20 µm.
Temperatura	27.9°C	28.0°C

De cada muestra se colocaron de 1 a 4 mL en frascos de 30 mL con medio de cultivo GSe (Blackburn *et al.*, 2001) modificado, enriquecido con silicatos (164.4 µM) y sin extracto de suelo (Sección 7.2.4). Las muestras fueron transportadas en vivo al laboratorio a una temperatura promedio de 24 ±1°C, en oscuridad.

7.2 Trabajo de laboratorio

7.2.1 Identificación de organismos potencialmente formadores de FAN y obtención de abundancias del género *Pseudo-nitzschia*

Las muestras fijadas en formol se sedimentaron por 24 horas para ser observadas en microscopio invertido (Olympus, modelo 1x70) con un aumento de 400x para la identificación de fitoplancton formador de FAN con base en artículos taxonómicos (Aké-Castillo *et al.*, 2014; García-Mendoza *et al.*, 2016). Posteriormente se



cuantificó la comunidad fitoplanctónica y se dividió en dos grupos: células de *Pseudo-nitzschia* y el resto de la comunidad. Se contó el número de células en todos los campos con efecto de borde, se tomó en cuenta el volumen filtrado ($Volumen = \pi \cdot r^2 \cdot d$) y se sacaron porcentajes para las abundancias relativas.

7.2.2 Evaluación en la concentración de nutrientes

Se analizaron nitritos, nitratos y ortofosfatos. Se realizó una curva patrón para el análisis de cada nutriente y posteriormente se determinaron las concentraciones de las muestras. El método que se utilizó para cada nutriente fue: nitritos: método de ácido sulfanílico; nitratos: método de ácido fenoldisulfónico; ortofosfatos: método del cloruro estañoso (Cervantes, 1984; Rice *et al.*, 2012).

7.2.3 Extracción de ácido domoico en tejidos de bivalvos y espectroscopia de infrarrojo

Se pesaron 100 g en balanza granataria de los bivalvos obtenidos de la zona de estudio; posteriormente se maceraron en un mortero de porcelana y se realizó una extracción orgánica múltiple en un embudo de separación, utilizando una mezcla inmiscible de agua: hexano 10:1 (10 H₂O:1 C₆ H₁₄), en tres repeticiones con 10 mL de hexano por cada una. Las fases orgánicas se evaporaron a temperatura ambiente (Martínez *et al.*, 2001). Después de la evaporación se realizó una última extracción con cloroformo (CHCl₃) (Paniagua *et al.*, 2006).

También se realizó una última extracción del material de referencia (*National Research Council, Canada, Certified Reference Material for Amnesic Shellfish Poisoning*, (NRC CRM-ASP)), de tejidos de moluscos contaminados con AD.

De todas las muestras y del material de referencia se tomó una gota y ésta se colocó en una ventana de bromuro de potasio (KBr) para obtener el espectro correspondiente por el método de película. Se analizaron los grupos funcionales mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro FT-IR, (Perkin Elmer, One, FTIR).



7.2.4 Preparación del medio de cultivo GSe (Blackburn *et al.*, 2001)

Se pesó cada uno de los reactivos que se muestran en la tabla 5 en una balanza analítica y se aforaron por separado.

Tabla 5. Preparación de soluciones stock (Modificado de (Blackburn *et al.*, 2001).

	Por 1000 mL de agua destilada (dH ₂ O)
KNO ₃	20g
K ₂ HPO ₄	34.8g
Na ₂ SiO ₃ . 5H ₂ O	113.5g
Micronutrientes (pH8 NaOH)	
Na ₂ EDTA	6g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.29g
H ₃ BO ₃	6.85g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.86g
ZnCl ₂	0.06g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.026g
Vitaminas	1 ampolleta en 100 mL

Para preparar la solución madre se tomó lo correspondiente de cada solución stock, como se ve en la tabla 6 para aforar a 100 mL toda la solución.

Tabla 6. Preparación para la solución madre de nutrientes.

Solución stock	100 mL	[Final µM]
KNO ₃	10 mL	1978.2
K ₂ HPO ₄	10 mL	199.79
Na ₂ SiO ₃ . 5H ₂ O	10 mL	164.1
Micronutrientes (pH8 NaOH)	25 mL	
Na ₂ EDTA		80.59
FeCl ₃ .6H ₂ O		5.36
H ₃ BO ₃		553.94
MnCl ₂ .4H ₂ O		21.73
ZnCl ₂		0.44
CoCl ₂ .6H ₂ O		0.55
Vitaminas	10 mL	(desconocido, preparación comercial)

Para la preparación del medio de cultivo se añadieron 20 mL de solución madre en 1 L de agua de mar, previamente esterilizada por calor húmedo, con una salinidad de 34 ±1.

7.2.5 Aislamiento y establecimiento de cultivos

Los aislamientos se realizaron de cada una de las muestras obtenidas en campo, en microscopio invertido (Zeiss; Axxio Observer.A1) con el método de pipeta



reducida o con un capilar y con diluciones seriadas (Guillard, 1973a; Andersen *et al.*, 2005), hasta obtener un cultivo que se consideró monoclonal. Las células se colocaron en cajas de cultivo de 96 pozos con 100 μL del medio descrito; posteriormente se transfirieron a cajas de cultivo de 24 pozos con 2 mL con el mismo medio para posteriormente ser sembrados en cajas de Petri y matraces de policarbonato de 50 y 125 mL con el mismo medio. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivos a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ con una intensidad luminosa de $95.264 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

7.2.6 Eliminación de materia orgánica de las frústulas para la identificación de especímenes por microscopía electrónica

Se realizó la preparación para microscopía electrónica de transmisión (MET o TEM por sus siglas en inglés, *Transmission Electron Microscopy*) y de barrido (MEB o SEM, por sus siglas en inglés, *Scanning Electron Microscope*) con el método de blanqueamiento (Nagumo, 1990) modificado, el cual consistió en obtener una alícuota de cultivo de 2 mL, realizar tres lavados con agua destilada, centrifugar a $2621 \times g$ (6000 rpm) por 6 min y decantar entre cada lavado. Al pellet se le agregó posteriormente una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 6%, se dejó reposar por 6 minutos, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y se lavó con agua destilada mínimo cuatro veces. Se tomó una alícuota de 10 μL que se colocó sobre una malla de cobre, que posteriormente se recubrió con una película de carbono. La observación por MET se realizó en un microscopio JEOL (JEM- 1200 Ex II). Para MEB la observación fue en un microscopio JEOL (JSM-6360LV), previamente se colocó una gota de 100 μL en un cubreobjetos redondo unido a un portamuestras con una cinta de carbón, que posteriormente fue recubierta con oro. La determinación taxonómica se realizó de acuerdo a la morfometría descrita por (Lundholm *et al.*, 2002) y por (Teng *et al.*, 2013).

7.2.7 Extracción de ADN, amplificación, purificación y secuenciación de PCR

Las células se concentraron por centrifugación y se congelaron a -70°C . Para la extracción se siguió el método CTAB (Doyle, 1991) con modificaciones (Lundholm



et al., 2002). Para tener una prueba visible de la presencia de ADN, se tomó una muestra de 2 μL y se corrió en un gel de agarosa (Agarose Ultrapure™, Invitrogen) al 1.5% teñido con GelRed (Biotium, GelRed® Nucleic Acid Gel Stain) utilizando como buffer TBE 1x (Trizma-base, ácido bórico, EDTA 0,5 M) durante aproximadamente 45 min, a 95 voltios y 400 miliamperios. El producto fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Transilluminator; modelo TM-205). También se obtuvo una prueba cuantitativa con el uso de NanoDrop (Thermo Scientific; NanoDrop 2000 spectrophotometer).

La amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) (ITS-5.85-ITS2) de ADNr nuclear se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores universales ITS1 reverse 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS4 forward-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (IBT-UNAM), en una primera ronda de amplificación. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de mezcla de reacción de 12.5 μL conformada de la siguiente manera: tampón Promega 1x, 2.5 mM de MgCl_2 , 200 μM dNTPs (Qiagen), 0.2 μM de cada cebador, 0.025 U de Taq ADN polimerasa (Promega) y 40-50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN total.

El programa de reacción fue: desnaturalización por 3 min a 94°C, seguida de 30 ciclos (40 s a 94°C, 40 s a 55°C y 1 min 30 s a 72°C), y una extensión final de 72°C durante 7 min en un termociclador (Techne Flexigene Thermal Cycler). Posteriormente se hizo una reamplificación con una mezcla de reacción de 25 μL conformada de la siguiente manera: tampón Promega 1x, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.4 mM de cada dNTPs (Qiagen), 0.02 μM de cada cebador, 2.5 U de Taq polimerasa (Promega) y se agregaron 3 μL de la amplificación anterior. Las condiciones de reamplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min, seguida de 35 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 51°C y 60 s a 72°C), y una extensión final a 72°C durante 7 min (Tabla 7).

Los productos de la PCR se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa (UltraPure Agarose, Invitrogen) al 1.5% que se corrió en buffer TBE 1x durante 45 min aproximadamente, a 100 voltios y 500 miliamperios. Se utilizó



GelRed para la visualización de los fragmentos, cuyo tamaño fue determinado por un marcador de peso molecular de 100 pb – 3000 pb (Axygen Biosciences), y fue visualizado por medio de luz ultravioleta en un transiluminador (UVP 2UV Transilluminator; modelo LM-20E). Posteriormente, los productos de amplificación fueron cortados del gel para ser purificados usando el Kit de Gel DNA Recovery de Zymoclean™, siguiendo el protocolo del fabricante.

El producto final de la amplificación fue secuenciado y purificado en el Laboratorio de Biología Molecular y Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología, UNAM.

Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción y del programa para la amplificación.

Ronda de amplificación				
Reacción 12 µL		Amplificación		
Reactivo	Concentración final	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón	1x	94°C	3 min	1
MgCl ₂	2.5 mM	94°C	40 s	30
dNTPs	200 µM	55°C	40 s	
ITS1	0.2 µM	72°C	1 min 30 s	
ITS4	0.2 µM	72°C	7 min	1
Taq polimerasa	0.025 U	4°C	Indefinido	
Reamplificación				
Reacción 25 µL		Amplificación		
Reactivo	Concentración final	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Tampón	1x	94°C	4 min	1
MgCl ₂	2.5 mM	94°C	30 s	35
dNTPs	0.4 mM	51°C	30 s	
ITS1	0.02 µM	72°C	60 s	
ITS4	0.02 µM	72°C	7 min	1
Taq polimerasa	2.5 U	4°C	Indefinido	

7.2.7.1 Diseño de cebadores y análisis de secuencias

Con las secuenciaciones elaboradas con el método anterior no se obtuvo la identificación de los aislados, por lo que se procedió a elaborar cebadores específicos del género de la región ITS1-5.8S - ITS2 del ADNr nuclear, utilizando el software BioEdit versión 7.2.6.1. Las secuencias de la región de los taxones están disponibles en el GenBank del NCBI (por sus siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Los cebadores fueron los siguientes: Pnizsch-R-reverse-5'- AAGAGTGRCAACGCCGTCTT-3' y Pnizsch-F-forward-5'- AGGTTCCACAACGATGAAG-3'.



Las amplificaciones con estos nuevos cebadores se realizaron de la misma manera que la reamplificación y fueron visualizados de la misma forma. Posterior a la verificación de los fragmentos de PCR se enviaron a secuenciar ambas cadenas al Laboratorio de Biología Molecular y secuenciación genómica de la Biodiversidad y la Salud (LANABIO; IB-UNAM).

Las secuencias obtenidas se visualizaron en el programa BioEdit, y se compararon mediante el algoritmo BLAST (por sus siglas en inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*), con la base datos del GenBank del NCBI para definir la identidad de los aislados. Estas secuencias y otras que se obtuvieron del GenBank, de la misma región y especie (Tabla 8) se editaron usando BioEdit, para hacer un alineamiento múltiple con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, con el programa MEGA 2.1 se realizó una matriz de distancias con el modelo Distancias por Pares o en inglés, *Pairwise Distance*, utilizando a *P. brasiliensis*, con número de acceso KM386875.1 como plantilla, debido a que fue con la que se definió la identidad de todos los aislados. Después se procedió a un análisis de agrupamiento, y se construyó un dendrograma con el método estadístico *Neighbor Joining* (Saitou *et al.*, 1987) y con el modelo de sustitución Probabilidad Máxima Compuesta, (*Maximum Composite Likelihood*) para calcular las distancias evolutivas (Tamura *et al.*, 2004) con un *bootstrap* de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El árbol fue enraizado con *P. americana*, con número de acceso GQ330378.1.

Tabla 8. Lista de cepas utilizadas para la elaboración del árbol. Estas cepas han sido descritas por varios autores y obtenidas de GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.

Especie	No. de acceso	Localidad	Referencia
<i>P. brasiliensis</i>	KM386875	Costas de China	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. brasiliensis</i>	HM236161	Costas de China	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. brasiliensis</i>	HQ111397	Malasia	(Lim <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. brasiliensis</i>	JN252428	Malasia	(Teng <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. brasiliensis</i>	EU327365	España	(Sonia <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. brasiliensis</i>	EU407608	España	(Sonia <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. americana</i>	GQ330378	Colección de Cultivos para Fitoplancton Marino (CCMP), Canadá	(Moniz <i>et al.</i> , 2010)



7.2.8 Curvas de crecimiento y cálculo de tasa de crecimiento y tiempo de división

Una vez establecidos los cultivos, se sembraron 50 000 cél en 100 mL de medio de cultivo (500 cél mL⁻¹) por triplicado para cada aislado. Se registró el crecimiento diariamente hasta terminada la fase exponencial. Para realizar los conteos se tomó una alícuota de 1 mL y se fijó con Lugol ácido; posteriormente se colocaron 100 µL en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó en un microscopio óptico a 20x (U.S. Micro- Optical Solutions, modelo MICRO II) (Vega-Arredondo *et al.*,2017).

Las tasas de crecimiento específicas (μ) se calcularon mediante la ecuación de la velocidad específica de crecimiento de Monod:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

donde: X_1 y X_2 = número de células inicial y final al t_1 y t_2 = tiempos de inicio y fin de la fase exponencial de crecimiento calculado en días (Guillard, 1973b).

También se calculó el tiempo de generación (t_g) a partir de la tasa de crecimiento mediante la ecuación:

$$t_g = \frac{0.6931}{\mu}$$

Para determinar con seguridad el inicio y el final de la fase exponencial se calculó la tasa de crecimiento con logaritmos en base 2 (μ_2), para posteriormente conocer la suma progresiva de las tasas de crecimiento diario ($\sum \mu_2$), ya que cualquier cambio de la pendiente de estos datos indica una variación de la velocidad de duplicación (Guillard, 1973b).

$$\mu_2 = \frac{\ln X_2 - \ln X_1 / \ln 2}{t_2 - t_1}$$



7.2.9 Experimento con distintas concentraciones de nutrientes

Se eligió el aislado 8C, ya que fue el que mostró menor desviación estándar cuando se realizó su curva de crecimiento. Se sembraron 50,000 células en 100 mL por triplicado para cada tratamiento.

Se probaron dos tratamientos que consistieron en modificar únicamente la concentración de nitratos en el medio GSe, mencionado anteriormente. El primer tratamiento fue con una mayor concentración de nitratos con respecto al medio de cultivo original. Esta concentración fue de 3956.4 μM . El segundo tratamiento se realizó con una menor concentración de nitratos con respecto al medio de cultivo original. Esta concentración fue de 98.9 μM (Tabla 9). De la misma manera, se prepararon los cultivos control, con la misma densidad celular y con el medio original, con una concentración de nitratos de 1978.2 μM . Se evaluó la densidad celular durante el crecimiento, se calculó la tasa de crecimiento y se analizó el contenido de la toxina celular en la fase de crecimiento estacionaria (terminada la fase exponencial). La densidad celular se evaluó con alícuotas de 1 mL fijadas con Lugol, como se describió anteriormente.

Tabla 9. Concentraciones de nitratos utilizadas para el experimento.

Tratamiento	KNO₃ [Final μM]
Control	1978.2
Reducido	98.9
Aumentado	3956.4

7.2.10 Análisis estadísticos

Para identificar las diferencias en el crecimiento entre los aislados y en los tratamientos experimentales, previo a las pruebas estadísticas se realizó un gráfico de normalidad para conocer la distribución de los datos conforme a la curva de normalidad de Gausse. En función de los resultados, se decidió ajustar o no los datos con \log_{10} . Resuelto lo anterior se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, y de homocedasticidad con el estadístico de Levene, para determinar si los datos cumplían estos supuestos y proceder a realizar pruebas



paramétricas. Se analizó si existía diferencia de medias con un análisis de varianza (ANDEVA) para poder realizar una prueba *a posteriori* de rangos múltiples (Tukey) (De Cantú, 1991). Todos los análisis se hicieron con el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I.

7.2.11 Extracción y análisis de toxinas

De cada aislado se realizó el conteo celular de una alícuota como se describió anteriormente en las curvas de crecimiento. La biomasa se concentró por centrifugación (448 x g) en microtubos de 2 mL. Se consideraron los mililitros de medio en los que crecía cada aislado. Se realizó del mismo modo para los experimentos (Tabla 10).

El análisis de las toxinas celulares se realizó por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas en tándem (LC-MS/MS), en el Laboratorio FICOTOX del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) en Ensenada Baja California.

Tabla 10. Células por mililitro, mililitros y células totales de cada aislado y del experimento.

Aislados	Cél mL⁻¹	mL	Células totales
4C	375 750	55	20 666 250
5A	322 500	51	16 447 500
5E	361 250	39	14 088 750
6D	350 000	53	18 550 000
8C	648 750	68	44 115 000
Experimento (Aislado 8C)			
Nitrógeno en concentración normal			
A	328 750	78	25 642 500
B	203 750	83	16 911 250
C	272 500	84.5	23 026 250
Nitrógeno en concentración reducida			
A	266 250	80	21 300 000
B	216 250	81.5	17 624 375
C	217 500	78.5	17 073 750
Nitrógeno en concentración aumentada			
A	122 500	80	9 800 000
B	145 000	78.5	11 382 500
C	272 500	79	21 527 500

El método consistió en la disrupción celular con perlas de sílice-zirconia de 0.5 mm de diámetro y 1 mL de una mezcla metanol:agua 1:1 en un Mini BeadBeater



(Biospec Products Inc., E.U.A), agitando por 10 segundos a 500 rpm por triplicado con un periodo de enfriamiento entre cada agitación.

Se realizó la limpieza del extracto con dos periodos de centrifugación; uno a 13000 x g por 8 minutos, se colectó el sobrenadante y se transfirió a un microtubo limpio. Posteriormente, se centrifugó el sobrenadante a 13000 x g durante 5 min. Se colectó una alícuota a la cual se le adicionó ácido trifluoroacético (TFA) con una concentración final de 0.15%. Se agitó con vórtex durante 30 segundos y se analizó por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS) (Agilent 6470) con triple cuadrupolo. La detección del AD se realizó mediante un monitoreo múltiple MRM (Multi Reaction Monitoring), con fuente de ionización en modo positivo. Las transiciones monitoreadas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Transiciones utilizadas para la detección del ácido domoico.

Ion precursor	Ion producto	Energía de Colisión
312.1	266.1	10
312.1	161.1	15

Se utilizó la transición 312.1 → 266.1 como ion cuantificador y la transición 312.1 → 161.1 como calificador, aunque para el cálculo de la concentración se usó la suma de las áreas de ambos iones (TIC).



8 Resultados

Se realizaron cinco muestreos a lo largo del año 2016-2017, comprendidos en los meses de septiembre y noviembre del 2016, febrero, marzo y mayo del 2017. Cabe mencionar que todas las muestras de noviembre se tomaron en la playa de Antón Lizardo y no en el arrecife Santiaguillo debido a las condiciones climatológicas, por ser época de nortes.

8.1 Taxones potencialmente formadores de FAN y dinámica de *Pseudo-nitzschia*

Se identificaron siete taxones potencialmente formadoras de FAN dentro del PNSAV, de los cuales cuatro han sido reportados como no productores de toxinas (Figura 7) y tres potencialmente tóxicos (Figura 8), de acuerdo a Aké, 2014 (Aké-Castillo *et al.*, 2014).

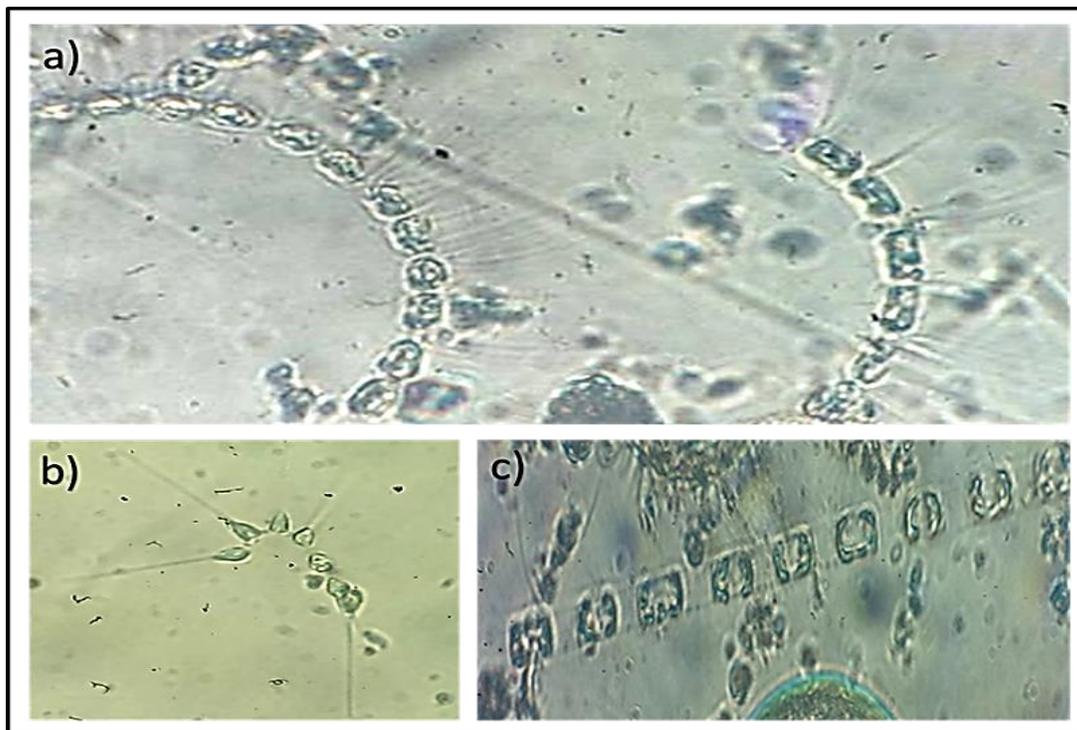


Figura 7. Taxa no tóxicos identificadas dentro del PNSAV, de septiembre 2016 a mayo 2017. a) *Chaetoceros curvisetus*, b) *Asterionellopsis* sp., c) *Skeletonema closterium*. Imágenes obtenidas en un microscopio Olympus, modelo 1x70 a 400x.

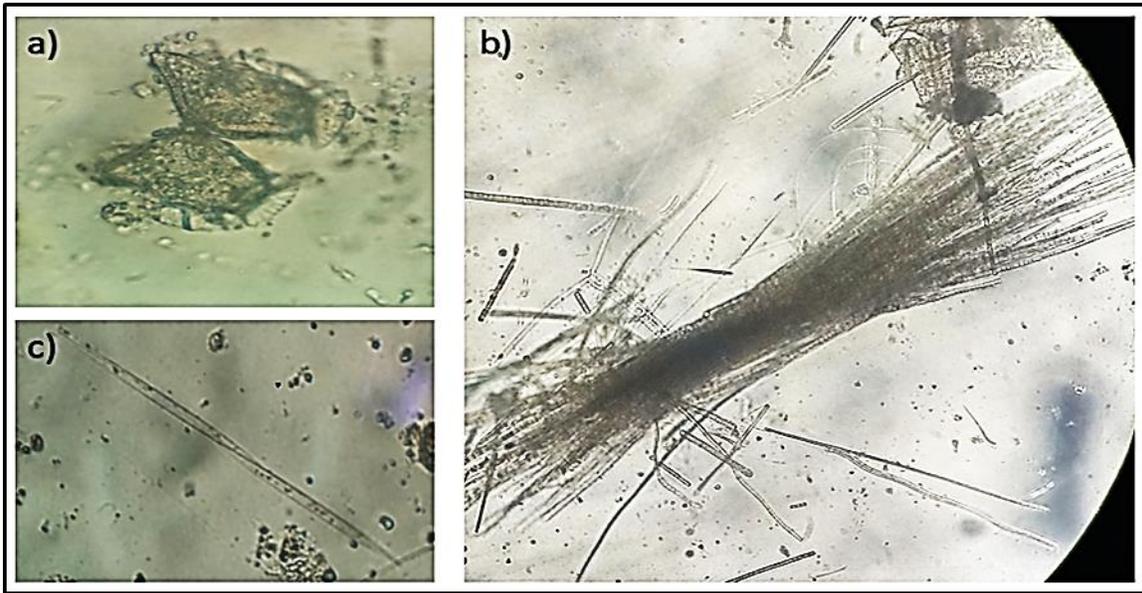


Figura 8. Taxa potencialmente tóxicos dentro del PNSAV, de septiembre 2016 a mayo 2017. a) *Dinophysis* sp., b) *Trichodesmium* sp., c) *Pseudo-nitzschia* sp. Imágenes obtenidas en un microscopio Olympus, modelo 1x70 a 400x.

Al comparar la dinámica de las abundancias de *Pseudo-nitzschia* durante el periodo de septiembre de 2016 a mayo de 2017 con el resto de la comunidad fitoplanctónica (Figura 9), se observa que las mayores abundancias se presentaron en noviembre de 2016, con 99.7 células mL⁻¹ y las más bajas en febrero de 2017, con 17 células mL⁻¹. En noviembre y marzo *Pseudo-nitzschia* dominó en un 61.61% y 57.66% respectivamente (Figura 10).

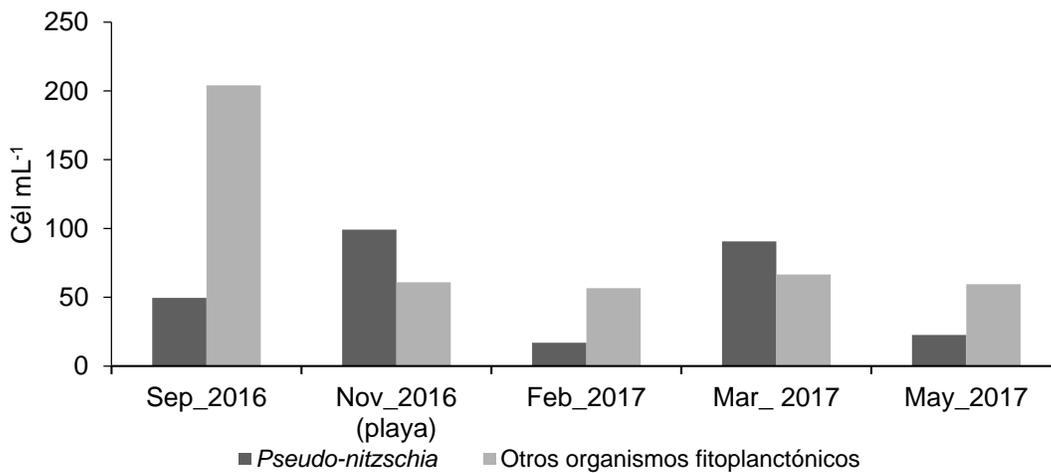


Figura 9. Dinámica de las abundancias de *Pseudo-nitzschia* comparada con las abundancias de otros organismos fitoplanctónicos dentro del PNSAV durante septiembre 2016 a mayo 2017.

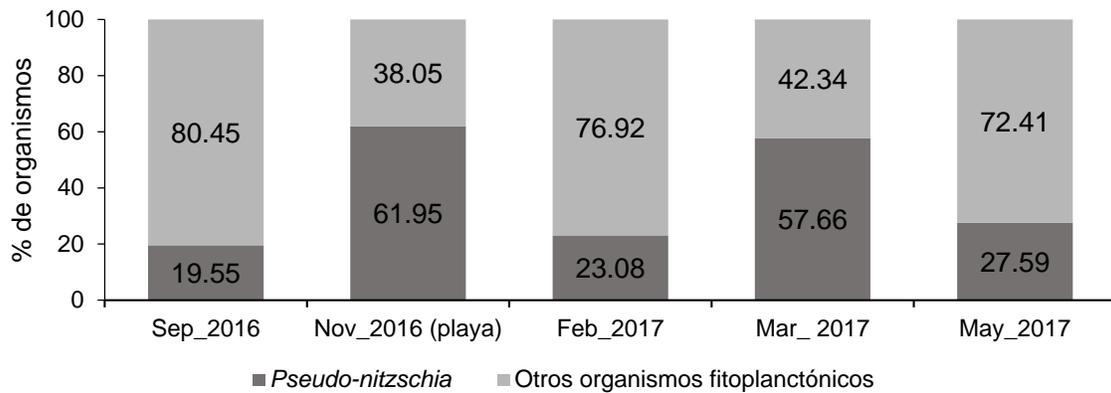


Figura 10. Abundancias relativas de *Pseudo-nitzschia* y otros organismos fitoplanctónicos identificados dentro del PNSAV durante septiembre de 2016 a mayo de 2017.

8.2 Factores fisicoquímicos y cuantificación de nutrientes en el PNSAV

8.2.1 Temperatura y oxígeno disuelto

Los valores obtenidos de la temperatura del agua se registraron cuidando que fuera en el mismo horario, presentando un promedio de $28.8 \pm 1.8^\circ\text{C}$. La temperatura más baja se registró en el mes de febrero de 2017, con 26°C y la más alta en el mes de septiembre de 2016, con 30°C , como se puede observar en la figura 11.

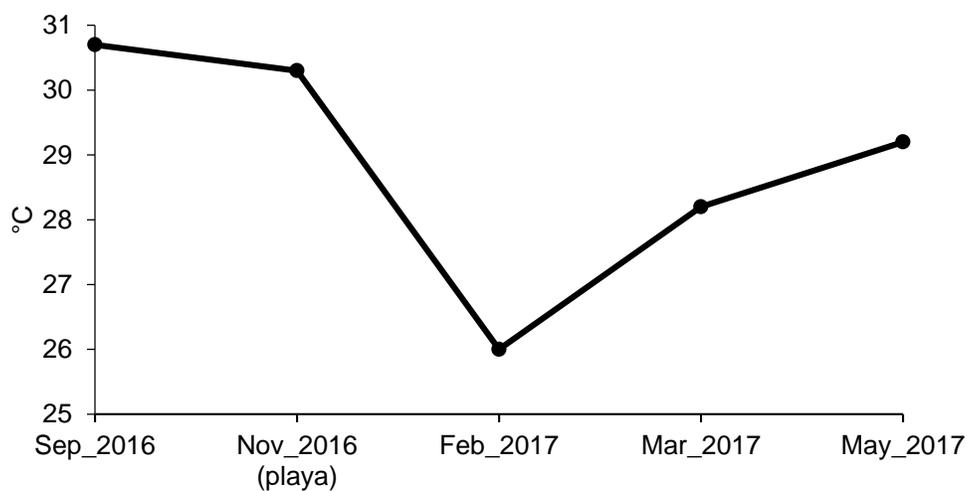


Figura 11. Variabilidad de la temperatura del agua de mar por mes en el PNSAV de septiembre de 2016 a mayo de 2017.



En el mes de febrero de 2017 se registraron las concentraciones mayores de oxígeno, de hasta 9.5 mgL^{-1} , lo que coincide con las temperaturas más bajas. Las concentraciones menores fueron de 6.1 mgL^{-1} en el mes de noviembre de 2016, lo que coincidió con las temperaturas más altas. El promedio fue de $7.4 \pm 1.3 \text{ mgL}^{-1}$ con una saturación de $95\% \pm 14.1$.

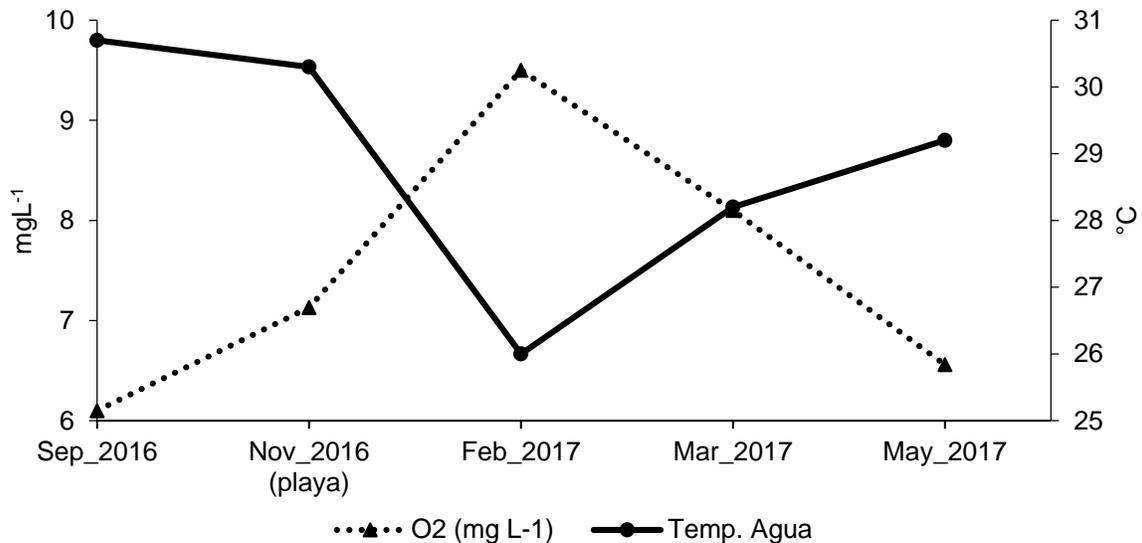


Figura 12. Relación inversamente proporcional del oxígeno disuelto y la temperatura mensual en el PNSAV, de septiembre de 2016 a mayo de 2017.

8.2.2 Salinidad y sólidos disueltos totales

En la figura 13 se muestra que existe una estrecha relación entre la conductividad medida en milisiemens (mS) que resulta del movimiento de partículas ionizadas, con promedio de $65.12 \pm 4.2 \text{ mS}$, concentración de sólidos disueltos totales medida en partes por millón (ppm), con promedio de $44,470 \pm 1,758 \text{ ppm}$ y la salinidad medida en unidades prácticas de salinidad (ups), con promedio de $38.15 \pm 1.3 \text{ ups}$, en noviembre de 2016 se registran los valores menores.

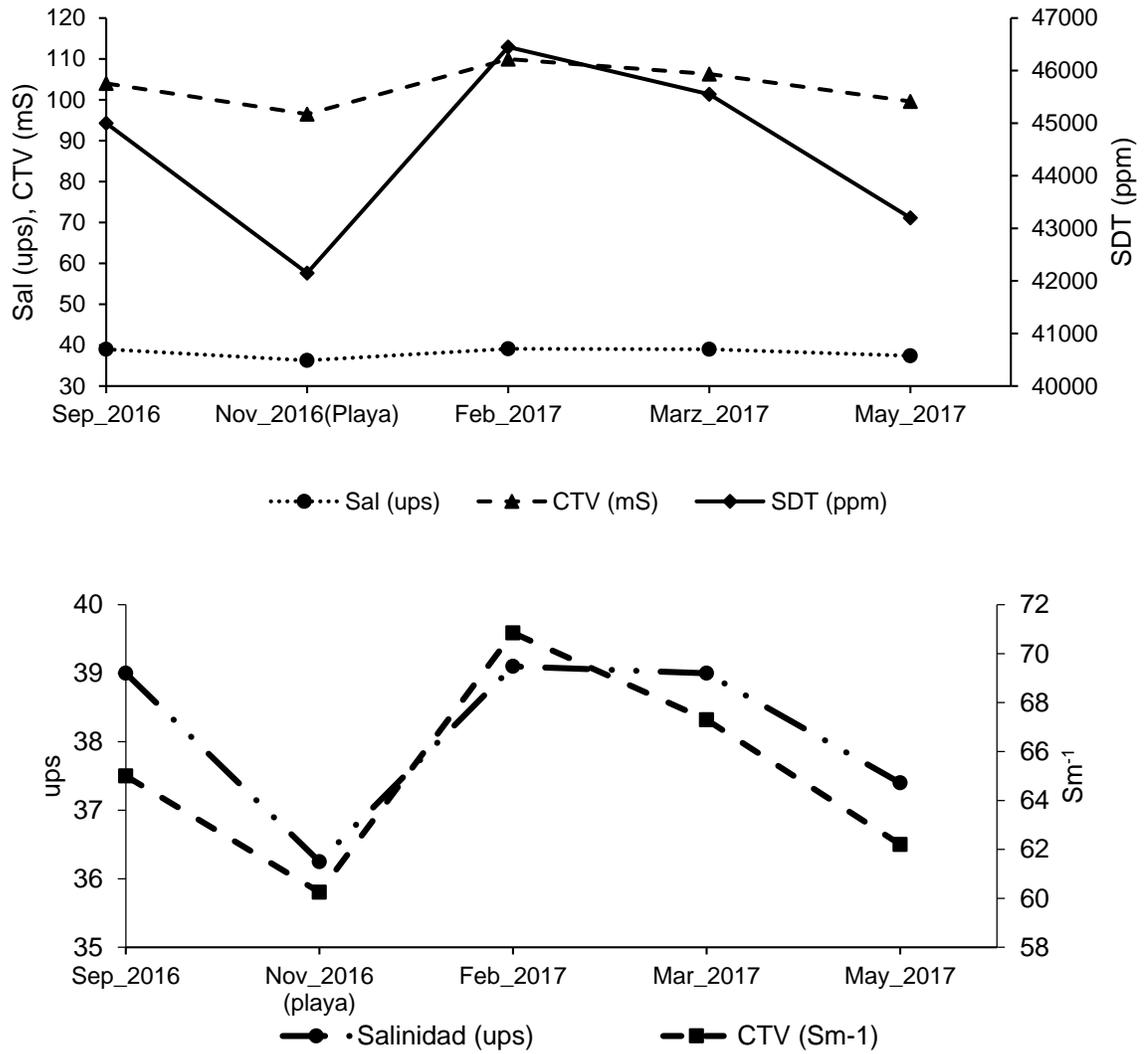


Figura 13. Variabilidad de la salinidad (ups), CTV (mS), sólidos disueltos totales (SDT, ppm) por mes en el PNSAV, de septiembre de 2016 a mayo de 2017.



8.2.3 pH

De los muestreos se obtuvo un pH con promedio de 7.9 ± 0.35 , siendo febrero de 2017 el que presentó el pH más alto, de 8.3 y mayo de 2017 el más bajo, de 7.4 (Figura 14).

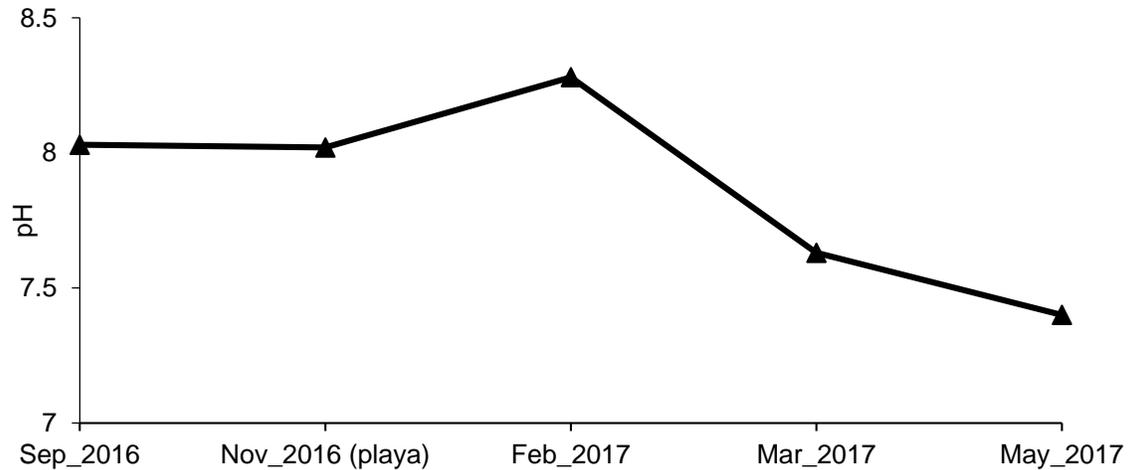


Figura 14. Variación del pH de septiembre de 2016 a mayo de 2017 en el PNSAV.

8.2.4 Nutrientes

Los nitratos mostraron una concentración promedio de $8.8 \pm 9.9 \mu\text{M}$, siendo el mes de febrero de 2017 el que presentó las concentraciones más altas, con $26.4 \mu\text{M}$. Las más bajas se presentaron en marzo de 2017, con $3.4 \mu\text{M}$ (Figura 15).

Los nitritos presentaron una concentración promedio de $4.6 \pm 4.5 \mu\text{M}$. Los niveles más altos se registraron en el mes de noviembre de 2016, con $11.9 \mu\text{M}$ y los más bajos en el mes de febrero de 2017, en el cual estuvieron por debajo del límite de detección (Figura 15).

Para los fosfatos se registró una concentración promedio de $0.34 \pm 0.3 \mu\text{M}$, con pocas variaciones. El valor más bajo se observó en el mes de febrero de 2017, ya que el espectrómetro no detectó estos nutrientes (Figura 16).

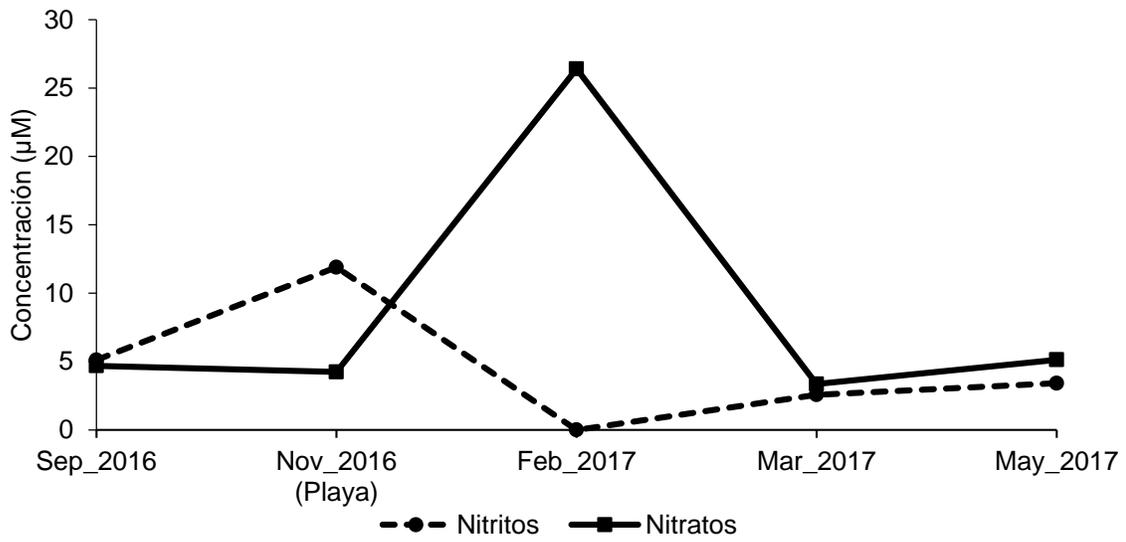


Figura 15. Concentración de nutrientes (nitritos y nitratos) dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.

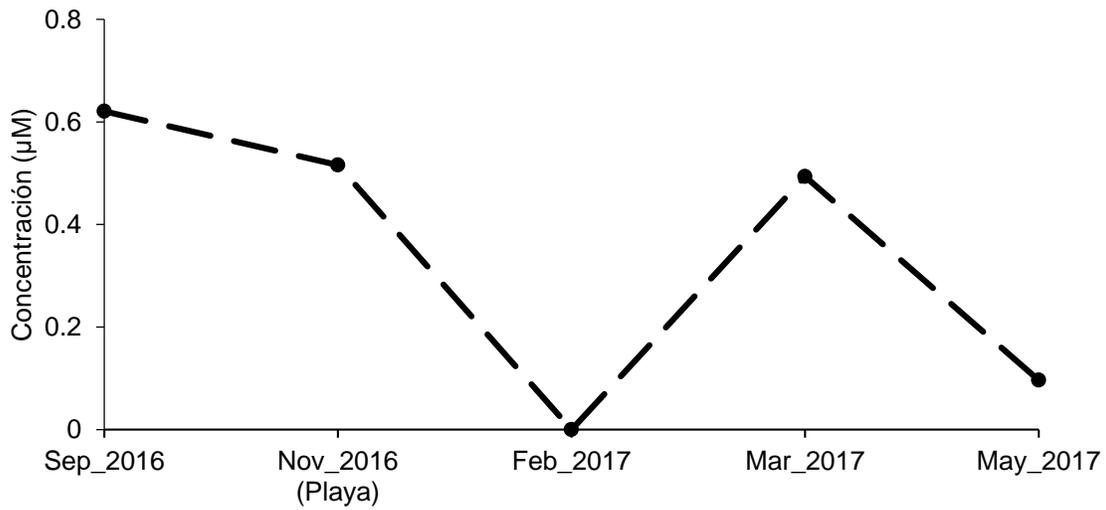


Figura 16. Concentración de fosfatos dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.

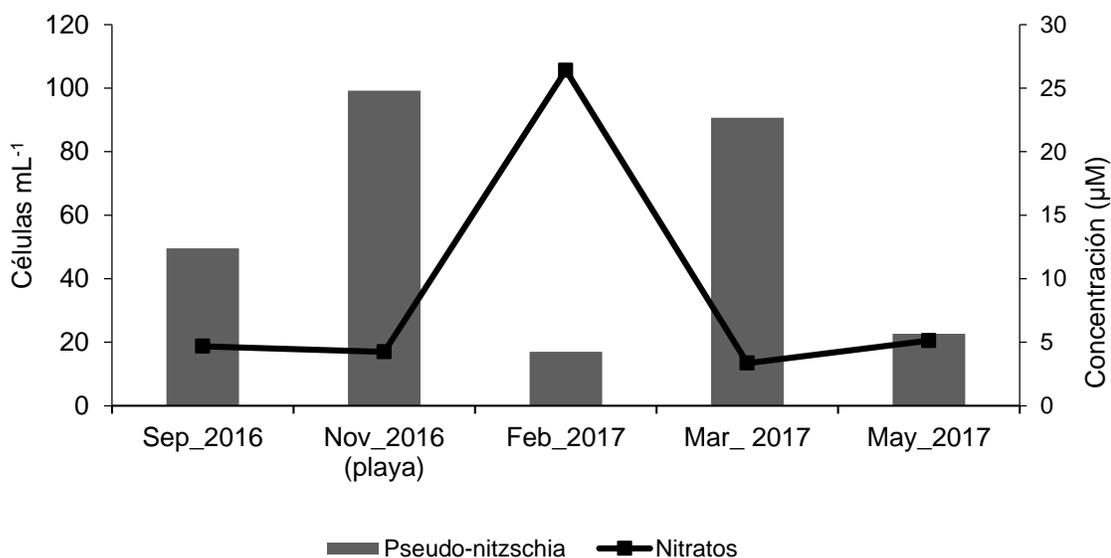


Figura 17. Relación entre nitratos y abundancias de *Pseudo-nitzschia* dentro el PNSAV en la isla Santiaguillo, tomados de septiembre de 2016 a mayo de 2017.

8.3 Análisis por espectroscopia de infrarrojo de moluscos potencialmente tóxicos

Se hicieron tres extracciones de los tejidos de moluscos. Se observaron los grupos funcionales del AD en la extracción con hexano en los moluscos obtenidos durante los meses de septiembre de 2016 y de mayo de 2017.

Para su interpretación, el espectro se divide en dos regiones; la región fundamental (RF) que va de los 4000 a los 1600 cm^{-1} y la región de la huella dactilar (RH) de los 1600 a los 450 cm^{-1} , y se grafica el porcentaje de transmitancia (%T) contra la longitud de onda (cm^{-1}). En las figuras 18-24 las líneas verticales negras muestran esta división. Del lado derecho, en la parte inferior se encuentra la estructura química del AD, donde cada círculo de color representa un grupo funcional. La amina secundaria está señalada en amarillo, los alquenos disustituidos en azul, los alcanos (metilos) en rosa y los ácidos carboxílicos en verde. En las figuras 20, 22-24, se comparan espectros, las líneas verticales tienen los colores correspondientes a las señales para los grupos funcionales.



Las señales de las aminas se visualizan en la RF en los 3350-3310 cm^{-1} como una señal sencilla, de una intensidad de mediana a baja y usualmente finas, y las señales anchas en la RH en los 1580-1490 cm^{-1} corresponden a aminas secundarias. Los alquenos presentan señales en la RF en los 3100-3000 cm^{-1} y en la RH en los 980-965 cm^{-1} , y en los 725-675 cm^{-1} cuando son disustituídos. Las señales para los alcanos se observan en la RF en los 2962-2853 cm^{-1} y los metilos, en los 1470-1430 cm^{-1} y a los 1370-1365 cm^{-1} . Los ácidos carboxílicos presentan una señal ancha característica en los 3000-2200 cm^{-1} en la RF, debido a los enlaces de hidrógeno (rojo) y una señal intensa en RH en los 1725-1700 cm^{-1} . Todas estas señales se pueden observar en las figuras 18 y 19, que son los análisis de las muestras obtenidas en los meses de septiembre de 2016 y mayo de 2017. En estos espectros se localizan los grupos funcionales de la estructura química del AD, de manera que existe una alta posibilidad de que las muestras analizadas estuvieran contaminadas con la toxina. Estos espectros se compararon entre sí (Figura 20) y con el material de referencia (NRC CRM-ASP) (Figuras 22-24). En este último se presentaron todas las señales anteriores excepto la de los carboxilos a 1725-1700 cm^{-1} en la RH, observándose en sólo una señal a los 1741 cm^{-1} , la cual se representa subrayada en las figuras; esta evidencia la presencia de ésteres, señal que también se visualiza en las otras muestras.

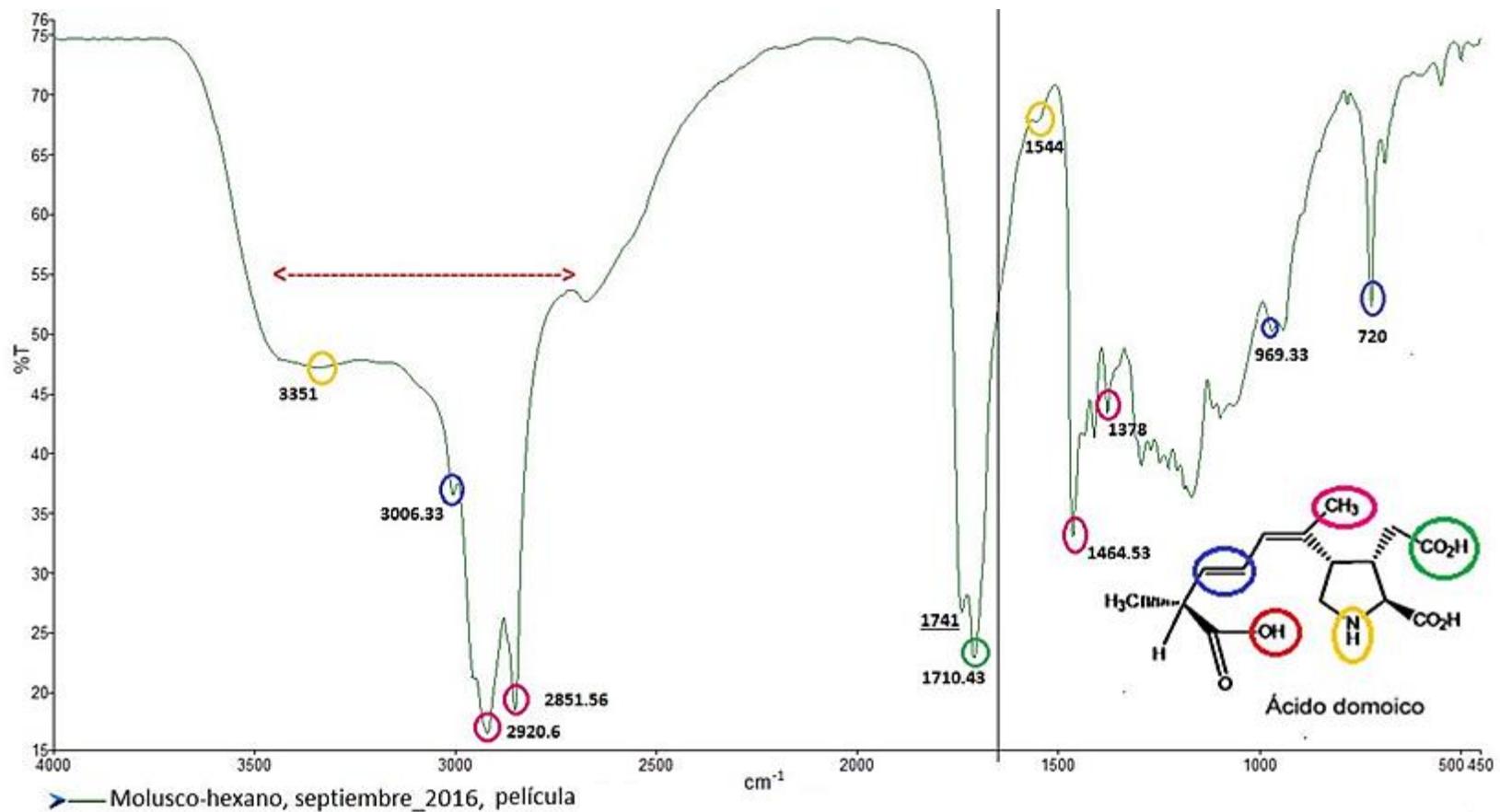


Figura 18. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de las muestras de tejidos de moluscos de septiembre de 2016. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH; los círculos de colores corresponden a los grupos funcionales del AD.

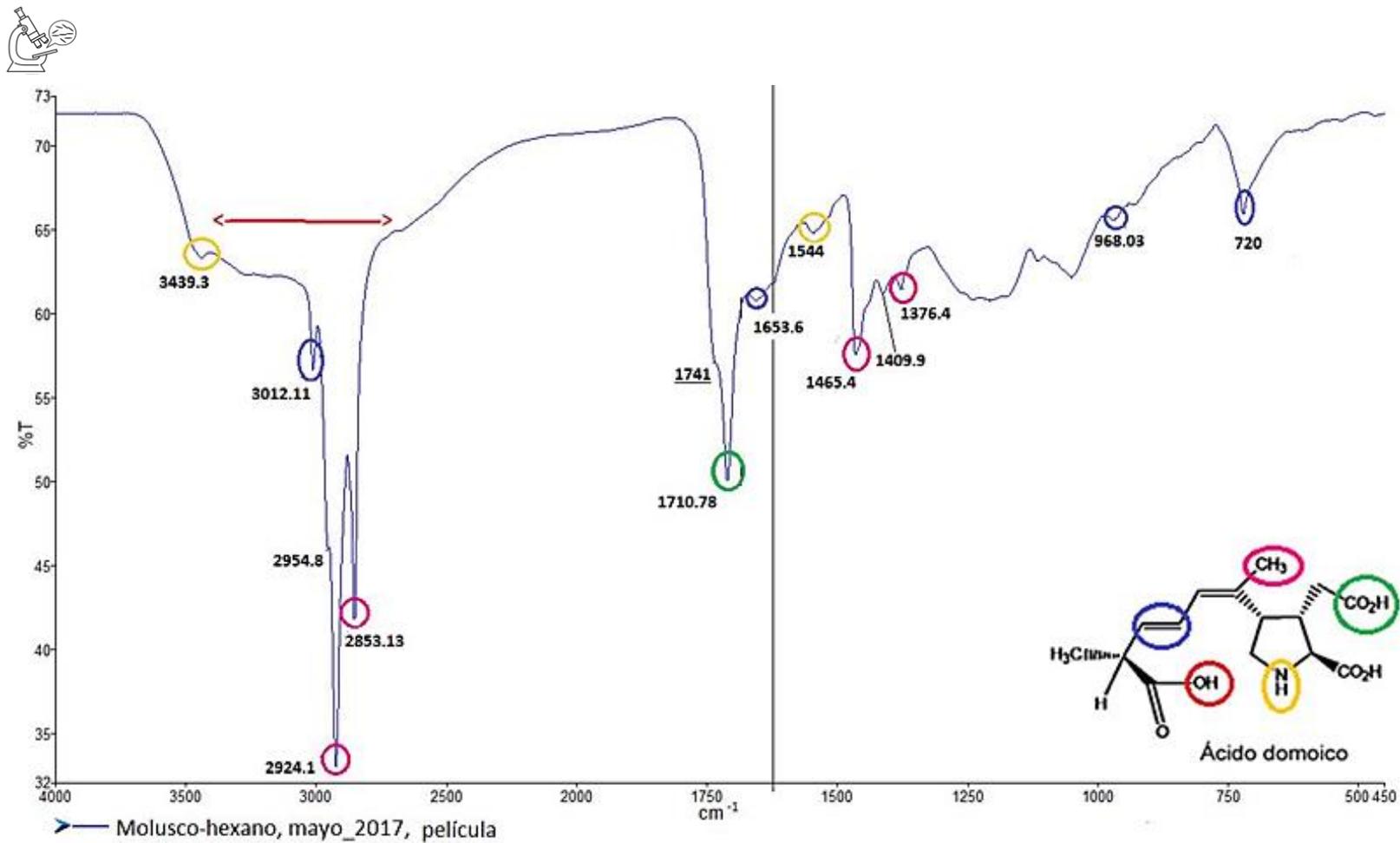


Figura 19. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de las muestras de tejidos de moluscos de mayo de 2017. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH; los círculos de colores corresponden a los grupos funcionales del AD.

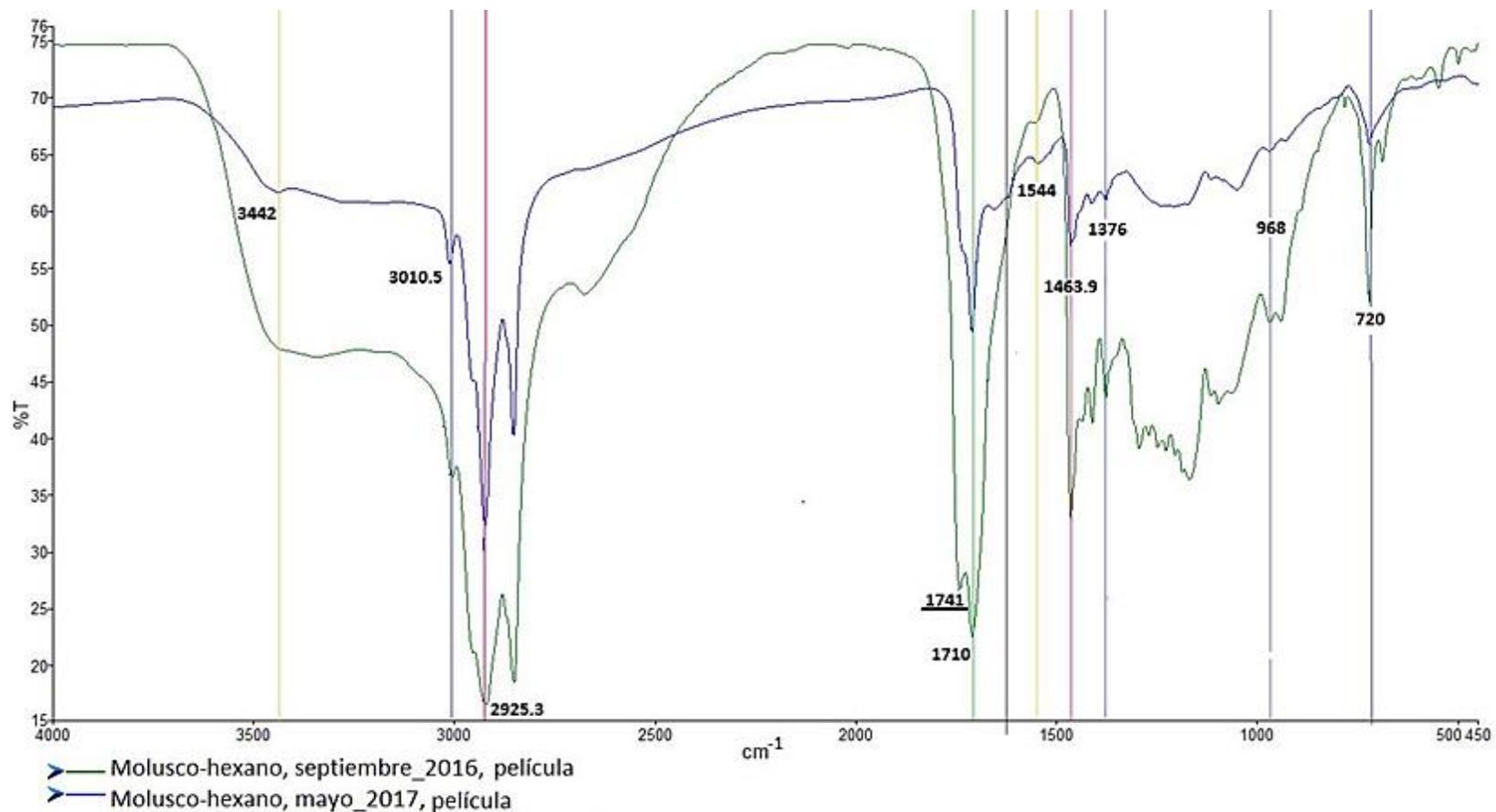


Figura 20. Espectros donde se comparan las muestras de septiembre de 2016 y mayo de 2017. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH, y las otras líneas verticales representan los grupos funcionales del AD, con su respectivo color.

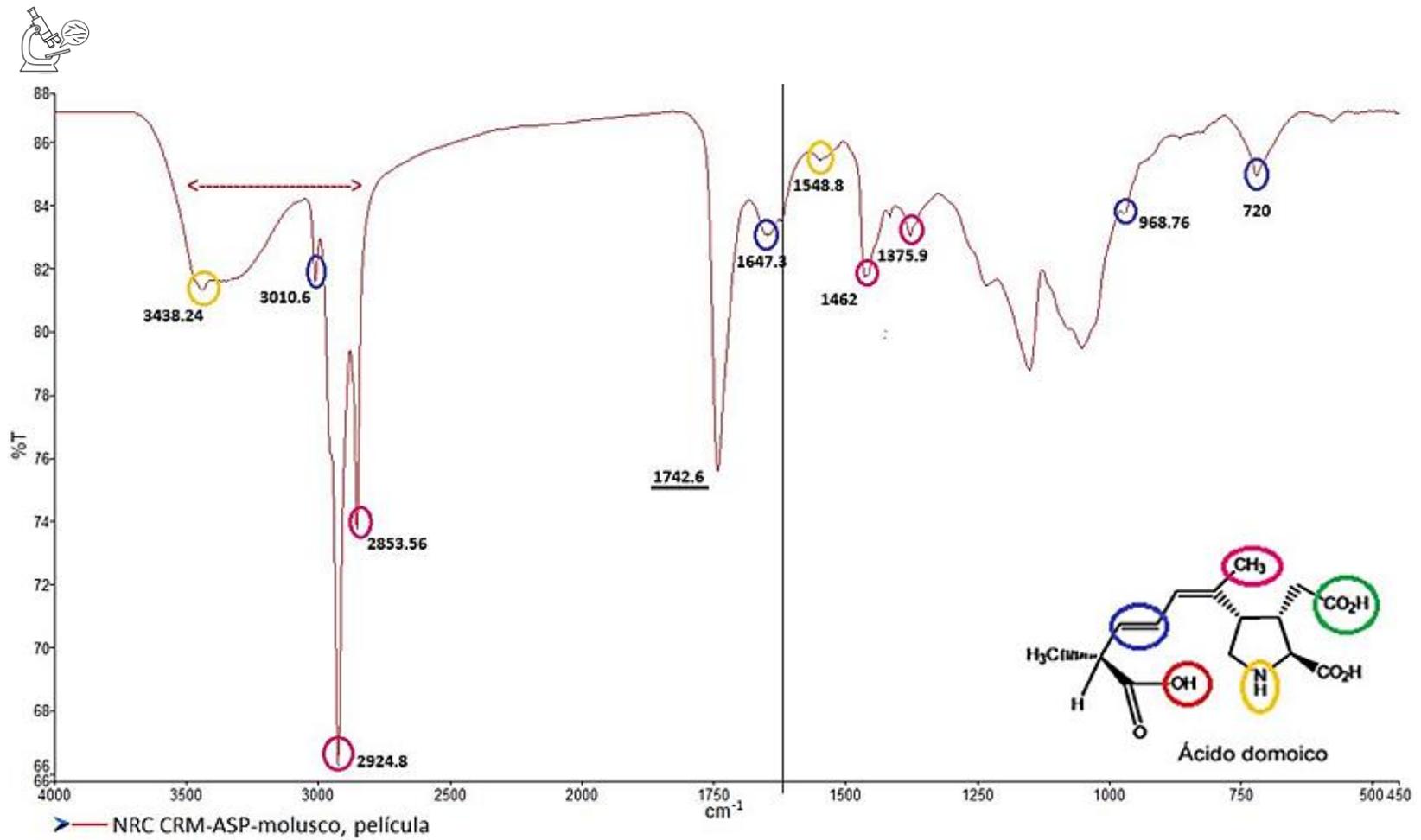


Figura 21. Espectro del análisis cualitativo en infrarrojo FTIR de la muestras de tejidos de molusco utilizados para la detección de AD. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH, los círculos de colores corresponden a los grupos funcionales del AD.

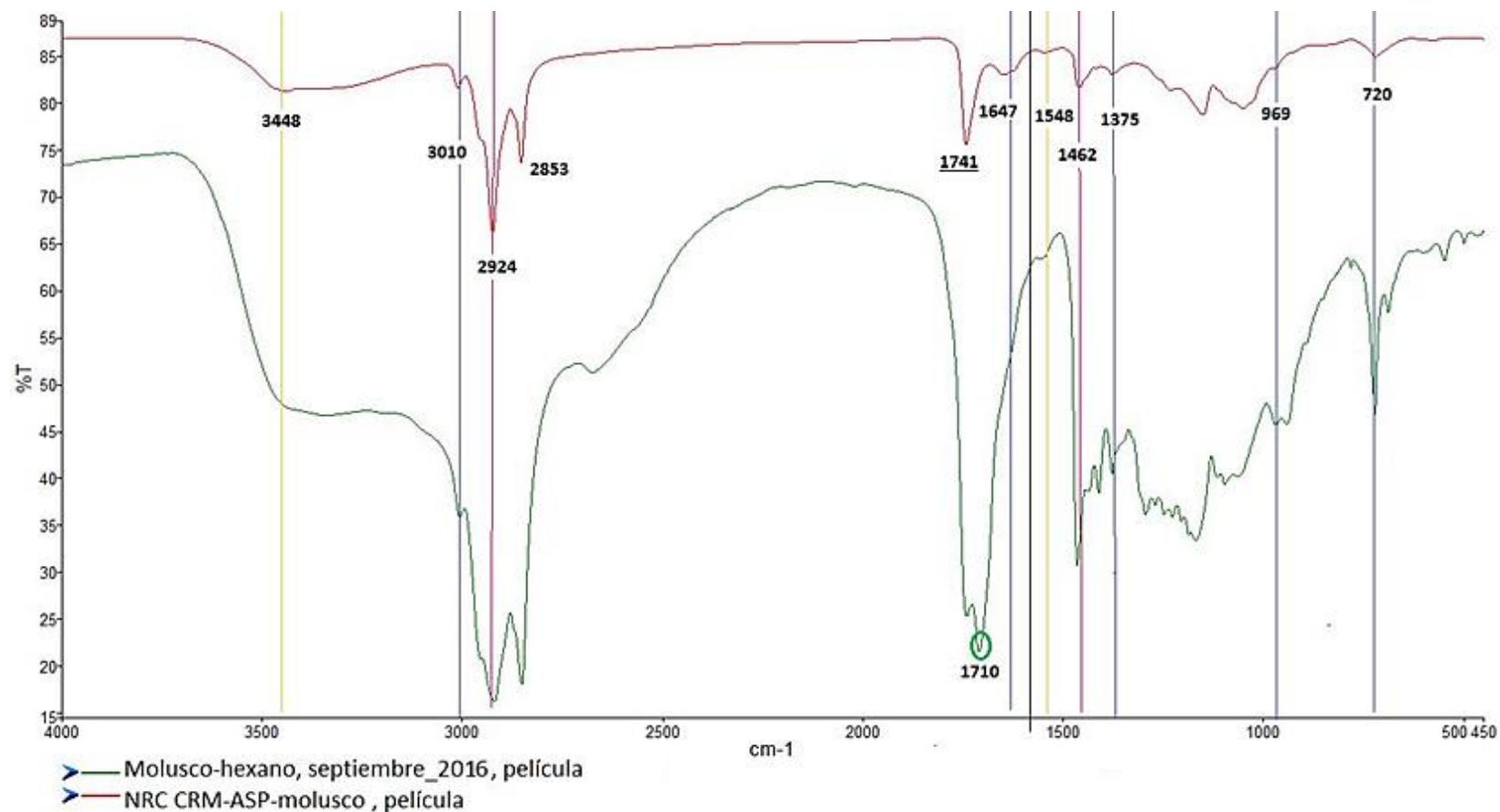


Figura 22. Espectros donde se compran las muestras de septiembre de 2016 y los tejidos utilizados para la detección de ácido domoico. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH, y el resto de las líneas verticales representan los grupos funcionales del AD, con su respectivo color, la longitud de onda subrayada hace mención a los ésteres y el círculo verde encierra la señal de los carboxilos, estas últimas representan las diferencias entre ambos espectros.

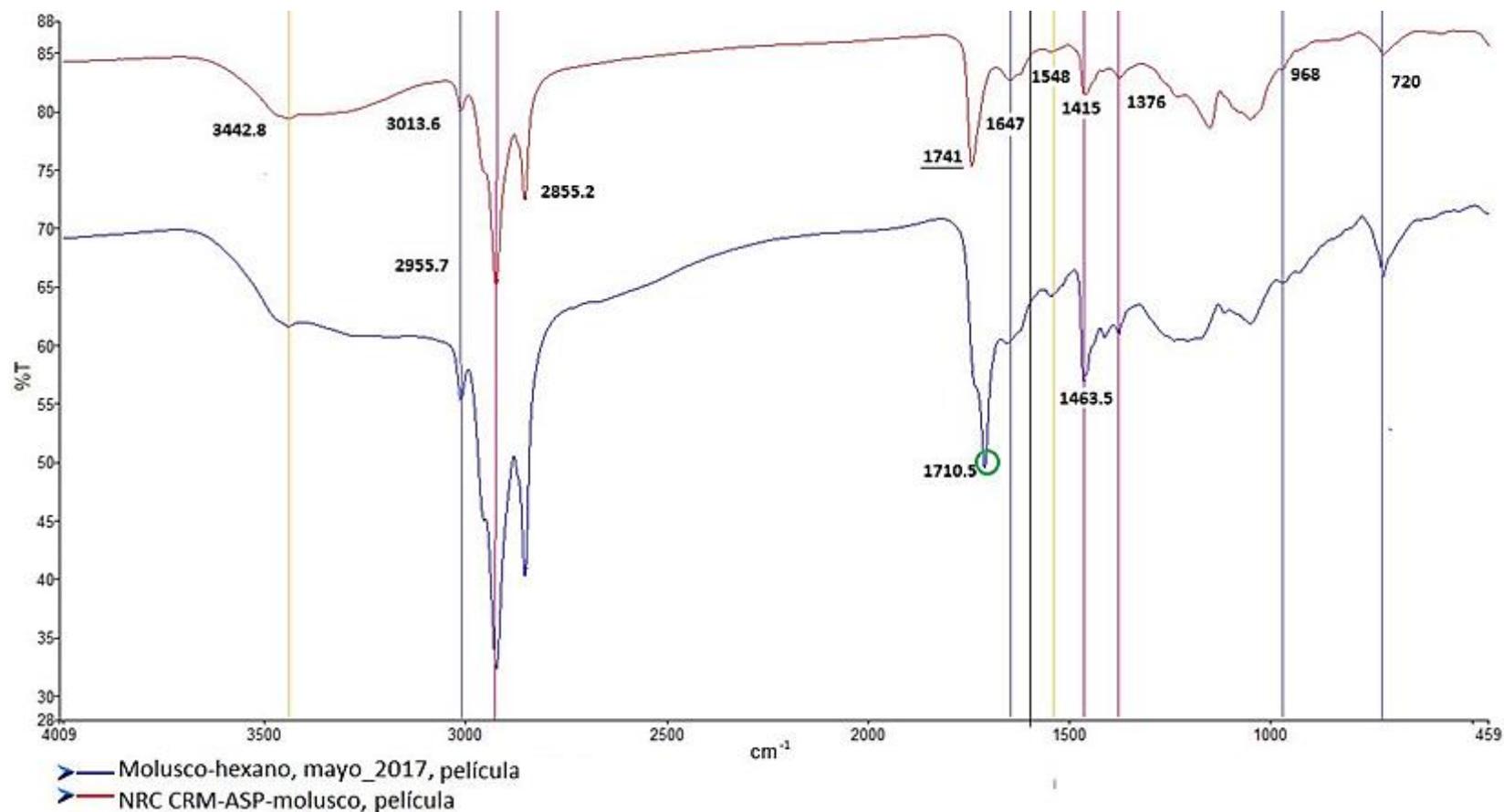


Figura 23. Espectros donde se comparan las muestras de mayo de 2017, y los tejidos utilizados para la detección de AD. La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH, y el resto de las líneas verticales representan los grupos funcionales del ácido domoico, con su respectivo color, la longitud de onda subrayada hace mención a los ésteres y el círculo verde encierra la señal de los carboxilos, estas últimas representan las diferencias entre ambos espectros.

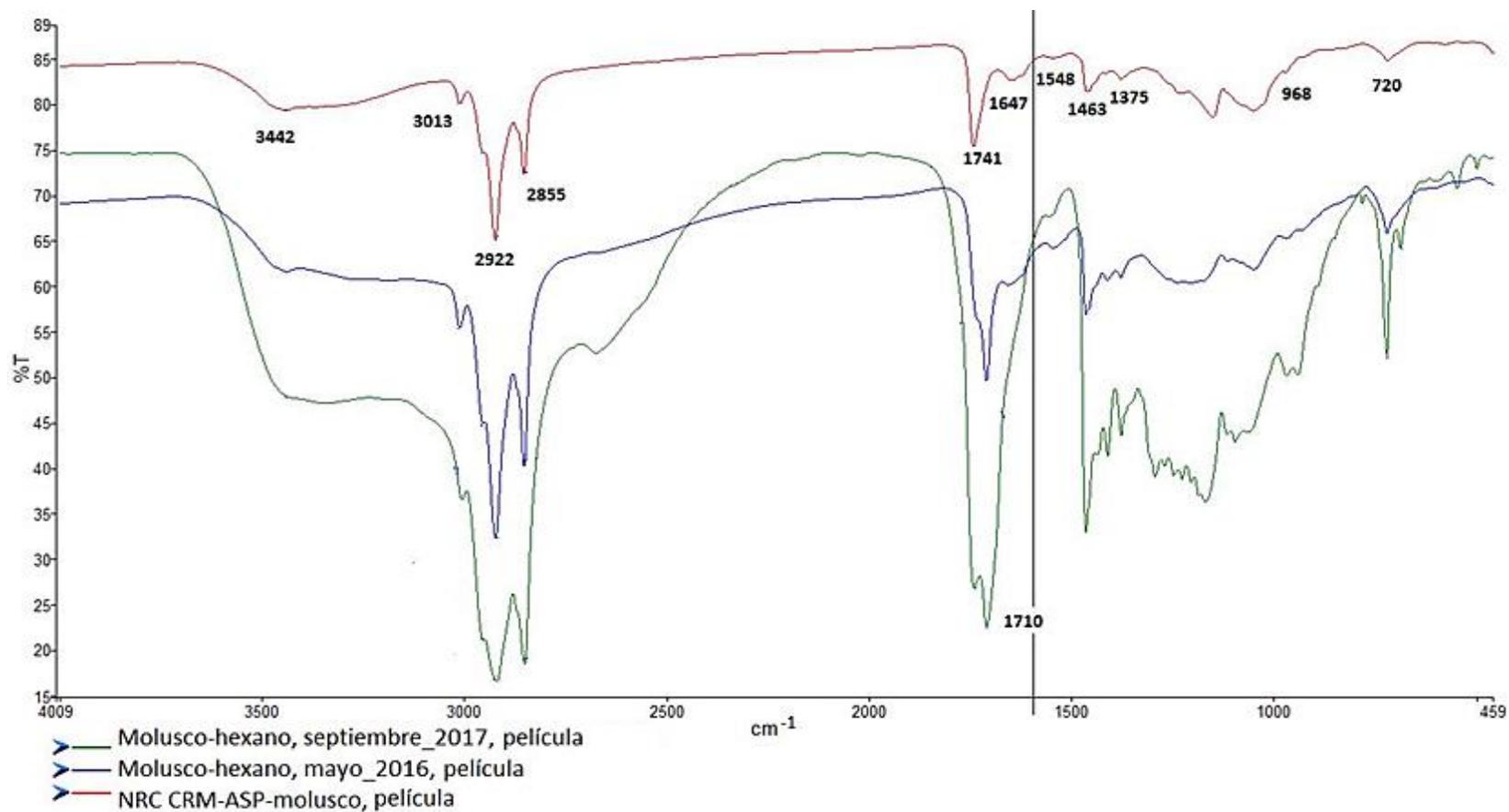


Figura 24. Espectros donde se comparan las muestras de septiembre de 2016, mayo de 2017 y los tejidos utilizados para la detección de ácido domoico.

La línea vertical negra representa la división entre la RF y RH



8.4 Identificación de los aislados del género *Pseudo-nitzschia* por morfometría

Se obtuvieron cinco aislados, tres de Isla Santiaguillo, denominados 5E, 8C, 4C y dos de Isla verde, denominados 6D y 5A (Tabla 12). Las medidas morfométricas (Tablas 14-19), se calcularon con fotografías tomadas en MEB y MET (Figuras 25-29, sección 8.5). Se consideraron las siguientes características: ausencia o presencia del interespacio central (I-E central), tamaño de eje apical, que corta longitudinalmente a la valva; eje transapical, el cual la atraviesa transversalmente; número de fíbulas y estrías en 10 µm, las cuales se encuentran paralelas al eje transapical; número de poroides en 1 µm y la cantidad de filas que los contienen por estrías, además de la forma del himen. Las medidas entre los aislados no variaron de manera suficiente para poder distinguir especies, sin embargo, se puede afirmar que todos los organismos pertenecen al “complejo americana”, comprendido por *P. americana*, *P. brasiliana* y *P. linea*, descritas por (Lundholm et al., 2002). Estas tres especies están estrechamente relacionadas por ser pseudo-crípticas, por lo cual la distinción entre ellas es complicada y se basa en la estructura de la valvocópula (primera banda que está en contacto con la valva en el cíngulo) la cual solo se puede visualizar en vista cingular, sin embargo, no fue posible observar esta vista en las sesiones de microscopía electrónica.

Tabla 12. Lugar de donde fueron aisladas las células de *Pseudo-nitzschia* dentro del PNSAV, para su posterior análisis

Aislados	Lugar
5E	Isla Santiaguillo
8C	
4C	
6D	Isla Verde
5A	

Tabla 13. Taxonomía del género *Pseudo-nitzschia*.

Tomada de AlgaBase, <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=77753>

División	Bacillariophyta
Clase	Bacillariophyceae
Subclase	Bacillariophycidae
Orden	Bacillariales
Familia	Bacillariaceae
Género	<i>Pseudo-nitzschia</i> H.Pergallo, 1899



Tabla 14. Características morfométricas del aislado **4C** *Pseudo-nitzschia* sp.

-, ausencia de interespacio central (I-E central); *, no se lograron observar las características, Hex., himen hexagonal.

Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
Aislado 4C							
MEB							
2.73	24.5	-	23	24	2	*	8
2.83	26.2	-	23	24	2	*	8
2.55	23.8	-	25	27	2	*	8
2.68	28.8	-	21	22	2	*	8
2.74	27.1	-	22	22	2	*	9
2.94	25.9	-	27	26	2	*	10
2.61	25.5	-	23	26	2	*	8
2.76	25.2	-	25	27	2	*	11
2.8	25.8	-	24	24	*	*	*
MET							
2.52	26.76	-	23	23	*	*	*
2.9	25.57	-	22	25	2	Hex.	8
3.4	25.08	-	21	21	2-3	Hex.	9
3.59	30.77	-	20	22	2-3	Hex.	9
2.6	25.2	-	24	24	2-3	Hex.	9
Máximos – mínimos							
2.52- 3.59	23.8-30.77	-	20-27	21-27	2-3	Hex.	8-11

Tabla 15. Características morfométricas del aislado **5E** *Pseudo-nitzschia* sp.

-, ausencia de interespacio central (I-E central); *, no se lograron observar las características, Hex., himen hexagonal.

Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
Aislado 5E							
MEB							
2.74	26.7	-	25	25	2	*	9
2.74	25.7	-	24	23	2	*	8
2.52	25.7	-	22	22	*	*	*
2.64	25.6	-	23	23	2	*	*
2.52	25.4	-	*	*	*	*	*
2.35	25.5	-	24	25	*	*	*
2.50	26	-	24	25	2	*	8
2.74	26.7	-	25	25	2	*	9
MET							
2.01	25.77	-	22	23	2-3	*	9
2.78	25.06	-	22	23	2	*	8
2.60	24.97	-	23	23	2-3	Hex.	8
2.7	26.79	-	21	21	2-3	Hex.	8
2.7	25.84	-	22	24	*	Hex.	*
Máximos – mínimos							
2.01-2.78	24.97-26.79	-	21-25	21-25	2-3	Hex.	8-9



Tabla 16. Características morfométricas del aislado **5A** *Pseudo-nitzschia* sp.

-, ausencia de interespacio central (I-E central); *, no se lograron observar las características, Hex., himen hexagonal.

Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
Aislado 5A							
MEB							
2.51	27.1	-	25	27	2	*	8
2.67	27.0	-	24	22	2	*	8
2.59	25.9	-	25	28	2	*	8
2.82	26.2	-	23	23	2	*	8
2.49	26.2	-	24	23	2	*	8
3	21	-	24	24	2	*	8
MET							
2.62	26.69	-	22	24	2	Hex.	8
2.54	26.56	-	23	25	2-3	Hex.	7
2.78	26.64	-	19	21	2-3	Hex.	8
2.52	26.49	-	22	23	2	Hex.	8
2.37	26	-	23	25	2-3	Hex.	9
2.88	25.40	-	22	22	2-3	Hex.	9
2.98	26.78	-	22	23	2-3	Hex.	7
3.13	26.33	-	22	22	2-3	Hex.	8
2.62	26.69	-	22	24	2	Hex.	8
Máximos - mínimos							
3.13-2.37	27.1-25.40	-	19-25	21-28	2-3	Hex.	7-9

Tabla 17. Características morfométricas del aislado **8C** *Pseudo-nitzschia* sp.

-, ausencia de interespacio central (I-E central); *, no se lograron observar las características, Hex., himen hexagonal.

Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
Aislado 8C							
MEB							
2.69	27.7	-	24	24	2	*	9
2.67	25.9	-	23	23	2	*	9
2.65	25.3	-	24	24	2	*	9
2.74	26.3	-	22	22	2	*	9
2.80	24.6	-	23	23	*	*	*
MET							
2.0	20.52	-	21	21	2-3	Hex.	8
1.89	18.59	-	29	30	2-3	*	10
Máximos - mínimos							
1.89-2.80	18.59-27.7	-	21-29	21-30	2-3	Hex.	10-8



Tabla 18. Características morfométricas del aislado **6D** *Pseudo-nitzschia* sp.

-, ausencia de inter espacio central (I-E central); *, no se lograron observar las características, Hex., himen hexagonal

Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
Aislado 6D							
MEB							
2.9	24.8	-	23	25	*	*	*
2.84	27.6	-	*	*	*	*	*
2.41	24.6	-	26	26	*	*	10
2.52	27.4	-	26	25	*	*	*
2.74	26.7	-	*	*	*	*	*
2.43	26.6	-	22	24	2	*	9
MET							
2.05	19.14	-	31	32	2	*	8
2.95	27.19	-	21	22	2-3	Hex.	8
2.93	27.02	-	23	23	*	*	*
3.29	29.51	-	22	22	2-3	Hex.	7
3.20	14.73	-	*	*	*	*	*
3.45	28.89	-	*	*	*	*	*
Máximos - mínimos							
2.05-3.45	19.14-29.51	-	21-31	22-32	2-3	Hex.	7-10

Tabla 19. Máximos y mínimos de las características morfométricas de los cinco aislados.

Aislado	Eje transapical	Eje apical	I-E central	Fíbulas en 10µm	Estrías en 10µm	Filas de poros	Himen	Poros en 1 µm
4C	2.52-3.59	23.8-30.77	-	20-27	21-27	2-3	Hex.	8-11
5E	2.01-2.78	24.97-26.79	-	21-25	21-25	2-3	Hex.	8-9
5A	2.37	21-27.1	-	19-25	21-28	2-3	Hex.	7-9
8C	1.89-2.80	18.59-27.7	-	21-29	21-30	2-3	Hex.	10-8
6D	2.05-3.45	19.14-29.51	-	21-31	22-32	2-3	Hex.	7-10

8.5 Microscopía electrónica

Las características morfométricas observadas en microscopía electrónica de TEM y MEB se reportan en la sección 8.4. Aunque se realizó un análisis detallado de la frústula, solo se logró determinar que pertenece al “complejo americana” como se mencionó anteriormente. En todos los organismos aislados (Figuras 25-29) se observaron las siguientes características: las valvas rectangulares con extremos un poco redondeados, las células con dos cloroplastos marrones, uno en cada extremo, y un núcleo central difícil de diferenciar. El rafe es extremadamente excéntrico. Las estrías que corren paralelas al eje transapical, excepto en los polos, donde algunas se vuelven casi perpendiculares a éste. Las fíbulas y las estrías a veces correspondieron en número, por lo que en ocasiones aparecieron alineadas.



En las figuras 25-19 la flecha que señala el rafe por el centro indica que hay ausencia de interespacio central.

Las estrias contienen dos filas de poroides, pero se puede observar en las frústulas que pueden tener indicios de tres; aparecen como poroides aislados entre las dos filas regulares. Los poroides de ambas frústulas están marcados por pequeñas perforaciones (himen) en un patrón hexagonal. El arreglo de las células es en cadenas escalonadas, superpuestas de $1/8$ a $1/11$.

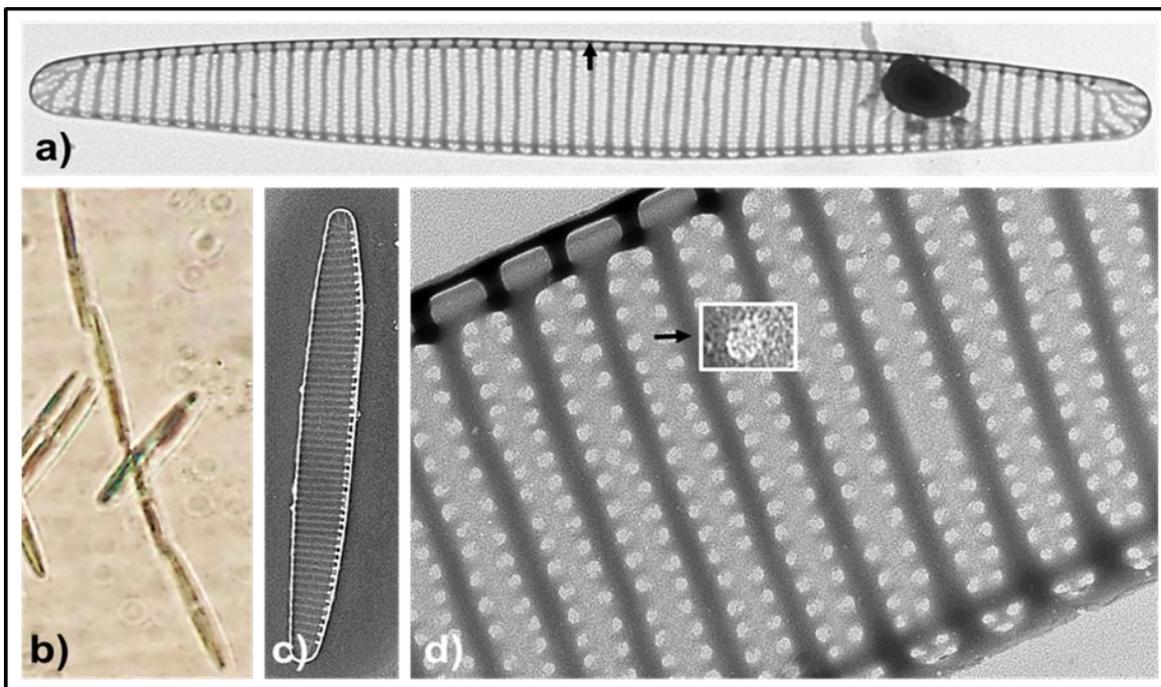


Figura 25. Aislado 4C. Forma y estructura de la valva.

a) MET, la flecha señala la mitad de la valva, en donde se observa la falta de inter espacio central, b) colonias en cadenas (microscopio óptico, 200x), c) valva completa con MEB, d) se muestra las estrias con dos filas de poroides, algunos aparecen aislados entre las dos filas, la flecha indica el aumento de un poroide sin sector de himen y forma hexagonal.

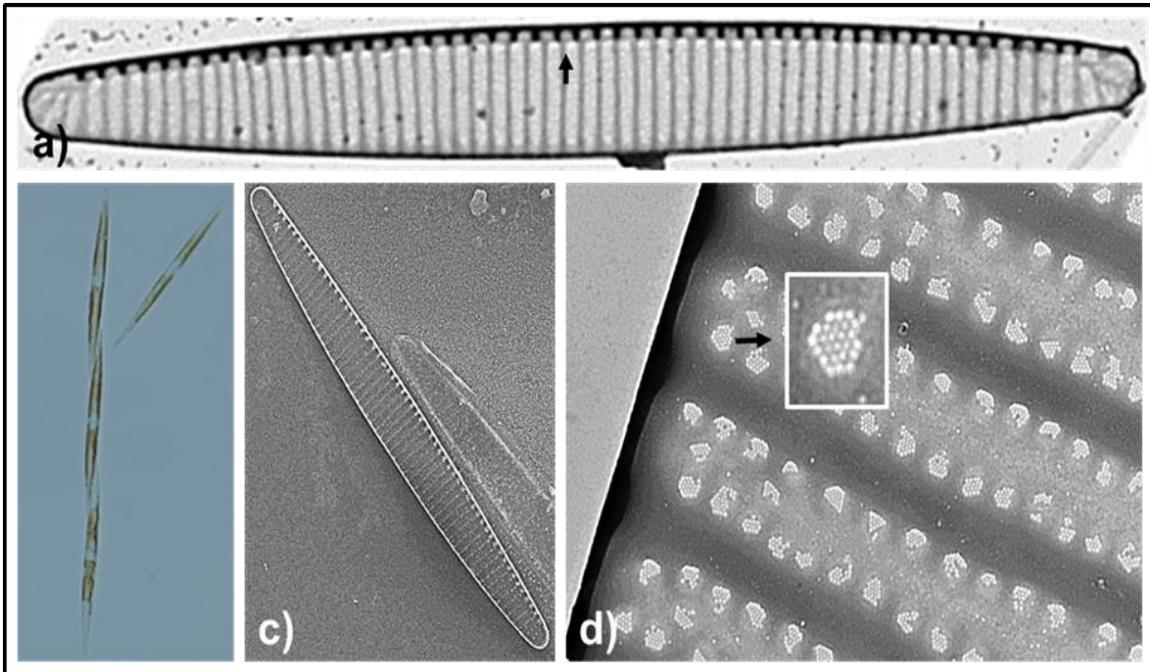


Figura 26. Aislado 5E. Forma y estructura de la valva.

a) MET, la flecha señala la mitad de la valva, donde se observa la falta de interespacio central, b) colonias en cadenas (microscopio óptico 200x), c) valva completa con MEB, d) estrías con dos filas de poroides, algunos aparecen aislados entre las dos filas, la flecha indica el aumento de un poroide sin sector de himen y forma hexagonal.

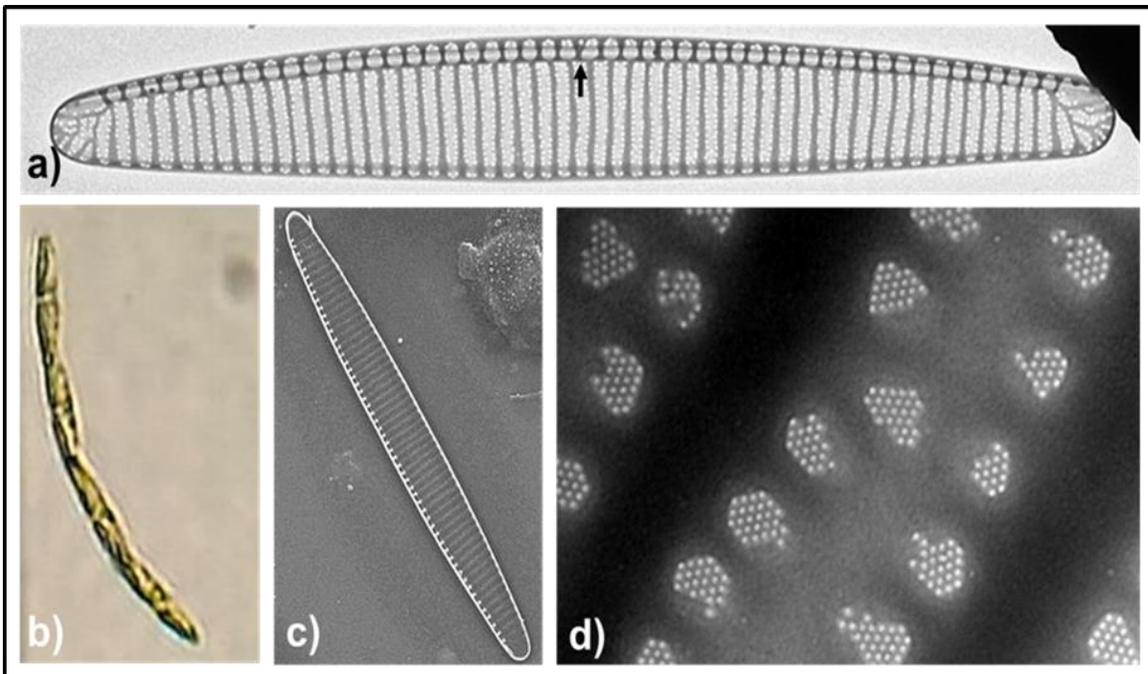


Figura 27. Aislado 5A. Forma y estructura de la valva

a) MET, la flecha señala la mitad de la valva, en donde se observa la falta de inter espacio central, b) colonias en cadenas (microscopio óptico, 600x), c) valva completa con MEB, d) se muestra las estrías con dos filas de poroides, el poroide sin sector de himen y forma hexagonal.

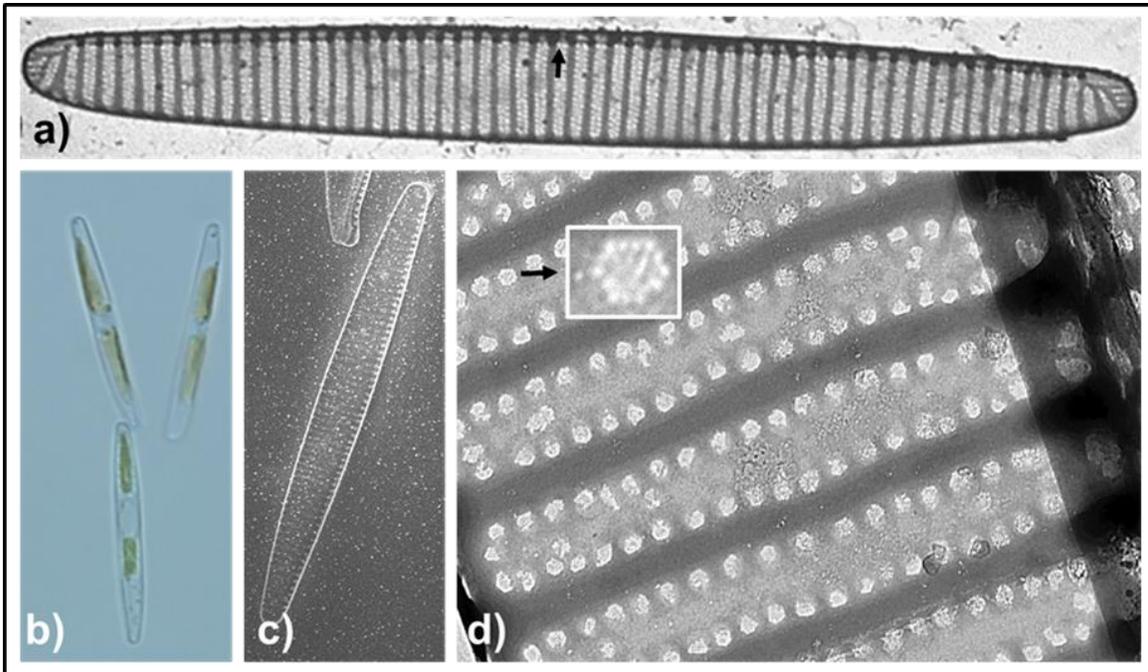


Figura 28. Aislado 8C. Forma y estructura de la valva.

- a) MET, la flecha señala la mitad de la valva, en donde se observa la falta de inter espacio central,
b) colonias en cadenas (microscopio óptico con focal, aumento a 630x), c) valva completa con MEB, d) se muestra las estrías con dos filas de poroides, algunos aparecen aislados entre las dos filas, la flecha indica el aumento de un poroide sin sector de himen y forma hexagonal

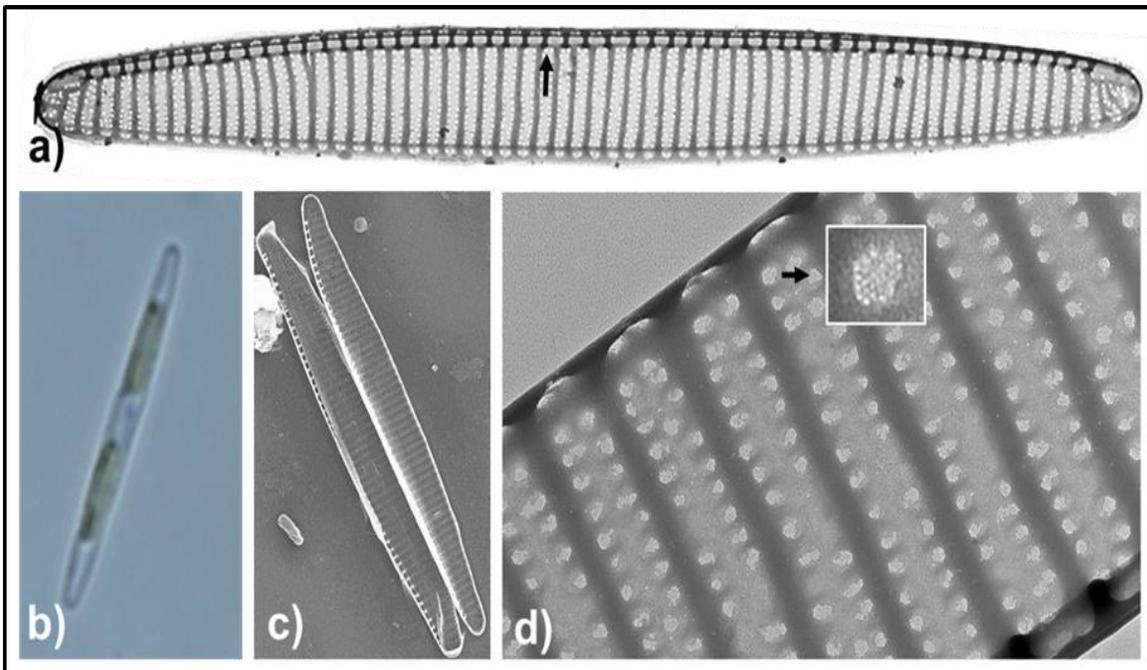


Figura 29. Aislado 6D. Forma y estructura de la valva.

- a) MET, la flecha señala la mitad de la valva, en donde se observa la falta de inter espacio central,
b) colonias en cadenas (microscopio óptico con focal, aumento a 630x), c) valva completa con MEB, d) se muestra las estrías con dos filas de poroides, algunos aparecen aislados entre las dos filas, la flecha indica el aumento de un poroide sin sector de himen y forma hexagonal.



8.6 Identificación de las especies por métodos moleculares

Se realizaron 30 extracciones de ADN, seis para cada aislado, en diferentes fechas durante su cultivo. La concentración y pureza del ADN, se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000 spectrophotometer; Thermo Scientific. Massachusetts, EE.UU). De todas las extracciones se seleccionaron las cinco mejores, una por cada aislado.

En la tabla 20 se muestran los datos registrados en el NanoDrop. La longitud de onda (λ) a la que absorbe el ADN es de 260 nm; la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes absorben fuertemente a 280 nm o cerca de ellos; 230 nm es un valor influenciado por la presencia de sales en la muestra, por lo que la relación de pureza del coeficiente 260 /280 nm oscila entre 1.8-2.2 y la de 260/230 nm comúnmente en el mismo intervalo, por lo que las extracciones elegidas fueron las más cercanas a estos valores.

Tabla 20. Concentración en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ del ADN extraído e índices de pureza.

Aislado	280/260 nm	260/230 nm	[$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]
5E	1.92	1.51	47.7
4C	2.17	2.19	64.0
8C	1.88	1.01	43.6
6D	2.14	1.70	63.8
5A	1.76	0.77	44

Para conocer la integridad del ADN extraído también se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el producto fue visualizado con luz ultravioleta (Figura 30).

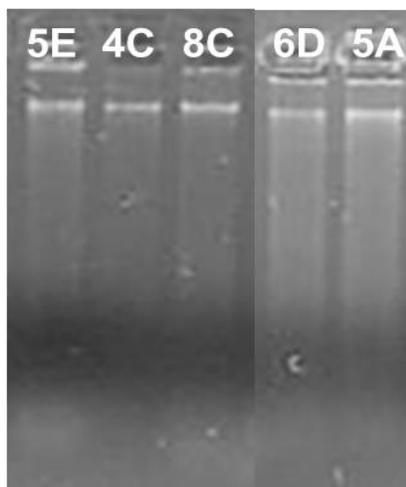




Figura 30. Gel de electroforesis 1% de la extracción de ADNr de los cinco aislados cultivados.

Las amplificaciones de los cinco aislados, se hicieron por duplicado con el fin de obtener la mejor calidad. Se generaron diferentes fragmentos a 1000 pb, 800 pb y 700 pb con los cebadores universales ITS de la región ITS-5.85-ITS2 de ADNr nuclear, ITS1 *reverse*-5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS4 *forward*-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (Figura 31).

El resultado de la ampliación no fue de la calidad necesaria, ya que en primer lugar, en la electroforesis se visualiza varios fragmentos de diferentes tamaños y una vez secuenciados el tamaño de los picos no fue claro y al comparar las secuencias con la base datos de GenBank del NCBI mediante el algoritmo BLAST, se obtuvieron dímeros de los cebadores y organismos no relacionados con *Pseudo-nitzschia*. Por este motivo se decidió hacer nuevas PCR con el diseño de cebadores específicos de la misma región, Pnizsch-R-reverse-5'- AAGAGTGRCAACGCCGTCTT-3' y Pnizsch-F-forward-5'-AGGTTCCACAACGATGAAG-3'. Con estos cebadores se obtuvieron bandas más delineadas pero con fragmentos más pequeños, de aproximadamente 300 pb (Figura 32), a excepción del aislado 5A, del que no se logró visualizar ninguna banda. Una vez obtenidas las secuencias se realizó nuevamente el BLAST, y con base en los alineamientos más significativos (e-value e identidad), se definió la identidad de los aislados (Tabla 21).

De los cinco aislados, cuatro fueron compatibles con *P. brasiliiana*, del aislado 5E sólo se logró analizar el forward y del aislado 5A no se encontró similitud en GenBank.

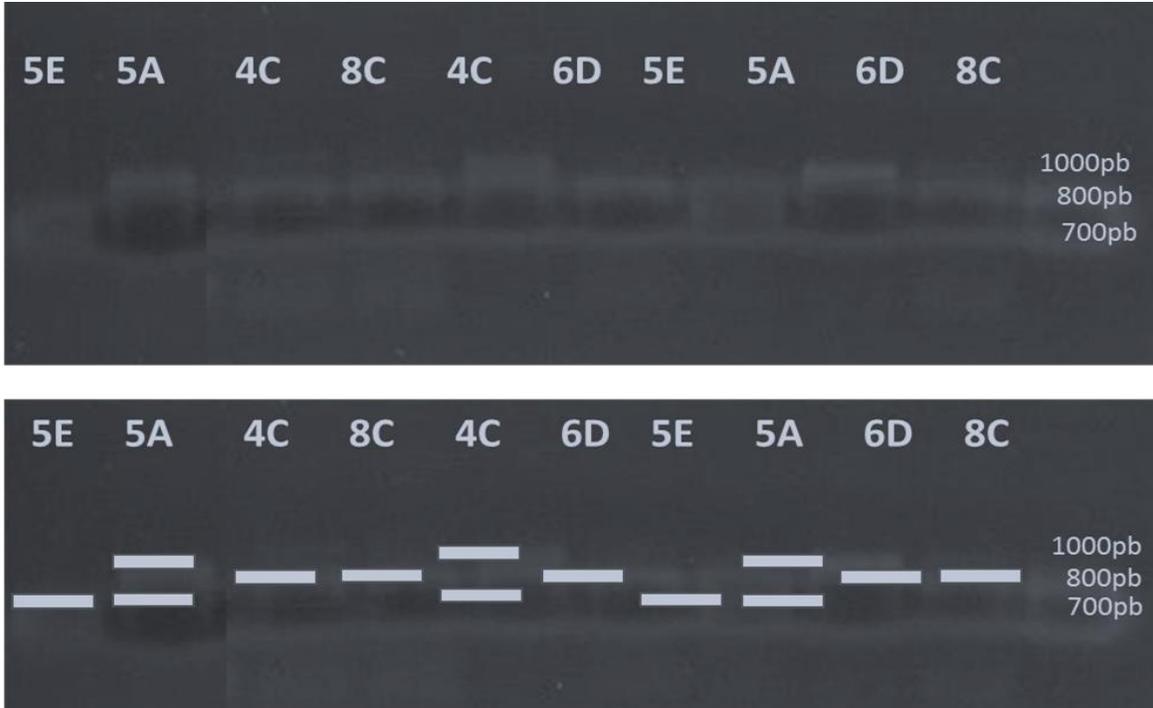


Figura 31. Gel de agarosa al 1.5%, en el que se observan los productos de amplificación de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4.

Se obtuvieron fragmentos de diferentes tamaños: 1000 pb, 800 pb y 700 pb. La imagen superior es la fotografía original y en la inferior se resaltaron los productos de las amplificaciones.

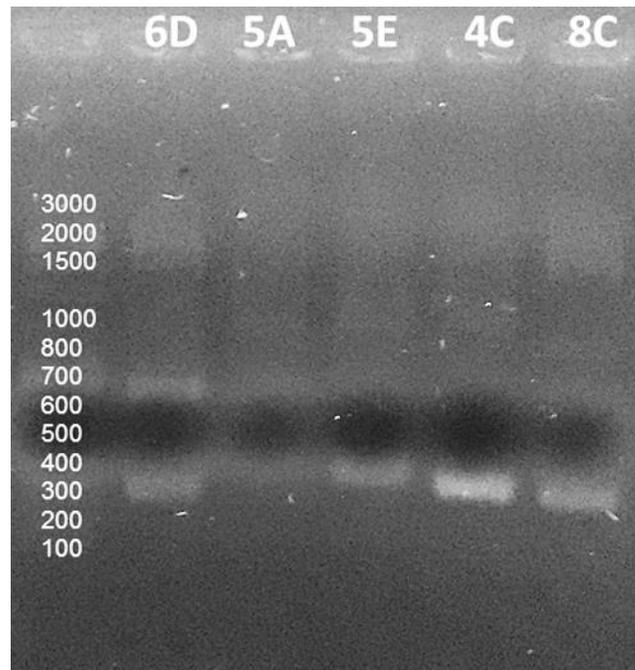


Figura 32. Gel de agarosa al 1.5%. Productos de amplificación de PCR con los cebadores específicos Pnizsch-R y Pnizsch-F.

Se obtuvieron fragmentos de 300 pb, excepto para el aislado 5A.



Tabla 21. Homologías en GenBank, a partir de la amplificación de la región ITS-5.85-ITS2 de ADNr nuclear de acuerdo al BLAST.

Aislado	Homología en GenBank	Tamaño del fragmento (pb)	Identidad (%)	Valor de expectación (e)	Número de acceso
4C	<i>P. brasiliiana</i>	291	93	2×10^{-113}	KM386875.1
5A	No se encontró similitud				
5E	Forward- <i>P. brasiliiana</i>	267	96	4×10^{-118}	KM386875.1
6D	<i>P. brasiliiana</i>	285	94	5×10^{-115}	KM386875.1
8C	<i>P. brasiliiana</i>	278	95	1×10^{-115}	KM386875.1

8.6.1 Análisis de las secuencias

Las 4 secuencias obtenidas del PNSAV fueron alineadas y se añadieron secuencias del GenBank de otros países (Tabla 8, sección 7.2.7.1). De esta manera se obtuvo una matriz de distancias genéticas y diferencias en la composición de los nucleótidos entre aislados (Anexos, 11.1 y 11.2). Con base en lo anterior se construyó un cladograma (Figura 33), para representar con un diagrama en forma de árbol ramificado la relación entre los distintos aislados. El árbol dio como resultado que todos los aislados pertenecen a la especie *P. brasiliiana*, ya que se agruparon en un clado con once terminales y dejando fuera a *P. americana* como grupo externo. También se puede observar que todos los aislados del PNSAV se separan de los otras secuencias obtenidas en GenBank (74% NJ). El aislado 5E fue el más cercano con los otros países, 8C y 6D se encuentran más emparentados (62% NJ) y son los más lejanos.

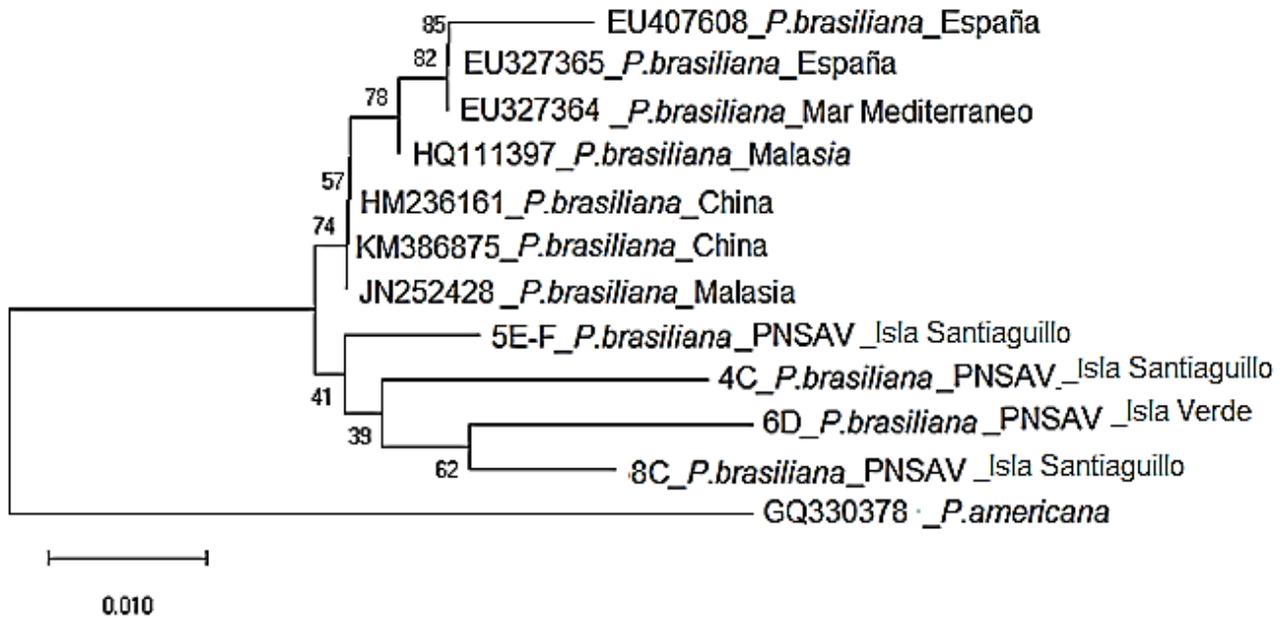


Figura 33. Árbol realizado con el método de Unión de Vecinos (*Neighbor Joining*) basado en la región ITS1-5.85-ITS2, de los aislados obtenidos en este trabajo (PNSAV_Isla Santiagoullo, _Isla Verde) y las secuencias del GenBank de diferentes países.

Se utilizó a *P. americana* como grupo externo. Sobre las ramas se muestran los porcentajes de réplicas en los que los taxones se agruparon, con la prueba bootstrap (1000 réplicas). Las longitudes de las ramas se dibujaron en función de las distancias evolutivas y se calcularon con el método de Probabilidad Máxima Compuesta.

8.7 Deformaciones de la valva

Algunas de las células analizadas mostraron modificaciones morfológicas en el frústula después de cuatro meses en cultivo. En la figura 34 a) se observa del lado izquierdo una célula dividiéndose vegetativamente; este fue el tamaño más pequeño observado. De lado derecho se encuentra una célula alargada, que representa el mayor tamaño observado en el cultivo, probablemente debido a la reproducción sexual dentro de los mismos.

Los incisos b y c muestran cómo las estrías se entrecruzan; esta deformación solo se observó en las células con frústulas alargadas.

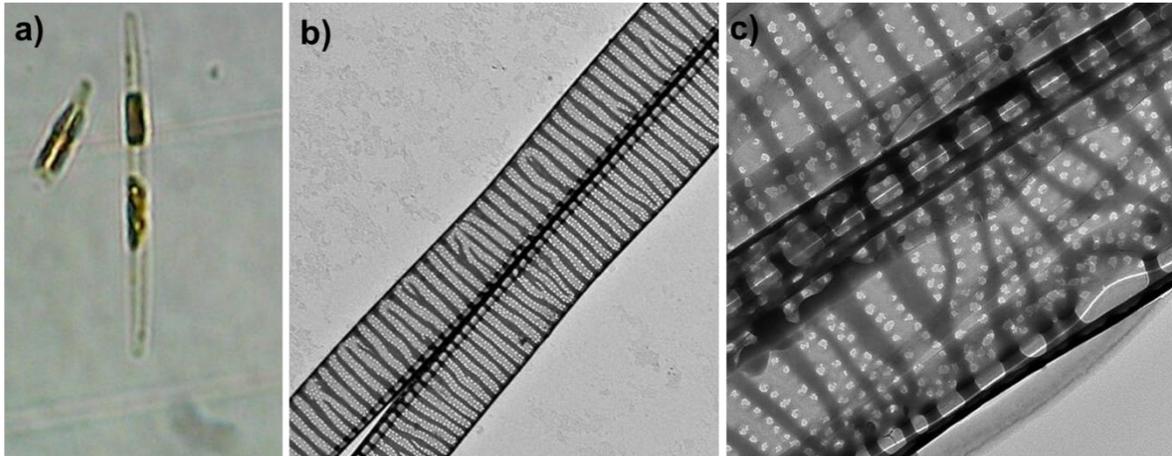


Figura 34. Deformación de la frústula después de la reproducción sexual.

a) Fotografía con microscopio óptico, aumento 400x, diferentes tamaños de las frústulas, b) y c) fotografía con MET, entrecruzamiento de las estrías.

8.8 Curvas de crecimiento, tasa de crecimiento y tiempo de división

Al realizar los conteos para poder hacer las curvas de crecimiento, se evidenció cómo los aislados aumentaban el número de células conforme pasaban los días, dejando de contar cuando este número comenzó a disminuir; de cualquier manera se contó un día extra para confirmar. Se logró distinguir el inicio y final de la fase exponencial, para posteriormente identificar la tasa de crecimiento, el tiempo de división y la densidad máxima.

Los aislados 5E y 5A presentaron la menor tasa de crecimiento, de $1.0 \pm 0.7 \text{ div día}^{-1}$ y $1.1 \pm 0.7 \text{ div día}^{-1}$, respectivamente. También tuvieron la menor densidad celular máxima, con $65,347 \pm 10,376 \text{ cél mL}^{-1}$ para el primero y $19,583 \pm 3,819 \text{ cél mL}^{-1}$ para el segundo, así como el mayor tiempo de división, de $0.8 \pm 0.4 \text{ días}$ y $0.9 \pm 0.7 \text{ días}$.

Los aislados 8C y 6D iniciaron y terminaron el mismo día su fase exponencial; su tasa de crecimiento y tiempo de división fue similar, aunque el máximo de densidad celular varió, y fue de $118,750 \pm 6,250$ y $88,750 \pm 25,830 \text{ cél mL}^{-1}$, respectivamente.

El aislado 4C tardó más tiempo en iniciar su fase exponencial. El tiempo fue de $2.3 \pm 1.2 \text{ días}$ y alcanzó la mayor densidad celular, de $138,750 \pm 50,420 \text{ cél mL}^{-1}$. El aislado 8C mostró menor variación entre sus repeticiones en los seis parámetros considerados en la tabla 22, por lo que se eligió para el experimento que se describe de la sección 8.10.



El tiempo que duró el crecimiento de todos los aislados fue de entre 6 y 10 días, siendo para 5A el mínimo, y para 5E el máximo (Figuras 35-40 y Tabla 22).

Las curvas de crecimiento de los cinco aislados se muestran en la figura 40 y las tasas de crecimiento, tiempo de división por día, densidad celular máxima, inicio y final de la fase exponencial en la tabla 22.

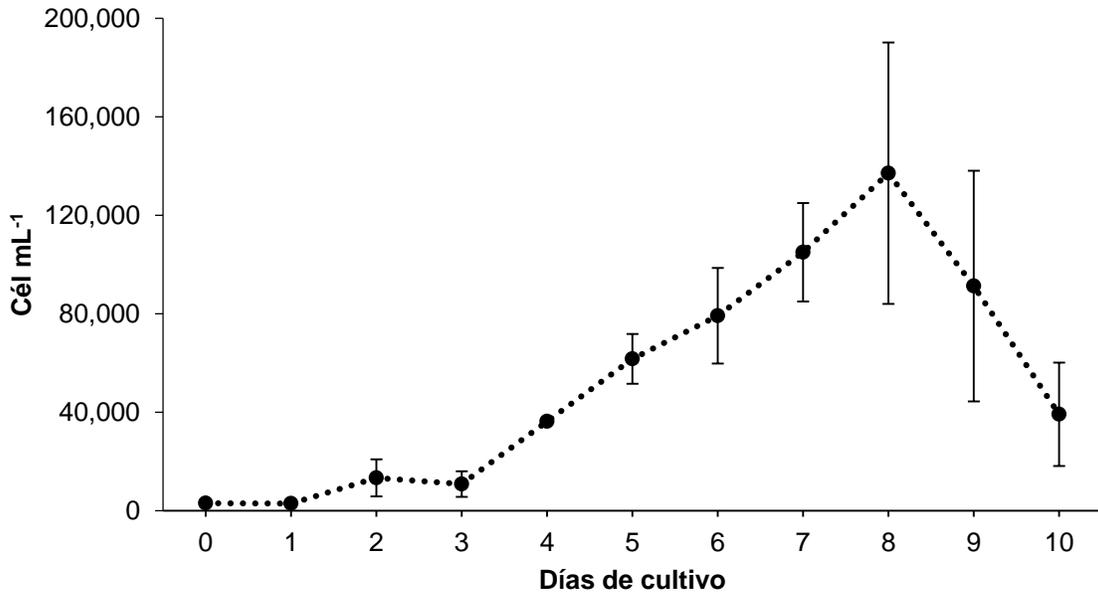


Figura 35. Curva de crecimiento del aislado 4C.

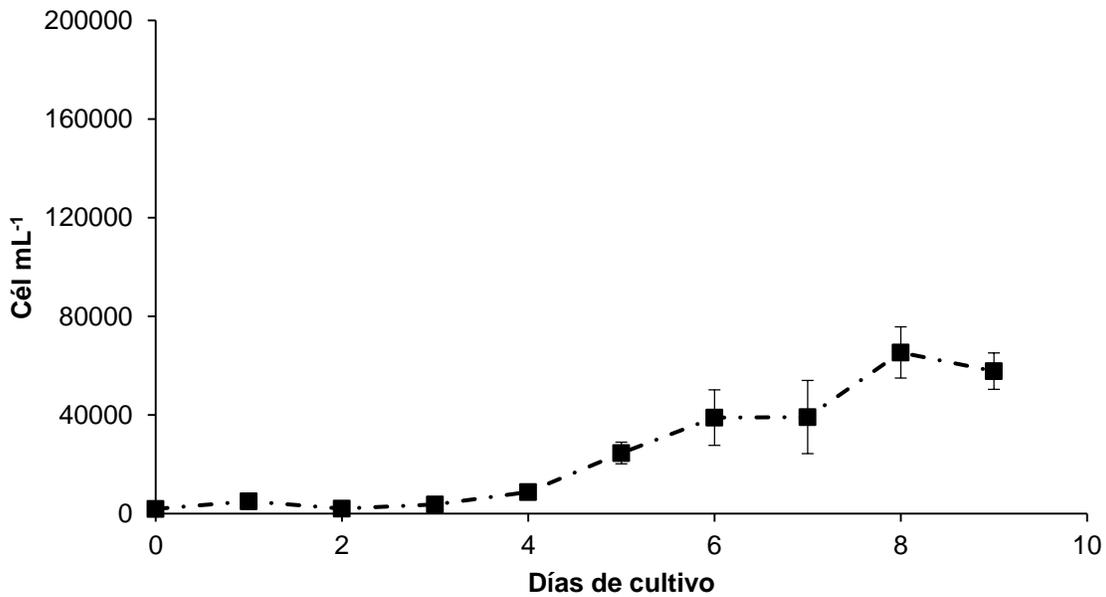


Figura 36. Curva de crecimiento del aislado 5E.

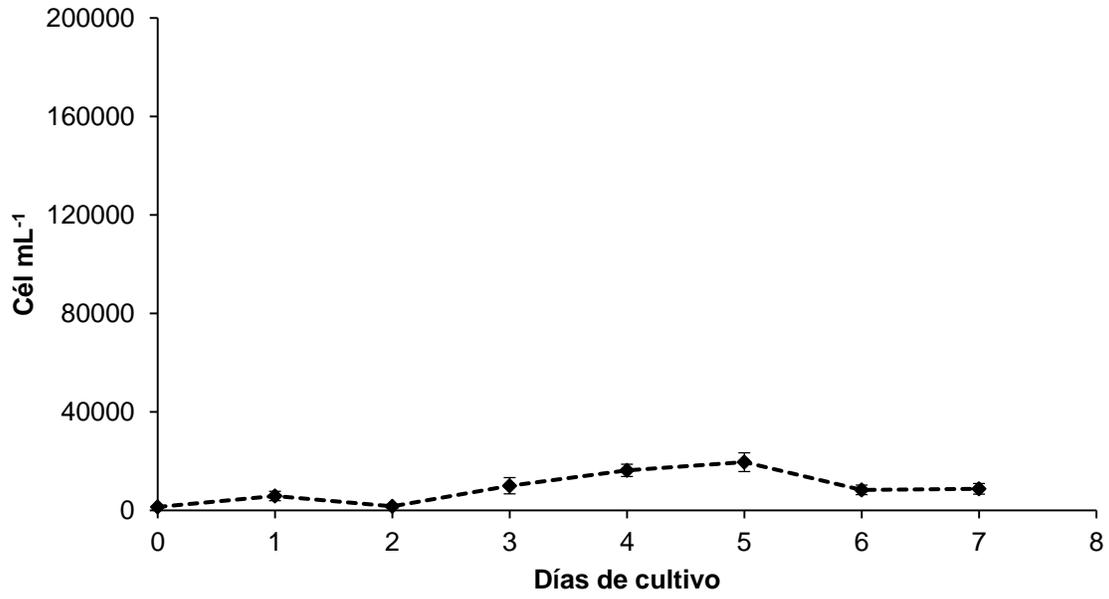


Figura 37. Curva de crecimiento del aislado 5A

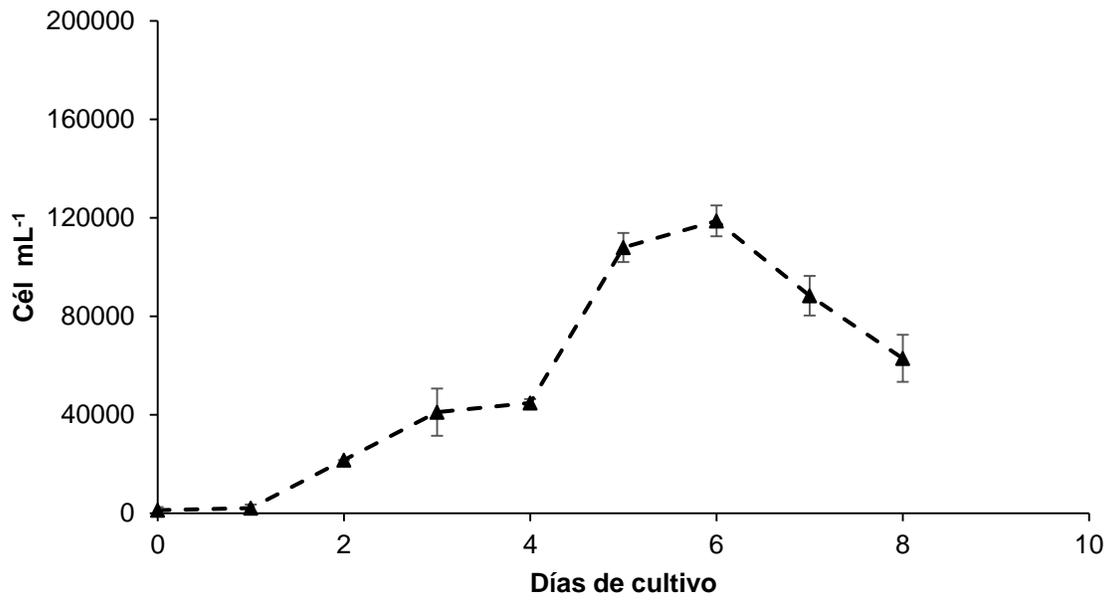


Figura 38. Curva de crecimiento del aislado 8C.

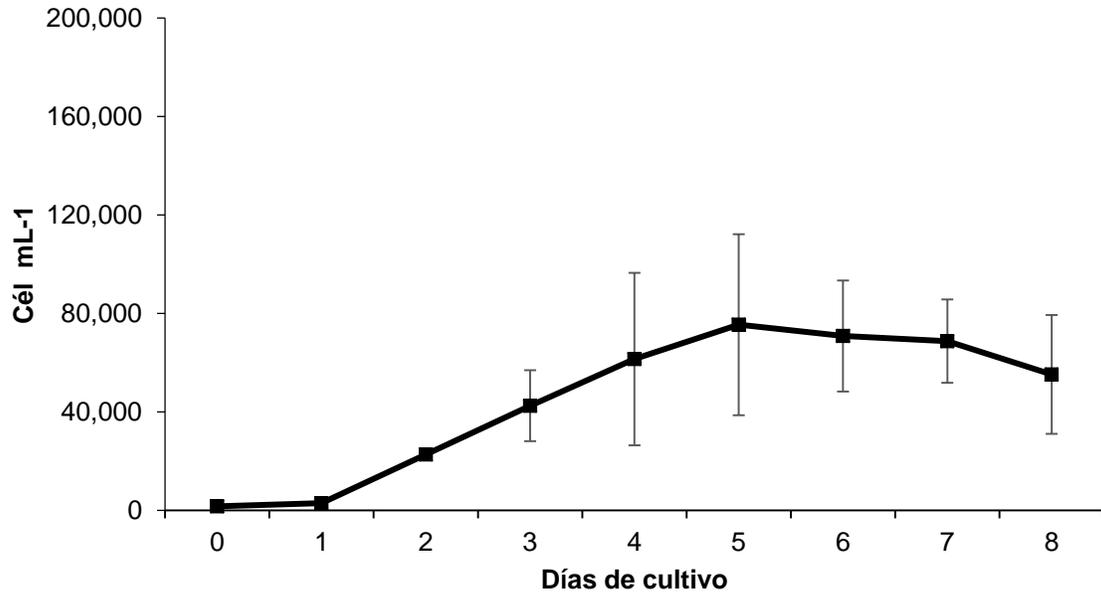


Figura 39. Curva de crecimiento del aislado 6D.

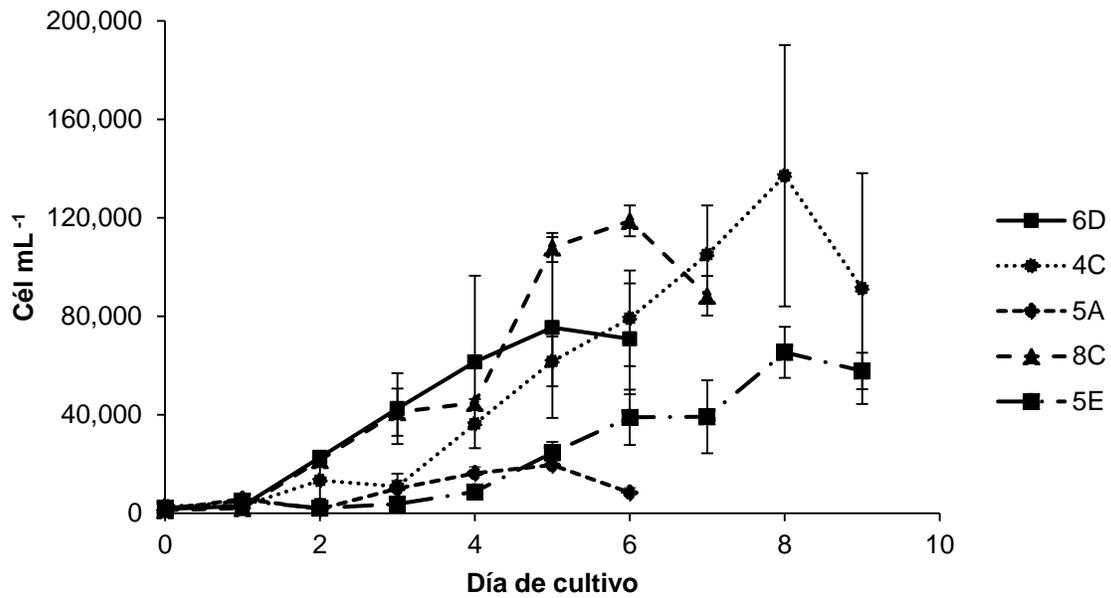


Figura 40. Curvas de crecimiento de los cinco aislados.



Tabla 22. Promedio y desviación estándar de los datos de crecimiento de los cinco aislados.

Aislado	Inicio de la fase exponencial (día)	Fin de la fase exponencial (día)	Tasa de crecimiento (div.día ⁻¹)	Tiempo de división (día)	Densidad celular máxima (cél.mL ⁻¹)	Tiempo en alcanzar la densidad celular máxima (días)
4C	2.3 ±1.2	3.3 ±1.2	1.6 ±0.5	0.5 ±0.2	138750 ±50420	7.6 ±0.6
5E	1.3 ±0.6	2.7 ±1.2	1.0 ±0.7	0.8 ±0.4	65347 ±10376	8.0
5A	1.7 ±0.6	3.3 ±0.6	1.1 ±0.7	0.9 ±0.7	19583 ±3819	5.0
8C	1.0	2.0	2.5 ±0.6	0.3 ±0.1	118750 ±6250	6.0
6D	1.0	2.0	2.2 ±0.6	0.3 ±0.1	88750 ±25830	5.7 ±1.2

8.8.1 Análisis estadísticos

Se realizó el gráfico de probabilidad normal para las tasas de crecimiento, tiempo de división y densidad celular máxima de los aislados para conocer si los datos provenían de una distribución normal. Para ello se consideró el valor de sesgo y el valor de curtosis estandarizado, para saber si estos se encontraban dentro el rango estimado ± 2 .

Tasa de crecimiento

Los datos se ajustaron a la curva de normalidad, por lo cual no fue necesario aplicar \log_{10} . En la tabla 23 se muestran las pruebas estadísticas realizadas y el valor de p obtenido para cada una. Cuando el valor de significancia (p) fue mayor o igual a 0.05, no se rechaza la hipótesis nula (H_0).

Tabla 23. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la tasa de crecimiento de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.80	Distribución normal
Levene, homogenidad de varianzas	0.99	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.06	No existe diferencia entre las medias de los aislados
Rangos múltiples (Tukey)		No aplica

La tasa de crecimiento entre los aislados varió entre la mínima, de 1.0 ± 0.7 div día⁻¹ para el aislado 5E y la máxima, de 2.5 ± 0.6 div día⁻¹ para el 8C. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias.

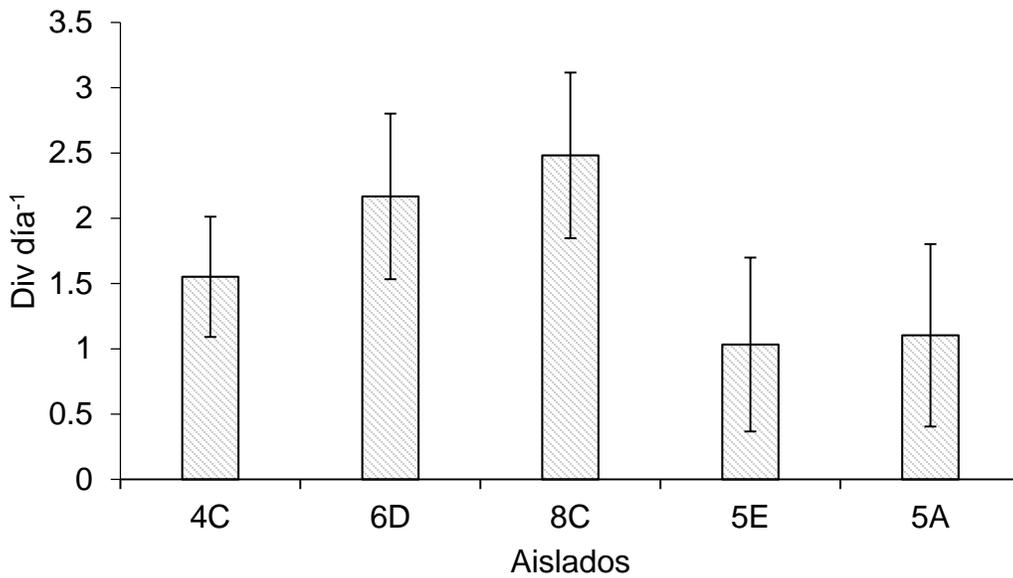


Figura 41. Tasa de crecimiento de los aislados cultivados de *Pseudo-nitzschia*. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias.

Tiempo de división

Para ajustar los datos a la curva de normalidad se aplicó \log_{10} . En la tabla 24 se muestra las pruebas estadísticas realizadas y el valor de p .

Tabla 24. Pruebas estadísticas para la comparación de medias del tiempo de división de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.79	Distribución normal
Levene, homogeneidad de varianzas	0.64	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.14	No hay diferencia entre las medias de los aislados
Rangos múltiples (Tukey)		No se aplica

El tiempo de división de los aislados varió entre un mínimo de 0.3 ± 0.1 días para los aislados 8C y 6D, y un máximo de 0.9 ± 0.7 días para el aislado 5A. En la prueba de ANDEVA no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias.

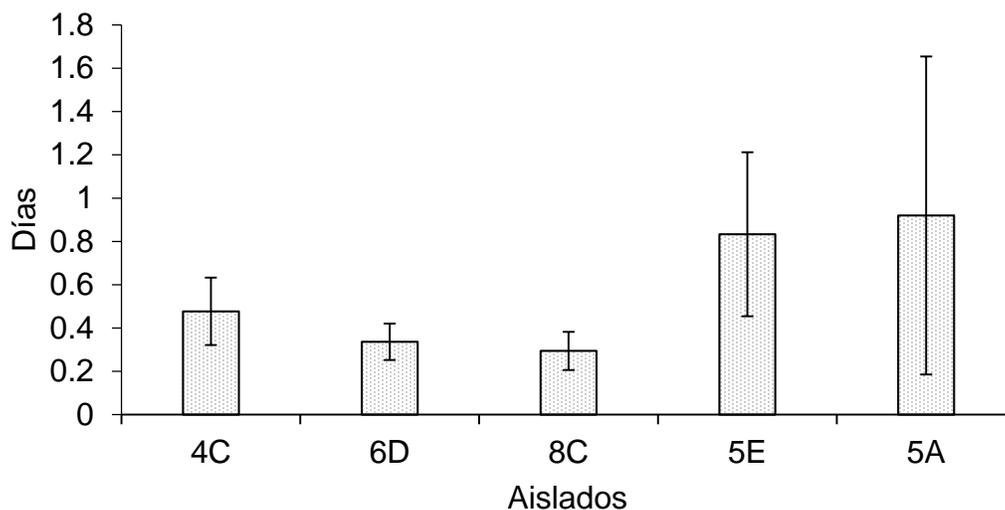


Figura 42. Tiempo de división de los aislados cultivados de *Pseudo-nitzschia*. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias

Densidad celular máxima

Los datos se ajustaron a la curva de normalidad. En la tabla 25 se muestran las pruebas estadísticas realizadas y el valor de p .

Tabla 25. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la densidad celular máxima de los aislados, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.99	Distribución normal
Levene, homogeneidad de varianzas	0.18	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.002	Hay diferencia entre las medias de los tratamientos
Rangos múltiples (Tukey)		Los aislados 5E y 5A no presentan diferencias significativas, así como también 4C, 6D y 8C, y por último 6D con 5E.



La densidad celular máxima registrada durante el cultivo de los aislados varió de un mínimo de $19,583 \pm 3,819 \text{ cél mL}^{-1}$ para el aislado 5A a un máximo de $138,750 \pm 0,420 \text{ cél mL}^{-1}$ para el aislado 4C; de esta manera se lograron agrupar los datos estadísticamente. En la figura 43 se observa que los aislados 5A y 5E no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$), por lo que se pueden considerar como un grupo (c), al igual que 4C, 6D y 8C (a), aunque existen aislados que comparten estos grupos con un tercero, 6D (ab) y 5E (bc).

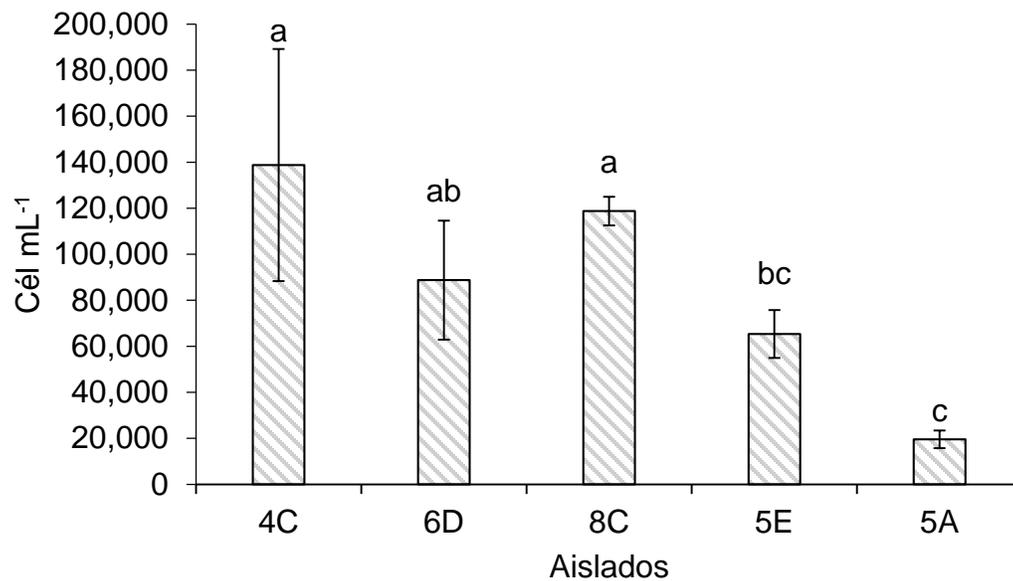


Figura 43. Densidad celular máxima de los aislados cultivados de *Pseudo-nitzschia*. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.9 Diatomeas del género *Minidiscus*

En dos de los cinco aislados de *Pseudo-nitzschia* se observó la presencia de una segunda diatomea. Se tomaron fotografías en MET y MEB, y de esta manera se determinó que la diatomea asociada al cultivo pertenece al género *Minidiscus* Hasle, 1973. Esta es una diatomea céntrica, una de las más pequeñas del fitoplancton marino, que se superpone a las fracciones pico y nanoplanctónicas, con diámetros de < 2 a $5 \mu\text{m}$. En la figura 44 se observan las tres fultopórtulas alrededor del centro, cada fultopórtula está reforzada con un anillo de sílice en la base. La rimopórtula se ubica en el centro, y se observa un labio que sobresale de la valva (Park *et al.*, 2017). En la tabla 26 se indica su taxonomía.



Tabla 26. Taxonomía del género *Minidiscus*.
Tomada del AlgaBase, <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=77746>.

División	Bacillariophyta
Clase	Mediophyceae
Subclase	Thalassiosirophyceidae
Orden	Thalassiosirales
Familia	Thalassiosiraceae
Género	<i>Minidiscus</i> Hasle, 1973

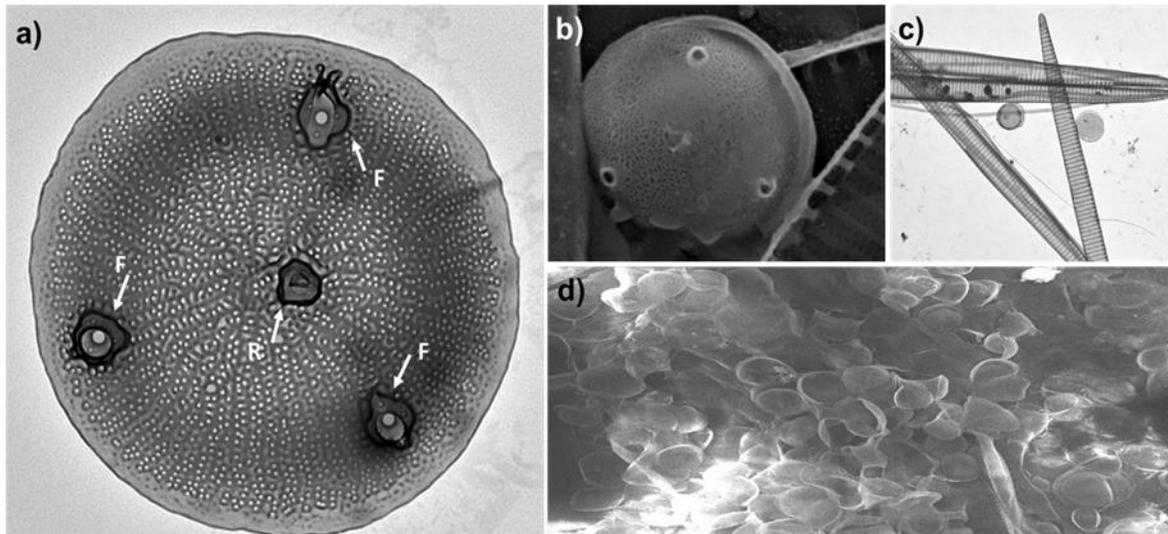


Figura 44. Diatomea del género *Minidiscus* sp. Forma y estructura de la valva a) fotografía con MET, las flechas señalan los procesos de la valva, la “R” es la rimopórtula central y la “F” las fulropórtula que rodean el centro b) fotografía con MEB c) *Minidiscus* coexistiendo con *Pseudo-nitzschia* (MET), d) colonia de *Minidiscus* (MEB).

8.10 Experimento con distintas concentraciones de nutrientes

En las curvas de crecimiento de los cultivos realizados con diferentes concentraciones de nitratos (Figura 45-48) se observa que el control (“normal” bajo condiciones de laboratorio) y el que tiene nitratos reducidos crecieron de manera similar y presentaron también una densidad celular máxima similar.

En la tabla 27 se registran los datos obtenidos del crecimiento de los diferentes tratamientos. El tratamiento con nitratos reducidos y el control tomaron más tiempo para alcanzar la fase exponencial y sus tasas de crecimiento fueron muy similares. En el tratamiento con nitratos aumentados la tasa de crecimiento fue menor y también obtuvo la menor densidad celular máxima, de $172,083 \pm 10,943$ cél mL⁻¹.

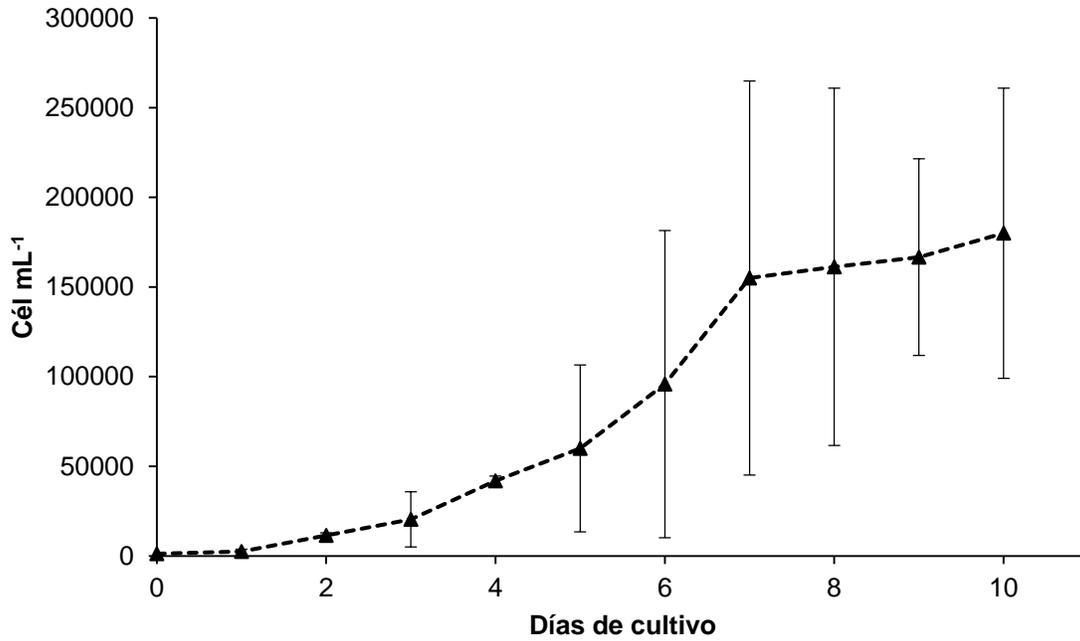


Figura 45. Curva de crecimiento del aislado 8C con la concentración de nitratos aumentada.

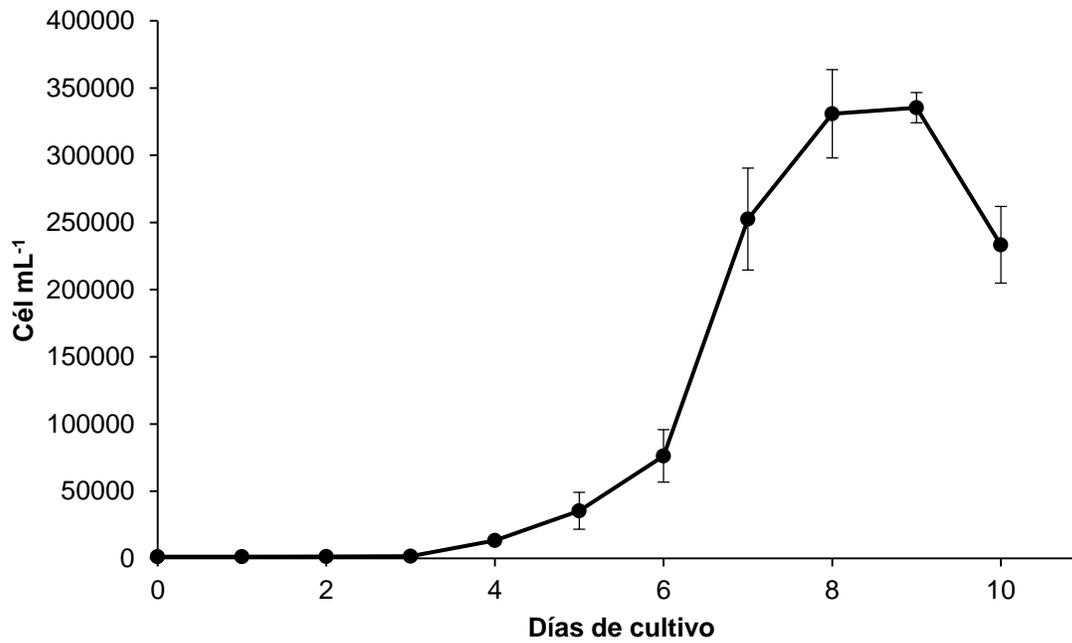


Figura 46. Curva de crecimiento del aislado 8C con la concentración de nitratos reducida.

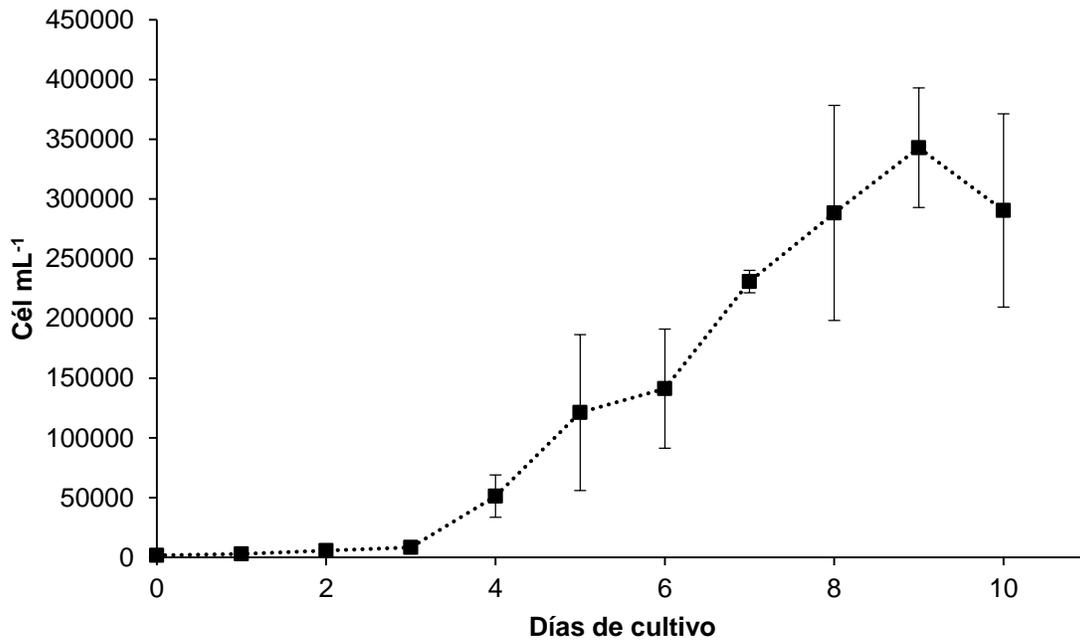


Figura 47. Curva de crecimiento del aislado 8C sin modificar el medio de cultivo (control).

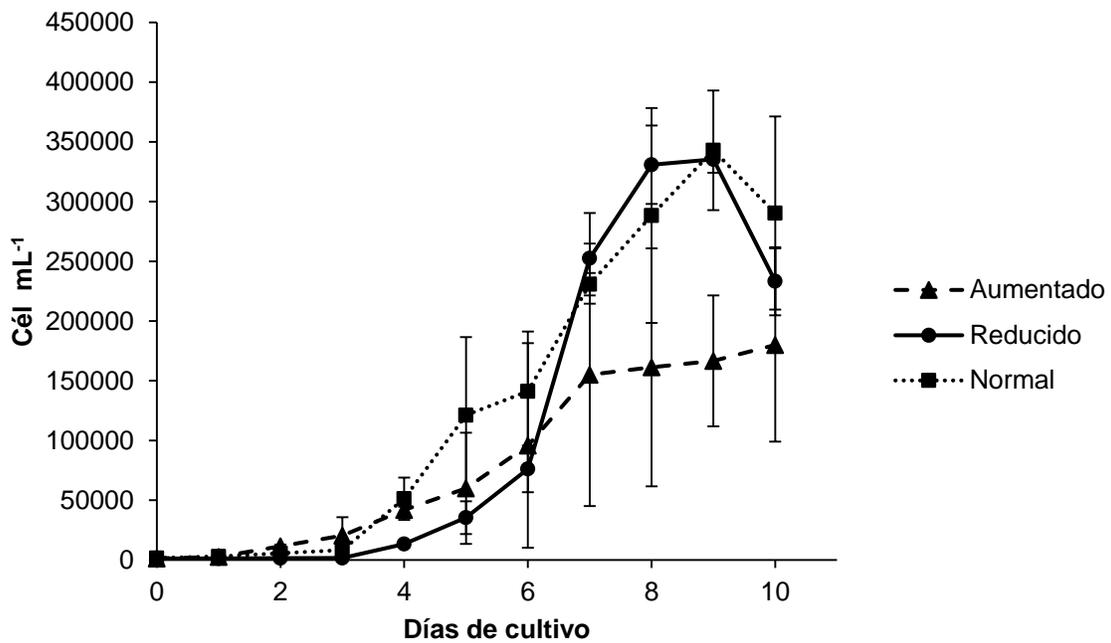


Figura 48. Curvas de crecimiento del aislado 8C con diferentes concentraciones de nitrato.



Tabla 27. Promedio y desviación estándar de los datos de crecimiento del experimento con diferentes concentraciones de nitratos.

Aislado	Inicio de la fase exponencial (día)	Fin de la fase exponencial (día)	Tasa de crecimiento (div.día ⁻¹)	Tiempo de división (día)	Densidad celular máxima (cél.mL ⁻¹)	Tiempo en alcanzar la densidad celular máxima (días)
Reducido	2.7 ±0.6	4.3 ±0.6	1.6 ± 0.9	0.5 ±0.3	340833 ±16314	8.3 ±0.6
Normal	2.7 ±0.6	4	1.6 ±0.4	0.4 ±0.1	342917 ±50068	9
Aumentado	1.7 ±0.6	3.3 ±0.6	1.3 ±0.4	0.5 ±0.1	172083 ±10943	8.7 ±1.5

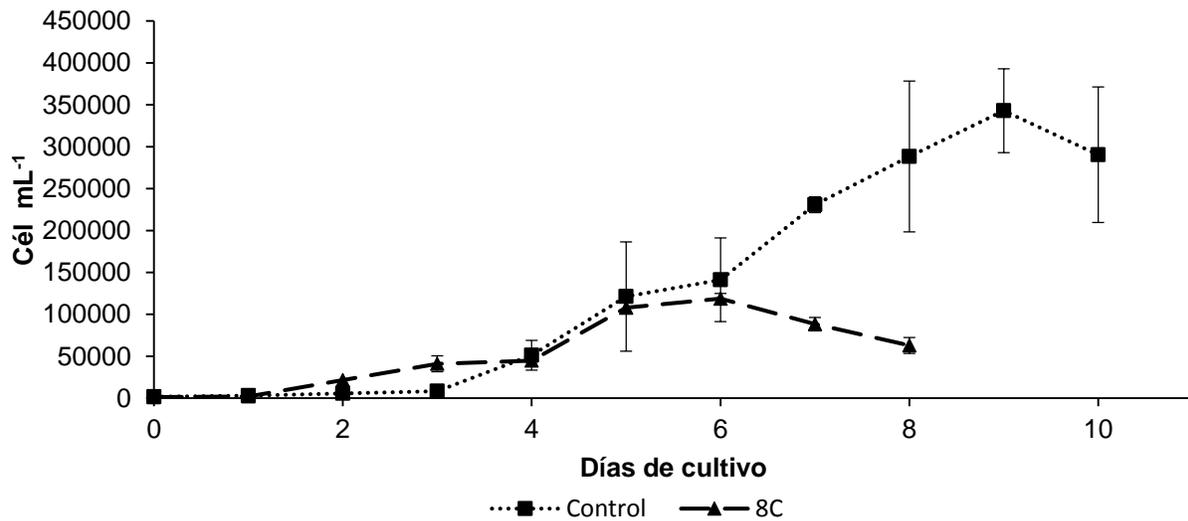


Figura 49. Curvas de crecimiento del aislado 8C y del control del experimento.

Tabla 28. Comparación del promedio y la desviación estándar de los datos de crecimiento del control y del aislado 8C.

Cepa	Inicio de la fase exponencial (día)	Fin de la fase exponencial (día)	Tasa de crecimiento (div.día ⁻¹)	Tiempo de división (día)	Densidad celular máxima (cél.mL ⁻¹)	Tiempo en alcanzar la densidad celular máxima (días)
8C	1	2	2.5 ±0.6	0.3 ±0.1	118,750 ± 6,250	6
Control	2.7 ±0.6	4	1.6 ±0.4	0.4 ±0.1	342,917 ±50,068	9



8.10.1 Análisis estadísticos

De la misma manera que en las curvas de crecimiento de los aislados, se realizó un gráfico de probabilidad normal para conocer si los datos se ajustaban a ella.

Tasas de crecimiento

Los datos se modelan adecuadamente a una curva de distribución normal. En la tabla 29 se muestran las pruebas estadísticas realizadas. Cuando el valor de significancia (p) fue mayor o igual a 0.05, no se rechaza la hipótesis nula (H_0).

Tabla 29. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la tasa de crecimiento de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.71	Distribución normal
Levene, homogenidad de varianzas	0.28	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.71	No hay diferencia entre las medias de los tratamientos
Rangos múltiples (Tukey)		No aplica

Se puede observar en la figura 50 que el aumentado tuvo la menor tasa de crecimiento 0.7 ± 0.4 div día⁻¹ con respecto a los otros dos, sin embargo en la prueba de ANDEVA se determinó que las medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). (Figura 50).

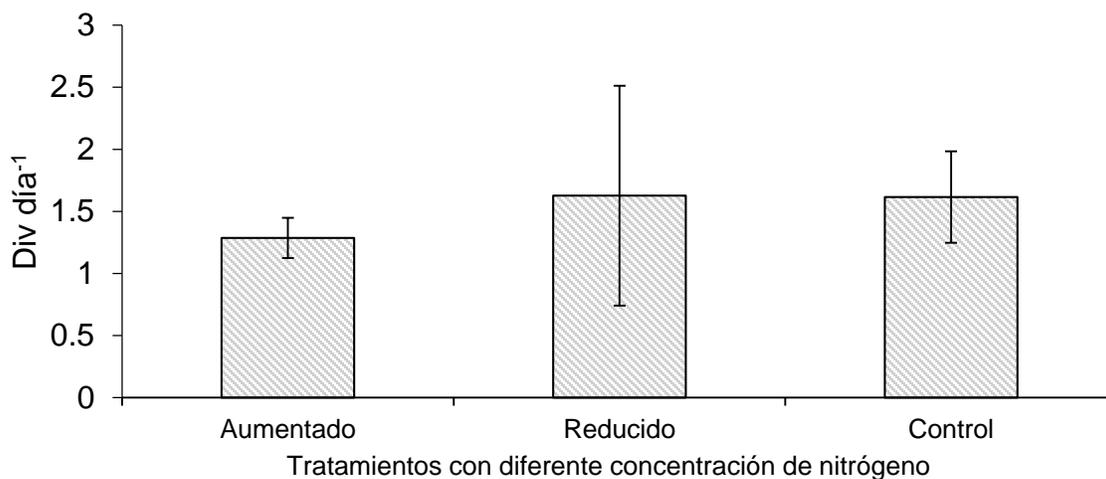


Figura 50. Tasa de crecimiento de los aislados bajo diferentes concentraciones de nitratos. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias.



Tiempo de división

Los datos se ajustan a la gráfica de normalidad. En la tabla 30 se muestra las pruebas estadísticas que se realizaron y el valor de p .

Tabla 30. Pruebas estadísticas para la comparación de medias del tiempo de división de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.94	Distribución normal
Levene, homogenidad de varianzas	0.33	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.78	No hay diferencia entre las medias de los tratamientos
Rangos múltiples (Tukey)		No aplica

El tiempo de división varió entre 0.5 ± 0.1 días para el control y 1.5 ± 1.3 días para el tratamiento con nitrógeno aumentado; en la prueba de ANDEVA no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre medias, sin embargo en la figura 51 se puede observar que el control mostró menor tiempo que el de los tratamientos.

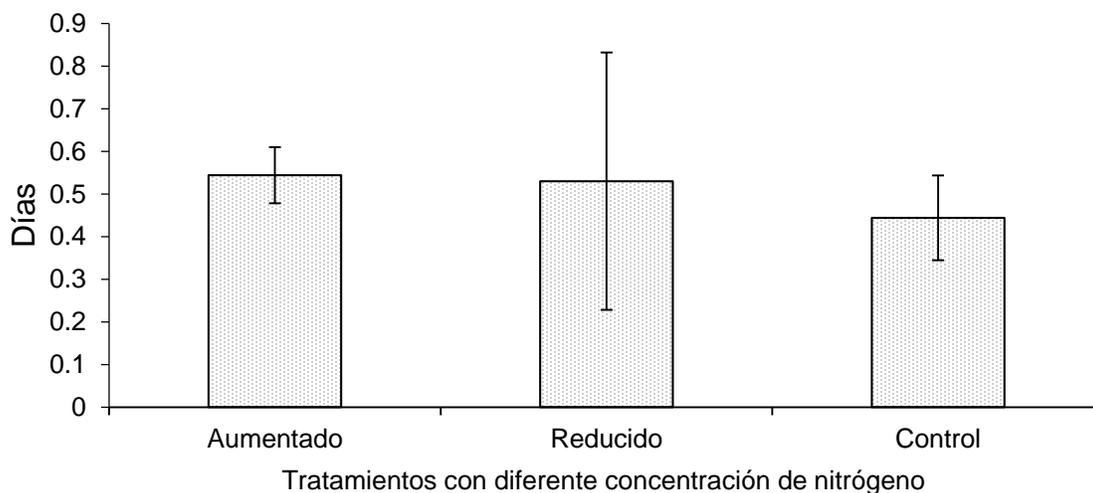


Figura 51. Tiempo de división de los aislados con diferentes concentraciones de nitratos. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las medias.



Densidad celular máxima

Los datos se ajustaron a la curva de normalidad. En la tabla 31 se muestran las pruebas estadísticas realizadas y el valor de p .

Tabla 31. Pruebas estadísticas para la comparación de medias de la densidad celular máxima de los tratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

Prueba estadística	Valor de p	Decisión
Kolgomorov-Smirnov, normalidad	0.87	Distribución normal
Levene, homogenidad de varianzas	0.55	No hay diferencias entre varianzas
ANDEVA	0.04	Hay diferencia entre las medias de los tratamientos
Rangos múltiples (Tukey)		El tratamiento con nitrógeno aumentado se diferencia del control y del tratamiento con nitrógeno reducido, que son homogéneos entre sí

La densidad celular máxima varió entre $172,083 \pm 10,943$ cél mL⁻¹ en el tratamiento con nitrógeno aumentado y $342,917 \pm 50,068$ cél mL⁻¹ para el control, logrando agrupar al reducido y al control (b) separados del aumentado (a) por presentar la densidad celular menor (Figura 52).

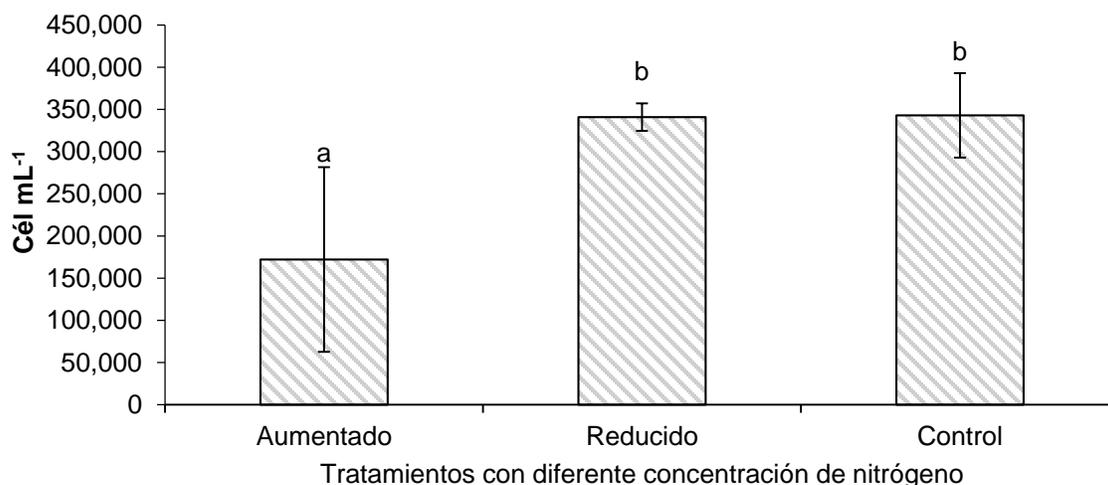


Figura 52. Densidad celular máxima de los aislados con diferentes concentraciones de nitratos. Las letras representan diferencias significativas ($p < 0.05$).



8.11 Toxicidad de los aislados

El análisis de toxinas se llevó a cabo para cada uno de los cinco aislados y para cada réplica de los tratamientos del experimento, con un total de 14 muestras analizadas, todas en fase estacionaria de crecimiento. Todos los resultados fueron negativos para AD.



9 Discusión de resultados

9.1 Factores fisicoquímicos

Las características hidrodinámicas y meteorológicas en este estudio presentaron variaciones temporales y espaciales, debido a la dinámica dentro del PNSAV, lo que genera cambios en los parámetros fisicoquímicos. Aunque los muestreos se realizaron en meses en los que se encontraban en diferentes temporadas del año, las características descritas del agua no pueden ser generalizadas como el comportamiento de toda la temporada, ya que se realizaron en un solo momento del día del mes correspondiente. Sin embargo, los datos sirven para conocer las condiciones en las que se encuentran los organismos de interés y para relacionar estos datos con registros previos y estimar los factores que los modifican en el momento de muestreo.

La temporalidad en las características del agua superficial está marcada por tres épocas del año; la temporada de nortes, la de secas y la de lluvias. El mes de octubre se identifica como un periodo de transición entre las lluvias y la época de nortes que se da a partir de este mes y hasta mayo; la época de secas es un periodo corto, coincide temporalmente con el final de la temporada de nortes y se ubica entre abril y mayo, aunque se puede identificar desde marzo, y la temporada de lluvias es entre julio y septiembre. El mes de junio es también un mes de transición pero entre la época de secas y lluvias (Wiseman *et al.*, 1999; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2013). Estas tres temporadas son constantes pero se traslapan de manera relativa, y su intensidad varía por efectos del cambio climático (Llorente *et al.*, 2008).

9.1.1 Temperatura y oxígeno disuelto

La temperatura del agua es un parámetro importante, debido a que ejerce una influencia sobre varios eventos, como la velocidad a la que se realizan los procesos y/o reacciones químicas y biológicas, determina parcialmente la concentración de los gases disueltos en el agua de mar, incluyendo el oxígeno y el dióxido de carbono, e influye en la distribución global de las especies marinas (Lalli *et al.*, 1997; Mann, 2000). La distribución de la temperatura superficial oceánica es en parte el resultado directo de la insolación, y varía estacionalmente. Los meses de septiembre del 2016



y noviembre del 2016, presentaron una temperatura similar: uno marcó el fin de la temporada de lluvias y el otro el inicio de los nortes. El mes de febrero del 2017 muestra la temperatura más baja que coincide con la temporada de nortes, en marzo del 2017 y mayo del 2017 se presentó la temporada de secas.

Se ha demostrado en cultivos que el crecimiento óptimo de *Pseudo-nitzschia* ocurre en un amplio intervalo de temperatura, desde los 5°C hasta los 30°C, incluso se ha reportado a -1.5°C (Bates, 1998), y de acuerdo con el promedio obtenido en este trabajo ($28.8 \pm 1.8^\circ\text{C}$), el sistema es apto para su crecimiento. Sin embargo, en el medio natural es más complejo de comprender, ya que diferentes especies pueden demostrar distintas correlaciones con las características ambientales, relacionadas con la región o la estación del año (Fryxell *et al.*, 1997). Por ejemplo, se ha registrado para *P. pungens* que en aguas frías (1–10°C) en el norte de China, está presente solo en invierno y primavera, mientras que en aguas cálidas (21–29°C), en el sur de China, está presente todo el año, lo que revela dos ecotipos para esta especie (Zou *et al.*, 1993).

El oxígeno disuelto es uno de los gases más importantes en la dinámica y caracterización de los sistemas acuáticos (Roldán, 1992), ya que interviene en diferentes funciones como la respiración y reacciones de óxido-reducción (Wright, 1995; Wetzel, 2001). Este gas se encuentra como componente de la atmósfera y llega al mar; al disolverse en el agua, está influenciado por la temperatura, la salinidad, la actividad biológica y los procesos de mezcla debido a la hidrodinámica del mar, como las corrientes y el oleaje (Roldán, 1992; Alvarado *et al.*, 2009). En el Golfo de México la concentración de oxígeno disuelto depende de las aguas del Mar Caribe mexicano debido a la corriente de Lazo, cuya concentración es homogénea en la capa superficial (0 a 250 m de profundidad) durante el transcurso del año, con un promedio de 3.15 mgL^{-1} , con un máximo de 4.2 mgL^{-1} . Los valores por debajo de éstos representan un peligro para la vida acuática (Caso *et al.*, 2004).

Durante este estudio los niveles de oxígeno se mantuvieron por arriba los valores ya mencionados, debido a que existe una alta tasa de actividad fotosintética. Esto también se puede comprobar por el porcentaje de saturación, ya que se presentó



un promedio de $95\% \pm 14.1$; esta unidad nos permite conocer la calidad del agua relacionada con la cantidad máxima de oxígeno a una temperatura y presión determinadas (Wetzel, 2001).

A lo largo del estudio destacaron los meses de febrero y marzo del 2017, los cuales coinciden con la temporada de nortes, y considerando que las capas superficiales están más influenciados por las condiciones meteorológicas (Ichiye, 1959), es esta temporada cuando los vientos mezclan la columna de agua, generando oleaje y por lo tanto el atrapamiento de burbujas de aire (Salas-Pérez *et al.*, 2011).

Además, existe una relación inversa con la temperatura, y ésta es un factor importante en la capacidad del oxígeno para disolverse. El incremento de la temperatura y/o salinidad reduce la cantidad de gas que se puede disolver, debido al aumento de la energía cinética de las moléculas y de la ocupación disponible de espacios iónicos (Alvarado & Aguilar, 2009), por lo que su relación es inversamente proporcional, como se puede observar en la figura 11, sección 8.2.1.

9.1.2 Salinidad y sólidos disueltos

La salinidad es una propiedad que resulta de la combinación de los diferentes iones que se encuentran disueltos en el agua oceánica, y los principales son cloruros (Cl^-), bicarbonatos (HCO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}), sodio (Na^+) y magnesio (Mg^{2+}) (Wright, 1995). Los cambios en la salinidad no tienen efecto sobre las proporciones relativas de los iones, ya que sus concentraciones cambian en la misma proporción (Millero, 2013). Sin embargo, cuando la concentración de iones aumenta, existe una mayor interacción entre ellos, aumentando también de esta manera la conductividad, que resulta del movimiento de partículas (Wright, 1995). Los sólidos totales disueltos (TDS) son una medida de la concentración total de iones en solución. Es por ello que existe una relación estrecha entre estas tres variables; salinidad, conductividad y TDS (Figura 13, sección 8.2.2). La salinidad en el agua de mar puede afectar las funciones fisiológicas de los organismos al alterar su balance osmótico, afectando su distribución y comportamiento (Lalli & Parsons, 1997; Mann, 2000).

En las aguas superficiales de los océanos abiertos, la salinidad oscila entre 33 y 37; para el Golfo de México las aguas típicamente oscilan alrededor de 34 a 36.5



(Wright, 1995; Montoya, 2012). La concentración en la salinidad depende casi por completo del equilibrio entre la evaporación y la precipitación (Wright, 1995). Durante este estudio la variación fue de 36.2 a 39.1, por arriba de lo anteriormente reportado. Los meses con mayor salinidad fueron febrero del 2017 y marzo del 2017, que es durante la temporada de secas en conjunto con la de nortes. El aumento en su concentración se debe a que existe mayor evaporación, y el oleaje provocado por los vientos ayuda a romper la tensión superficial del agua, lo que facilita la transferencia de agua a la atmósfera (Wright, 1995; Millero, 2013). En el mes de septiembre del 2016 se registró uno de los valores más altos de precipitación, con 255.9 mm para ese año (CONAGUA, 2017), por lo que se esperaba que la salinidad disminuyera, sin embargo la concentración aumentó.

Los valores de salinidad de 39 se consideran altos (>34 ups), sin embargo, es una propiedad de áreas con alta evaporación, característica que distingue a los arrecifes de coral. (Expósito-Díaz *et al.*, 2009) reportan estos valores para la zona conurbada de Veracruz - Boca del Río.

Se ha registrado en cultivos que *Pseudo-nitzschia* tiene una amplia gama de crecimiento óptimo, que va desde salinidades bajas como 6 y altas como 48, por lo que está adaptada al PNSAV. En el medio natural *P. pungens* y *P. pseudodelicatissima*, son capaces de crecer en salinidades que van desde 1 a 39.8 ups (Thessen *et al.*, 2005); *P. cuspidata* de 25 a 35 (Doan-Nhu *et al.*, 2008) y *P. americana* a 26 (Miller *et al.*, 1986).

9.1.3 pH

El pH se define como el logaritmo inverso de la concentración de iones hidrógeno (H^+) de una sustancia en un medio; expresa el grado de acidez o basicidad de una solución. Los valores de pH en el agua de mar tienen efecto directo en la disponibilidad de iones, y son afectados principalmente por los cambios en la concentración de dióxido de carbono disuelto (CO_2).

El dióxido de carbono se encuentra disuelto en iones bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}), aunque no en las mismas concentraciones (aproximadamente el 87% es bicarbonato). Cuando se encuentran en dosis equilibradas, el pH del agua



de mar tiende hacia valores alcalinos, de entre 8.1 y 8.3, aunque se pueden presentar tan bajos como 7.5. El pH afecta los procesos químicos y biológicos en el agua, y el rango preferible para los organismos acuáticos se encuentra entre 6.5 y 8.5; fuera de este rango se suele dar una disminución en la diversidad (González, 2014).

El promedio de pH durante el estudio fue de 7.9 ± 0.35 , no se observaron grandes cambios, se mantuvieron valores alcalinos y propicios para la vida en el sitio.

Se han realizado estudios autoecológicos en *P. multiseriis* con respecto al pH. Esta especie demostró ser capaz de usar tanto el CO_2 como el HCO_3^- , lo que le da una ventaja a pH bajo y alto. A pesar de la acidificación oceánica con que amenaza el cambio climático, el mayor interés es sobre el pH alto alcanzado al final de florecimientos intensos. En cultivos se ha reportado que *P. multiseriis* aumenta su contenido celular de AD hasta 70 veces al aumentar el pH de 7.9 a 8.4 (Trimborn *et al.*, 2008).

9.1.4 Nutrientes

Las actividades humanas alteran los ecosistemas de manera significativa; la composición del agua marina es afectada principalmente por los efluentes vertidos, provenientes de la industria, la agricultura y las aguas municipales, además de las descargas de los ríos. De esta manera, los efluentes favorecen la contaminación del medio marino al permitir la entrada de compuestos inorgánicos, principalmente compuestos nitrogenados y fosfatados, que son claves para la eutrofización (Nixon *et al.*, 2009). Por ese motivo se consideró evaluar nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y ortofosfatos (PO_4^{3-}), ya que son las formas iónicas más comunes en los ecosistemas acuáticos (Camargo *et al.*, 2007), y las que más aprovecha la comunidad fitoplanctónica (Wright, 1995).

Los niveles de nitritos y nitratos en aguas naturales son un indicador importante de la calidad del agua. Los nitritos se producen por la oxidación biológica del amoníaco y por la descomposición de materiales proteicos, por lo que se utilizan como indicadores de contaminación fecal reciente en aguas crudas (Cabrera *et al.*, 2003). Los nitratos en cantidades altas indican contaminación agrícola por fertilizantes;



están mayormente asociados al crecimiento de organismos autótrofos fotosintéticos, lo cual implica riesgos de desarrollo de FAN, aunque el nitrógeno en sus diferentes formas también suele ser asimilado (González, 2014). El exceso de fosfatos indica la presencia de detergentes y fertilizantes (Quintero-Rendón *et al.*, 2010).

La estimación global de la concentración de nitratos en el agua marina es de 1 a 500 μM ; la de nitritos es de 0.1 a 50 μM y la de fosfatos mayor a 0.3 μM . La diferencia entre estas estimaciones dependerá de las condiciones de cada sistema (Millero, 2013). En la zona costera de Veracruz, los valores que se han reportado de nitratos se encuentran entre 6.5 y 43.5 μM , y de fosfatos entre 4.2 y 20.0 μM (Aké-Castillo *et al.*, 2014). En ese estudio, que se realizó entre los años 2005 y 2012, se obtuvieron las concentraciones de cada nutriente y se reportó un incremento promedio en la concentración a lo largo de los años: los nitratos aumentaron, de 20.3 a 23.9 μM y los fosfatos de 8.7 - 9.5 a 12.4 μM , lo que sugiere que la zona se está eutrofizando.

Los valores obtenidos en este trabajo se encontraron por debajo de lo que se describió anteriormente, sin embargo en el mes de febrero del 2017 se obtuvieron valores altos de nitratos (26.4 μM), lo que constituyó una excepción. Esto puede deberse a las descargas de los ríos Jamapa, Antigua y Papaloapan, debido a que su pluma suele extenderse por varios kilómetros de las aguas costeras por efecto de las corrientes, y durante ese mes su pluma se orienta hacia el sur del PNSAV (Krutak, 1997), afectando a la isla Santiaguillo. Aunque la influencia de los ríos también es evidente en otros meses: en junio del 2018 se observó en Santiaguillo la presencia de lirio acuático (Com. Pers. Durán-Riveroll, 2018).

La presencia de abundancias elevadas de organismos del género *Pseudo-nitzschia* se ha atribuido a concentraciones altas de nitratos (>20 μM) (Parsons & Dortch, 2002; Marchetti *et al.*, 2004). También se ha observado que ocurre una sucesión del género respecto a la concentración de nitratos (Marchetti *et al.*, 2004). En una comunidad de *Pseudo-nitzschia* spp. en una bahía en Sudáfrica, se determinó que existía mayor tasa de absorción de nitratos cuando estos se encontraban bajos



(<0.1 μM) en el medio (Seeyave *et al.*, 2009). En la figura 15, sección 8.2.4, se observa una relación inversa con las abundancias del género y la concentración de nitratos, por lo que se sugiere una probable sucesión en el medio.

9.2 Riesgo de un sistema impactado con nutrientes de origen urbano y con taxa formadores de FAN

Los nutrientes son determinantes para el desarrollo, el mantenimiento y la expansión de los FAN, ya que son esenciales para el crecimiento celular del fitoplancton (Glibert *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2015). La mayor parte de las especies que producen FAN son excelentes competidoras bajo condiciones altamente variables de nitrógeno y fósforo en aguas costeras (Imai *et al.*, 2006). Los cambios en la dominancia de especies formadoras de FAN pueden ser atribuidos a las diferencias en su ciclo de vida y a su respuesta hacia cambios en la concentración de nutrientes (Anderson *et al.*, 2002; Glibert & Burkholder, 2011). En este trabajo se reportan al menos siete taxones diferentes que son potenciales formadoras de FAN, por lo que se considera que el PNSAV se encuentra en riesgo de ser impactado por estos eventos. Además, el estado de Veracruz se encuentra fuertemente afectado por descargas de aguas residuales. Este estado cuenta con 212 municipios, de los cuales, para el año 2014, únicamente el 50% cuenta con servicio de tratamiento de aguas residuales municipales (101 municipios) (CONAGUA, 2014; Martínez-Austria *et al.*, 2017), aunque algunas fuentes de información aseguran que este porcentaje es menor, y que alcanza apenas un 5.6%, ya que no todas las plantas de tratamiento están en operación y en buenas condiciones, y que la información oficial no es totalmente transparente y confiable (Com. Pers. Murillo, 2018). Incluso se ha evaluado la eficiencia de algunas plantas de tratamiento y, de acuerdo a las fuentes, estas son bajas, lo que propiciaría un nivel alto de contaminación en el PNSAV (Leal *et al.*, 2017).

Es necesario establecer que existe una estrecha relación entre la formación de FAN y las descargas antropogénicas, para instaurar estrategias de prevención que regulen los aportes de nutrientes al ambiente marino.



9.3 Análisis por espectrometría de infrarrojo de moluscos potencialmente tóxicos

El espectro infrarrojo de un compuesto puede dar información importante acerca de su naturaleza química, ya que permite deducir estructuras moleculares a partir de sus grupos funcionales, tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos (Smith, 1979).

Las señales de absorción que se visualizan en el espectro representan las vibraciones de los enlaces que forman la estructura química de un compuesto, por lo que resultan útiles para su identificación (Miller *et al.*, 2010; Cakmak *et al.*, 2012). La región de la huella dactilar proporciona espectros únicos de las moléculas, ya que incluso diferencias pequeñas en su estructura dan lugar a cambios significativos en las señales de absorción.

Los tres espectros de los tejidos de moluscos resultaron ser muy similares entre sí; las señales que se presentan permiten considerar que estaban contaminados con AD, ya que no existen espectros iguales para compuestos diferentes (Skoog *et al.*, 2017). Sin embargo el material de referencia (NRC-CRM-ASP) mostró una diferencia en la señal de los carbonilos, que correspondía a ésteres en lugar de los carboxilos, y la señal también se encontró en las muestras. Esta diferencia probablemente se deba a que tanto las muestras como el material de referencia pudieron tener transformaciones químicas por el tiempo de almacenamiento, y los grupos carboxilo pudieron haber sufrido esterificación. La esterificación es el resultado de una reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol.

La espectrometría en el infrarrojo tiene importantes limitaciones, como la preparación de la muestra, que en este caso, de la extracción de AD obtuvimos una mezcla de compuestos, por lo que para mayor confiabilidad en la determinación se recomienda el uso de sustancias puras (Smith, 1979). Cuando se trata de una mezcla de compuestos, lo que ocurre es una superposición de espectros individuales de todos los compuestos extraídos, ya que no solo se detecta una molécula, sino que se observa la composición química de toda la mezcla, por lo que su interpretación es complicada (Cakmak *et al.*, 2012). Por ello, es recomendable la



comparación de los espectros con el compuesto puro de AD y corroborar la información obtenida por otras técnicas (Barraza-Garza *et al.*, 2013).

Cuando ocurrió el evento de envenenamiento en la Isla Prince Edward en 1987, se realizó un esfuerzo de varios grupos de investigación para conocer de manera confiable al agente causante. Primero se optó por aislar la toxina de los moluscos contaminados mediante diversas técnicas de separación como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para posteriormente caracterizar su estructura por varias técnicas espectroscópicas y espectrométricas, entre las que se encontraban la detección por luz ultravioleta (UV), espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN) y se incluía al infrarrojo; de esta manera, se obtuvo el primer espectro en infrarrojo del AD (Wright *et al.*, 1989). Esta técnica también se utilizó para detectar isómeros, pero siempre a partir del compuesto puro (Wright *et al.*, 1990).

Desde entonces, se han obtenido y comercializado estándares y materiales de referencia, y se perfeccionaron las técnicas de extracción. La cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas (LC/MS) se ha convertido en una de las principales tecnologías para la detección de biotoxinas marinas debido a su alta sensibilidad y especificidad (Goto *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002).

9.4 Identificación morfológica de los aislados en cultivo

Con los datos morfométricos y las fotografías en ME únicamente se logró determinar que los aislados pertenecían al “complejo americana”, el cual está confirmado por tres especies, y las tres se han reportado en el Golfo de México: a) *P. americana*, que puede presentarse en colonias escalonadas cortas o como células individuales; se reportó junto con otras especies, en las costas de Louisiana en los Estados Unidos de América (EUA), y en este estudio se evidencia por primera vez al género como un posible vector de AD en el Golfo de México, aunque esta especie no ha sido reportada como tóxica (Del Rio *et al.*, 2010); b) *P. lineata*, que se ha registrado en las costas de Florida en los EUA, aunque no se ha comprobado su toxicidad (Lundholm *et al.*, 2002); y c) *P. brasiliensis*, se ha registrado en las costas de Veracruz



en el PNSAV y se ha reportado como productora de toxinas en el Mar Mediterráneo (Sahraoui *et al.*, 2011).

P. americana y *P. linea* se han observado como epífitas en otras diatomeas, lo que podría indicar diferencias fisiológicas con *P. brasiliiana*, que se ha reportado como tóxica y de vida libre (Lundholm *et al.*, 2002).

Por medio de análisis filogenéticos se ha determinado que estas tres especies son taxones hermanos, con un origen monofilético, por lo que están fuertemente relacionadas (Lundholm *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado, son especies pseudo-crípticas, que pertenecen a un mismo complejo; presentan caracteres morfológicos muy específicos que las diferencian, sin embargo fueron estos caracteres los que no se lograron observar por ME, por lo que no se pudo determinar la especie con este método.

En general, la determinación de especies del género *Pseudo-nitzschia* ocasiona problemas para los taxónomos debido a que las características morfológicas son muy finas y a que éstas se comparten entre diferentes especies, por lo que pueden ser indistinguibles entre sí. Además, tienden a presentar deformaciones, tanto en campo como después de periodos cortos en cultivo (Villac, 1996; Sommer, 1998). Esta característica representa un problema para diferenciar entre especies toxigénicas y no toxigénicas, e incluso ambas pueden coexistir en el medio (Teng *et al.*, 2013). En algunos casos de FAN se presenta una mezcla de cepas genéticamente similares que pertenecen a diferentes especies e incluso pueden presentarse varios complejos (Pettersson & Pozdnyakov, 2012; Rodríguez-Gómez, 2013).

Para conocer mejor sobre su ecología, fisiología, toxicidad, etcétera, es fundamental esclarecer su especie, y para ello se utilizan métodos de microscopía muy refinados, como la microscopía electrónica. Esta técnica ha tenido un papel importante en el diagnóstico taxonómico para la clasificación de grupos y subgrupos basados en su morfología (Teng *et al.*, 2013). Las características de *Pseudo-nitzschia* han sido bien documentadas (Hasle *et al.*, 1996; Lundholm, Hasle, *et al.*, 2002), sin embargo su identificación hasta especie sigue siendo un desafío, particularmente para distinguir



entre especies crípticas y pseudo-crípticas (Lundholm *et al.*, 2006), por lo que se hace necesario combinar caracteres morfológicos y caracteres moleculares. Además, se recomienda añadir estudios de apareamiento, y el análisis de la estructura secundaria del ITS2 (Isabel *et al.*, 2009). Por lo anterior, su estudio e identificación representan un desafío para la gestión de FAN (Anderson, 2009). En México, la COFEPRIS, a través de las Autoridades Sanitarias Estatales, ha diseñado programas de monitoreo permanente para realizar muestreos y análisis de fitoplancton potencialmente tóxico. Este programa contiene el lineamiento de trabajo, en el cual se describen de manera “preventiva” análisis cuantitativos y cualitativos, a través de conteos expresados en abundancias relativas, además de la identificación de organismos al nivel taxonómico. Estos resultados sirven como criterio de alerta para determinar si se implementa una veda sanitaria (Marinas, 2005). Sin embargo, debido a que estos análisis se realizan con microscopía de luz, el procedimiento que se sigue para su monitoreo resulta limitado en la correcta identificación de especies, y se pueden dar confusiones sobre la especie que se encuentra y su potencial toxicogenicidad.

En el PNSAV se han identificado por lo menos siete especies tóxicas de *Pseudonitzschia*, lo cual señala una problemática ambiental y un riesgo potencial a la salud (Parsons *et al.*, 2012b), por lo que es preciso implementar mejores técnicas de muestreo para afrontar los desafíos que presenta la identificación de especies, ya que es necesario que se confirme el potencial tóxico de las especies a través estudios toxicológicos.

9.5 Identificación molecular de los aislados en cultivo

Debido a la dificultad que presentó su identificación con base a sus caracteres morfológicos, se decidió realizar análisis moleculares para poder determinar con seguridad las especies de los aislados mantenidos en cultivo. Los análisis arrojaron como resultado su pertenencia a la especie *P. brasiliiana*.

La especie *P. brasiliiana* Lundholm, Hasle & G.A. Fryxell, fue registrada como una nueva especie en 2002 (Lundholm *et al.*, 2002), pero fue reportada por primera vez en Sepetiba, una Bahía en Brasil en 1998 (Villac *et al.*, 2005), como una especie



oportunista. Se le ha encontrado en aguas costeras de la zona semitropical, como el Golfo de Panamá, el Golfo de México, el Golfo de California, Vietnam, Indonesia, Tailandia, Corea del Sur, China y España (Hasle *et al.*, 2005; Sonia *et al.*, 2009; Del Rio *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Sahraoui *et al.*, 2011).

Las regiones ITS son altamente variables y conservadas; se les considera como marcadores universales debido a la amplia gama de reinos no animales para los que pueden amplificar; se han utilizado para identificar especies de hongos (U'Ren *et al.*, 2009), de plantas de los géneros *Atractylodes* (Shiba *et al.*, 2006) y *Bupleurum* (Yang *et al.*, 2007), entre otras; y también para identificar dinoflagelados (Wayne *et al.*, 2007) y diatomeas (Moniz & Kaczmarek, 2010). Por este motivo, se requirió elaborar cebadores específicos con regiones más pequeñas que se encontraran solo dentro del complejo de *P. americana*, ya que los parámetros utilizados para la identificación morfológica determinaron que los aislados en cultivo pertenecían a este complejo.

Anteriormente se han analizado diferentes regiones del genoma para evaluar la filogenia e identificación de *Pseudo-nitzschia*: la subunidad grande del gen ribosomal (LSU), las regiones espaciadoras (ITS1 e ITS2), el gen 5.8S del ADN ribosomal y la subunidad grande de RuBisCo (Daugbjerg, *et al.*, 2002; Lundholm, Hasle, *et al.*, 2002; Orsini *et al.*, 2004b; Lundholm *et al.*, 2006; Amato *et al.*, 2007). Se ha determinado que *P. brasiliensis* comprende un clado monofilético, como se observa en la figura 33, sección 8.6.1, junto con *P. americana* como grupo hermano, por lo que se decidió enraizar el árbol con esta última especie (Lundholm *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2008).

Las regiones ITS han sido las más utilizadas, ya que proporcionan una separación de especies estrechamente relacionadas (Mann & Evans, 2007; Moniz & Kaczmarek, 2010) como son las especies crípticas y pseudo-crípticas (Amato *et al.*, 2007; Kaczmarek *et al.*, 2008). Es por ello que se logró determinar la especie con una alta identidad y separar a *P. brasiliensis* de *P. americana*. Esta región tiene un tamaño de entre 580 y 750 pb aproximadamente, por lo que la amplificación que



se obtuvo fue un fragmento relativamente pequeño (265 pb), sin embargo se logró agrupar todos los aislados con el clado de *P. brasiliiana*.

Existen trabajos sobre *P. brasiliiana* con filogenias que utilizan la región ITS que tratan de explicar si existe alguna diferencia genética entre poblaciones que se encuentran separadas geográficamente. Wang y colaboradores encontraron que las cepas originarias de Asia están separadas de las Europeas, aunque todas pertenecen al mismo clado (Lim *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). En el árbol elaborado en este trabajo, todos los aislados del PNSAV se agrupan en un clado diferente a todas las demás secuencias del GenBank, por lo que probablemente muestren un patrón de separación regional, sin embargo es necesario el estudio detallado de la región ITS1–5.8S–ITS2 que permita conocer el grado de diferenciación genética entre otras poblaciones.

9.6 Deformaciones en las frústulas de las células

La reproducción vegetativa fue la que dominó mayormente en los cultivos; ésta condujo a una reducción progresiva en el tamaño de las frústulas, debido a que las diatomeas tienen una frústula muy rígida por su naturaleza silíceo lo que impide la expansión de la célula (Chepurnov *et al.*, 2005).

Se sabe que comúnmente el género *Pseudo-nitzschia* es heterotálico, por lo que se creía que eran incapaces de reproducirse sexualmente en cultivos monoclonales, ya que esto ocurría únicamente si las células eran de diferentes cepas compatibles, por lo que solo se daba la disminución de su tamaño hasta convertirse en inviables y morían (Chepurnov *et al.*, 2005). Sin embargo, (Sonia *et al.*, 2009) experimentó con cultivos monoclonales y observó la formación de auxosporas en *P. brasiliiana*, por lo que propuso que esta especie suele ser homotálica, de manera que las células son monoicas (el mismo individuo produce estructuras masculinas y femeninas) y se pueden autofecundar. Las células alargadas observadas en este estudio probablemente sean el resultado de este tipo de reproducción dentro de los cultivos, ya que ésta es necesaria para poder obtener células iniciales largas con nuevas frústulas (Amato *et al.*, 2007; Garcés *et al.*, 2001). Aunque no es la primera



vez que se observa el alargamiento de las células en este tipo de cultivos, no se habían reportado deformaciones en las células que se reproducen de esta manera. Las deformaciones en las nuevas frústulas quizá se deban a que en los eventos sexuales se da un intercambio de material genético, y al ser de la misma cepa hay menor variación y por ende mayor ocurrencia de mutaciones (Garcés *et al.*, 2001). Esta recombinación, afecta la estructura genotípica, con implicaciones fenotípicas y probablemente también fisiológicas.

9.7 Curvas de crecimiento.

Se han realizado diferentes estudios con cultivos de *Pseudo-nitzschia* enfocados en comprender el vínculo entre la producción de toxina y las condiciones ambientales (p. ej., concentraciones de micro y macro nutrientes, temperatura e irradiancia, salinidad, pH, etc.). De manera general, se ha observado que la toxina se produce una vez que la división celular ha cesado o está ausente (Bates *et al.*, 1996), al inicio de la fase exponencial (Garrison *et al.*, 1992; Cusack *et al.*, 2002) y principalmente cuando el cultivo se encuentra limitado, en la fase estacionaria temprana o tardía (Marchetti *et al.*, 2008; Thessen *et al.*, 2009). Por ello se decidió evaluar la concentración de AD cuando los cultivos se encontraban en la fase estacionaria, tanto para los aislados como en el experimento, aunque todos los resultados fueron negativos. La especie *P. brasiliiana* ha sido controversial con respecto a la producción de toxina, ya que existen reportes de aislados que no produjeron AD en las costas de Brasil (Lundholm *et al.*, 2002) y Malasia (Lim *et al.*, 2010) y otros han confirmado la presencia de la toxina en aislamientos de la bahía de Bizerta en Túnez (Sahraoui *et al.*, 2011; Sahraoui *et al.*, 2012).

En el crecimiento de todos los aislados se lograron identificar cinco fases: la fase de adaptación, en donde la tasa de crecimiento es mínima; la fase exponencial, donde la velocidad de crecimiento es máxima y la concentración celular va aumentando al doble; la fase de desaceleración, donde la tasa de división celular disminuye, aunque es en la que se alcanzaron los valores más altos de densidad, en vista del alto número de células que se siguen dividiendo; la fase estacionaria, donde la tasa de natalidad y de mortalidad se equilibran; y la fase de muerte, donde la tasa de



mortalidad es mayor a la de natalidad y las densidades disminuyen (Vega-Arredondo *et al.*, 2017). De esta manera la tasa de crecimiento y el tiempo de división celular se calcularon durante la fase exponencial, y la densidad máxima terminada la fase de desaceleración.

El tiempo que tardó el crecimiento hasta la fase de muerte de todos los aislados fue de 7 a 10 días, que corresponde a lo reportado por otros autores (7 a 18 días) (Howard *et al.*, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2009; Radan *et al.*, 2018). Las tasas de crecimiento en este trabajo fueron relativamente altas (entre 1.0 ± 0.7 y 2.5 ± 0.6 div día⁻¹), debido a que se han reportado tasas que varían de 0.49 ± 0.063 a 1.05 ± 0.033 div día⁻¹ (Trainer *et al.*, 2012). Aunque el tiempo de la fase exponencial de todos los aislados fue muy corto (entre 1 y 2 días), otros autores han reportado una duración de 4 a 7 días. Las densidades máximas se encuentran dentro de lo reportado en estudios anteriores (entre 7×10^4 y 1.97×10^6 cél mL⁻¹) (Thessen *et al.*, 2009; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011; Radan & Cochlan, 2018). Los análisis estadísticos revelaron que no existen diferencias significativas entre los aislados, por lo que todos ellos se comportaron de manera similar a pesar de haber sido obtenidos en distintos lugares y tiempos. La densidad máxima fue una excepción en los aislados 5A y 5E, que obtuvieron las más bajas.

9.8 Sobre la diatomea céntrica del género *Minidiscus*

En la sección 8.8, se muestran las curvas de crecimiento; aquí se observa que los aislados 5A y 5E presentaron menores tasas de crecimiento, mayor tiempo de división y menor densidad celular con respecto al resto. Aparentemente, para estos aislados fue más complicada la adaptación al medio de cultivo, probablemente debido a la competencia con las diatomeas del género *Minidiscus* presentes en los cultivos. Una vez terminado el cálculo de las curvas de crecimiento, los cultivos se mantuvieron por siete meses, y fue entonces cuando se observó que ésta desplazó por completo a las células de *Pseudo-nitzschia*.

Las diatomeas del género *Minidiscus*, se encuentran entre los primeros 20 géneros de diatomeas más abundantes, y a pesar de que nunca se ha descrito como una de las principales especies causantes de FAN, podría ser un contribuyente importante



(Malviya *et al.*, 2016; Leblanc *et al.*, 2018). Los miembros de este género, sin embargo, suelen pasar desapercibidos debido a que los métodos tradicionales de recolecta e identificación han impedido una observación adecuada. No obstante, los FAN de estas diatomeas pueden ser más frecuentes de lo que se aprecia actualmente, tanto en mar abierto como en áreas costeras. Los FAN de *Minidiscus* spp. han sido reportados en la Bahía de Monterey, California, que es una región costera caracterizada por fuertes eventos de surgencia (Buck *et al.*, 2008). También se han reportado en otras áreas eutróficas del Océano Pacífico Subártico (Clemons *et al.*, 1984), en una cuenca de Noruega (Daniels *et al.*, 2015) y en la Península Antártica (Kang *et al.*, 2003; Annett *et al.*, 2010).

Esta diatomea puede ejercer un control específico sobre el desarrollo de células más grandes, abriendo un nicho ecológico para que las diatomeas pequeñas tengan éxito (Bork *et al.*, 2015); esto puede deberse a que presentan mayor superficie de contacto en un menor volumen, lo cual las hace más eficientes en la incorporación de nutrientes. Actualmente no existen trabajos que demuestren la existencia de una relación simbiótica entre *Pseudo-nitzschia* y *Minidiscus*, pero se ha reportado que en presencia de este último no se presenta *Pseudo-nitzschia*, y viceversa (Kang *et al.*, 2003; Leblanc *et al.*, 2018).

9.9 Experimento con diferentes concentraciones de nitratos

Mucho de lo que se sabe sobre la fisiología del plancton proviene de experimentos con cultivos en laboratorio. Esta área del conocimiento se denomina autoecología, y es la única manera para comprender ciertos procesos de los microorganismos, como los ciclos de vida y las condiciones ambientales a las que pueden sobrevivir. Para *Pseudo-nitzschia* se han realizado estudios que comparan diferentes fuentes de nitrógeno, entre ellas de nitratos, y se han enfocado en especies tóxicas; *P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. australis*, *P. cuspidata* (Bates *et al.*, 1989; Garrison *et al.*, 1992; Lundholm *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 2007; Thessen *et al.*, 2009). Para *P. brasiliensis* se han realizado cultivos en donde la producción de AD se propicia cuando hay limitación de silicatos o fosfatos durante la fase estacionaria (Bates, 1998; Trainer *et al.*, 2008; Trainer *et al.*, 2012), sin embargo, en



el campo su toxicidad se ha asociado positivamente con una concentración alta de nitratos y silicatos, así como con altas salinidades (Villac *et al.*, 2005; Sahraoui *et al.*, 2011; Sahraoui *et al.*, 2012).

Existe la idea generalizada de que el nitrógeno es indispensable para esta diatomea, ya que es fundamental para la síntesis de aminoácidos, y por lo tanto cumple una función en el crecimiento y la división celular. Como el AD es un aminoácido, requiere también de este nutriente para ser sintetizado (Lelong *et al.*, 2012). En cultivos se ha observado que un pre-requisito para el crecimiento celular y la producción de la toxina es que existan concentraciones no limitantes de nitrógeno (Bates, 1998; Kudela, Cochlan, *et al.*, 2002; Kudela, Roberts, *et al.*, 2002). Sin embargo, los datos que se han obtenido no son uniformes entre las diferentes especies del género, por lo que no se pueden extrapolar. Se ha argumentado que existe una amplia diferencia fisiológica entre especies, incluso entre aislados de la misma especie y del mismo lugar (Thessen *et al.*, 2009). Por este motivo, los factores ambientales y las condiciones fisiológicas que promueven la producción de AD aún no se conocen en su totalidad (Kudela *et al.*, 2002; Lundholm *et al.*, 2004).

Al comparar el aislado de la cual se partió para realizar el experimento (8C) con el cultivo control del mismo aislado (Figura 49, sección 8.10), aunque ambos se mantuvieron a las mismas condiciones, se observaron diferencias; en el aislado original la tasa de crecimiento fue mayor, el control tardó más en iniciar la fase exponencial, pero una vez establecida la fase de desaceleración, se extendió por más días haciendo que su densidad celular máxima fuera mayor que la del cultivo original. Esto puede deberse a que el inicio del experimento fue un mes después de terminada la curva de crecimiento del aislado y es conocido que las propiedades fisiológicas de *Pseudo-nitzschia* cambian con la edad del cultivo (Bates *et al.*, 1999).

Las concentraciones de nitratos utilizadas en este experimento, aún con el nitrógeno reducido (entre 98.9 y 3,956.4 μM) fueron altas debido a que las reportadas se encuentran entre 55 y 500 μM (Howard *et al.*, 2007; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011).



Entre los dos tratamientos y el control, de acuerdo con los análisis estadísticos, no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento ni en el tiempo de división durante la fase exponencial. La diferencia en la concentración de nitratos no influyó en la reproducción en esta fase, por lo que se sugiere que *Pseudo-nitzschia* puede aprovechar múltiples regímenes en un entorno cambiante (Thessen *et al.*, 2009). Sin embargo ninguno de los tratamientos influyó para que se desencadenara la producción de AD.

De cualquier manera, *P. brasiliiana* ha sido reportada como productora de toxinas en Túnez (Sahraoui *et al.*, 2011), y en el PNSAV se ha documentado su presencia junto con otras seis especies toxigénicas: *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* y *P. cf. subcurvata*, aunque no se ha llevado a cabo ningún análisis toxicológico que compruebe la producción del AD. Si bien no se han realizado estudios para todas estas especies con respecto a su preferencia nutricional, sí se sabe que *P. cuspidata* y *P. brasiliiana* se acumulan en el ambiente cuando existe una razón alta de silicatos y nitratos (Trainer *et al.*, 2009b; Sahraoui *et al.*, 2012), por lo que el aumento en la concentración de nutrientes podría representar un riesgo potencial para este sistema. También se ha visto que algunas especies son capaces de usar otras fuentes de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas (nitritos, nitratos, urea y amonio) (Howard *et al.*, 2007; Cochlan *et al.*, 2008).

En el tratamiento con nitratos aumentados, una vez terminada la fase exponencial, se observó una mayor variabilidad entre los aislados. Esto se debió a que una de ellos no se logró adaptar al tratamiento. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas en la densidad máxima entre los tratamientos, debido a que éste presentó la menor biomasa.

Aunque en este experimento la concentración de nitratos fue mucho mayor a los otros dos tratamientos, no se observaron pruebas de una mayor incorporación de este nutriente en las células, ya que no existe evidencia de que haya influido en su reproducción o en la producción de toxina, por lo que es posible que el nitrógeno fuera aprovechado por otros organismos, como bacterias desnitrificantes, ya que



existen antecedentes que indican que las bacterias y el fitoplancton en ocasiones llegan a competir por los nutrientes inorgánicos en aguas marinas (Abarzúa *et al.*, 1995; Thessen *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que las bacterias pueden tener un efecto diferencial entre los aislados y durante toda la vida de un cultivo (Stewart, 2008), aunque en el presente estudio no se analizó la población bacteriana de los cultivos. Lo anterior incluso se puede comparar con lo sucedido con los aislados 5A y 5E, en donde la diatomea *Minidiscus* pudo haber influido en la densidad máxima de *Pseudo-nitzchia* al competir con ella por nutrientes.



10 Conclusiones y sugerencias

Aké y colaboradores (2014), lograron evidenciar un incremento en la concentración de nutrientes dentro del PNSAV, y lo atribuyeron a factores antropogénicos, como la eutrofización por la descarga de aguas residuales. Ésta podría ser la causa por la que se presentaron concentraciones elevadas de nitratos en el mes de febrero de 2017, debido la descarga de los ríos, aunque también puede deberse a algún evento de surgencia.

Por lo anterior el PNSAV se encuentra en riesgo de ser impactado por FAN. Es posible que suceda una sucesión de especies hacia aquellas que pueden aprovechar los nitratos para aumentar su densidad, con al menos siete taxones que fueron identificados en este trabajo y entre ellas a *Pseudo-nitzschia*.

El aumento en la densidad de organismos del género *Pseudo-nitzschia* se relaciona con el aumento en la concentración de nutrientes, y esto se ha observado tanto en cultivos (estudios autoecológicos) como en el medio natural, sin embargo, los factores que desencadenan los eventos de FAN, son múltiples. Ejemplo de éstos, son las interacciones con otras especies, como se observó con las diatomeas del género *Minidiscus* en dos de los aislados, la cual influyó en el crecimiento poblacional de *P. brasiliana*.

La producción de AD y el incremento en la densidad de *Pseudo-nitzschia*, relacionados con la concentración de nitratos, depende de cada especie y de la región en la que habita, por lo que a pesar de las relaciones que se han encontrado con especies, el estudio de estos microorganismos debe ser característico de cada zona. Por ello es necesario sumar estudios de toxicología dentro del PNSAV que confirmen que las siete especies reportadas como potencialmente tóxicas en realidad estén produciendo AD, y además conocer en qué condiciones lo están haciendo. Sin embargo, debido a diversidad de fitoplancton formador de FAN en este sistema y registrada su relación con la concentración de nutrientes, es importante también revisar, y de ser necesario, hacer más eficientes las plantas de tratamiento de aguas residuales, como una medida de prevención.



Aunque las condiciones de cultivo de fitoplancton en el laboratorio no se pueden considerar idénticas a aquellas encontradas en el medio natural, estos análisis bajo condiciones controladas facilitan su estudio y contribuyen a esclarecer dudas sobre estos organismos, como su ciclo de vida, sus requerimientos de nutrientes, temperatura y luz, además de que permiten producir la cantidad celular suficiente para realizar su determinación taxonómica por medios morfológicos y moleculares con mayor facilidad.

Las herramientas moleculares y la microscopía electrónica son métodos que se complementan, por lo que se deben utilizar en conjunto, aunque las herramientas moleculares ayudan reducir errores en la identificación de las especies que representan mayor dificultad, como sucede con las especies crípticas y pseudo-crípticas. Al utilizar ambos métodos la determinación taxonómica es más precisa e inequívoca, lo cual es de extrema importancia para conocer sobre la ecología, fisiología y toxicidad de las especies en particular. Además, tratándose de organismos formadores de FAN, la identificación incorrecta puede conducir a conclusiones incorrectas que podrían afectar las actividades económicas y poner en riesgo a la población. Por estas razones se considera necesario, dentro del PNSAV, la implementación de mejores programas de monitoreo y la dirección de más investigaciones hacia el uso de las nuevas tecnologías, con métodos de detección toxicológica y taxonómica accesibles y confiables. También se considera necesario difundir la información para el cuidado y protección del PNSAV y realizar actividades de divulgación acerca de los eventos de FAN en México.



11 Literatura citada

- Abarzúa, M., Basualto, S., & Urrutia, H. (1995). Relación entre la abundancia y biomasa de fitoplancton y bacterioplancton heterotrófico en aguas superficiales del Golfo de Arauco, Chile. *Investigaciones marinas*, 23, 67-74.
- Aguilera, A. J. (2012). *Caracterización estructural y dinámica del paisaje en lagunas arrecifales: estudio de caso Sistema Arrecifal Veracruzano*. (Maestro en Ecología y Pesquerías), Universidad Veracruzana, Boca del Río, Veracruz. Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/41392>
- Ajani, P. A., Verma, A., Lassudrie, M., Doblin, M. A., & Murray, S. A. (2018). A new diatom species *P. hallegraeffii* sp. nov. belonging to the toxic genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from the East Australian Current. *PloS one*, 13(4), e0195622.
- Akallal, R., Mouradi, A., Givernaud, T., & Billard, C. (2000). *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* bloom in Atlantic Moroccan waters 1999. *Harmful Algae News*, 20, 14.
- Aké-Castillo, J., Okolodkov, Y.B., Steidinge, K.A., González-González, J., & Pérez-España, H. (2010). *Karenia* sp. "Mexican hat" first bloom in Mexico. *Harmful Algae News*, 41(1).
- Aké-Castillo, J. A. (2011). Temporal dynamics of *Trichodesmium erythraeum* (Cyanophyta) in the National Park "Sistema Arrecifal Veracruzano" in the Gulf of Mexico. *J Environ Biol*, 32(4), 395.
- Aké-Castillo, J. A., Okolodkov, Y. B., Rodríguez-Gómez, C. F., & Campos-Bautista, G. (2014). Florecimientos Algales Nocivos en Veracruz: especies y posibles causas (2002-2012). In A. Botello, V. O. Rendón, A. Benítez, & G. G. Bouchot (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (pp. 133-146): UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida.
- Allen, R. (2016). *The sound of the birds Partners in suspense*: Manchester University Press.
- Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., Ferreyra, G. A., Schloss, I. R., Esteves, J. L., & Papparazzo, F. E. (2007). The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in continental shelf waters of Argentina (Southwestern Atlantic Ocean, 38–55 S). *Harmful Algae*, 6(1), 93-103.
- Altamirano, R. C., & Sierra-Beltrán, A. P. (2008). Biotoxins from freshwater and marine harmful algal blooms occurring in México. *Toxin Reviews*, 27(1), 27-77.
- Alvarado, J. J., & Aguilar, J. F. (2009). Batimetría, salinidad, temperatura y oxígeno disuelto en aguas del Parque Nacional Marino Ballena, Pacífico, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 57, 19-29.
- Alvarez-Falconí, P. P. (2009). Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4), 505-516.
- Amato, A., Kooistra, W. H., Ghiron, J. H. L., Mann, D. G., Pröschold, T., & Montresor, M. (2007). Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, 158(2), 193-207.
- Amato, A., & Montresor, M. (2008). Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov.(Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic



- species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia*, 47(5), 487-497.
- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D., & Montresor, M. (2005). Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) *Phycology*, 41(3), 542-556.
- Andersen, P., Aune, P. T., & Baden, D. (2004). Report of the Joint FAO/IOC/WHO Ad Hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway: FAO/IOC/WHO.
- Andersen, R. A., & Kawachi, M. (2005). Microalgae Isolation Techniques. *Algal culturing techniques*, 83.
- Anderson, C. R., Brzezinski, M. A., Washburn, L., & Kudela, R. (2006). Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Marine Ecology Progress Series*, 327, 119-133.
- Anderson, D. (1995). Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. *Harmful Algal Blooms*.
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & coastal management*, 52(7), 342-347.
- Anderson, D. M., Andersen, P., Bricelj, V. M., Cullen, J. J., & Rensel, J. J. (2001). *Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters*: Unesco.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25(4), 704-726.
- Annett, A. L., Carson, D. S., Crosta, X., Clarke, A., & Ganeshram, R. S. (2010). Seasonal progression of diatom assemblages in surface waters of Ryder Bay, Antarctica. *Polar biology*, 33(1), 13-29.
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal/Editado por: Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina.
- Badylak, S., Phlips, E., & Kelley, K. (2006). *Pseudo-nitzschia calliantha* (Bacillariophyceae) from the Indian River Lagoon, Florida. *Diatom Research*, 21(2), 263-267.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E., & Hernández-Sandoval, F. E. (2011). El estado actual del estudio de Florecimientos Algales Nocivos en México. *Hidrobiológica*, 21(3), 381-413.
- Bargu, S., Silver, M. W., Ohman, M. D., Benitez-Nelson, C. R., & Garrison, D. L. (2012). Mystery behind Hitchcock's birds. *Nature Geoscience*, 5(1), 2.
- Barraza-Garza, G., de la Rosa, L. A., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), 125-148.
- Bates, S., Bird, C. J., Freitas, A. d., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L. A., . . . Pocklington, R. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary



- source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can J Fish Aquat Sci*, 46(7), 1203-1215.
- Bates, S., & Richard, J. (1996). Domoic acid production and cell division by *Pseudo-nitzschia multiseriis* in relation to a light: Dark cycle in silicate-limited chemostat culture. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 140-143.
- Bates, S., & Trainer, V. (2006). The ecology of harmful diatoms *Ecology of harmful algae* (pp. 81-93): Springer.
- Bates, S. S. (1998). Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. *Nato Adv Sci Inst Se*, 41, 405-426.
- Bates, S. S. (2000). Domoic-acid-producing diatoms: another genus added. *Journal of phycology*, 36(6), 978-983.
- Bates, S. S., Freitas, A. S. W. d., Milley, J. E., Pocklington, R., Quilliam, M. A., Smith, J. C., & Worms, J. (1991). Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* in culture: nutrients and irradiance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(7), 1136-1144.
- Bates, S. S., Hiltz, M. F., & Leger, C. (1999). Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriis* resulting from sexual reproduction. *Can J Fish Aquat Sci*(2261), 21-26.
- Bates, S. S., & Richard, D. J. A. (2000). Shellfish harvest area closure due to domoic acid-Mill River, Prince Edward Island. *Harmful Algae News*, 21, 6-7.
- Bill, B., Lundholm, N., Connell, L., Baugh, K., & Trainer, V. (2005). Domoic acid in *Pseudo-nitzschia cuspidata* from Washington State coastal waters. Paper presented at the Abstract from the 3rd Symposium on Harmful Algae in the US. Monterey, CA.
- Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Haskard, K. A., & Hallegraeff, G. M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40(1), 78-87.
- Bogan, Y., Bender, K., Hervas, A., Kennedy, D., Slater, J., & Hess, P. (2007). Spatial variability of domoic acid concentration in king scallops *Pecten maximus* off the southeast coast of Ireland. *Harmful Algae*, 6(1), 1-14.
- Bohbot, V. D., Kalina, M., Stepankova, K., Spackova, N., Petrides, M., & Nadel, L. (1998). Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychologia*, 36(11), 1217-1238.
- Bork, P., Bowler, C., De Vargas, C., Gorsky, G., Karsenti, E., & Wincker, P. (2015). Tara oceans studies plankton at planetary scale: American Association for the Advancement of Science.
- Botana, L., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A., & Louzao, M. (1996). Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. *Food Sci Tech-New York*, 1147-1170.
- Buck, K., Chavez, F., & Davis, A. (2008). *Minidiscus trioculatus*, a small diatom with a large presence in the upwelling systems of central California.(With 2 figures). *Nova Hedwigia Beihefte* 114, 133, 1.
- Cabrera, M. E., Hernández, G. L., Gómez, R. H., & Cañizares, M. M. (2003). Determinación de nitratos y nitritos en agua: Comparación de costos entre un



- método de flujo continuo y un método estándar. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(1), 88-92.
- Cakmak, G., Miller, L. M., Zorlu, F., & Severcan, F. (2012). Amifostine, a radioprotectant agent, protects rat brain tissue lipids against ionizing radiation induced damage: an FTIR microspectroscopic imaging study. *Archives of biochemistry and biophysics*, 520(2), 67-73.
- Camargo, J., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Caso, M., Pisantry, I., & Ezcurra, E. (2004). Diagnóstico ambiental del Golfo de México (Vol. 1). Instituto Nacional de Ecología.
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., & Zingone, A. (2005). The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*, 4(1), 33-48.
- Cervantes, S. (1984). Manual de técnicas básicas para el análisis de ambientes acuáticos. *Departamento de Biología sección de Limnología y contaminación. UNAM*. 172p.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Vyverman, W. (2005). Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *Eur J Phycol*, 40(4), 379-395.
- Cho, E., Hur, H., Byun, H., Lee, S., Rhodes, L., Jeong, C., & Park, J. (2002). Monthly monitoring of domoic acid producer *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Hasle) Hasle using species-specific DNA probes and WGA lectins and abundance of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) from Chinhae Bay, Korea. *Botanica marina*, 45(4), 364-372.
- Clemons, M. J., & Miller, C. B. (1984). Blooms of large diatoms in the oceanic, subarctic Pacific. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 31(1), 85-95.
- Cleve, P. T. (1883). *Diatoms, collected during the expedition of the Vega*. Bibliolife DBA of Bibilio Bazaar II LLC, Stockholm.
- Cochlan, W. P., Herndon, J., & Kudela, R. M. (2008). Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*, 8(1), 111-118.
- COFEPRIS. (2016). Lineamiento de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotoxinas marinas.
- CONAGUA. (2014). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación Ciudad de México.
- CONAGUA. (2017). Reporte del Clima en México. Retrieved from <http://smn.cna.gob.mx/es/>
- Cook, P. F., Reichmuth, C., Rouse, A. A., Libby, L. A., Dennison, S. E., Carmichael, O. T., Fravel, V. A. (2015). Algal toxin impairs sea lion memory and hippocampal connectivity, with implications for strandings. *Science*, 350(6267), 1545-1547.
- Costa, L. G., Giordano, G., & Faustman, E. M. (2010). Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology*, 31(5), 409-423.



- Cusack, C. K., Bates, S. S., Quilliam, M. A., Patching, J. W., & Raine, R. (2002). Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters *J Phycol*, 38(6), 1106-1112.
- Dale, B., Edwards, M., & Reid, P. (2006). Climate change and harmful algal blooms. *Ecology of Harmful Algae*, 367-378.
- Daniels, C., Poulton, A. J., Mario, E., Paulsen, M. L., Bellerby, R., St John, M., & Martin, A. P. (2015). Phytoplankton dynamics in contrasting early stage North Atlantic spring blooms: composition, succession, and potential drivers. *Biogeosciences*.EGU.
- Dao, H. V., Phan, V. B., Teng, S. T., Uchida, H., Leaw, C. P., Lim, P. T., . . . Pham, K. X. (2015). *Pseudo-nitzschia fukuyoi* (Bacillariophyceae), a domoic acid-producing species from Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. *Fisheries Science*, 81(3), 533-539.
- Dao, V., Lim, P., Ky, P. X., Takata, Y., Teng, S. T., Omura, T., . . . Kodama, M. (2014). Diatom *Pseudo-nitzschia* cf. *caciantha* (Bacillariophyceae), the most likely source of domoic acid contamination in the thorny oyster *Spondylus versicolor* Schreibers 1793 in Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. *Asian Fish. Sci*, 27, 16-29.
- Davidovich, N. A., & Bates, S. S. (1998). Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 34(1), 126-137.
- Del Rio, R., Bargu, S., Baltz, D., Fire, S., Peterson, G., & Wang, Z. (2010). Gulf menhaden (*Brevoortia patronus*): a potential vector of domoic acid in coastal Louisiana food webs. *Harmful Algae*, 10(1), 19-29.
- Diario Oficial de la Federación, D. (1992). Decreto por el que se declara área natural protegida con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Sistema Arrecifal Veracruzano, ubicada frente a las Costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado del estado de Veracruz Llave, con superficie de 52,238-91-50 hectáreas. Mexico, D.F.: Diario Oficial de la Federación.
- Dickman, M., & Zhang, F. (1999). Mid-ocean exchange of container vessel ballast water. 2: Effects of vessel type in the transport of diatoms and dinoflagellates from Manzanillo, Mexico, to Hong Kong, China. *Marine Ecology Progress Series*, 253-262.
- Doan-Nhu, H., Nguyen Thi, M., & Nguyen-Ngoc, T. (2008). *Pseudo-nitzschia* in south-central coastal waters of Vietnam: growth and occurrence related to temperature and salinity. Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae (Ed. by Moestrup).
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293): Springer.
- Expósito-Díaz, G., Salas-de León, D., Monreal-Gómez, M., Salas-Monreal, D., & Vázquez-Gutiérrez, F. (2009). Corrientes inerciales en el sur del Golfo de México. *Ciencias Marinas*, 35(3), 287-296.
- Fehling, J., Davidson, K., & Bates, S. S. (2005). Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae*, 4(4), 763-769.



- Fehling, J., Green, D. H., Davidson, K., Bolch, C. J., & Bates, S. S. (2004). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish waters. *J Phycol*, 40(4), 622-630.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fernandes, L. F., Hubbard, K. A., Richlen, M. L., Smith, J., Bates, S. S., Ehrman, J., Quilliam, M. (2014). Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia peragallo* in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res Pt II*, 103, 139-162.
- Ferrario, M., Sar, E., & Sala, S. (1995). Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. *Manual de métodos ficológicos*, 1-23.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374), 237-240.
- Frescos, P. (2005). Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. *Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-242-SSA1-2005*.
- Fritz, L., Quilliam, M. A., Wright, J. L., Beale, A. M., & Work, T. M. (1992). An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *J Phycol*, 28(4), 439-442.
- Fryxell, G. A., Villac, M. C., & Shapiro, L. P. (1997). The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920–1996: a review. *Phycologia*, 36(6), 419-437.
- Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C., López-Cortés, D., Bustillos-Guzmán, J., & Erler, K. (2007). Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (june-july 2006). *Harmful Algae News*, 33, 6-7.
- Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B., & Dale, B. (2001). Life histories of microalgal species causing harmful blooms: Calvi, Majorca, Spain: European Commission Directorate General Science, Research and Development.
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., & Nuñez-Vázquez, E. J. (2016). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. Ensenada, Baja California: CICESE.
- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazan-Becerril, A., Castaneda-Vega, C., & Pena-Manjarrez, J. L. (2009). A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae*, 8(3), 493-503.
- García Amaro, E. (2004). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (5th ed.). México, D.F.: UNAM.
- Garrison, D. L., Conrad, S. M., Eilers, P. P., & Waldron, E. M. (1992). Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J Phycol*, 28(5), 604-607.
- Giraldo, A., & Gutiérrez, E. (2007). Composición taxonómica del zooplancton superficial en el Pacífico colombiano (septiembre 2003). *Investigaciones Marinas*, 35(1), 117-122.



- Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2011). Harmful algal blooms and eutrophication: "strategies" for nutrient uptake and growth outside the Redfield comfort zone. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4), 724-738.
- González, C., Hermilo. (2014). Densidad y distribución del zooplancton en los Lagos del Dique, Xalapa, Veracruz. Período 2012-2013.
- Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Yasumoto, T. (2001). Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 907(1-2), 181-189.
- Grimmelt, B., Nijjar, M., Brown, J., Macnair, N., Wagner, S., Johnson, G. R., & Amend, J. F. (1990). Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon*, 28(5), 501-508.
- Guillard, R. R. (1973). Division rates. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, 289-311.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2019. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 06 November 2018.
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G. M. (1995). Harmful algal blooms: a global overview. *Manual on harmful marine microalgae*, 33, 1-22.
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *J Phycol*, 46(2), 220-235.
- Hasle, G., Lange, C., & Syvertsen, E. (1996). A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 50(2), 131.
- Hasle, G. R. (1994). *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30(6), 1036-1039.
- Hasle, G. R. (1997). *Identifying marine phytoplankton*: Acad. Press. California, USA.
- Hasle, G. R. (2002). Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae*, 1(2), 137-146.
- Hasle, G. R., & Lundholm, N. (2005). *Pseudo-nitzschia seriata* f. *obtusata* (Bacillariophyceae) raised in rank based on morphological, phylogenetic and distributional data. *Phycologia*, 44(6), 608-619.
- Hays, G. C., Richardson, A. J., & Robinson, C. (2005). Climate change and marine plankton. *Trends in ecology & evolution*, 20(6), 337-344.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Humphries, E. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3-13.
- Hernández-Orozco, M. L., & Gárate-Lizárraga, I. (2006). Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomédica*, 17(1), 45-60.
- Herrera-Silveira, J. A., Comin, F. A., Aranda-Cirerol, N., Troccoli, L., & Capurro, L. (2004). Coastal water quality assessment in the Yucatan Peninsula:



- management implications. *Ocean & coastal management*, 47(11-12), 625-639.
- Herrera, S. A., Sierra, B. A., & Hernández, S. N. (2008). Floraciones Algales Nocivas: perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *BioTecnología*, 12(1), 23-40.
- Hiltz, M., Bates, S. S., & Kaczmarska, I. (2000). Effect of light: dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Bacillariophyceae) in culture. *Phycologia*, 39(1), 59-66.
- Holland, P. T., Selwood, A. I., Mountfort, D. O., Wilkins, A. L., McNabb, P., Rhodes, L. L., King, K. L. (2005). Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chem Res Toxicol*, 18(5), 814-816.
- Horta-Puga, G., & Tello-Musi, J. (2009). Sistema Arrecifal Veracruzano: condición actual y programa permanente de monitoreo: Primera etapa. *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DM005. México DF.*
- Horta-Puga, G., Vargas-Hernández, J. M., & Carricart-Ganivet, J. P. (2007). Reef corals. *Coral Reefs of the Southern Gulf of Mexico*, JW Tunnel, EA Chávez and K. Withers (eds.). *Texas University Press, Huston*, 95-101.
- Howard, M. D. A., Cochlan, W. P., Ladizinsky, N., & Kudela, R. M. (2007). Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae*, 6(2), 206-217.
- Ichiye, T. (1959). Circulation and water-mass distribution in the Gulf of Mexico. Paper presented at the *Journal Geophysical Research*, 64(8), 1109-1110.
- Imai, I., Yamaguchi, M., & Hori, Y. (2006). Eutrophication and occurrences of harmful algal blooms in the Seto Inland Sea, Japan. *Plankton and Benthos Research*, 1(2), 71-84.
- INEGI, (2012). Perspectiva estadística de Veracruz Ignacio de la Llave. Retrieved from <https://www.inegi.org.mx/default.html>
- Isabel, Q.-S. S., Garcés, E., Lundholm, N., Moestrup, Ø., Andree, K., & Camp, J. (2009). Morphology, physiology, molecular phylogeny and sexual compatibility of the cryptic *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyta), including the description of *P. arenysensis* sp. nov. *Phycologia*, 48(6), 492-509.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., & Boyle, C. (2004). Amnesic shellfish poison. *Food Chem Toxicol*, 42(4), 545-557.
- Jiménez, B., María de Lourdes. (2006). Catálogo de especies y artes de pesca del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (Vol. 6, pp. 182). Xalapa, Ver., México: Universidad Veracruzana.
- Kaczmarska, I., Martin, J. L., Ehrman, J. M., & LeGresley, M. M. (2007). *Pseudo-nitzschia* species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae*, 6(6), 861-874.
- Kaczmarska, I., Reid, C., Martin, J. L., & Moniz, M. B. (2008). Morphological, biological, and molecular characteristics of the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* from the Canadian Maritimes. *Botany*, 86(7), 763-772.



- Kang, J.-S., Kang, S.-H., Kim, D., & Kim, D.-Y. (2003). Planktonic centric diatom *Minidiscus chilensis* dominated sediment trap material in eastern Bransfield Strait, Antarctica. *Mar Ecol Prog Ser*, 255, 93-99.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Van Thuoc, C., Huyen, N. T. M., Hoi, N. C., Kodama, M. (2000). Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shirimp-culture pond in do son, Vietnam. *J Phycol*, 36(6), 1057-1060.
- Krutak, P. R. (1997). Petrography and provenance of siliciclastic sediments, Veracruz-Anton Lizardo reefs, Mexico. *Ocean and the Poles*, 19(3), 231-243.
- Kudela, R., Cochlan, W., & Roberts, A. (2002). Spatial and temporal patterns of *Pseudo-nitzschia* spp. in central California related to regional oceanography. *Harmful Algae*, 2004, 347-349.
- Kudela, R., Roberts, A., & Armstrong, M. (2002). Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. *Harmful Algae*, 136-138.
- Lalli, C., & Parsons, T. R. (1997). *Biological oceanography: an introduction* (2 ed.): Elsevier.
- Lampert, W., & Sommer, U. (1997). *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. (2 ed). Oxford University Press. New York.
- Landa, M., Blain, S., Christaki, U., Monchy, S., & Obernosterer, I. (2016). Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. *The ISME journal*, 10(1), 39.
- Lara, M., Padilla, C., García, C., & Espejel, J. (1992). *Coral reef of Veracruz Mexico I. Zonation and community*. Proceedings of the 7th International Coral Reef Symposium.
- Leal, A. M. T., Rolón, R. I., Castillo, G. E., & Cocotle, R. Y. (2017). Impacto de la evaluación de una PTAR. *Revista de la Alta Tecnología y Sociedad*, 9(2), 65-70. Retrieved from Academia Journals website: <http://www.academiajournals.com/revista-alta-tec-y-sociedad/>
- Leblanc, K., Quéguiner, B., Diaz, F., Cornet, V., Michel-Rodriguez, M., de Madron, X. D., Grégori, G. (2018). Nanoplanktonic diatoms are globally overlooked but play a role in spring blooms and carbon export. *Nature Communications*, 9(1), 953.
- Lefebvre, K. A., Kendrick, P. S., Ladiges, W., Hiolski, E. M., Ferriss, B. E., Smith, D. R., & Marcinek, D. J. (2017). Chronic low-level exposure to the common seafood toxin domoic acid causes cognitive deficits in mice. *Harmful Algae*, 64, 20-29.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., & Bates, S. S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51(2), 168-216.
- Li, Y., Huang, C. X., Xu, G. S., Lundholm, N., Teng, S. T., Wu, H., & Tan, Z. (2017). *Pseudo-nitzschia simulans* sp. nov. (Bacillariophyceae), the first domoic acid producer from Chinese waters. *Harmful Algae*, 67, 119-130.
- Li, Y., Ma, Y., & Lu, S. (2010). Morphological characteristics of *Pseudo-nitzschia americana* complex in Daya Bay, China. *Acta Hydrobiol. Sin*, 34, 851-855.
- Licea-Durán, S., Moreno, J., Santoyo, H., & Figueroa, G. (1995). *Dinoflageladas del Golfo de California*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.



- Lim, H.-C., Lim, P.-T., Su, S. N.-P., Teng, S.-T., & Leaw, C.-P. (2012). Genetic diversity of *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyceae) from Malaysia. *Journal of applied phycology*, 24(6), 1465-1475.
- Lim, H.-C., Su, S. N.-P., Mohamed-Ali, H., Kotaki, Y., Leaw, C.-P., & Lim, P.-T. (2010). Toxicity of diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Science and Technology in the Tropics*, 6, S116-S119.
- Lim, H.-C., Teng, S. T., Leaw, C. P., & Lim, P. T. (2013). Three novel species in the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. batesiana* sp. nov., *P. lundholmiae* sp. nov., and *P. fukuyoi* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the Strait of Malacca, Malaysia. *Journal of phycology*, 49(5), 902-916.
- Llewellyn, L., Negri, A., & Robertson, A. (2006). Paralytic shellfish toxins in tropical oceans. *Toxin Rev*, 25(2), 159-196.
- Llorente, B. J., & Ocegueda, S. (2008). Capital natural de México, Vol. I: conocimiento actual de la biodiversidad. *México: Conabio*.
- Loa, L. E., & Suman, D. (1994). *Los manglares de México: sinopsis general para su manejo*. Paper presented at the 1. y 2. Talleres sobre el Manejo del Ecosistema de Manglar Jun y Nov 1993. Miami, Fla. (EUA) y Panamá (Panamá).
- Lund, H. L. C., & Vang, T. (2004). An inflow and intrusion event in the Little Belt at the North Sea–Baltic Sea transition and a related sub-surface bloom of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 59(2), 265-276.
- Lundholm, N., Daugbjerg, N., & Moestrup, Ø. (2002). Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *Eur J Phycol*, 37(1), 115-134.
- Lundholm, N., Hansen, P. J., & Kotaki, Y. (2004). Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar Ecol Prog Ser*, 273, 1-15.
- Lundholm, N., Hasle, G. R., Fryxell, G. A., & Hargraves, P. E. (2002). Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia lineata*. *Phycologia*, 41(5), 480-497.
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., & Miller, P. (2006). Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses 1. *J Phycol*, 42(2), 464-481.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., & Moestrup, Ø. (1994). Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia*, 33(6), 475-478.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., & Moestrup, Ø. (1997). Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia*, 36(5), 381-388.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., & Suzuki, T. (2002). Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels



- (*Perna canaliculus*), revealed by LC–MS/MS analysis. *Toxicon*, 40(9), 1321-1330.
- Maldonado, M. T., Hughes, M. P., Rue, E. L., & Wells, M. L. (2002). The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *Pseudo-nitzschia australis*. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 515-526.
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Bittner, L. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *P Natl Acad Sci USA*.
- Mancera, P. J. E., Gavio, B., & Arencibia Carballo, G. (2010). Floraciones algales nocivas, intoxicación por microalgas e impactos en el desarrollo regional: El caso de San Andrés Isla, Caribe Colombiano. *Cuadernos del Caribe*, 13.
- Mann, D. G., & Evans, K. M. (2007). Molecular genetics and the neglected art of diatomics. *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*, 231.
- Mann, K. (2000). Ecology of coastal waters with implications for management blackwell science. Inc. Massachusetts.
- Marchetti, A., Lundholm, N., Kotaki, Y., Hubbard, K., Harrison, P. J., & Virginia Armbrust, E. (2008). Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from iron-limited waters in the northeast subarctic Pacific. *J Phycol*, 44(3), 650-661.
- Marchetti, A., Trainer, V. L., & Harrison, P. J. (2004). Environmental conditions and phytoplankton dynamics associated with *Pseudo-nitzschia* abundance and domoic acid in the Juan de Fuca eddy. *Mar Ecol Prog Ser*, 281, 1-12.
- Marinas, F. y. d. d. b. (2005). Introducción de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotixinas marinas.
- Marques de Cantú, M. J. (1991). *Probabilidad y estadística: para ciencias químico-biológicas* (9684222459). Retrieved from
- Martin, J. L., Haya, K., Burrige, L., & Wildish, D. (1990). *Nitzschia pseudodelicatissima*—a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Mar Ecol Prog Ser*, 177-182.
- Martínez-Austria, P. F., Díaz-Delgado, C., & Moeller-Chávez, G. (2017). *Seguridad hídrica en México* A. d. I. México (Ed.) (pp. 47).
- Martínez, G. M. A., & Csaky, A. G. (2001). *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*. Madrid: Síntesis.
- Miller, L. M., & Dumas, P. (2010). From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Curr Opin Struc Biol* 20(5), 649-656.
- Miller, R. L., & Kamykowski, D. L. (1986). Effects of temperature, salinity, irradiance and diurnal periodicity on growth and photosynthesis in the *Nitzschia americana*; light-saturated growth. *Journal of phycology*, 22(3), 339-348.
- Millero, F. J. (2013). *Chemical oceanography*. CRC press.
- Mondello, L., Dugo, G., & Bartle, K. D. (1996). On-line microbore high performance liquid chromatography-capillary gas chromatography for food and water analyses. A review. *J Microcolumn Sep*, 8(4), 275-310.
- Moniz, M. B., & Kaczmarek, I. (2010). Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist*, 161(1), 7-34.



- Montoya, J. J. (2012). Variación de los parámetros oceanográficos alrededor del Arrecife Verde en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (Golfo de México Occidental).
- Munday, R., Holland, P. T., McNabb, P., Selwood, A. I., & Rhodes, L. L. (2008). Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C. *Toxicon*, 52(8), 954-956.
- Nagumo, T. (1990). The bleaching method for gently loosening and cleaning a single diatom frustule. *Diatom*, 5, 45-50.
- Neelesh, T. (2016). Diatoms: Characteristics, Occurrence and Reproduction. Retrieved from <http://www.biologydiscussion.com/algae/diatoms-characteristics-occurrence-and-reproduction/46940>
- Nezan, E., Antoine, E., Fiant, L., & Billard, C. (2006). Identification of *Pseudo-nitzschia australis* and *P. multiseriis* in the Bay of Seine. Was there a relation to presence of domoic acid in king scallops in autumn 2004? *Harmful Algae News*(31), 1-3.
- Nijjar, M. S., & Nijjar, S. S. (2000). Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca²⁺ overload and inhibition of Ca²⁺ calmodulin-stimulated adenylate cyclase in rat brain. *Int J Mol Med*, 6(4), 377-466.
- Nixon, S., & Fulweiler, R. (2009). Nutrient pollution, eutrophication, and the degradation of coastal marine ecosystems. *Global loss of coastal habitats: rates, causes and consequences*, 23-58.
- Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Parsons, M., Torres-Salgado, R., & Aké-Castillo, J. (2009). El género *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, Golfo de México: taxonomía y dinámica estacional. *Resúmenes del Taller sobre Florecimientos Algales Nocivos (FAN): Integración del Conocimiento sobre Eventos de FAN en México*, 9-11.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D., & Montresor, M. (2004a). Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series*, 271, 87-98.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D., & Montresor, M. (2004b). Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar Ecol Prog Ser*, 271, 87-98.
- Ortiz-Lozano, L. (2012). Identification of priority conservation actions in marine protected areas: Using a causal networks approach. *Ocean Coast Manage*, 55, 74-83.
- Pan, Y., Subba Rao, D. V., & Mann, K. H. (1996). Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigen diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* under phosphate limitation. *Journal of phycology*, 32(3), 371-381.
- Paniagua, M., Diaz, D., Zuluaga, J., & Menéndez, N. (2016). Experimentación Básica en Química (Grado de Química). Unidad Autónoma de Madrid. Retrieved from <http://www.qfa.uam.es/labqui/index2.html>
- Park, J. S., Jung, S. W., Ki, J.-S., Guo, R., Kim, H. J., Lee, K.-W., & Lee, J. H. (2017). Transfer of the small diatoms *Thalassiosira proschkiniae* and *T. spinulata* to



- the genus *Minidiscus* and their taxonomic re-description. *PloS one*, 12(9), e0181980.
- Parsons, M. L., & Dortch, Q. (2002). Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnol Oceanogr*, 47(2), 551-558.
- Parsons, M. L., Okolodkov, Y. B., & Aké-Castillo, J. A. (2012a). Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Bot Mex*(98), 51-72.
- Parsons, M. L., Okolodkov, Y. B., & Aké-Castillo, J. A. (2012b). Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana*(98).
- Parsons, M. L., Scholin, C. A., Miller, P. E., Doucette, G. J., Powell, C. L., Fryxell, G. A., Soniat, T. M. (1999). *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: molecular probe field trials, genetic variability, and domoic acid analyses. *J Phycol*, 35(6), 1368-1378.
- Perez, B. E., Antoine, E., Crassous, M. P., & Compere, C. (2008). Detection and molecular identification of *Pseudo-nitzschia* species in natural samples from the French coasts. 3rd Congress of the International Society for Applied Phycology Incorporating National University of Ireland, Galway.
- Pérez, M. A., Martínez, L. A., & Camalich, C. J. M. (2015). Dry weight, carbon, C/N ratio, hydrogen, and chlorophyll variation during exponential growth of selected microalgae species used in aquaculture. *Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) Océánides*, 30(1), 33-34.
- Pettersson, L. H., & Pozdnyakov, D. (2012). *Monitoring of harmful algal blooms*: Springer Science & Business Media. Instrucción de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotoxinas marinas (2005).
- Qiu, S., Pak, C. W., & Currás, C. M. C. (2005). Sequential involvement of distinct glutamate receptors in domoic acid-induced neurotoxicity in rat mixed cortical cultures: effect of multiple dose/duration paradigms, chronological age, and repeated exposure. *Toxicol Sci*, 89(1), 243-256.
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., . . . Camp, J. (2008). Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Scientia Marina*, 72(2), 343-359.
- Quilliam, M. A. (2003). Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson, & A. D. Cembella (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae* (Vol. 11, pp. 211-246). Paris.
- Quilliam, M. A., Hess, P., & Dell'Aversano, C. (2001). Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. In W. J. de Koe, Samson R A, H. P. Van Egmond, J. Gilbert, & M. Sabino (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium* (pp. 383-391). Sao Paulo, Brazil.
- Quintero-Rendón, L. A., Agudelo, E. A., Quintana-Hernández, Y. A., Cardona-Gallo, S. A., & Osorio-Arias, A. F. (2010). Determinación de indicadores para la



- calidad de agua, sedimentos y suelos, marinos y costeros en puertos colombianos. *Gestión y Ambiente*, 13(3).
- Radan, R. L., & Cochlan, W. P. (2018). Differential toxin response of *Pseudo-nitzschia multiseriata* as a function of nitrogen speciation in batch and continuous cultures, and during a natural assemblage experiment. *Harmful Algae*, 73, 12-29.
- Ramanan, R., Kim, B.-H., Cho, D.-H., Oh, H.-M., & Kim, H.-S. (2016). Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology advances*, 34(1), 14-29.
- Reyna-González, P. C., Bello-Pineda, J., Ortiz-Lozano, L., Pérez-España, H., Arceo, P., & Brenner, J. (2014). Incorporating expert knowledge for development spatial modeling in assessing ecosystem services provided by coral reefs: A tool for decision-making. *Rev Biol Mar Oceanog*, 49(2).
- Rhodes, L., White, D., Syhre, M., & Atkinson, M. (1996). *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. Harmful and Toxic Algal Blooms: Seventh International Conference on Toxic Phytoplankton, Sendai, Japan.
- Rhodes, L. L. (1998). Domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species detected by whole cell DNA probe-based and immunochemical assays. In B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández, & T. Wyatt (Eds.), *Harmful Algae* (pp. 274-277). Santiago de Compostela, España: UNESCO.
- Rhodes, L. L., Adamson, J., & Scholin, C. (2000). *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand. *New Zeal J Mar Fresh*, 34(3).
- Rice, E., Baird, R., Eaton, A., & Clesceri, L. (2012). *Standard Methods for examination of water and wastewater*. (22nd ed). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation
- Rodríguez-Gómez, C. F. (2013). *Contribución de especies planctónicas formadoras de Florecimientos Algales Nocivos a la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano*. (Maestro en Ecología y Pesquerías), Universidad Veracruzana, Boca del Río.
- Rodríguez-Gómez, C. F., Aké-Castillo, J. A., & Campos-Bautista, G. (2013). Productividad primaria bruta y respiración planctónica en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. *Hidrobiológica*, 23(2), 143-153.
- Roldán, G. (1992). Fundamentos de limnología tropical. Medellín. (2 ed). Editorial Universidad de Antioquia.
- Rue, E., & Bruland, K. (2001). Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. *Mar Chem*, 76(1-2), 127-134.
- Sahraoui, I., Bates, S., Bouchouicha, D., Hadj, M. H., & Sakka, H. A. (2011). Toxic and potentially toxic *Pseudo-nitzschia* populations in Bizerte Lagoon (Tunisia, SW Mediterranean) during 2006-2007, and first report of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia brasiliensis* Lundholm. Hasle, & GA Fryxell. *Diatom Res*, 26(3), 293-303.
- Sahraoui, I., Grami, B., Bates, S. S., Bouchouicha, D., Chikhaoui, M. A., Mabrouk, H. H., & Hlaili, A. S. (2012). Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions



- in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia). *Estuar Coast Shelf S*, 102-103, 95-104.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-425.
- Salas-Pérez, J. d. J., & Arenas-Fuentes, V. (2011). Winter water mass of the Veracruz Reef System. *Atmósfera*, 24(2), 221-231.
- Santiago-Morales, I. S., & García-Mendoza, E. (2011). Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si: NO₃ ratios. *Harmful Algae*, 12, 82-94.
- Sarno, D. (2000). Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algal News*, 21, 5.
- Scholin, C., Buck, K., Britschgi, T., Cangelosi, G., & Chavez, F. (1996). Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia*, 35(3), 190-197.
- Scholin, C. A., Gulland, F., Doucette, G. J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F. P., Harvey, J. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403(6765), 80.
- Seeyave, S., Probyn, T., Pitcher, G., Lucas, M., & Purdie, D. (2009). Nitrogen nutrition in assemblages dominated by *Pseudo-nitzschia* spp., *Alexandrium catenella* and *Dinophysis acuminata* off the west coast of South Africa. *Mar Ecol Prog Ser*, 379, 91-107.
- Sepulveda, H. (2008). *Diseño de métodos moleculares para el análisis de fitoplancton tóxico y nocivo*. (Maestro en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur.
- Shiba, M., Kondo, K., Miki, E., Yamaji, H., Morota, T., Terabayashi, S., . . . Aburada, M. (2006). Identification of medicinal *Atractylodes* based on ITS sequences of nrDNA. *Biol Pharm Bull*, 29(2), 315-320.
- Shipe, R., Leinweber, A., & Gruber, N. (2008). Abiotic controls of potentially harmful algal blooms in Santa Monica Bay, California. *Continental Shelf Research*, 28(18), 2584-2593.
- Simon, N., Cras, A. L., Foulon, E., & Lemée, R. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C R Biol*, 332(2-3), 159-170.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis* (7 ed.). Cengage learning.
- Skov, J., Lundholm, N., Pocklington, R., Rosendahl, S., & Moestrup, Ø. (1997). Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 1. Isozyme variation among isolates of *P. pseudodelicatissima* during a bloom in Danish coastal waters. *Phycologia*, 36(5), 374-380.
- Smayda, T. J. (1997). Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol Oceanogr*, 42(5), 1137-1153.
- Smayda, T. J. (2007). Reflections on the ballast water dispersal—harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae*, 6(4), 601-622.



- Smith, A. L. (1979). *Applied infrared spectroscopy. Fundamentals, Techniques and Analytical Problem Solving* (J. E. Philip, D. W. James, & I. Kolthoff Eds.).
- Smith, J. (1991). *Population dynamics and toxicity of various species of Dinophysis and Nitzschia from the southern Gulf of St. Lawrence*. Proceedings of the Second Canadian Workshop in Harmful Algae, 1991.
- Sommer, U. (1998). Silicate and the functional geometry of marine phytoplankton. *J Plankton Res*, 20(9), 1853-1859.
- Sonia, Q.-S., Garcés, E., Andree, K., Fortunato, J. M., & Camp, J. (2009). Homothallic auxosporulation in *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (Bacillariophyta). *J Phycol*, 45(1), 100-107.
- Sonia, Q.-S., Garcés, E., Andree, K. B., De la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J. M., & Camp, J. (2010). *Pseudo-nitzschia* species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Sci Mar*, 74(2), 395-410.
- Spatharis, S., Danielidis, D. B., & Tsirtsis, G. (2007). Recurrent *Pseudo-nitzschia calliantha* (Bacillariophyceae) and *Alexandrium insuetum* (Dinophyceae) winter blooms induced by agricultural runoff. *Harmful Algae*, 6(6), 811-822.
- Stewart, J. E. (2008). Bacterial involvement in determining domoic acid levels in *Pseudo-nitzschia multiseriata* cultures. *Aquat Microb Ecol*, 50(2), 135-144.
- Suárez-Isla, B., & Guzmán-Méndez, L. (1992). Floraciones de algas nocivas, mareas rojas y toxinas marinas. *Revista Sanidad Defensa Nacional*, 9, 133-138.
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *P Natl Acad Sci USA*, 101(30), 11030-11035.
- Teng, S. T., Leaw, C. P., Lim, H. C., & Lim, P. T. (2013). The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Malaysia, including new records and a key to species inferred from morphology-based phylogeny. *Bot Mar*, 56(4), 375-398.
- Teng, S. T., Lim, H. C., Lim, P. T., Dao, V. H., Bates, S. S., & Leaw, C. P. (2014). *Pseudo-nitzschia kodamae* sp. nov. (Bacillariophyceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia. *Harmful Algae*, 34, 17-28.
- Teng, S. T., Tan, S. N., Lim, H. C., Dao, V. H., Bates, S. S., & Leaw, C. P. (2016). High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 52(6), 973-989.
- Thessen, A. E. (2007). *Taxonomy and ecophysiology of Pseudo-nitzschia in the Chesapeake Bay*. University of Maryland, College Park.
- Thessen, A. E., Bowers, H., & Stoecker, D. K. (2009). Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae*, 8(5), 792-810.
- Thessen, A. E., Dortch, Q., Parsons, M. L., & Morrison, W. (2005). Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of phycology*, 41(1), 21-29.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res Nucleic*, 22(22), 4673-4680.



- Tomas, C. R. (1997). *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego, California Academic Press.
- Toyofuku, H. (2006). Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins. *Mar Pollut Bull*, 52(12), 1735-1745.
- Trainer, V. L., Bates, S. S., Lundholm, N., Thessen, A. E., Cochlan, W. P., Adams, N. G., & Trick, C. G. (2012). *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14, 271-300.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., & Bates, S. S. (2008). Toxic Diatoms. In J. P. Walsh, L. S. Smith, E. L. Fleming, M. H. Gabriele, & H. W. Gerwick (Eds.), *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Sea* (pp. 219-237). San Diego, California: Academic Press.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., & Horner, R. A. (2002). Biological and physical dynamics of domoic acid production off the Washington coast. *Limnology and Oceanography*, 47(5), 1438-1446.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., Lessard, E. J., Cochlan, W. P., Trick, C. G., Wells, M. L., . . . Moore, S. K. (2009a). Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnology and Oceanography*, 54(1), 289-308.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., Lessard, E. J., Cochlan, W. P., Trick, C. G., Wells, M. L., . . . Moore, S. K. (2009b). Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnol Oceanogr*, 54(1), 289-308.
- Trick, C. G., Bill, B. D., Cochlan, W. P., Wells, M. L., Trainer, V. L., & Pickell, L. D. (2010). Iron enrichment stimulates toxic diatom production in high-nitrate, low-chlorophyll areas. *P Natl Acad Sci USA*, 107(13), 5887-5892.
- Trimborn, S., Lundholm, N., Thoms, S., Richter, K. U., Krock, B., Hansen, P. J., & Rost, B. (2008). Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and non-toxic diatoms: the effect of pH-induced changes in seawater carbonate chemistry. *Physiologia Plantarum*, 133(1), 92-105.
- Tunnell Jr, J. W. (1992). *Natural versus human impacts to southern Gulf of Mexico coral reef resources*. Paper presented at the Proceedings of the 7th International Coral Reef Symposium, Guam, Center for Coastal Studies, Texas.
- U'Ren, J. M., Dalling, J. W., Gallery, R. E., Maddison, D. R., Davis, E. C., Gibson, C. M., & Arnold, A. E. (2009). Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. *Mycol Res*, 113(4), 432-449.
- Vargas, M. M., & Freer, E. (2004). Proliferaciones algales de la diatomea toxigénica *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev Biol Trop*, 52, 127-132.
- Vega-Arredondo, B. O., Lobina, D. V., Zenteno, S. T., Arce, M. M., & Gómez, A. G. A. (2017). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (2da ed.). La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Villac, M. C. (1996). *Synecology of the genus Pseudo-nitzschia H. Peragallo from Monterey Bay, California, USA*. Texas A & M University.



- Villac, M. C., de Melo, S., Menezes, M., & Tenenbaum, D. R. (2005). *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyceae), uma diatomácea oportunista da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Atlântica (Rio Grande)*, 27(2), 139-145.
- Vyverman, W. (2004). Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *Int Rev Cytol*, 237, 91.
- Wang, P., Liang, J., Lin, X., Chen, C., Huang, Y., Gao, Y., & Gao, Y. (2012). Morphology, phylogeny and ITS-2 secondary structure of *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyceae), including Chinese strains. *Phycologia*, 51(1), 1-10.
- Wang, Q., Deeds, J. R., Place, A. R., & Belas, R. (2005). Dinoflagellate community analysis of a fish kill using denaturing gradient gel electrophoresis. *Harmful Algae*, 4(1), 151-162.
- Wayne, L. R., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Reece, K. S., Stokes, N. A., Lutzoni, F. M., . . . Tester, P. A. (2007). Recognizing Dinoflagellate species using ITS rDNA sequences *J Phycol*, 43(2), 344-355.
- Wells, M. L., Trick, C. G., Cochlan, W. P., Hughes, M. P., & Trainer, V. L. (2005). Domoic acid: the synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. *Limnology and Oceanography*, 50(6), 1908-1917.
- Werlinger, C., Alveal, K., & Romo, H. (2004). *Biología marina y oceanografía: conceptos y procesos*: Consejo Nacional del Libro y la Lectura.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems* (A. Press Ed. 3ra ed.): Gulf Professional Publishing.
- William, H. (1980). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. In W. Horwitz, P. Chichilo, & H. Reynolds (Eds.), (pp. 1015). Washington, USA Association of Official Analytical Chemists.
- Wiseman, W., & Sturges, W. (1999). Physical oceanography of the Gulf of Mexico: Processes that regulate its biology. In K. S. a. K. S. H. Kumpf (Ed.), *The Gulf of Mexico Large Marine Ecosystem: Assessment, Sustainability and Management* (pp. 77-92). New York: Blackwell Science.
- Work, T. M., Barr, B., Beale, A. M., Fritz, L., Quilliam, M. A., & Wright, J. L. (1993). Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J Zoo Wildlife Med*, 24(1), 54-62.
- Wright, J. (1995). *Seawater: its composition, properties, and behaviour* (Vol. 2): Pergamon.
- Wright, J., Boyd, R., Freitas, A. d., Falk, M., Foxall, R., Jamieson, W., . . . Odense, P. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chemistry*, 67(3), 481-490.
- Wright, J., & Quilliam, M. (1995). Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson, & A. D. Cembella (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides* (Vol. 33, pp. 113-127): United Nations Educational, .
- Wright, J. L., Falk, M., McInnes, A. G., & Walter, J. A. (1990). Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Can J Chemistry*, 68(1), 22-25.



- Yang, Z. Y., Chao, Z., Huo, K. K., Xie, H., Tian, Z. P., & Pan, S. L. (2007). ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China. *Phytomedicine*, 14(6), 416-423.
- Zaccaroni, A., & Scaravelli, D. (2008). Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. In V. Evangelista, L. Barsanti, V. Passarelli, & P. Gualtier (Eds.), *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection* (pp. 91-158): Springer.
- Zou, J., Zhou, M., & Zhang, C. (1993). Ecological features of toxic *Nitzschia pungens* Grunow in Chinese coastal waters. *Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. BV*, 651-657.



12 Anexos

12.1 Protocolo para extracción de ADN

- **Lisis celular**

Añadir 500 μ L de 2x CTAB en microtubos de 1.5 mL y calentar a 60°C por más de 10 min. Agregar la muestra de ADN y agitar con vórtex. Mantener a 60 °C durante 1 h y utilizar vórtex cada 10 min.

- **Enjuague con cloroformo**

Agregar 500 μ L de 24:1 cloroformo:alcohol isoamílico a cada tubo y agitar manualmente. Posteriormente, centrifugar a 10000 x g (RCF) durante 10 min. Transferir el sobrenadante (fase transparente) a un nuevo tubo, repetir este paso.

- **Precipitación del ADN**

Añadir 1 mL de etanol al 96% frío y 50 μ L de acetato de sodio (NaAc) a una concentración 3 M y agitar. Centrifugar por 10 min a 20000 x g (RCF) y remover con cuidado el líquido sin alterar el pellet. Después agregar 0.5 mL de etanol al 70% frío y lavar suavemente. Centrifugar 10 min a 20000 x g (RCF) y remover de nuevo. Centrifugar 10 min a 20000 x g (RCF).

Eliminar los restos de etanol en una estufa con los tubos abiertos durante no más de 10 min. Por último disolver en 31 μ L de agua destilada y colocar Parafilm para evitar evaporación. Dejar a temperatura ambiente (30°C) durante un día y posteriormente almacenar en el congelador o realizar la amplificación.



12.1 Matriz de distancias genéticas

Tabla 32. Distancias genéticas en la región ITS1-5.85-ITS2 de diferentes cepas de *P. brasiliiana*.

Cepas	KM386875	HM236161	HQ111397	JN252428	EU327364	EU407608	EU327365	5E-F	4C	6D	8C
KM386875_ <i>P. brasiliiana</i> _China	0.000										
HM236161_ <i>P. brasiliiana</i> _China	0.004	0.004									
HQ111397_ <i>P. brasiliiana</i> _Malasia	0.000	0.000	0.004								
JN252428_ <i>P. brasiliiana</i> _Malasia	0.008	0.008	0.004	0.008							
EU327364_ <i>P. brasiliiana</i> _Mediterraneo	0.020	0.020	0.016	0.020	0.012						
EU407608_ <i>P. brasiliiana</i> _España	0.008	0.008	0.004	0.008	0.000	0.012					
EU327365_ <i>P. brasiliiana</i> _España	0.016	0.016	0.020	0.016	0.024	0.036	0.024				
5E-F_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	0.036	0.036	0.040	0.036	0.043	0.055	0.043	0.044			
4C_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	0.040	0.040	0.043	0.040	0.047	0.059	0.047	0.036	0.055		
6D_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	0.028	0.028	0.032	0.028	0.036	0.047	0.036	0.036	0.047	0.035	
8C_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	0.086	0.086	0.090	0.086	0.094	0.106	0.094	0.099	0.106	0.118	0.102
GQ330378.1_ <i>P. americana</i>											



12.2 Diferencias en la composición de los nucleótidos entre cepas.

Tabla 33. Composición de nucleótidos de diferentes ubicaciones obtenidas de la región ITS1-5.85-ITS2 (en pares de bases) en *P. brasiliiana* y *P. americana*. Las bases que se muestran son las que tuvieron variaciones comparadas con KM386875.1_ *P. brasiliiana*_China.

No. de nucleótido	1	5	1	1	2	4	5	8	8	9	9	13	13	13	14	14	14	14	14	14	16
	3	5	4	8	4	6	9	7	8	7	8	9	0	1	2	3	4	8	2		
KM386875_ <i>P. brasiliiana</i> _China	A	C	-	A	-	A	A	A	A	C	T	-	-	T	T	T	G	G	C	G	T
HM236161_ <i>P. brasiliiana</i> _China	.	.	-	.	-	-	-
HQ111397_ <i>P. brasiliiana</i> _Malasia	.	.	-	.	-	-	-
JN252428_ <i>P. brasiliiana</i> _Malasia	.	.	-	.	-	-	-
EU327364_ <i>P. brasiliiana</i> _Mediterraneo	.	.	-	.	-	-	-	A
EU407608_ <i>P. brasiliiana</i> _España	.	.	-	.	-	A	-	-	A
EU327365_ <i>P. brasiliiana</i> _España	.	.	-	.	-	-	-	A
5E-F_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	.	.	-	-	-	-	-
4C_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	T	.	T	C	T	C	C	C	C	G	.	-	-	.	.	.	T
6D_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	.	G	-	.	-	.	.	.	C	G	.	-	-
8C_ <i>P. brasiliiana</i> _PNSAV	.	G	-	.	-	G	.	G	T	C
GQ330378.1_ <i>P. americana</i>	.	.	-	.	-	-	-	-	-	-	T	A	T	A	.



Tabla 33. Continuación...

16 3	16 4	17 6	17 7	18 0	18 1	18 2	18 6	18 9	20 8	21 5	22 8	22 9	23 0	23 2	23 4	23 5	23 6	23 7	23 9	24 0	24 4	24 6	24 7	25 8	25 9	26 0
-	-	C	C	C	T	C	T	G	-	C	G	A	-	C	T	-	G	A	C	C	A	A	-	T	C	A
-	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.
-	-	.	.	.	C	.	.	.	-	.	.	.	-	-	.	.	.
-	-	-	.	.	.	-	-	.	.	.
-	-	.	.	.	C	.	.	.	-	.	.	.	-	-	.	.	.
-	-	.	.	.	C	.	.	.	-	.	.	.	-	-	.	.	.
-	-	.	.	.	C	.	.	.	-	.	A	.	-	.	.	-	T	.	.	.	T	.	T	.	.	C
-	-	G	.	.	-	.	.	T	C	.	.	G	T	G	.	.	G	C	T	.	.	.
-	-	G	A	-	.	.	.	-	.	.	G	T	G	.	.	T	C	T	.	.	.
C	C	.	T	G	.	.	C	T	-	T	.	.	-	G	C	G	A	.	.	A	G	G
-	-	.	T	G	.	-	C	T	-	T	.	.	-	G	C	-	.	.	A	G	G	.	-	G	A	.