



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Identificación y potencial tóxico de especies de diatomeas planctónicas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) mediante la utilización de HPLC-UV

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:
BIÓL. YACCIRY AHUJA-JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. DAVID URIEL HERNÁNDEZ BECERRIL
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS (INSTITUTO DE QUÍMICA)
DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA (FEZ IZTACALA)
DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA (INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)
DRA. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ (INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)

MÉXICO, D. F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Identificación y potencial tóxico de especies de diatomeas
planctónicas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia*
(Bacillariophyceae) mediante la utilización de HPLC-UV**

BIÓL. YACCIRY AHUJA-JIMÉNEZ

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
2015

A MIS PADRES Y HERMANO:
JOSÉ, MARICELA Y JOERIC

Por ser mi gran inspiración, creer en mí, apoyarme y cuidarme siempre.

¡Los amo!

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. David Uriel Hernández Becerril por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo de tesis, además del apoyo y ánimo brindados durante este proceso.

A mi comité tutorial, la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez, la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia, el Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y el Dr. José Estuardo López Vera por sus atinados comentarios para mejorar este trabajo.

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila y a la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera por el apoyo en la utilización del HPLC-UV y el análisis de muestras químicas. Asimismo al M. En C. Miguel Cuevas por su apoyo en análisis de muestras por medio de la técnica de DART.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por aceptarme en su programa de maestría, así como también al personal de este: Dra. Gloria Vilaclara, Diana, Chantal, Lupita y Gaby. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios, ya que sin ella esto no hubiera sido posible.

Al programa PAPIIT-UNAM por el apoyo económico para la obtención de muestras a bordo del Buque/Oceanográfico “El Puma”. Al equipo de investigadores y alumnos presentes en la campaña oceanográfica “Fitoplancton Tóxico y Nocivo del Pacífico Tropical Mexicano (MareaR-V).

A mis inigualables y viejos amigos, que a pesar de la distancia estuvieron ahí para darme palabras de aliento cuando fue necesario: Brenda Salgado, Jocelyne Ontiveros, Oscar Morales, Alejandro Mejía, Sebastián Sánchez, Erandeni Duran, Danerick Lemus, Valentín Mar, Sandy Andrade y Jesús Ayala. A mis compañeros y amigos que hicieron amena mi estancia en esta ciudad y en el ICMYL, especialmente a Karina Esqueda, Dulce Parra, Berenice Rojo, Carlos Obregón, Zuleima Santana. Y por último a cada una de las personas que se han ido agregando a mi vida y que me han apoyado en el aspecto personal o profesional para continuar y llegar a la culminación de este proyecto.

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
3. Objetivos	8
3.1. Objetivo general	8
3.2. Objetivos particulares	8
4. Descripción del área de estudio	9
5. Materiales y métodos	11
5.1. Actividades de campo	11
5.1.1. Colecta del material fitoplanctónico	12
5.1.2. Muestreo para el análisis de ácido domoico (AD)	12
5.2. Actividades de laboratorio	12
5.2.1. Establecimiento de cultivos	12
5.2.2. Observación e identificación del material fitoplanctónico	13
5.2.3. Determinación de ácido domoico por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	13
5.2.4. Abundancia celular	14
5.3. Actividades de Gabinete	14
5.3.1. Descripción de las especies	14
6. Resultados	15
6.1. Descripción de las especies	15
6.2. Análisis de muestras del medio natural	19
6.2.1. Análisis de ácido domoico (AD)	19
6.2.2. Abundancia de células	21
6.3. Análisis de muestras de cultivo	21
6.3.1. Análisis de ácido domoico (AD)	21
6.3.2. Abundancia de células de cultivo	23

7. Discusión	24
7.1. Características de las especies	24
7.2. Análisis de muestras del medio natural	25
7.2.1. Análisis de ácido domoico (AD)	25
7.3. Análisis de muestras de cultivo	27
7.3.1. Análisis de ácido domoico (AD)	27
8. Conclusiones	29
9. Literatura citada	30
10. Anexo	38
10.1. Cromatogramas de las muestras analizadas	38
10.2. Análisis directo en tiempo real (DART)	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio	10
Figura 2. <i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i>	16
Figura 3. <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	17
Figura 4. <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	18
Figura 5. Mapa de las estaciones que presentan ácido domoico	20

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de muestreo	11
Cuadro 2. Datos morfométricos de las especies registradas como tóxicas de <i>Pseudo-nitzschia</i> encontradas en el área de estudio	19
Cuadro 3. Abundancia de <i>Pseudo-nitzschia</i> y concentración de ácido domoico de agua de mar por estación	20
Cuadro 4. Abundancia y concentración de ácido domoico de cultivos	22

RESUMEN

Las diatomeas son parte importante del fitoplancton marino, durante los últimos años el estudio de las diatomeas potencialmente tóxicas ha sido de gran interés, especialmente el género *Pseudo-nitzschia*; actualmente se conoce que 14 de las 35 especies descritas pertenecientes a este género pueden producir Ácido Domoico (AD), una potente neurotoxina que provoca el Envenenamiento Amnésico por Consumo de Mariscos en seres humanos y causa efectos nocivos en animales marinos. En este estudio se registra la presencia de AD disuelto en condiciones naturales de la región del Pacífico Tropical Mexicano asociado a la presencia y abundancia de especies pertenecientes a este género, así como también se determinó el potencial tóxico de las diferentes especies cultivadas de la bahía de Mazatlán. La colecta del material fitoplanctónico se llevó a cabo mediante botella Niskin y fueron fijadas con yodo lugol para después ser analizadas, mientras que para el establecimiento de cultivos se tomó muestra directa. La identificación y cuantificación del ácido domoico se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alto desempeño-detección ultravioleta (HPLC-UV) con un límite de detección de 0.04 ng/ml. Se colectaron 22 muestras en diferentes sitios desde Cabo Corrientes, Jalisco hasta Acapulco, Guerrero; de las cuales ocho muestras presentan niveles de ácido domoico disuelto, *Pseudo-nitzschia multistriata* estuvo presente en siete de las ocho estaciones en las que se encontró AD disuelto, se corroboró la presencia de AD de *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia multistriata* en condiciones de cultivo. Se reporta a *Pseudo-nitzschia brasiliensis* en cultivo como especie tóxica por primera vez en México aportando datos de AD disuelto y celular. Cabe mencionar que el presente trabajo es el primero en México con énfasis en la producción de ácido domoico disuelto en condiciones naturales y la presencia de especies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia*. Además que incluye estudios de toxicidad en cultivo de tres especies de este género.

ABSTRACT

Diatoms are an important component of marine phytoplankton communities, in recent years the study of potentially toxic diatoms has been of great interest, especially of those of the genus *Pseudo-nitzschia*; currently it is known that 14 of the 35 described species of this genus can produce domoic acid (DA), a potent neurotoxin that causes harmful effects in marine animals and poisoning in humans by consumption of the contaminated shellfish. In this study the presence of dissolved domoic acid (dDA) in natural conditions in the region of the tropical Mexican Pacific is recorded and associated with the presence and abundance of species of this genus, and the toxic potential of different species of *Pseudo-nitzschia* collected in Mazatlán Bay is determined by their culture. The phytoplankton samples were collected using Niskin bottles and they were fixed using Lugol's iodine solution for their further analysis, while for establishment of phytoplankton cultures direct samples of sea water were taken. The identification and quantification of DA were carried out using high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV) with a detection limit of 0.04 ng/ml. Twenty two samples were collected at different locations from Cabo Corrientes, Jalisco to Acapulco, Guerrero; of which eight showed dDA, *Pseudo-nitzschia multistriata* was recorded in seven of the eight sampling sites where dDA was detected, the presence of DA produced by *Pseudo-nitzschia pungens* and *Pseudo-nitzschia multistriata* was corroborated in culture conditions. *Pseudo-nitzschia* is reported as toxic species for the first time in Mexico and data of the dissolved and cellular DA that this diatom produces in culture is provided. Worth mentioning that this research is the first one in Mexico that emphasizes on the production of dDA in natural conditions and in the presence of potentially toxic species of *Pseudo-nitzschia*. Besides including toxicity studies conducted from the culture of three species of this genus.

1. INTRODUCCIÓN

En el mar se encuentran organismos microscópicos tanto animales como vegetales de múltiples formas que constituyen lo que se denomina plancton, dentro del cual encontramos dos grandes grupos: la parte animal llamada zooplancton que incluye rotíferos, copépodos, larvas de peces e invertebrados, y el fitoplancton como la parte vegetal. El fitoplancton marino es una comunidad de microalgas que habitan en el ambiente pelágico marino y que en su gran mayoría, tienen la capacidad de fotosintetizar; presentan una gran diversidad de formas celulares, algunas carecen de movimiento mientras que otras tienen una capacidad limitada para nadar. La importancia de esta comunidad reside en que es fuente primaria de alimento para los consumidores del primer nivel trófico (Hernández-Becerril, 2003).

Dentro del fitoplancton existen diferentes grupos de organismos, entre los cuales se encuentran las diatomeas (Bacillariophyta). Uno de los rasgos característicos de las células de diatomeas es la presencia de una cubierta de sílice (dióxido de silicio hidratado) que consta de dos partes asimétricas o valvas unidas por bandas silíceas que simulan ser un cinturón llamado cingulo, estas valvas o frústulas muestran una gran diversidad de formas muy ornamentadas, muchas especies forman cadenas u otros agregados mucilaginosos (Round *et al.*, 1990; Hoeck *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 1996). Las diatomeas han sido divididas en dos grandes grupos debido a su simetría: céntricas, con simetría radial; y penales, con simetría bilateral y forma alargada (Hasle y Syvertsen, 1997); además, son células pigmentadas y fotosintéticas, sus cloroplastos presentan lamelas con tres tilacoides y diferentes pigmentos como clorofila α , c_2 y β , β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina y diadinoxantina (Jeffrey y Vesk, 1997). Presentan un ciclo de vida complejo, la mayor parte del tiempo se encuentran en crecimiento vegetativo, tienen la capacidad de producir células y esporas en estado de reposo (Round *et al.*, 1990; Edlund y Stoermer, 1997). El crecimiento vegetativo está caracterizado por la disminución de tamaño de los organismos al existir división celular. Esto es provocado por la formación de dos nuevos componentes dentro de la célula parental, que resultan en la reducción del eje apical, sin cambios significativos en los ejes trans-apical y pervalvar (Amato *et al.*, 2005; Chepurnov *et al.*, 2005). En el proceso de reproducción del tipo sexual se lleva a cabo la restauración del tamaño celular, en donde a partir de la formación de auxosporas se desarrolla

una célula vegetativa de gran tamaño, llamada célula inicial. (Round *et al.*, 1990; Mann, 1993; Edlund y Stoermer, 1997).

El género *Pseudo-nitzschia* Peragallo pertenece a la división Bacillariophyta, los rasgos útiles para su identificación son: valvas fusiformes y alargadas que forman finas cadenas de células traslapadas, en sus valvas presentan estrías, fíbulas e hileras de poroides, dichos rasgos se pueden observar con mayor detalle por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) (Hasle, 1994). Las características específicas que definen a las diferentes especies son la longitud y amplitud de la valva, longitud del traslape de las puntas valvares, forma de las puntas valvares, densidad lineal de interestrías y fíbulas y presencia del interespacio central. En la mayoría de los casos, la identificación de las especies es difícil ya que se necesita analizar la ultra-estructura del himen de los poroides, específicamente el número de sectores y su patrón de distribución. Recientemente, se han utilizado técnicas moleculares para identificar especies difíciles de diferenciar mediante características morfológicas (Lundholm y Møestrup 2000; Lundholm *et al.*, 2002, 2003, 2006; Orsini *et al.* 2002, 2004; Evans *et al.* 2004, 2005).

En general, el género *Pseudo-nitzschia* está relacionado con el fenómeno conocido como Florecimiento Algal Nocivo (FAN), estos se asocian a eventos de surgencias costeras, eutrofización de ecosistemas costeros y tormentas invernales (Smayda, 1990; Hallegraeff, 1993, 2003; Glibert *et al.*, 2005a y 2005b). Dichos FANs consisten en el crecimiento masivo de diferentes especies del fitoplancton, este aumento de biomasa puede alcanzar abundancias desde cientos de miles hasta millones de células por litro de agua, dichos florecimientos pueden o no ser tóxicos, se considera nocivo cuando es producido por especies de microalgas que afectan a moluscos, peces, aves y mamíferos debido a la producción de toxinas o a daños mecánicos en branquias y alteración de la calidad del agua, provocando una coloración sobre la superficie del mar dependiendo de los pigmentos fotosintéticos que posee cada especie (GEOHAB, 2001).

Se ha detectado que especies de *Pseudo-nitzschia* son causantes de intoxicación amnésica por mariscos (ASP), ya que son productoras de ácido domoico (AD), el cual es un compuesto natural ubicado en el grupo de los kainatos, asimismo, es un aminoácido cristalino, soluble en

agua, incoloro e insípido, su peso molecular es de 311 Da (Wright y Quilliam, 1995). Este ácido actúa sobre el sistema nervioso central de los seres humanos, produciendo la destrucción de la célula neuronal. En intoxicaciones menos severas se producen vómitos, abundante secreción bronquial, dificultad en la respiración, pérdida del equilibrio, pérdida permanente de la memoria, mientras que en casos más severos puede provocar coma y muerte por paro respiratorio (Hallegraeff, 1993).

Los niveles celulares de AD de las diferentes especies son muy variables y difieren entre ellos, siendo *Pseudo-nitzschia australis* la especie con mayor potencial tóxico por su alto contenido celular de AD, estando entre 5.6-12.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ ó 0-117 pg Cel^{-1} . Por otro lado, los niveles más altos de esta toxina en el medio natural se encuentran entre los rangos de 3.8-12.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ ó 78-117 pg Cel^{-1} . Cabe mencionar que estos niveles están asociados a la presencia de esta especie en las costas de California, E.U.A. (Scholin *et al.*, 2000; Trainer *et al.*, 2000; Schnetzer *et al.*, 2007). Es importante mencionar que la capacidad de producir AD en condiciones de cultivo es difícil de comparar, debido a las diferentes condiciones de crecimiento de las mismas (Bates *et al.*, 1989; Cusack *et al.*, 2002).

Existen diferentes métodos para el análisis de esta toxina debido al impacto negativo que tiene en ambientes marinos, los más comunes son: bioensayos en ratón, inmunoensayos como la prueba de ELISA y ensayos químicos como la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) (Pocklington *et al.*, 1990; Quilliam, 2003), que es la técnica analítica preferida, ya que este tipo de análisis aporta una amplia información cualitativa debido a la capacidad de separar compuestos; y cuantitativa gracias a la comparación de la altura o del área del pico del analito con la de uno o más patrones inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas (Jeffrey y Wright, 1997). Por otro lado se ha comenzado a utilizar un método relativamente nuevo llamado: análisis en tiempo real (DART), este nos permite saber con exactitud el peso molecular asegurando la presencia de la molécula de nuestro interés.

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial existe un extenso número de trabajos científicos relacionados con el potencial tóxico del género *Pseudo-nitzschia*, siendo detectado en 1987 el primer registro de envenenamiento por ácido domoico en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. Hasta ahora han sido reconocidas en el mundo 14 taxones del género *Pseudo-nitzschia* como productoras de AD, entre las cuales encontramos a *P. brasiliiana* (Sahraoui *et al.*, 2011); *P. komadae* (Tung Teng *et al.*, 2014); *P. australis*, *P. cuspidata*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. multiseriis*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. seriata* y *P. turgidula* (Lundholm, 2015).

En el Pacífico Americano fuera de las costas mexicanas se han detectado varios eventos de florecimientos algales nocivos relacionados con este grupo de especies. Es el caso de la Bahía de Monterey de California, EU, en septiembre de 1991 se encontró AD producido por organismos de *Pseudo-nitzschia australis* con una abundancia de aproximadamente $6.5 \text{ a } 20 \times 10^4$ Cél/L, causando así la muerte de varios pelícanos pardos y cormoranes por el consumo de anchoveta. En noviembre del mismo año, se registró una abundancia de la misma especie de $6.5 \text{ a } 20 \times 10^4$ Cél/L. Hacia 1992 del 10 al 20 de noviembre reapareció *P. australis*, presentando 4×10^5 Cél/L. (Garrison y Walz, 1993).

En el otoño de 1996 y en 1998, se reconoció la presencia de altas concentraciones de *Pseudo-nitzschia* sp., este suceso fue asociado con la intoxicación de mamíferos acuáticos en las costas de California, EU por efecto del consumo de peces portadores de AD (Gómez-Aguirre *et al.*, 2004). En mayo de 1998 en San Luis Obispo, California se encontraron varados 72 leones marinos presentando vómito, diarrea y desorientación, de estos el 50 % fallecieron; asimismo se encontraron aves muertas; estos padecimientos se relacionan con el AD producido por la diatomea *P. australis*, esta toxina fue encontrada en tejidos y sangre de los organismo infectados. En la Bahía de Monterey, en la segunda mitad de mayo de 1999, se presentó una floración por un lapso de 2-3 semanas de *P. australis*, la cual alcanzó un pico máximo de 200.000 células por litro; como era de esperarse, se registraron peces con una concentración de AD de 50-250 mg por pescado entero, igualmente se analizaron toxinas en

anchovetas y a este fenómeno se le atribuyen diversas alteraciones en los leones marinos (Scholin, 1999).

En las costas del Pacífico Mexicano han sido registradas diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* con potencial tóxico como son: *P. australis*, *P. brasiliana*, *P. delicatissima*, *P. fraudulentata*, *P. mutiseries*, *P. seriata*, *P. pseudodelicatissima* y *P. pungens*, algunas de ellas de amplia distribución como *P. pungens* y otras como *P. australis* están restringidas a aguas frías (Hernández-Becerril, 1998; Hernández-Becerril y Díaz-Almeyda, 2006; Hernández-Becerril *et al.*, 2007; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2007; García-Mendoza *et al.*, 2009; Ahuja-Jiménez, 2012; Rivera-Vilarelle *et al.*, 2012). Sin embargo, no existe ningún reporte de envenenamiento en humanos ni organismos marinos por ácido domoico en el Pacífico mexicano, a pesar del registro de eventos de mortalidad masiva de aves y mamíferos marinos en la región norte del país, perteneciente al Golfo de California.

Sierra-Beltrán *et al* (1997) documentó en los Cabos, Baja California Sur la muerte de aves marinas alimentadas por pescado contaminado por AD, pero no se identificó a la especie de *Pseudo-nitzschia* responsable de la producción de esta toxina.

Por otro lado, únicamente se han presentado tan solo dos trabajos que reportan concentraciones de AD en el medio natural identificando a la especie responsable, el primero sucedió en la Bahía de La Paz en donde se reporta a *P. fraudulentata* como productora de AD (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2007); el segundo ocurrió en la Bahía de Todos Santos, Baja California, identificándose a *P. australis* como principal especie asociada a la presencia de AD en la zona (García-Mendoza *et al.*, 2009). En cuanto a estudios de toxicidad en condiciones de cultivo sólo hay uno referente a *P. australis* (Santiago-Moreno, 2011). Es por eso que el presente trabajo es de gran importancia, ya que en nuestro país es evidente la falta de información específica acerca de este fenómeno, que pueda proporcionar datos de especies y su potencial tóxico, además los estudios mencionados se han llevado a cabo en el Golfo de California, mientras que este trabajo abarca zona costera y oceánica desde Mazatlán, Sinaloa hasta Acapulco, Guerrero.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar el potencial tóxico de especies pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* en condiciones naturales y de cultivo.

3.2. Objetivos Particulares

- Identificar las especies potencialmente tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* encontradas en el área de estudio.
- Detectar la presencia de ácido domoico (AD) disuelto en condiciones naturales de la región central del Pacífico Tropical Mexicano, asociado a la presencia de especies pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia*.
- Determinar el potencial tóxico de las diferentes especies cultivadas provenientes de la bahía de Mazatlán, Sinaloa.

▪ 4. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

México cuenta con 4,188 km de costa correspondientes al Pacífico Mexicano (Meneard y Smith, 1966), que se ha sectorizado de acuerdo a criterios climáticos-oceanográficos en cuatro regiones, siendo estas: la costa occidental de la Península de Baja California, el Golfo de California, el Pacífico tropical mexicano y el Golfo de Tehuantepec (Hernández-Becerril *et al.*, 2003), de las cuales dos de las cuatro regiones han sido consideradas para el presente estudio.

En el presente trabajo, el muestreo se realizó en dos áreas diferentes (Fig. 1), la primera dentro de la bahía de Mazatlán, Sinaloa, localizada en la región del Golfo de California, cuya influencia llega hasta Cabo Corrientes, Jalisco. Se caracteriza por presentar una capa superficial de alta salinidad, una fuerte fluctuación de temperatura (9 a 22°C) y un patrón de circulación complejo (Cano-Pérez, 1991). En marzo, tiene influencia de la Corriente de California, mientras que en septiembre, cobra importancia la Corriente Norecuatorial. También, el Golfo de California es caracterizado como una zona de alta fertilidad resultado de las altas concentraciones de nutrientes, debido al proceso de mezcla de las masas de agua por las fuertes corrientes de marea y por efectos de advección que se traducen en la existencia de remolinos en la zona (Lepley *et al.*, 1975). Asimismo en la costa oriental del golfo se presentan surgencias marinas durante invierno-primavera y en la región occidental durante verano-otoño (Ayala-Torres y Pacheco-Sandoval, 1991; Monreal *et al.*, 1999; Hernández-Becerril *et al.*, 2003).

La segunda área está ubicada entre las coordenadas geográficas 20° 27. 08´ N; 105° 53. 381´ O y 16° 11. 042´ N; 100° 6.192 O, que comprende las aguas oceánicas que son adyacentes a los estados de Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero. Esta región corresponde al Pacífico Tropical Mexicano (PTM) ubicada entre Cabo Corrientes hasta la frontera con Guatemala, en esta zona la columna de agua está influenciada por 4 tipos de masas de agua superficiales: a) el agua superficial tropical, b) el agua superficial subtropical, c) el agua superficial de la Corriente de California y d) el agua de la Corriente Norecuatorial (Garfield *et al.*, 1983). La columna de agua se caracteriza por tener una capa superficial con temperatura prácticamente constante a lo largo del año; las oscilaciones más agudas no sobrepasan los 5°C debido a la

influencia de surgencias e intromisión de la Corriente de California. Asimismo presenta una termoclina somera (entre 10 y 30 m) y permanente (Hernández- Becerril *et al.*, 2003). Las aguas cálidas del PTM son densas debido a la intensa evaporación que permite la acción de fenómenos de convección que causan una fuerte mezcla en la capa superficial (Wyrтки, 1965).

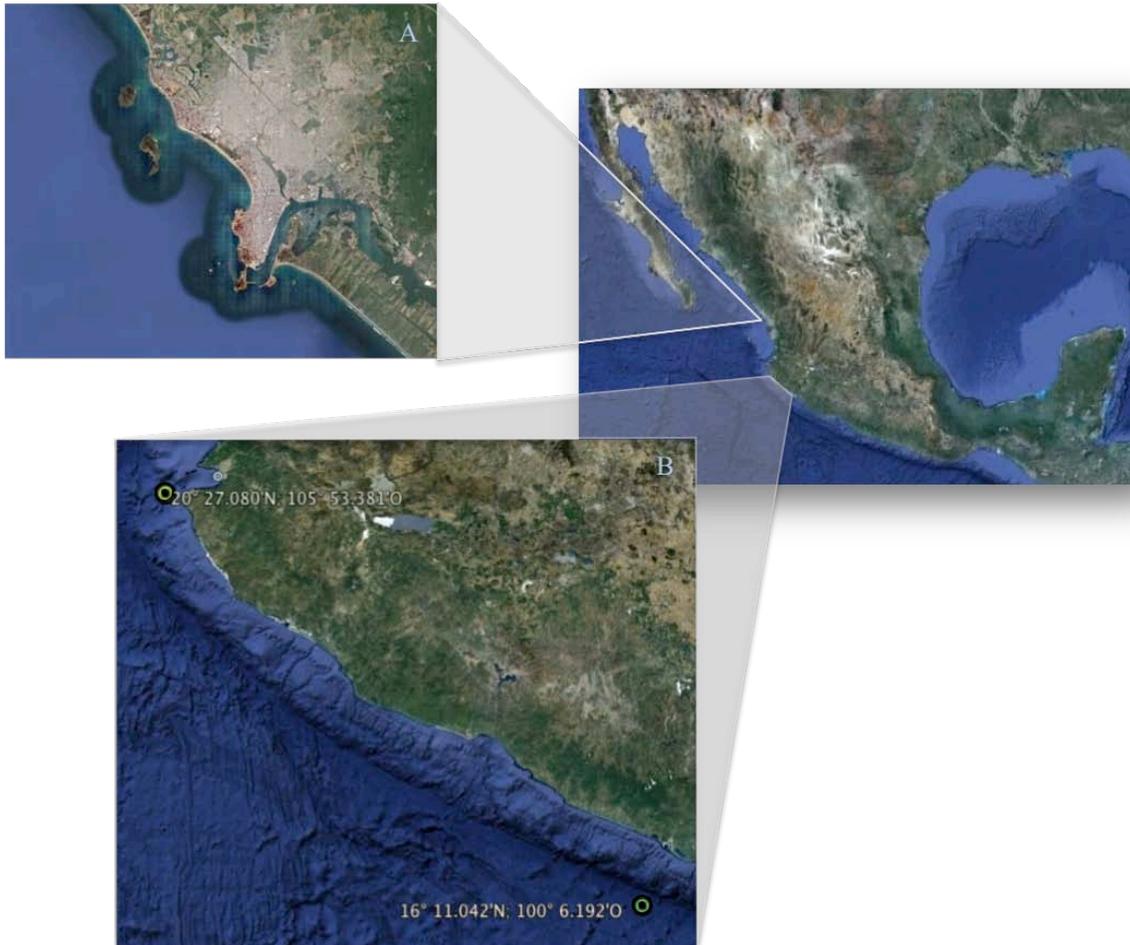


Figura 1. Área de estudio. A: Zona correspondiente a Mazatlán, Sin. y B: Zona correspondiente a la región central del Pacífico Tropical Mexicano

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Actividades de campo

Se realizaron dos tipos de colecta, la primera para el establecimiento de cultivos el día 14 de marzo de 2013 procedente de la bahía de Mazatlán y la segunda, para determinar la comunidad del medio natural proveniente de la campaña oceanográfica realizada del 2 al 13 de abril de 2013 a bordo del Buque Oceanográfico “El Puma” de la Universidad Nacional Autónoma de México durante el crucero MareaR-V. La selección de las estaciones de muestreo para este caso (Cuadro 1), se realizó considerándose las estaciones de muestreo establecidas en el derrotero del crucero.

Cuadro 1. Sitios de muestreo

Estación	Lat. N.	Long. O.
3	20° 27. 080´	105° 53. 381´
5	20° 17. 312´	105° 42. 003´
7	20° 17. 655	106° 04. 229
9	20° 17. 336´	106° 25. 276´
16	19° 18. 653´	105° 02. 357´
20a	18° 28. 286´	104° 44. 371´
21	18° 45. 763´	104° 32. 952´
23	19° 03. 360´	104° 22. 622´
25	18° 15. 819´	103° 28. 639´
28a	17° 36. 365´	103° 37. 925´
29	17° 54. 704´	103° 28. 750´
31	18° 12. 897´	103° 19. 945´
32	18° 09. 744´	103° 10. 933´
34	17° 47. 784´	102° 09. 074´
37	17° 27. 947´	102° 15. 591´
38a	17° 09. 709´	102° 22. 138´
42	16° 49. 117´	099° 53. 159´
44	16° 39. 433´	099° 55. 702´
45	16° 29. 766´	099° 59. 251´
46a	16° 11. 042´	100° 06. 192´
PG	17° 07. 818´	100° 54. 885´

5.1.1. Colecta de material fitoplanctónico

La colecta de material para el establecimiento de cultivos se realizó mediante muestras directas y fue trasladado en vivo al laboratorio.

El muestreo de fitoplancton para la determinación de la comunidad natural, se realizó por medio de una botella Niskin con capacidad de 10 L, correspondiente a la profundidad del primer máximo de clorofila registrado en el perfil del fluorímetro acoplado al CTD. Posteriormente se fijó con solución de Lugol hasta una concentración final de 2%. Las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio, en donde se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo para conocer el número de organismos de las diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* por litro de agua de mar.

5.1.2. Muestreo para el análisis de ácido domoico (AD)

El material a analizar fue tomado directamente de los cultivos establecidos en fase exponencial; se identificó y determinó el AD del medio acuoso del cultivo así como el de la biomasa. En el caso de las muestras del crucero, el material fue tomado de la misma botella Niskin correspondiente a las muestras de fitoplancton, para esto, se filtraron 70 ml de agua en filtros Millipore de 0.45 μm con el fin de separar la materia disuelta de la particulada colectando el agua filtrada en frascos oscuros con capacidad de 70 ml, los cuales se mantuvieron en refrigeración durante el transporte al laboratorio y hasta su análisis.

5.2. Actividades de laboratorio

5.2.1. Establecimiento de cultivos

Para la fase de cultivo, la muestra se dejó 14 horas en el cuarto de cultivo para que los organismos se aclimataran, después se filtró 1 L con filtros millipore de 1.2 μm de abertura de poro con el fin de concentrar el material biológico, posteriormente se realizó la separación de organismos mediante el método de aislamiento por pipeteo (González *et al.*, 1995)

colocándose en placas de cultivo celular de 96 pozos previamente llenados con medio f/2 (Guillard, Sigma-Aldrich), al alcanzar una densidad apreciable por medio del color verdoso, los organismos fueron resembrados en placas de 24 pozos y después escalados hasta un volumen total de 200 ml. Durante el establecimiento y mantenimiento de los cultivos se utilizó medio f/2 (Guillard, Sigma-Aldrich), con un periodo de 12:12 luz-obscuridad y temperatura ambiente (20-23 °C).

5.2.2. Observación e identificación del material fitoplanctónico

La identificación del material biológico de los cultivos y de las muestras *in situ* se realizó mediante microscopía óptica (MO) usando microscopio Olympus BX40 con objetivos de 40X y 100X y un Carl Zeiss Axiolab con objetivos de 10X, 40X, y 100X y oculares de 10X, adicionalmente se hicieron observaciones en microscopía electrónica de transmisión (MET) por medio de un microscopio JEOL, para lo cual el material fue previamente lavado y montado por el método de Simonsen (1974), el cual consiste en enjuagar la muestra con agua destilada 6 veces, por medio de centrifugación (1500 rpm, durante 5 minutos) con el fin de remover tanto la sal del agua como el fijador, agregar permanganato de potasio y dejar por un periodo de 24 hrs, adicionar ácido clorhídrico concentrado en proporción 1:1, calentar la solución suavemente con una lámpara de alcohol hasta que adquiriera una tonalidad incolora o ligeramente amarillenta, y finalmente se enjuagó la muestra como al inicio (Ferrario *et al.*, 1995).

5.2.3. Determinación de ácido domoico por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)

La identificación y cuantificación del AD disuelto y AD celular se realizó mediante cromatografía líquida de alto desempeño-detección ultravioleta (HPLC-UV), para el caso de las muestras del medio natural se siguió el método propuesto por Vera-Ávila *et al.*, (2011) el cual consiste en una doble extracción en fase sólida (SPE) seguida por la transferencia en línea y el análisis del extracto completo por HPLC-UV. Primero, mediante una SPE fuera de línea en cartuchos de fase reversa C18 se logró la preconcentración del AD a partir de 70 ml de

muestra y una eliminación de impurezas. Posteriormente, el extracto se diluyó y se cargó en una precolumna de fase reversa polimérica, el cual se eluyó y analizó en línea. Se requirió de la adición de ácido perclórico (HClO_4) 0.01 M y de un agente formador de pares de iones (Hexano sulfonato de sodio 0.5 M) a la solución de carga para la retención del analito hidrofílico en el cartucho y la precolumna. Este método tiene un límite de detección de 0.04 ng/ml y se ha utilizando como referencia un estándar CRM-DA-e (National Research Council-Canada). Para las muestras de cultivo se realizaron modificaciones en el método.

5.2.4 Abundancia celular

La abundancia de organismos de *Pseudo-nitzschia* en cultivo se obtuvo mediante conteo de organismos en cámara Sedgwick-Rafter tomando un mililitro del cultivo, para los organismos obtenidos de las muestras directas se utilizó el método de Utermöhl, dejando sedimentar la muestra 48 horas en cámaras de 25 ml (Edler y Elbrächeter, 2010), ambas cámaras fueron observadas en un microscopio invertido Carl Zeiss Invertoskop con objetivo de 20 X. Cada célula fue considerada como un individuo de la especie correspondiente, incluyendo las unidades de las cadenas de diatomeas, donde cada célula se contó por separado, ya que la unidad que se replica es la célula, no la colonia (Villafañe y Reid, 1995). Como resultado de esto, se expresó como reportándose como el número de individuos de *Pseudo-nitzschia* de cada especie en Cél/L⁻¹.

5.3. Actividades de Gabinete

5.3.1. Descripción de las especies

Una vez identificadas las especies de *Pseudo-nitzschia* se elaboró un listado de especies, en el cual se consideraron todas las especies registradas como tóxicas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* presentes en los cultivos y en muestras obtenidas del medio natural, se incluyó su descripción morfológica, referencias bibliográficas, distribución, además de fotografías de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

6. RESULTADOS

Se identificaron un total de cinco especies registradas como tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*, las cuales se describen a continuación en orden alfabético, considerando su ubicación taxonómica (Round *et al*, 1990; Hasle & Syvertsen, 1997; Hernández-Becerril, 1998, 2000, 2006). Cabe mencionar que del total de las especies encontradas, tres de ellas se pudieron establecer en cultivo.

DIVISIÓN: BACILLARIOPHYTA

CLASE: BACILLARIOPHYCEAE

SUBCLASE: BACILLARIOPHYCIDAE

ORDEN: BACILLARIALES

FAMILIA: BACILLARIACEAE

GÉNERO: *Pseudo-nitzschia* Peragallo

ESPECIE: *P. brasiliiana* Lundholm, Hasle *et*
Fryxell

ESPECIE: *P. delicatissima* (Cleve) Heiden

ESPECIE: *P. fraudulenta* (Cleve) Hasle

ESPECIE: *P. multistriata* (Takano) Takano

ESPECIE: *P. pungens* (Grunow *ex* Cleve) Hasle

6.1. Descripción de las especies

Pseudo-nitzschia brasiliiana Lundholm, Hasle *et* Fryxell

Descripción: Células dispuestas en cadenas largas (4-6 células) en fase exponencial y generalmente solitarias en fase estacionaria, valvas con márgenes rectos y extremos redondeados, rafe excéntrico y no interrumpido por nódulos centrales, células con dos cloroplastos color amarillo marrón situados a lo largo de la pared celular y a cada lado del núcleo central, largo 50-65 μm , ancho 1.8-3 μm , fíbulas e interestrías 20-26 en 10 μm , poroides 7-10 en 1 μm (Fig. 2).

Referencias: Lundholm *et al.*, 2002. Fig. 21-45.

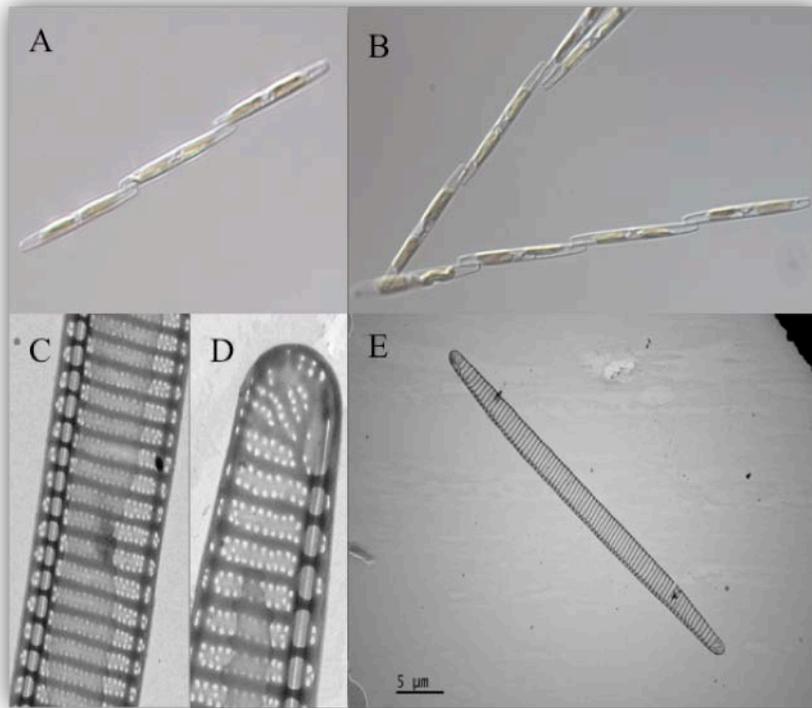


Figura 2. *Pseudo-nitzschia brasiliiana*. A: Cadena (ML); B: Células en reproducción vegetativa (ML); C: Detalle inter-valvar (MET); D: Detalle de la parte terminal de la valva (MET) y E: Frústula completa (MET)

Pseudo-nitzschia delicatissima (Cleve) Heiden *in* Heiden *et* Kolbe

Descripción: Células en cadenas largas (4-6 células), valvas con márgenes rectos y extremos redondeados, rafe excéntrico, sin nódulo central, largo 50-65 μm , ancho 1.8-3 μm , fíbulas e interestrías 18-26 en 10 μm , poroides 8-9 en 1 μm (Fig. 5).

Referencias: Hasle, 1965. Lám. 2, Fig. 10. Lám. 15, Fig. 19-23. Lám. 16, Fig. 3-7.

Pseudo-nitzschia fraudulenta (Cleve) Hasle

Descripción: Son organismos coloniales con valvas fusiformes, débilmente silicificadas, la

superposición de las células en las cadenas es bastante corta, pseudonódulo central, canal del rafe delgado, largo: 70-86 μm , ancho: 3.8-5.3 μm , fíbulas 13-15 y estrías 24-26 en 10 μm , 2 hileras de poroides de forma circular a triangular, 6 poroides en 1 μm .

Referencias: Hasle & Syvertsen, 1997, p. 313, lám. 70; Hernández-Becerril, 1998, p. 80, fig. 8-11; Kaczmarzka *et al.*, 2005, p. 8. fig. 24-29.

Pseudo-nitzschia multistriata (Takano) Takano

Descripción: Células solitarias o dispuestas en cadenas cortas o largas en fase exponencial (2-10 células), sigmoideas en vista cingular y lanceoladas en vista valvar, ausencia de espacio central, largo 45-60 μm , ancho 3.9-4.4 μm , 18-21 fíbulas en 10 μm , 27-29 estrías en 10 μm y 7-8 poros en 1 μm (Fig. 3).

Referencias: Rhodes *et al.*, 2000. Fig. 1 A-F; Orsini *et al.*, 2002. Fig. 10-13.

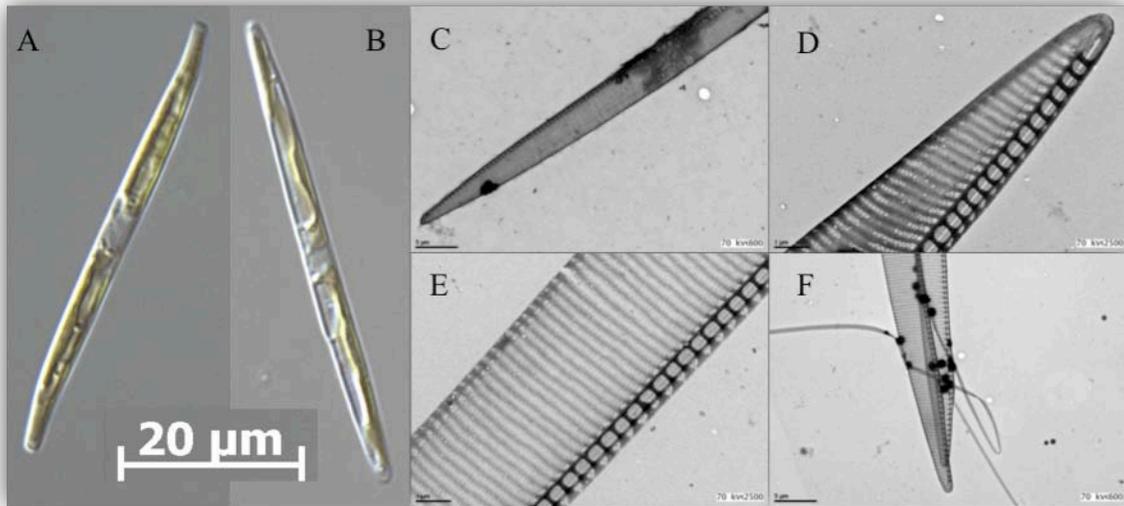


Figura 3. *Pseudo-nitzschia multistriata*. A: Célula en vista cingular (ML); B: Célula en vista valvar (ML); C: Ausencia de espacio central (MET); D: Detalle de la parte terminal de la valva (MET); E: Detalle de las estrías (MET) y F: Bandas de Cíngulo (MET).

Pseudo-nitzschia pungens (Grunow *ex* Cleve) Hasle

Descripción: Células dispuestas en cadena (2-13 células), las células en la cadena se traslapan cerca de un tercio de la longitud de la célula. Valva lineal a lanceolada con extremos puntiagudos, ausencia de espacio central, largo 94-109 μm , ancho 3-4 μm , fíbulas 10-12 en 10 μm , interestrías 10-12 en 10 μm , 3-4 poros en 1 μm (Fig. 4).

Referencias: Hasle, 1993; Hallegraeff, 1994. Fig. 3 a-i; Hasle *et al.*, 1996, Fig. 3-6 y 30-37.

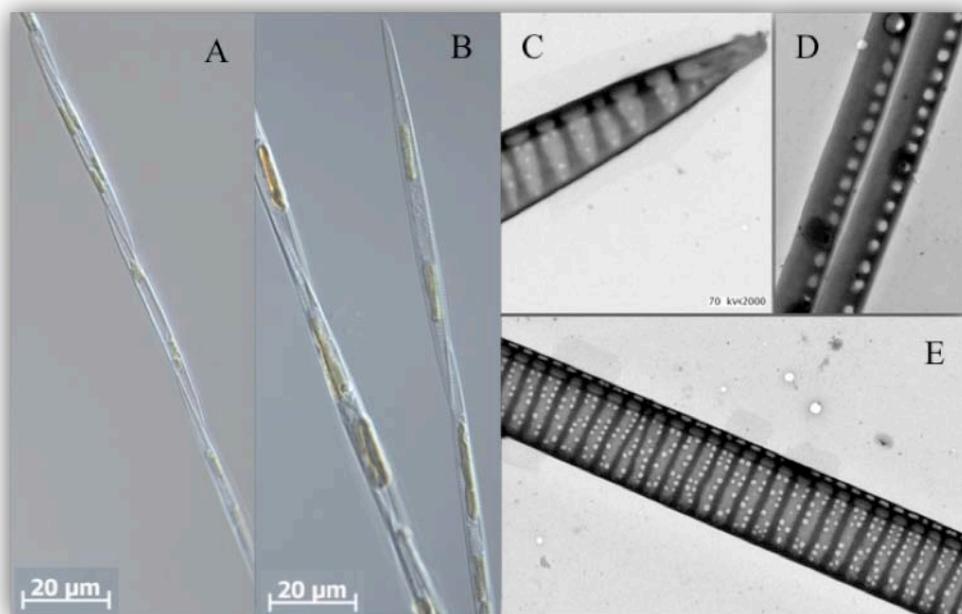


Figura 4. *Pseudo-nitzschia pungens*. A y B: Cadena de células vivas (ML); C: Ápice de la frústula (MET); D: Bandas de cíngulo (MET) y E: Detalle de la parte intermedia de la frústula.

A manera de resumen se presentan algunos de los rasgos característicos para la identificación de las especies de *Pseudo-nitzschia*, además se expresa que especies fueron cultivadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Datos morfométricos de las especies registradas como tóxicas de *Pseudo-nitzschia* encontradas en el área de estudio.

Especie	Nódulo central	Largo (µm)	Ancho (µm)	Fíbulas e interestrías en 10 µm	Poroides en 1 µm	Cultivada
<i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i>		50-56	1.8-3	20-26	7-10	SI
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	X	50-65	1.8-3	18-26	8-9	NO
<i>Pseudo-nitzschia fraudulenta</i>	X	70-86	3.8- 5.3	13-15	6	NO
<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>		45-60	3.9- 4.4	12-21	7-8	SI
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>		94-109	3-4	10-12	3-4	SI

6.2. Análisis de muestras del medio natural

6.2.1. Análisis de ácido domoico (AD)

Las 22 muestras de agua de mar, colectadas con el fitoplancton durante el crucero, han sido procesadas y analizadas, así como también se realizó el estudio de los datos cromatográficos correspondientes para la identificación y cuantificación del AD, de las cuales sólo ocho muestras arrojaron concentraciones de AD disuelto (Fig. 5; Cuadro 3, anexo I).

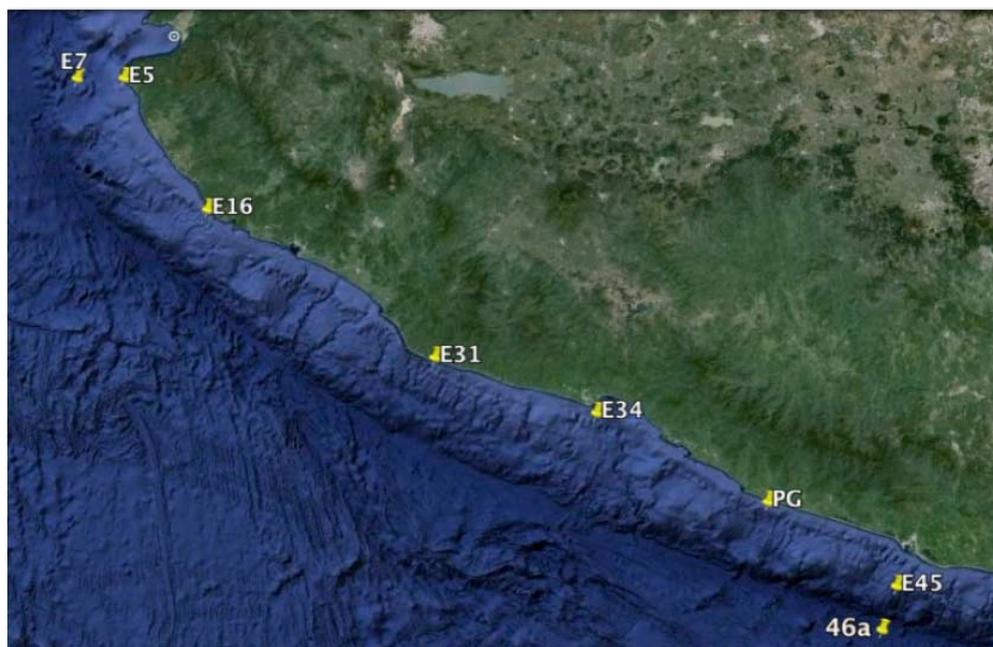


Figura 5. Mapa de las estaciones que presentan ácido domoico.

La mayor concentración de ácido domoico encontrada en la zona de estudio corresponde a la estación 31 (Maruata, Michoacán) con 0.69 ng/ml de AD, lo cual coincide con la mayor concentración de células encontradas. Se realizó un análisis de regresión lineal, el cual sugiere que a pesar de que coincide la mayor concentración de AD con la mayor concentración de células, no existe relación alguna entre estas. Por otro lado la estación 5 correspondiente a Cabo Corrientes, Jalisco arrojó la menor concentración de AD siendo 0.04 ng/ml, cabe mencionar que en ambas estaciones la especie más abundante fue *P. delicatissima*.

Cuadro 3. Abundancia de *Pseudo-nitzschia* y concentración de ácido domoico de agua de mar por estación

Muestra	Profundidad (m)	Abundancia total (Céls L ⁻¹)	Concentración de AD (ng ml ⁻¹)
E5	20	108 530	0.04
E7	31	24 211	0.20
E16	16	68 458	0.06
E31	20	329 764	0.69
E34	18	155 539	0.10
E45	38	25 881	0.33
E46a	43	25 046	0.05
EPG	5	155 282	0.17

6.2.2. Abundancia de células

La estación que alcanzó los valores más altos de abundancia del género *Pseudo-nitzschia* en este estudio es la estación 31 con un total de 329 764 Cél/L mientras que la estación con menor número de células es la 7 con 24 211 Cél/L (Cuadro 3), cabe mencionar que la primera coincide con la concentración mas alta de ácido domoico. Por otro lado, la especie mayor representada en todas estaciones es *Pseudo-nitzschia delicatissima*, seguida de *P. pungens*, *P. multistriata* y *P. brasiliiana*.

6.3. Análisis de muestras de cultivo

6.3.1. Análisis de ácido domoico (AD)

Se realizaron pruebas con muestras de cultivo para determinar cuál era el procedimiento óptimo a seguir en el procesamiento de estas muestras, debido a que el método propuesto por Vera-Ávila *et al.* (2011) está diseñado específicamente para la determinación de AD disuelto de agua de mar y tuvo que adecuarse para medir el AD disuelto y celular de cultivos. Se realizaron tres pruebas diferentes. La primera consistió en inyectar el medio acuoso de cultivo directamente en el equipo para ver si la concentración del AD disuelto era suficientemente alta y permitía identificarlo y cuantificarlo sin necesidad de concentrar. Debido a que el resultado fue negativo, se realizó la extracción en fase sólida (SPE) de la misma muestra para la concentración del AD eventualmente presente. Se obtuvo un resultado positivo para la muestra analizada, ya que en el cromatograma se observó la presencia del pico de AD. Cabe señalar que la muestra analizada en esta prueba corresponde a un cultivo de *Pseudo-nitzschia pungens*. Las otras dos pruebas se realizaron con el objeto de encontrar el método más adecuado para procesar la biomasa e identificar el AD celular. Inicialmente se pensó en separar los organismos del medio de cultivo mediante filtración, someter el filtro a maceración para romper las células y liberar al AD; por lo tanto, fue necesario realizar un estudio previo para corroborar que el material de los filtros no generara interferencias en el análisis cromatográfico. Esto se realizó probando dos diferentes filtros de 0.45 µm de abertura de poro y 47 mm de diámetro, siendo uno GF/F de fibra de vidrio y el otro Millipore de nitrocelulosa.

Se pasaron 70 ml de una solución acuosa a través de cada filtro, una vez hecho esto, se colocó cada filtro en un tubo para centrifuga de 15 ml, procediendo a macerarlo. El primero se maceró en 6 ml de agua destilada y el segundo en 1 ml de metanol agregándosele después 5 ml de agua. Ambos fueron centrifugados a 6000 rpm por 20 min recuperándose el sobrenadante, el cual fue inyectado directamente en el equipo de cromatografía (HPLC) y posteriormente se concentró en una precolumna de fase reversa polimérica y se transfirió al cromatógrafo para su análisis. El cromatograma del extracto inyectado directamente no mostró ninguna interferencia, pero una vez que éste fue concentrado se obtuvo un cromatograma con múltiples picos, algunos de los cuales podrían interferir seriamente en la identificación y cuantificación del AD. Por ello, se decidió descartar este procedimiento para la preparación del material sólido. Asimismo se concluyó que la mejor opción para el tratamiento de las muestras era someter 70 ml de cultivo total a dos periodos de congelación-descongelación para romper las células y liberar el AD celular, posteriormente fue colocado en el ultrasonido por 20 minutos para después ser filtrada con un filtro Millipore de 0.45 μm de abertura de poro y 47 mm de diámetro, el líquido filtrado fue sometido a extracción en fase sólida, para después proceder con el procedimiento del método propuesto por Vera-Ávila *et al.* (2011).

Se analizaron tres cultivos en fase exponencial de diferentes especies del género de los cuales los tres presentan concentraciones de ácido domoico disuelto y celular, siendo *P. pungens* la especie con la mayor concentración de AD disuelto, mientras que *P. brasiliiana* es la de menor concentración; por otro lado *P. multistriata* es la especie que produjo mayor cantidad de AD por célula (Cuadro 4).

Cuadro 4. Abundancia y concentración de ácido domoico de cultivos

Especie	Abundancia (Céls L ⁻¹)	Contenido celular de AD (pg Cél ⁻¹)	Concentración (ng ml ⁻¹)	
			Disuelto	Celular
<i>Pseudo-nitzschia brasiliiana</i>	65.9X10 ⁶	0.00137	0.09	0.09
<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	49X10 ⁶	0.00081	0.13	0.04
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	25.4X10 ⁶	0.00275	0.38	0.07

6.3.2. Abundancia de células de cultivos

La especie con mayor abundancia alcanzada en fase exponencial de las diferentes especies cultivadas fue *P. brasiliiana* con un total de 65.9×10^6 Cél/L, seguida de *P. pungens* y *P. multistriata* con la menor cantidad, siendo 25.4×10^6 Cél/L (Cuadro 4).

7. DISCUSIÓN

7.1. Características de las especies

Pseudo-nitzschia brasiliiana Lundholm, Hasle *et* Fryxell

P. brasiliiana fue encontrada en las estaciones 5 (Cabo Corrientes, Jalisco) y 31 (Maruata, Michoacán). En México ha sido reportada en bahía de Manzanillo y bahía de Santiago durante un monitoreo comprendido entre octubre de 2009 a diciembre de 2010 (Rivera-Vilarelle *et al.* 2013).

Pseudo-nitzschia delicatissima (Cleve) Heiden *in* Heiden *et* Kolbe

Esta especie se hizo presente en todas la estaciones muestreadas. Se ha encontrado en las costas de Baja California (Hernández-Becerril, 1998) y en el Pacífico mexicano frente a bahía de Manzanillo y bahía de Santiago en Colima; y en la Bahía de Maruata en Michoacán (Quijano-Scheggia *et al.*, 2010; Ahuja-Jiménez, 2012), puede ser cosmopolita (Hasle y Syvertsen, 1997).

Pseudo-nitzschia fraudulenta (Cleve) Hasle

P. fraudulenta se encontró en las estaciones 16 (Manzanillo, Col.), 31 (Maruata, Mich.). *P. fraudulenta* ha sido reportada a lo largo de las costas del Pacífico Mexicano por Hernández-Becerril (1998) y Hernández-Becerril *et al.* (2007), en la Bahía de Mazatlán por Gómez-Aguirre *et al.* (2004) y en Michoacán por Ahuja-Jiménez (2012).

Pseudo-nitzschia multistriata (Takano) Takano

Esta especie fue encontrada en todas las estaciones excepto en la 46a (Acapulco, Gro.). Hay reporte de esta especie en la bahía de Manzanillo y bahía de Santiago sin reporte de toxinas (Rivera-Vilarelle *et al.* 2013).

Pseudo-nitzschia pungens (Grunow *ex* Cleve) Hasle

P. pungens fue encontrada en todas las estaciones muestreadas. Se ha reportado como cosmopolita (Hasle y Syvertsen, 1997), en México ha sido reportada en el Pacífico por Hernández-Becerril (1998).

7.2. Análisis de muestras del medio natural

7.2.1. Análisis de ácido domoico (AD)

Se ha encontrado que diferentes cepas de *Pseudo-nitzschia brasiliensis* provenientes de Brasil, España y Malasia no han sido productoras de ácido domoico (Lundholm *et al.*, 2003, Quijano-Scheggia *et al.*, 2010), mientras que en la laguna de Bizerta, Túnez se registró una concentración de 0.0095 pg Cél⁻¹ (Sahraoui *et al.*, 2011).

P. delicatissima ha sido asociada a la intoxicación en mamíferos marinos y en aves por ácido domoico en Baja California (Hernández-Becerril *et al.*, 2007), por otro lado, Bates *et al.* (1998), mencionaron que en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá; se registró como productora de ácido domoico (AD) junto con otras especies del mismo género; en condiciones de cultivos aislados, sus clones produjeron 5 fg de AD por célula. Fryxell y Hasle (2003) reportaron que la prueba de detección del ácido domoico, fue positiva. Por otro lado, Lundholm *et al.* (2006), realizaron cultivos seleccionados de esta especie procedentes de Puerto Shelter, Hong Kong; Aveiro, Portugal; Dinamarca, e Italia en los cuales no detectaron la producción de AD.

Hasle (1965) reportó a *P. fraudulenta* como tóxica en Nueva Zelanda y Australia, también fue reportada por Cortes-Altamirano y Sierra-Beltrán (2008) en 2006 como una de las especies

formadoras de florecimientos algales muy densos en las costas del Golfo de California y del Pacífico Tropical Mexicano siendo productora de ácido domoico.

Por otro lado *P. multistriata* es la segunda especie con mayor producción de ácido domoico en cultivo (Orsini *et al.* 2002). En México ha sido reportada en diferentes sitios pero sin análisis de toxinas.

Pseudo-nitzschia pungens fue el agente causal de un evento tóxico que ocurrió en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, en donde esta especie fue el organismo responsable (Bates *et al.*, 1989; Hallegraeff, 1995; Hasle y Fryxell, 1995). Se han hecho diferentes estudios toxicológicos con diferentes cepas de esta especie encontrándose como positiva la producción de AD (Fryxell y Hasle, 2003).

Se cree que la producción de ácido domoico está asociada a un estrés fisiológico por la limitación en la disponibilidad de macronutrientes o micronutrientes y la forma de nitrógeno disponible para el crecimiento de los organismos, es por ello que se realizó un análisis de la relación entre nitrógeno-fosforo (NID:PO₄) y la producción de ácido domoico, todos los valores de NID:PO₄ encontrados en la zona de estudio son menores a la proporción de Redfield establecida (16.1) y no se observó una tendencia o patrón al relacionarla con las concentraciones de ácido domoico (Libes, 2009).

Actualmente en México no existen trabajos que arrojen datos específicos de concentraciones de ácido domoico disuelto en el medio natural, es por ello que el presente trabajo es de gran importancia, ya que está específicamente enfocado al potencial tóxico del género *Pseudo-nitzschia*, además abarca diferentes puntos costeros y oceánicos del Pacífico tropical mexicano.

7.3. Análisis de muestras de cultivo

7.3.1. Análisis de ácido domoico (AD)

Pseudo-nitzschia brasiliiana ha sido reportada en Túnez como productora de ácido domoico con 0.0095 pg AD Cél⁻¹ mediante la utilización de cromatografía líquida de alto desempeño-fluorenilmetil oxicarbonilo (HPLC-FMOC) (Sahraoui *et al.*, 2011), comparable a la encontrada, en este trabajo se reporta con 0.00137 pg AD Cél⁻¹ por medio de cromatografía líquida de alto desempeño- detección ultravioleta (HPLC-UV).

Pseudo-nitzschia multistriata ha sido cultivada en diferentes partes del mundo, la concentración encontrada por medio de HPLC-FMOC es 0.28 pg AD Cél⁻¹ (Amato *et al.*, 2010), además mediante la utilización de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se obtuvieron dos concentraciones, siendo 0.645 pg AD Cél⁻¹ y 0.697 pg AD Cél⁻¹ (Sarno y Dahlmann, 2000 y Orsini *et al.*, 2002), asimismo se encontró una concentración de 0.001-0.697 pg AD Cél⁻¹ en la misma cepa de cultivos provenientes del Golfo de Nápoles, Italia (Orsini *et al.*, 2011), mientras que en Nueva Zelanda se encontró una concentración de 0.04 pg AD Cél⁻¹ mediante la utilización de LC-MS (Trainer *et al.*, 2012), cabe mencionar que en el análisis de muestras que se realizó en este estudio, *P. multistriata* obtuvo una concentración de 0.00081 pg AD Cél⁻¹ por medio de HPLC-UV siendo mucho menor a la registrada por los autores mencionados.

Las concentraciones de AD celular encontradas de *Pseudo-nitzschia pungens* son 0.47 pg AD Cél⁻¹ en Nueva Zelanda por medio HPLC-UV (Rhodes *et al.*, 1996), mientras que en Estados Unidos se ha encontrado una concentración de 0.070 pg AD Cél⁻¹ por medio de HPLC-FMOC (Trainer *et al.*, 1998) y 0.018 pg AD Cél⁻¹ por medio de ensayo de unión de receptor (RBA) Baugh *et al.*, 2006, finalmente en Francia se encontró una concentración de 0.2 pg AD Cél⁻¹ por medio de HPLC-UV (Calu *et al.*, 2009). En el presente trabajo se reporta una concentración de 0.00275 pg AD Cél⁻¹ (HPLC-UV), siendo menor a la registrada por los autores mencionados.

A nivel mundial existen diferentes estudios a cerca de la toxicidad de especies de *Pseudo-nitzschia*, sobre todo de *P. australis* que es la especie que produce mas toxina. Otras especies estudiadas son *P. multiseriata*, *P. multistriata* y *P. pungens*, entre otras. Algunos autores registran que no siempre hay producción de ácido domoico en las diferentes cepas establecidas, se cree que varia de acuerdo al área geográfica de procedencia, la forma de nitrógeno disponible, pH elevado, temperaturas e irradiancia alta, esto debido al impacto en la ruta metabólica de la síntesis de este metabolito o indirectamente por la regulación de las tasas de división celular. Además se cree que a menor concentración de hierro (Fe) disponible, mayor será la concentración de la toxina, por lo tanto el Fe puede afectar el crecimiento de especies tóxicas, también se propuso que las bacterias juegan un papel importante pero no esencial en la producción de AD (Trainer *et al.*, 1998; García-Mendoza *et al.*, 2009; Santiago-Morales, 2011; Trainer *et al.*, 2012).

Es importante resaltar que *P. brasiliensis* se reporta como tóxica por segunda vez en el mundo y por primera vez en México, aportando datos de concentración de AD disuelto y AD celular, además de la abundancia celular del cultivo. Es evidente la falta de información de la toxicidad de este género y sobre todo a nivel de especie, esto quizá debido a la problemática del establecimiento de cultivo.

8. CONCLUSIONES

- Se identificaron 5 especies potencialmente tóxicas en la zona de estudio, de las cuales se logró el establecimiento de cultivo de 3 de ellas.
- Se encontró la presencia de AD disuelto en condiciones naturales de ocho de las 22 muestras de agua de mar colectadas en el área de estudio.
- *Pseudo-nitzschia multistriata* estuvo presente en siete de las ocho estaciones en las que se encontró AD disuelto.
- Se reporta a *Pseudo-nitzschia brasiliensis* en cultivo como especie tóxica por primera vez en México aportando datos de AD disuelto y celular.
- Se corrobora la producción de AD por *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia multistriata* en condiciones de cultivo. Además, fue la especie con menor concentración de AD disuelto y celular
- Se utilizó una nueva metodología para la cuantificación del ácido domoico, la cual arrojó resultados comparables con las metodologías utilizadas en otros estudios a nivel mundial.
- Cabe mencionar que el presente trabajo es el primero en México con énfasis en la producción de ácido domoico disuelto en condiciones naturales y la presencia de especies potencialmente tóxicas de *Pseudo-nitzschia*. Además que incluye estudios de toxicidad en cultivo de tres especies de este género.

9. LITERATURA CITADA

- Ahuja-Jiménez, Y. 2012. Diatomeas potencialmente nocivas de un florecimiento algal durante un ciclo nictimeral frente a la bahía de Maruata Michoacán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México
- Amato, A., L. Orsini, D. D'Alelio y M. Montresor. 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41: 542-556.
- Ayala-Torres, O.M. y P. Pacheco-Sandoval. 1991. Oceanografía física del Pacífico Tropical Mexicano, de Cabo Corrientes a la Frontera con Guatemala. En: De la Lanza-Espino, G. (Compiladora). *Oceanografía de Mares Mexicanos AGT EDITOR*. México D. F. pp 569.
- Bates, S.S., C.J. Bird, A.S.W. de Freitas, R. Foxall, M. Gilgan, L.A. Hanic, G.R. Johnson, A.W. McCulloch, P. Odense, R. Pocklington, M.A. Quilliam, P.G. Sim, J.C. Smith, D.V. Subba Rao, E.C.D. Todd, J.A. Walter y J.L.C. Wright. 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: 1203-1215.
- Baugh, K.A., J.M. Bush, B.D. Bill, K.A. Lefebvre y V.L. Trainer. 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. *Afr. J. Mar. Sci.* 28, 403-407.
- Calu, G., V. Martin-Jezequel, E. Lefau, V. Sechet, P. Lassus, P. Weigel y Z. Amzil. 2009. The influence of nitrogen speciation on growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pungens* in batch and continuous cultures. In: Lassus, P. (Ed.), 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Nantes, France, p. 7.
- Cano-Pérez, F.A. 1991. Golfo de California. Oceanografía física. En: De la Lanza E. G. (Eds.). *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT Editor, S. A., México, pp. 453-495.
- Chepurnov, V.A., D.G. Mann, K. Sabbe, K. Vannerum, G. Casteleyn, E. Verleyen, L. Peperzak y W. Vyverman. 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.
- Cusack, C.K., S.S. Bates, M.A. Quilliam, J.W. Patching y R. Raine. 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish Waters.

- J. Phycol. 38: 1106–1112.
- Edler, L. y M. Elbrächeter. 2010. The Uttermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. En: Karlson, B, C. Cusack y E. Bresnan (Eds.). Microscopic and Molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. IOC. UNESCO. pp. 114.
- Edlund, M.B. y E.F. Stoermer. 1997. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. J. Phycol. 33: 897-918.
- Evans, K.M., S.S. Bates, L.K. Medlin y P.K. Hayes. 2004. Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 40: 911-920.
- Evans, K.M., S.F. Kuhn y P.K. Hayes. 2005. High levels of genetic diversity and low levels of genetic differentiation in North Sea *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations. J. Phycol. 41: 506-514.
- Ferrario, M.E., E.A. Sar y S.E. Sala. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. En: Alveal, K., M.E. Ferrario, C. Oliveira y E. Sour (Eds.). Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción-Chile. pp. 2-20.
- Flamand-Swaner, C.L. 1991. Pacífico Tropical Mexicano. Cabo Corrientes a la frontera con Guatemala. En: De la Lanza-Espino G. (Ed.). Oceanografía de los mares Mexicanos. A. G. T. Editor S. A. México. pp. 117-149.
- Fryxell, G.A. y G.R. Hasle. 2003. Taxonomy of harmful diatoms. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds) Manual on harmful marine microalgae. UNESCO Publishing, Paris, pp 465–509
- Gárate-Lizárraga, I., C.J. Band-Schmidt, J.J. Bustillos-Guzmán y D. López-Cortés. 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (June-July 2006). Harmful Algae News, IOC-UNESCO 32: 6-7.
- García-Mendoza, E., D. Rivas, , A. Olivos-Ortiz, A. Almazán-Becerril, C. Castañeda-Vega y J.L. Peña-Manjarrez. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. Harmful Algae 8(3): 493-503.
- Garrison, D. y Walz. 1993. Toxic diatom blooms and domoic acid. Harmful Algae News. An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms. IOC-UNESCO. No. 6:5.
- GEOHAB. 2001. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms, science plan. P.

- Glibert y G. Pritcher (eds.) SCOR and IOC, Baltimore and Paris 87 pp.
- Glibert, P.M., D.M. Anderson, P. Gentien, E. Granéli y K.G. Sellner. 2005a. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18(2): 137–147.
- Glibert, P.M., S. Seitzinger, C.A. Heil, J.M. Burkholder, M.W. Parrow, L.A. Codispoti y V. Kelly. 2005b. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanography* 18(2): 198-209.
- Gómez-Aguirre, S., S. Licea y S. Gómez. 2004. Proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) y otras especies del microplancton en la Bahía de Mazatlán, México. *Revista de Biol. Trop.* 52 (Supl. 1): 69-76.
- González, M.A., O.O. Parra y A.S. Cifuentes. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. K. Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (eds.), Universidad de Concepción, Concepción, Chile: 220-239.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycol.* 32(2): 79-99.
- Hallegraeff, G. M., 1994. Species of the genus *Pseudonitzschia* in Australian waters. *Bot. mar.* 37: 397–411.
- Hallegraeff, G.M. 1995. Harmful algal blooms: A global overview, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, pp. 551.
- Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO, Paris, pp. 25-49.
- Hasle, G.R. 1965. *Nitzschia* and *Fragillariopsis* species studied in the light and electronic microscope. Universitet for Laget, Oslo. Pp 43.
- Hasle, G.R. 1993. Nomenclatural notes on marine planktonic diatoms. The family Bacillariaceae. *Nova Hedwigia, Beih.* 106: 315–321.
- Hasle, G.R. 1994. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30,1036-1039.
- Hasle G.R. y G.A. Fryxell. 1995. Taxonomy of diatoms. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds) *IOC manual on harmful marine microalgae*, IOC Manuals and Guides 33. UNESCO, Paris, pp 341–366

- Hasle, G.R. y E.E. Syvertsen, 1997. Marine Diatoms. En: Tomas, C. R. (Ed.) Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press, Inc. pp 5, 23, 304-324
- Hernández-Becerril, D.U, 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. Hydrobiol. 379:77-84
- Hernández-Becerril, D.U., 2003. Diversidad del fitoplancton marino de México: Un acercamiento actual. En: Barreiro-Güemes, M.T., M. E. Meave Del Castillo, Signoret-Poillon y M. G. Figueroa-Torres (Eds.) Planctología Mexicana. Sociedad Mexicana de Planctología, A. C. México. Cap.1:1-18.
- Hernández-Becerril, D.U. y E.M. Díaz-Almeyda, 2006. The *Nitzschia bicapitata* group, new records of the genus *Nitzschia*, and further studies on species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) from Mexican Pacific coasts. Nova Hedwigia, Beiheft 130, pp 293-306.
- Hernández-Becerril, D.U., R. Alonso-Rodríguez, C. Álvarez-Góngora, S. Barón-Campis, G. Ceballos-Corona, J. Herrera-Silveira, M.E. Meave del Castillo, N. Juárez- Ruiz, F. Merino-Virgilio, A. Morales-Blake, J.L. Ochoa, E. Orellana-Cepeda, C. Ramírez-Camarena y R. Rodríguez-Salvador. 2007. Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. J. Environ. Sci. Health, Part A 42: 1349-1363.
- Hoeck, C. van den, D.G. Mann, y H.M. Jahns. 1995. Algae An Introduction to the Phycology. Ed- Cambridge University Press, Cambridge, pp 133-152.
- Jeffrey, S.W. y M. Vesk. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigments signatures. En: Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura y S. W. Wright (Eds.). Phytoplankton pigments in Oceanography. SCOR- UNESCO. Francia, pp. 37-84.
- Jeffrey, S.W. y S.W. Wright. 1997. Qualitative and quantitative HPLC analysis of SCOR reference algal cultures. En: Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura y S. W. Wright (Eds.). Phytoplankton pigments in Oceanography. SCOR- UNESCO. Francia, pp. 343-360.
- Kaczmarska, I., M.M. LeGresley, J.L. Martin y J. Ehrman, 2005. Diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Quoddy Region of the Bay of Fundy, Canada. Harmful Algae 4 (2005) pp 1-19.
- Libes, S. 2009. Introduction of marine biogeochemistry. Elsevier Inc. Estados Unidos de America, pp. 207-219.

- Lepley, L.L., S.P. Vonder Haar, J.R., Hendrickson y G. Calderon. 1975. Circulation in the Northern Gulf of California from orbital photographs and ship investigations. *Ciencias Marinas* 2: 86-93.
- Lundholm, N. (Ed) (2015). Bacillariophyceae, in IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Available online at <http://www.marinespecies.org/HAB>. Accessed on 2015-06-10
- Lundholm, N. y Ø. Møestrup. 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis-varingica*, sp. nov. (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. *J. Phycol.* 36: 1162-1174.
- Lundholm, N., G.R. Hasle, G.A. Fryxell y P.E. Hargraves. 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliiana* and *Pseudo-nitzschia lineata*. *Phycol.* 41:480-97
- Lundholm, N., Møestrup, Ø., Hasle, G.R., Hoef-Emden, K., 2003. A study of the *P. pseudodelicatissima/cuspidata*-complex (Bacillariophyceae). What is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39: 797-813.
- Lundholm, N., Ø. Møestrup, Y. Kotaki, K. Hoef-Emden, C. Scholin y P. Miller. 2006. Inter and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *J. Phycol.* 42: 464-481.
- Mann, D.G., 1993. Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiol.* 269/270: 11- 20.
- Menard H.W. y S.M. Smith. 1966. Hypsometry 01 ocean basin provinces. *Journal Geophysical Research* 71 : 4305-4325.
- Monreal-Gómez M.A., D.A. Salas de León y J. Aldeco-Ramírez. 1999. Las surgencias costeras de América. *Geofísica* 51: 1-43.
- Moreno, J.L., S. Licea y H. Santoyo. 1996. Diatomeas del Golfo de California.- Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), México. pp 273.
- Pacheco-Sandoval, P. 1991. Oceanografía física del Pacífico Tropical Mexicano, de Cabo Corrientes a la frontera con Guatemala. En: De la Lanza-Espino (Compiladora). *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT EDITOR. México D. F. 569 pp.

- Pocklington, R., J.E. Milley, S.S. Bates, C.J. Bird, A.S.W. Freitas y M.A. Quilliam. 1990. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by highperformance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 351-368.
- Orsini, L., D. Sarno, G. Procaccini, R. Poletti, J. Dahlmann y M. Montresor. 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species, *European Journal of Phycology*, 37:2, 247-257.
- Orsini, L., G. Procaccini, D. Sarno y M. Montresor. 2004. 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.
- Quijano-Scheggia S., E. Garcés, K. Andree, P. de la Iglesia, J. Diogène, J.M. Fortuño y J. Camp. 2010. *Pseudo-nitzschia* species in the Catalan Coast: characterization and contribution to the current knowledge of genus distribution in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina* 74: 395-410.
- Quilliam, M.A. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin, In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. IOC UNESCO, Paris, pp. 247-266.
- Rhodes, L.L., D. White, M. Syhre y M. Atkinson. 1996. *Pseudonitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. In: (T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, eds) *Harmful and toxic algal blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai. pp. 155–158.
- Rhodes, L.L., J. Adamson y C. Scholin. 2000. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34:3, 463-467.
- Rivera-Vilarelle M., S. Quijano-Scheggia, A. Olivos-Ortiz, J.H. Gaviño-Rodríguez, F. Castro-Ochoa y A. Reyes-Herrera. 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Manzanillo and Santiago Bays, Colima, Mexico. *Bot. Mar.* 2013; 56(4): 357–373.
- Round, F.E., R.M. Crawford y D.G. Mann. 1990. *The Diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Great Britain. pp 747.

- Santiago-Moreno, I.S. 2011 Potencial tóxico de cepas de *Pseud-nitzschia* aisladas de la costa occidental de Baja California. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, México.
- Sarno, D. y J. Dahlmann. 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algae News* 21, 5.
- Schnetzer, A., P.E. Miller, R.A. Schaffner, B. Stauffer, B. Jones, S.B. Weisberg, P.M. Di Giacomo, W. Berelson y D.A. Caron. 2007. Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003-2004. *Harmful Algae* 6: 372-387.
- Scholin, C. 1999. A Toxic Blooms of *Pseudonitzschia australis* in Monterey Bay, California. *Harmful Algae News*. An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms. IOC-UNESCO. No. 18: 6
- Scholin, C.A., F. Gulland, G.J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F.P. Chávez, J. Cordaro, R. Sahraoui, I., S.S. Bates, D. Bouchouicha, H.H. Mabrouk y A.S. Hlaili. 2011. Toxicity of *Pseudo-nitzschia* populations from Bizerte Lagoon, Tunisia, southwest Mediterranean, and first report of domoic acid production by *P. brasiliensis*. *Diatom Res.* 26: 293–303.
- Sierra-Beltrán, A., M. Palafox-Uribe, , J. Grajales-Montiel, A. Cruz-Villacorta y J.L. Ochoa. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, México: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35(3): 447-453.
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, In: Granéli, E., Gundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M., (Ed.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 29-40.
- Trainer, V.L., N.G. Adams, B.D. Bill, B.F. Anulacion y J.C. Wekell. 1998. Concentration and dispersal of a *Pseudo-nitzschia* bloom in Penn Cove, Washington, USA. *Nat. Toxins* 6: 113–125.
- Trainer, V.L., N.G. Adams, B.D. Bill, C.M. Stehr, J.C. Wekell, P. Moeller, M. Busman y D. Woodruff. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr.* 45(8): 1818-1833.
- Trainer, V.L., S.S. Bates, N. Lundholm, A.E. Thessen, W.P. Cochlan, N.G. Adams y C.G. Trick. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14: 271–300.

- Trainer, V.L., N.G. Adams, B.D. Bill, C.M. Stehr, J.C. Wekell, P. Moeller, M. Busman y D. Woodruff. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr.* 45(8): 1818-1833.
- Tung Teng, S., H. Chang Lim.P. Teen Lim, V. Ha Dao, S.S. Bates y C. Pin Leaw. 2014. *Pseudo-nitzschia komadae* sp. nov. (Bacillaryopiceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia. *Harmful Algae* 34 (2014) 17–28.
- Vera-Ávila, L.E., D.Y. Marín-Pérez y R. Covarrubias-Herrera. 2011. Trace level determination of domoic acid in seawater by off-line/on-line solid-phase extraction coupled to HPLC-UV. *J. Mex. Chem. Soc.* 55(2), 65-71.
- Villafañe, V.E. y F.M.H. Reid. 1995. Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. K. Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira y E. Sar (eds.), Universidad de Concepción, Concepción, Chile: 169-185.
- Wright, J.L.C. y M.A. Quilliam. 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *IOC manual on harmful marine algae*, IOC manuals and guides. UNESCO, Paris, pp. 113-133.

10. ANEXO

10.1. Cromatogramas de las muestras analizadas

Cromatogramas de las estaciones donde se encontró ácido domoico, con un tiempo de retención promedio de 6.770 minutos, en rojo se representa el estándar de ácido domoico y en azul cada muestra.

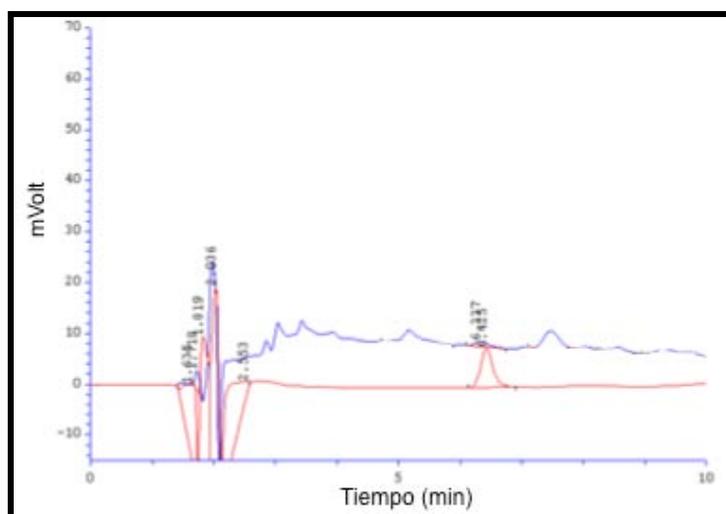


Figura 1. Cromatograma de la estación 5.

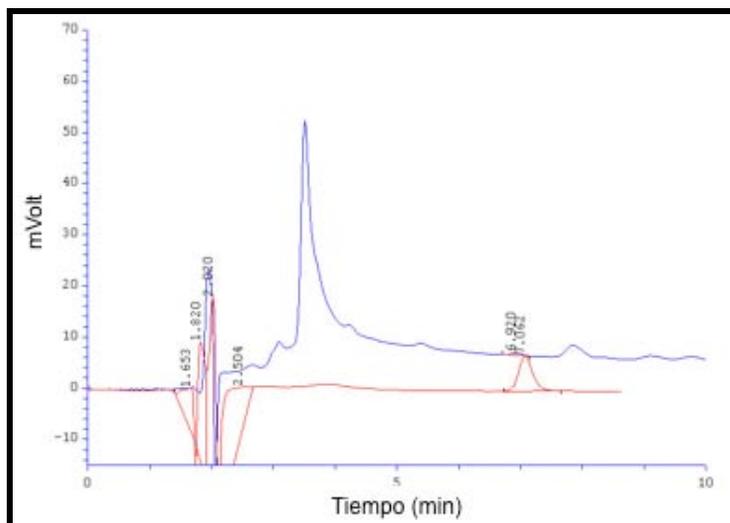


Figura 2. Cromatograma de la estación 7.

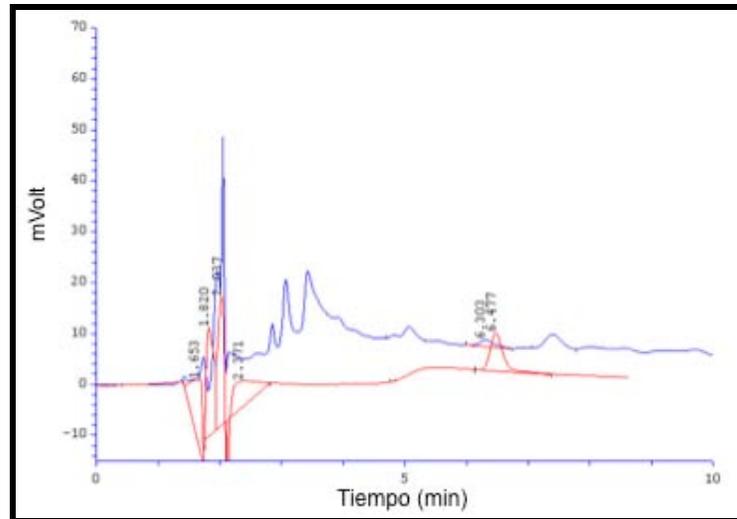


Figura 3. Cromatograma de la estación 16.

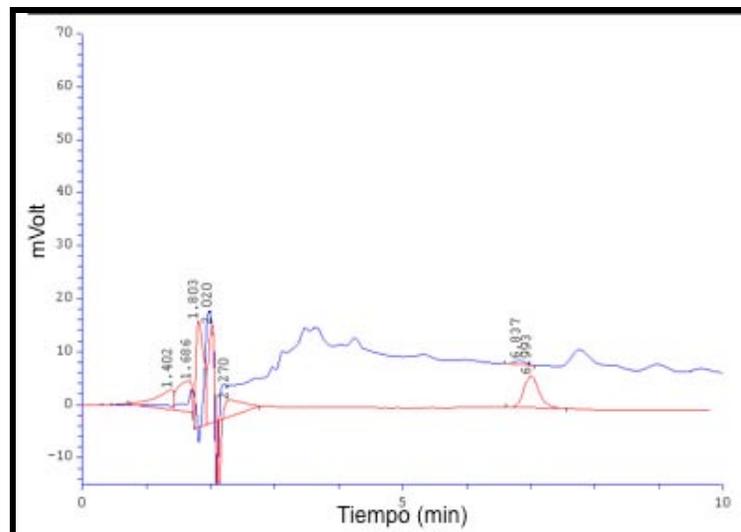


Figura 4. Cromatograma de la estación 21.

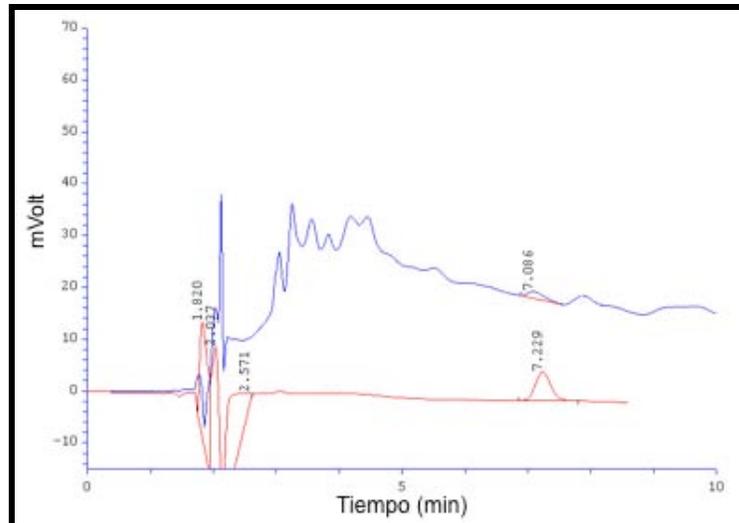


Figura 5. Cromatograma de la estación 31.

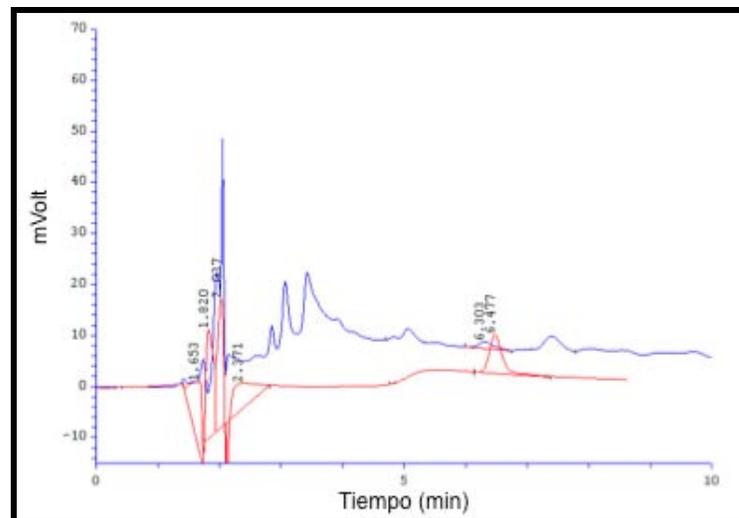


Figura 6. Cromatograma de la estación 34.

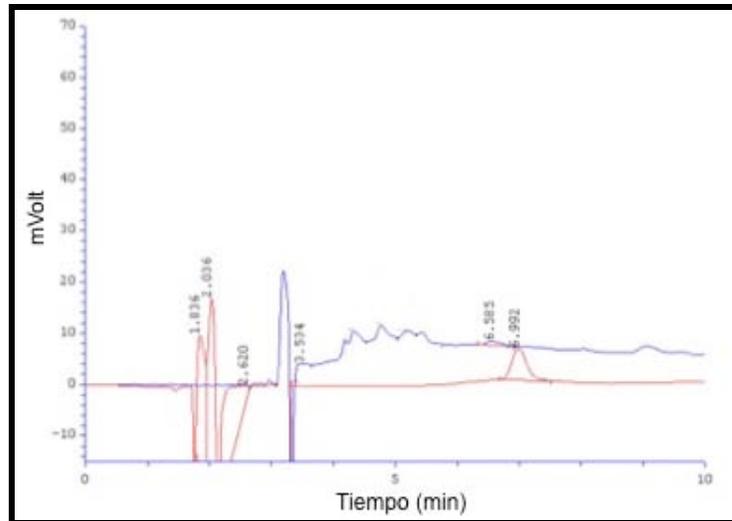


Figura 7. Cromatograma de la estación 45.

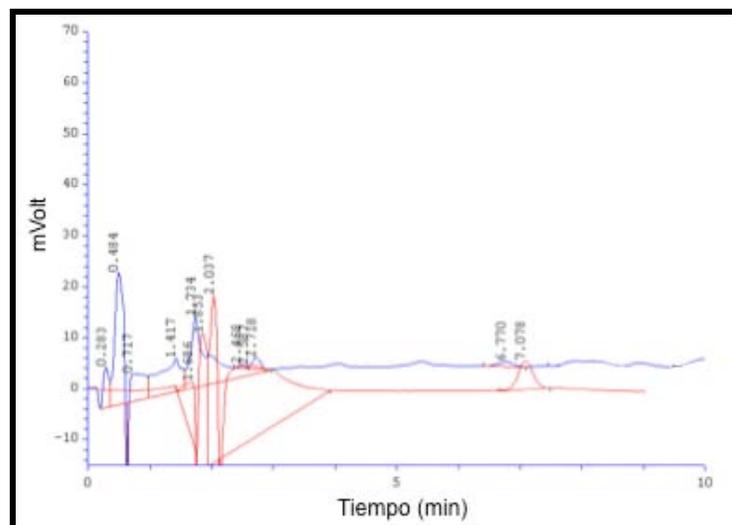


Figura 8. Cromatograma de la estación 46^a.

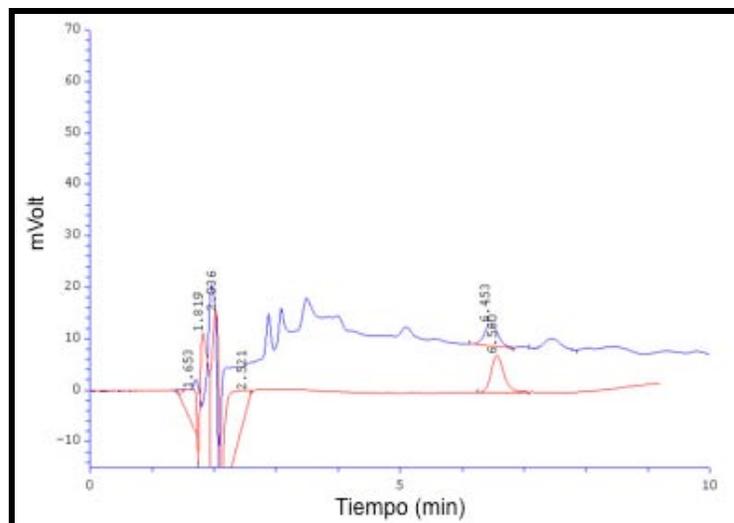


Figura 9. Cromatograma de la estación PG.

10.2. Análisis directo en tiempo real (DART)

Se realizó un estudio de análisis directo en tiempo real (DART) para corroborar la presencia de ácido domoico (AD) en las muestras analizadas, el DART es una técnica de ionización, el cual es un híbrido de impacto electrónico, ionización química y bombardeo rápido de átomos, el tratamiento previo de la muestra es mínimo y se presenta como una herramienta simple para la confirmación cualitativa de la identidad química mediante el peso molecular (Vaclavik *et al.*, 2009).

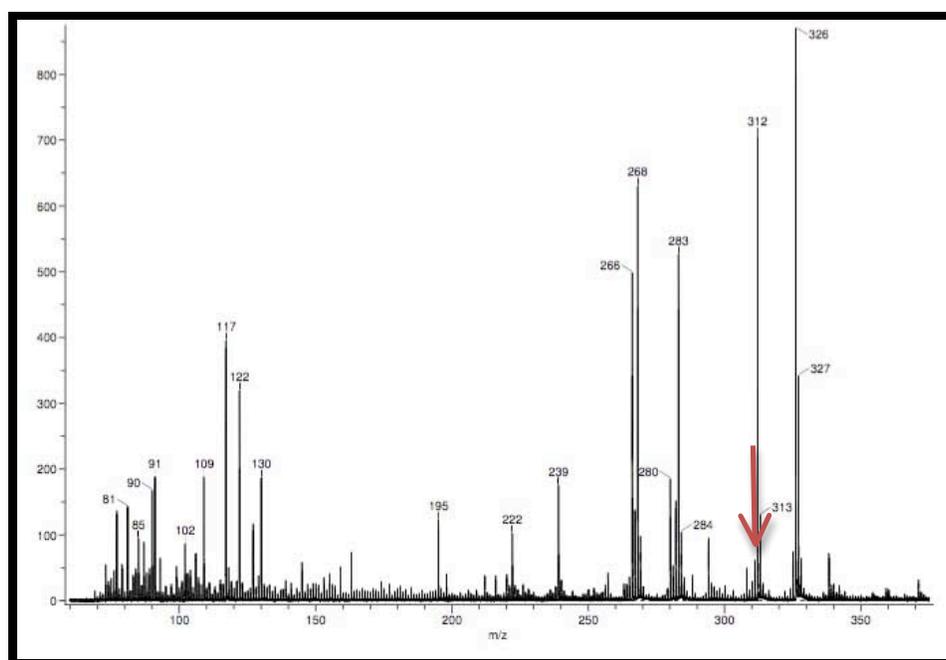


Figura 1. Espectro de estándar de ácido domoico (AD).

Es importante mencionar que el peso molecular de AD es de 311 Da. y coincide con pico correspondiente a 311, cabe mencionar que el pico es pequeño debido a la baja concentración de la muestra analizada (estándar $7.96 \mu\text{g L}^{-1}$) (Fig. 1.)

Referencia: Vaclavik, L., C. Tomas, H. Vojtech y J. Hajslova. 2009. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. *Analytica Chimica Acta* 645; 56–63