

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS DE LA VIDA
ORIENTACIÓN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Identificación de *Alexandrium ostenfeldii* como especie
productora de espirólidos y su acumulación en *Mytilus
galloprovincialis* cultivado**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Patricia Esthefanía Paredes Banda

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por
Patricia Esthefanía Paredes Banda

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Codirector del Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirector del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del Posgrado en
Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Noviembre, 2014

Resumen de la tesis que presenta Patricia Paredes Banda como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de La Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Identificación de *Alexandrium ostenfeldii* como especie productora de espirólidos y su acumulación en *Mytilus galloprovincialis* cultivado.

Resumen elaborado por:

Patricia Esthefanía Paredes Banda

Los espirólidos son compuestos poliéteres con un grupo imina en su estructura y son toxinas de acción rápida. Aunque no se encuentran reguladas, su monitoreo es importante ya que pueden interferir en los resultados de otras toxinas lipofílicas reguladas, provocando falsos positivos que conllevan a pérdidas económicas por el establecimiento de vedas innecesarias. En el 2012 se detectó al 13 desmetil espirólido C en mejillones cultivados en la Bahía de Todos Santos; sin embargo, no se pudo detectar a la especie productora de esta toxina. Por tanto, se planteó evaluar si *Alexandrium ostenfeldii*, como especie productora de espirólidos, está presente en la Bahía de Todos Santos (BTS). Para esto, se caracterizó a la comunidad fitoplanctónica en muestras de agua de superficie, de 10 m de profundidad y en muestras de red colectadas durante julio del 2013 a junio del 2014 en Rincón de Ballenas. Se examinaron las muestras por microscopía óptica mediante el método de Utermöhl. Para confirmar la presencia de *A. ostenfeldii* en las muestras de agua se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para ésta especie diseñados en la región ITS 5.8S. Asimismo, se evaluó la acumulación de espirólidos en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* cultivado en la región por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Se registró a *Alexandrium* spp. en el 44% de las muestras analizadas por microscopía. La abundancia máxima detectada fue de 3618 cél. L⁻¹ en superficie y 3586 cél. L⁻¹ a 10 m registrada el 10 de octubre del 2013. Aunque la presencia de *A. spp.* no presentó una temporalidad clara de aparición, las células de éste género se detectaron mayoritariamente cuando la temperatura superficial del mar fue de 17 a 20 °C. Por lo tanto, *A. spp.* no se presentó con abundancias mayores a 500 cél. L⁻¹ o estuvo ausente durante los meses de invierno. Los resultados de PCR confirmaron la presencia de *A. ostenfeldii* en la BTS. Se detectó a esta especie en el 52.6 % de las muestras analizadas. El mayor porcentaje de resultados positivos se detectaron en muestras de red (68.42 %). Los resultados positivos por PCR se presentaron durante casi todo el periodo de muestreo. El único análogo de espirólidos presente en mejillón fue el 13 desmetil espirólido C con una concentración máxima de 1.02 µg kg⁻¹ detectada en muestras del 10 de octubre del 2013. Durante el invierno la concentración de esta toxina estuvo por debajo del límite de detección. Los diferentes análisis realizados en el presente trabajo confirman la presencia de *A. ostenfeldii* en la BTS, lo que representa el primer registro de ésta especie en la región.

Palabras clave: ***Alexandrium ostenfeldii*, espirólidos, *Alexandrium* spp., 13 desmetil espirólido C, *Mytilus galloproviacialis*.**

Abstract of the thesis presented by Patricia Paredes Banda as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Identification of *Alexandrium ostenfeldii* as specie that produce spirolide and their acumulation in *Mytilus galloprovincialis* farmed.

Abstract by:

Patricia Esthefanía Paredes Banda

The spirolides are rapid action toxins of the polyether complex that have an imine group in its structure. Despite these toxins are not regulated, it is important to monitor them as they could interfere in the analysis and detection of other regulated lipophilic toxins, which can incur in false positive detections of other toxins used for temporarily banning certain fisheries. In 2012, the 13-desmethyl-spirolide-C was detected in farmed mussels at the Todos Santos Bay (TSB). As a result, a project was planned to assess the presence in the bay of *Alexandrium ostenfeldii*, a known producer of spirolides. For this purpose, the phytoplankton community of TSB was characterised by sampling with neuston-nets the bay waters at the surface and at a depth of 10 m. Samples were inspected with optical microscopy using the Utermöhl's method. The presence of *A. ostenfeldii* was evaluated by applying the polymerase chain reaction (PCR) method with species-specific oligonucleotides designed for the region ITS 5.8S. Furthermore, spirolides accumulation in the farmed mussel *Mytilus galloprovincialis* was assessed through liquid chromatography adapted to a tandem mass detector (HPLC-MS/MS). *Alexandrium* spp. were detected in the 44% of the analysed samples by microscopy. Maximum abundance was 3618 cell. L⁻¹ at surface and 3586 cell. L⁻¹ at 10 m deep registered on October 10th 2013. Although the presence of *A.* spp. did not show any seasonality, cells of this genus were mostly detected when sea surface temperature ranged from 17 to 20 °C. In this order, *Alexandrium* spp. abundance were less than 500 cell. L⁻¹ or absent during winter months. PCR results confirmed the presence of *A. ostenfeldii* in TSB, detected in 52.6% of the analysed samples. The biggest percentage of positive results were obtained through net sampling (68.42%). Positive results by PCR show this species presence in almost all the study period. The only spirolide found in mussels was the 13-desmethyl-spirolide-C with a maximum concentration of 1.02 µg kg⁻¹, detected on October 10th 2013. During winter, toxin concentration was below the detection threshold. Based on this results, the presence of *A. ostenfeldii* in TSB, which is the first record of this species in the region.

Keywords: *Alexandrium ostenfeldii*, spirolides, *Alexandrium* spp., 13-desmethyl-spirolide-C, *Mytilus galloproviacialis*.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mi mamá, porque ha sido su esfuerzo, su lucha y amor los que me han impulsado a seguir adelante y se la dedico a Dios porque sus bendiciones y amor de padre me han traído hasta aquí. Que sea conforme a su excelencia.

Agradecimientos

Doy gracias a mi madre porque su fe en mí jamás claudicó, aunque nadie apostaba por mí, ella jamás me abandonó y aquí están los frutos de su amor. A mi familia mis abuelitos (Agustín y Anita Luisa) a mis tíos (Washington y Martha) y mi hermana (Anita) porque me han apoyado con su cariño, con sus consejos y han celebrado mis éxitos como si fueran suyos y eso alegra mi corazón.

A mis directores, el Dr. Ernesto García Mendoza, gracias Doc por su apoyo incondicional, porque he aprendido mucho de usted, no sólo en la parte intelectual sino también personal, su ayuda y preocupación por mí y el interés en el proyecto, han hecho que el diamante en bruto tome una bonita forma. A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez gracias Doc por su ayuda y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México CONACYT, por haberme otorgado la beca, permitiéndome tener una educación de alto nivel con sus fondos.

A mis sinodales la Dra. Elizabeth Ponce, la Dra. Pilar Sánchez y la Dra. Fabiola Lafarga, gracias por haber enriquecido el trabajo con sus sugerencias y comentarios, pero sobretodo por el apoyo en la última etapa de este proyecto.

Le agradezco a la empresa Acuicultura Oceánica a los Oceanólogos Sergio Guevara Escamilla y Roger Frías por permitirme tomar las muestras dentro de su concesión y haberme apoyado tanto en la movilidad como en la disponibilidad de su personal.

Agradezco al Centro de Investigaciones Mariñas de Vilanova de Arousa – España, por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia para analizar mis muestras de toxinas. En especial al Dr. Juan Blanco, muchísimas gracias por haberme abierto las puertas de su laboratorio y de su casa, todo el conocimiento compartido, su paciencia y generosidad fueron un regalo para mi vida. Y claro a su equipo de episodios tóxicos Carmen y Helena gracias por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobretodo por su amistad.

Muchas gracias al Dr. David Rivas, por haberme prestado su CTD y haberme ayudado con la base de datos de mis parámetros físico – químicos y la donación del mapa de ubicación que sale en la presente tesis. Al Dr. Ricardo Cruz, gracias por ayudarme con la tinción de mis bichos para observarlos por epifluorescencia y por tener siempre la disponibilidad de hacerlo.

Gracias a mi compañera y amiga del laboratorio de genética funcional, Lau López sin ti todo habría sido más difícil y habría llevado muchísimo más tiempo gracias por la ayuda en el trabajo diario, por tu paciencia y conocimientos. Eres una gran amiga. Al equipo del laboratorio FICOTOX a Jennifer Mancera, Leslie, Axel, Caro, Ramón, Michelle y Yaireb, gracias porque todos pusieron un granito de arena ayudándome cuando lo necesité.

Gracias Arturo Villavicencio has sido la compañía que ha calentado mis días aquí, gracias por tu tiempo, por tu cariño, por todas las aventuras, por haberme hecho feliz, por simplemente haber estado ahí para mí.

A mis amigas Rosalinda Mejía y Monserrat Muñoz, han sido las compañeras de mis lágrimas, mis risas y mis locuras. Gracias por haberse quedado conmigo hasta el final.

A la Dra. Rufina Hernández, gracias Doc por su apoyo incondicional, le debo desde que me haya traído hasta acá, pero sobretodo que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en todo lo que podía. A su equipo de fitopatología que me echaron la mano siempre que lo necesité y me brindaron su amistad en especial a Sarita, Lupita, Habib, Marcos y Marisela.

Fausto has sido ese amigo incondicional, que siempre me supo querer y estar ahí, sé que puedo contar contigo de verdad gracias. A Rigo, aunque es poquito tiempo, eres el amigo que te hace reír mucho y peleas mucho, pero que ha estado pendiente de mí, gracias. Rupert, desde el principio siempre me estuviste ayudando en todo, gracias por tu amistad. Migue, gracias por haber estado ahí “GPS”. Yessenia, Roberto y Lau Camacho, gracias por su compañía y amistad han sido muchos momentos compartidos y mucha la ayuda que me han brindado, son una parte de esta aventura que viví aquí.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción	2
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1 Florecimientos algales nocivos	6
2.2 Espirólidos.....	8
2.3 <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	11
2.4 Cultivo de bivalvos en México	14
2.5 Taxonomía molecular.....	15
Capítulo 3. Hipótesis y objetivo	
3.1 Justificación.....	17
3.2 Hipótesis.....	18
3.3 Objetivos.....	18
3.3.1 Objetivo general	18
3.3.2 Objetivo específicos.....	18
Capítulo 4. Metodología	
4.1 Área de estudio.....	19
4.2 Evaluación de la comunidad fitoplanctónica.....	20
4.3 Identificación de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> por PCR	21
4.3.1 Protocolo extracción de ADN	21
4.3.2 Oligonucleótidos empleados.....	23
4.3.3 Amplificación por PCR	24
4.3.4 Purificación de bandas y secuenciación	26
4.3.5 Aplicación de la técnica qPCR para la determinación de dímeros de oligonucleótidos	26
4.4 Mantenimiento de la cepa de <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	28
4.5 Medición de toxinas en el mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) ...	28
Capítulo 5. Resultados	
5.1 Comunidad fitoplanctónica.....	34
5.2 Abundancia de <i>Alexandrium</i> spp. en muestras de agua	37
5.3 Temperatura	39

Tabla de contenido (continuación)

	Página
5.4 Evaluación de la presencia de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> por PCR.....	42
5.4.1 Extracciones	42
5.4.2 Estandarización de condiciones de PCR para la identificación de <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	43
5.4.3 qPCR para descartar producto inespecífico y verificar la dimerización de oligonucleótidos.....	44
5.4.4 Secuenciación.....	46
5.4.5 Resultados de las reacciones de PCR en muestras ambientales.....	47
5.5 Detección y cuantificación de toxinas.....	49
Capítulo 6. Discusiones	
6.1 Comunidad fitoplanctónica.....	56
6.2 Presencia de <i>Alexandrium</i> spp. en muestras de agua.....	58
6.3 Relación de la temperatura con la abundancia de <i>Alexandrium</i> spp.....	60
6.4 Identificación <i>Alexandrium ostenfeldii</i> por PCR punto final	61
6.5 Toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>).....	64
Capítulo 7. Conclusiones	69
Lista de referencias	70
Anexos	79

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura química de los espirólidos. En el panel A se observa la estructura básica de espirólidos que poseen un anillo de imina cíclica cerrado mientras que en el panel B, se observa el anillo de imina cíclico abierto en los espirólidos E y F. En el panel C se puede observar el anillo tri espiroquetal del espirólido G y su derivado. Tomado de Bernd <i>et al.</i> (2008).	9
2	<i>Alexandrium ostenfeldii</i> teñido con calcoflúor y observado con microscopio de epifluorescencia. Morfología de la placa 1', con un prominente poro ventral (D, E). En el panel G se observa la epiteca mostrando la conexión entre la placa del poro apical (Po) y la placa 1'. Tomado de Almandoz <i>et al.</i> (2014).	12
3	Esquema de ADNr eucariota que contiene los genes 18S, 28S, 5.8S, ITS y ETS. Tomado Gillespie <i>et al.</i> (2006).....	16
4	Batimetría de la Bahía de Todos Santos y ubicación del punto de muestreo.....	19
5	Esquema de la técnica de Utermhöl 1958	20
6	Pasos a seguir para la extracción de ADN.....	23
7	Pasos a seguir para la realización de la técnica de PCR para la identificación de <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	25
8	Esquema para la obtención del extracto metanólico utilizado en la medición de toxinas lipofílicas en el mejillón por medio de LC-MS/MS.....	29
9	Curva disociación obtenida del programa BioRad de la reacción de qPCR con el fluoróforo SYBR Green en cepas de cultivo de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> y muestras de campo.....	33
10	Variación temporal de la abundancia de dinoflagelados (panel B) y diatomeas (panel A) a 0 y 10 m de profundidad en Rincón de Ballenas durante julio del 2013 a junio del 2014. En el panel C se presenta la abundancia relativa de diatomeas y dinoflagelados en las muestras de red	36

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
11	Variación temporal de la abundancia absoluta para <i>Alexandrium</i> spp. a 0 y 10 m de profundidad en Rincón de Ballenas durante julio del 2013 a junio del 2014 (panel A) . En el panel B se presenta la abundancia relativa de <i>Alexandrium</i> spp. en las muestras de red	38
12	Perfiles de temperatura en la columna de agua para Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos. Los resultados para los meses de verano y principios de otoño se presentan en el panel A. Para otoño e invierno en el panel B, finales de invierno y principios de primavera en el panel C y finales de primavera y principios de verano en el panel D	40
13	Variación de temperatura a 0, 5 y 10 m de profundidad del Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos y variación de la abundancia de <i>Alexandrium</i> spp. en muestras de agua colectadas en superficie durante julio del 2013 a junio del 2014	41
14	Gel de agarosa del ADN extraído de muestras de 10 m (carril 1), red (carril 2,3,4) y superficie (carril 5). Colectadas en distintas fechas de muestreo.	42
15	Pruebas de estandarización de condiciones para la amplificación de un fragmento de la región ITS de 99 pb para la identificación de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> , utilizando como templado el ADN de la cepa.	44
16	Curva de disociación obtenida del programa BioRad de la reacción de qPCR con el fluoróforo SYBR Green en cepas de cultivo de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> y muestras de campo.....	45

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
17	Gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR con los oligonucleótidos AOF4, AOR3 en muestras colectadas el 8 de agosto del 2013 a 10 m (M2) y el 10 de octubre del 2013 con red (M5). Muestras de un cultivo de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> CCMP1773, control positivo (A+); agua, control negativo(A-)	46
18	Resultados de la reacción de PCR utilizando el oligonucleótido AOF4 y AOR3 en ADN extraído de la comunidad fitoplanctónica de muestras de agua colectadas en Rincón de Ballenas. La amplificación de un fragmento de 99 pb de la región ITS representa un resultado positivo de la presencia de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> en las muestras.	47
19	Concentración de toxinas lipofílicas detectadas en <i>Mytilus galloprovincialis</i> cultivado en Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos empleando la técnica de (LC-MS/MS) durante julio del 2013 a junio del 2014. Se presenta la concentración de ácido okadaico y pectenotoxinas (panel A), concentración de yesotoxinas (panel B) y concentración de azaspirácidos y gimnodiminas (panel C).....	50
20	Cromatograma del primer análisis general de los espirólidos acumulados en el mejillón mediterráneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) por LC-MS/MS	52
21	Cromatograma del segundo análisis por LC-MS/MS para la confirmación de la presencia del 13 desmetil espirólido C, del 13 – 19 didesmetil espirólido C y el espirólido B	53
22	Concentración del 13 desm SPXC acumulado en <i>M. galloprovincialis</i> colectado del 17 de julio del 2013 al 22 de junio del 2014 y su relación con la abundancia de <i>A. spp.</i> en las muestras colectadas a 10 m de profundidad. Los símbolos + (presencia) y - (ausencia) colocados sobre la abundancia, corresponde a los resultados de evaluación de la presencia de <i>A. ostenfeldii</i> por PCR. Si los resultados por PCR)......	55

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página	
23	Cromatograma del 13 desmetil espirólido C con sus transiciones características (692.501 > 164 y 692.501 > 444.30) (panel A). Espectro de las dos transiciones con un valor m/z de 164 y un m/z de 444.30 (panel B) presentes en las muestras de <i>M. galloproviencialis</i> del 12 de septiembre del 2014	88
24	Cromatograma correspondiente a los patrones utilizados para la cuantificación del 13 desm SPXC, en el panel A se observa la mayor concentración (nivel 2) del MixLipoDic 12 para las dos transiciones, primero la 692.501 > 444.30 y después la 692.501 > 164.0 con una concentración de 0.99 ng mL ⁻¹ . En el panel B se encuentra la segunda concentración (nivel 3) con 0.20 ng mL ⁻¹ de 13 desm SPX C y el panel C corresponde a la menor concentración (nivel 4) con 0.04 ng mL ⁻¹ del 13 desm SPX C.	89
25	Células de <i>Alexandrium</i> spp. vistas a 40 X con un microscopio invertido DM 13000B (Leica Microsystems). En el panel A se muestran las células vivas del organismo y en el panel B se muestran las células vacías de las muestras del 18 de julio del 2013 a 10 m de profundidad.....	90
26	Células de <i>Alexandrium</i> spp. correspondiente a la muestra de superficie del 10 de octubre del 2013, teñida con calcoflúor y vistas con un microscopio de epifluorescencia (panel A). Células de <i>A. ostendeldii</i> , de la cepa de cultivo, vista latero ventral, donde se puede distinguir el cíngulo y un prominente poro ventral, visto con un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Fluoview) (panel B).....	91
27	Esquema del ciclo de vida de <i>Alexandrium</i> spp. Tomado de Anderson <i>et al.</i> (2012).	95

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Secuencia, posición para la amplificación, tamaño del producto esperado y acceso del oligonucleótido utilizado para la amplificación de <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	24
2	Gradiente de elución utilizado para la medición de toxinas de tipo lipofílico de acuerdo a Regueiro <i>et al.</i> , (2011) con modificaciones.....	31
3	Estándares de toxinas lipofílicas indicando el proveedor donde fueron adquiridas y concentración de las soluciones patrón	31
4	Concentración final de las diferentes toxinas lipofílicas (MixLipoDic 12) a 4 niveles de concentración utilizados en la estandarización del equipo de LC-MS/MS	32
5	Método utilizado para la estandarización de espirólidos en el mejillón mediterráneo (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) donde se encuentran las transiciones de cada analito, la energía de colisión aplicada para un monitoreo de reacciones múltiples (MRM) y los tiempos de retención.....	33
6	Concentración, rendimiento total y pureza del ADN extraído en muestras de superficie, 10 m y red para distintas fechas de muestreo.....	43
7	Detección de <i>A. ostenfeldii</i> por medio de PCR en muestras de agua colectadas a 0, 10m y red	48
8	Componentes para la preparación del master mix, con la concentración final y volumen correspondiente a una reacción de 15 μ L para la identificación de <i>A. ostenfeldii</i>	81
9	Componentes para la preparación del master mix, con la concentración final y volumen correspondiente a una reacción de 10 μ L para la identificación de <i>A. ostenfeldii</i>	83
10	Método utilizado para la identificación de las distintas toxinas en muestras de mejillón (<i>M. galloprovincialis</i>) donde se muestran las transiciones de cada analito, la energía de colisión aplicada y los tiempos de retención.	84

Lista de tablas

Tabla		Página
11	Preparación de la solución madre de los distintos componentes que contiene el medio de cultivo GSe.	92
12	Componentes para la preparación del medio de cultivo GSe para <i>A. ostenfeldii</i> a un volumen final de 5 L.	93

Capítulo 1. Introducción

El fitoplancton es un grupo de microorganismos que en su mayoría son fotosintéticos y juegan un papel vital en la producción primaria de los ambientes acuáticos (Vicente *et al.*, 2005). Se han descrito aproximadamente 4000 especies marinas y se han reconocido alrededor de 60 especies con la capacidad de producir toxinas (Méndez, 2008). Las ficotoxinas (toxinas de origen vegetal) son metabolitos secundarios con diversas características químicas y aunque su función no es clara, es probable que sean sintetizadas para reducir la competencia con otras especies (alelopatía) o como mecanismo de defensa contra la depredación (Tillmann, 2007). Algunas ficotoxinas representan una amenaza para la salud pública, ya que pueden tener un efecto hemolítico, neurotóxico o enterotóxico (Méndez, 2008). La intoxicación en humanos por estos compuestos se origina principalmente por el consumo de moluscos bivalvos, ya que estos organismos acumulan toxinas en sus tejidos al alimentarse del fitoplancton y filtrar grandes volúmenes de agua (Camacho *et al.*, 2007). Por lo tanto, la presencia de ficotoxinas en moluscos bivalvos pueden afectar las actividades económicas costeras como la pesquería, acuicultura y turismo debido al cierre de las zonas de extracción y recreación turística (Lewitus *et al.*, 2012).

Las ficotoxinas se clasifican de acuerdo a su naturaleza química y propiedades físicas en hidrofílicas e hidrofóbicas (lipofílicas). En el grupo de las toxinas hidrofílicas están las toxinas de tipo amnésico (ASP) y las toxinas de tipo paralítico (PSP). Las toxinas lipofílicas son las toxinas diarreicas (DSP), yesotoxinas (YTX), azaspirácidos (AZA), pectenotoxinas (PTX), gimnodiminas (GYM), espirólidos (SPX), brevetoxinas (PbTX), maitoxinas y palitoxinas (Botana, 2014).

Las toxinas lipofílicas se dividen en 5 grupos de acuerdo a su estructura química y efectos biológicos. El bioensayo en ratón, es la prueba comunmente utilizada para la detección de toxinas lipofílicas. Éste método consiste en la extracción de la toxinas con un solvente orgánico (acetona), para luego ser evaporado, posteriormente se resuspenden las toxinas en un solución fisiológica para ser inyectada al ratón intraperitonealmente. La muerte de los animales de prueba en menos de 24 horas

indica la presencia de toxinas de tipo lipofílico a una concentración mayor a la permitida en la regulación internacional y nacional (EURLMB, 2011).

Dentro de los 5 grupos de toxinas lipofílicas está el ácido okadaico (AO) y las dinofisistoxinas (DTX) que son poliéteres ácidos que inhiben las proteínas fosfatasa y tienen un efecto diarreico en mamíferos. Estas toxinas han causado importantes casos de intoxicación en humanos en diferentes partes del mundo y especialmente en países de Europa y Asia, por lo que se encuentran reguladas. Las pectenotoxinas (PTX) son hepatotóxicas en el ratón y las yesotoxinas son cardiotoxicas en el ratón; sin embargo, hasta la fecha no han sido asociadas con intoxicaciones en humanos (Trainer *et al.*, 2013). Los azaspirácidos provocan una sintomatología muy similar a la intoxicación por consumo de toxinas diarreicas (DSP) y también se encuentran reguladas (Lawrence *et al.*, 2011). Las iminas cíclicas son otro grupo de toxinas lipofílicas y están comprendidas por los espirólidos y las gimnodiminas que son compuestos macrocíclicos con un grupo imina en su estructura y son toxinas de acción rápida ya que provocan una muerte rápida en el ratón al ser administradas por vía intraperitoneal (i.p). Aun cuando los ratones son muy susceptibles a éste tipo de toxinas, no se ha documentado casos de intoxicación en humanos asociados al consumo de éstas toxinas, por lo que no se encuentran reguladas (Mackinnon *et al.*, 2006).

Los espirólidos son compuestos poliéteres que contienen un grupo espiro unido a éteres tricíclicos. La toxicidad de los espirólidos fue detectada por primera vez en 1995 durante un monitoreo de biotoxinas en moluscos en Nueva Escocia (Canadá) al presentarse una muerte rápida inusual en los ratones al administrar un extracto lipofílico (i.p.) de mejillones (*Mytilus edulis*) y vieiras (*Placopecten magellanicus*). Esto evidenció una toxicidad elevada de los espirólidos en los organismos y fue hasta el año 2000 que se identificó a *Alexandrium ostenfeldii* como organismo productor de ésta toxina (Cembella *et al.*, 2000). Los espirólidos no se consideran en las regulaciones sanitarias ya que no se ha comprobado que exista un efecto nocivo en humanos y por lo tanto, no existen reportes de intoxicaciones asociadas (Otero *et al.*, 2011). El blanco principal de éstas toxinas son los receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) y actúan como un antagonista irreversible del receptor acetilcolina muscarínico, activando la transmembrana del canal de calcio de tipo L en mamíferos (Meilert y Brimble, 2006).

Los espirólidos son coextraídos con toxinas reguladas como el ácido okadaico, las yesotoxinas y los azaspirácidos, por lo que pueden interferir en los resultados por bioensayo en ratón, ocasionando falsos positivos (Trainer *et al.*, 2013).

En el año 2012 se implementaron tres vedas sanitarias en la Bahía de Todos Santos, debido a la presencia de toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en el área de Rincón de Ballenas. Se detectaron 5 grupos diferentes de toxinas lipofílicas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrofotómetro de masas en tándem (LC-MS/MS). Se detectó la presencia del 13 desmetil espirólido C (13desmSPXC) durante casi todo el año, sin observarse una temporalidad de aparición de ésta toxina (Sánchez Bravo, 2013). Asimismo, se detectaron gimnodiminas de julio a noviembre y las yesotoxinas fueron el segundo grupo de toxinas de tipo lipofílico con mayor concentración después del AO. Estas toxinas se detectaron principalmente entre julio y agosto (Sánchez Bravo, 2013). Se identificó al agente causal de la presencia de AO en los mejillones (*Dinophysis fortii* y *D. acuminata*), sin embargo no se detectaron las especies productoras de los otros tipos de toxinas lipofílicas (Sánchez Bravo, 2013).

La cuantificación de las ficotoxinas es fundamental en moluscos bivalvos para certificar su inocuidad. Asimismo, el monitoreo de la comunidad fitoplanctónica es necesario para identificar la presencia de especies potencialmente tóxicas como una medida de alerta temprana y para evaluar la evolución de un florecimiento algal nocivo. Por otra parte, el monitoreo de las condiciones ambientales ayuda a reconocer los factores que favorecen el incremento poblacional de especies tóxicas.

La detección de microalgas nocivas se realiza generalmente mediante microscopía óptica, identificándose a las especies por sus características morfológicas. Este procedimiento lleva mucho tiempo y requiere de un alto nivel de conocimiento y experiencia taxonómica, limitando así el número de muestras que pueden ser analizadas por día (Penna y Galluzzi, 2013). Las herramientas moleculares han ayudado a detectar la presencia de microalgas tóxicas en muestras ambientales ya que tienen la ventaja de ser metodologías con una alta especificidad y sensibilidad en la identificación de especies tóxicas (Penna *et al.*, 2007).

La falta en la identificación de la especie productora del 13 desmetil espirólido C en las muestras de mejillón cultivado en la Bahía de Todos Santos pudo estar asociada a la complejidad en la identificación de los dinoflagelados productores de ésta toxina. *Alexandrium ostenfeldii* es la especie responsable de la acumulación de espirólidos en moluscos bivalvos en diferentes partes del mundo (Cembella *et al.*, 2000b; Touzet *et al.*, 2008; Kremp *et al.*, 2009). *A. ostenfeldii* no ha sido registrado en la región, por lo que es necesario identificar si está presente en la Bahía de Todos Santos y si es el agente causal de la presencia de los espirólidos en los moluscos bivalvos. Por este motivo, en el presente estudio se empleó la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de agua utilizando oligonucleótidos específicos para *A. ostenfeldii* diseñado en la región ITS 5.8S. Los resultados de la técnica molecular se contrastaron con los resultados del análisis de agua por medio de microscopia y con la cuantificación de la concentración de toxinas de tipo lipofílico en mejillón. La comparación de diferentes técnicas permitirá determinar si *A. ostenfeldii* está presente en la bahía, lo que representaría un registro nuevo de ésta especie en la región.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Florecimientos Algales Nocivos

El fitoplancton es un grupo de organismos unicelulares, suspendidos en la columna de agua, son productores primarios en ambientes marinos o dulce acuícolas, con una locomoción limitada. Un florecimiento algal, es la acumulación de éstos organismos en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Un florecimiento algal nocivo está caracterizado por tener un efecto perjudicial en plantas, animales o humanos debido a ésta acumulación (Epstein, 1998).

Estudios recientes indican que la prevalencia de estos florecimientos y su impacto en el ambiente han aumentado en la última década (Lewitus *et al.*, 2012). A lo largo de las costas del Pacífico de Norte América desde Alaska hasta México, los florecimientos algales nocivos (FAN) han afectado a los recursos naturales y han causado pérdidas económicas; así como brotes de intoxicación y muertes humanas (Lewitus *et al.*, 2012). Los impactos producidos por los florecimientos algales nocivos en las costas de California, están relacionados con la destrucción de ecosistemas costeros, la pérdida económica asociada a las vedas de los recursos pesqueros, enfermedad y muerte de poblaciones de especies marinas; así como una amenaza para la salud humana debido al consumo de las toxinas. En Estados Unidos el impacto económico estimado de un evento de florecimiento algal nocivo es de 82 millones de dólares por año y sólo un FAN puede costar 10 millones de dólares (NCCOS, 2014)

En México los FAN son eventos comunes, tanto en la costas del Pacífico, Golfo de California como en el Golfo de México y el Caribe, los cuales han incrementado sustancialmente en los últimos 20 años (Band-Schmidt *et al.*, 2011). El aumento de registros puede atribuirse por una parte, al incremento en la capacidad de monitoreo costero ó por otra parte, a los cambios en los ecosistemas, sean éstos de origen natural y/o antropogénico como eutrofización, calentamiento global, transporte de organismos, deterioro del ambiente costero, incremento de actividades de acuicultura, uso de fertilizantes para la agricultura, entre otros (Band-Schmidt *et al.*, 2011).

Las especies fitoplanctónicas tóxicas que han sido registradas para el norte del Pacífico mexicano, así como para el Golfo de California son: *A. spp.*, *A. caetenella*, *A. tamarense*, pero éstas no han formado florecimientos algales (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998; Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008; Pérez-Cruz *et al.*, 2010). Especies de *Dinophysis spp.* pueden provocar intoxicación en humanos por el consumo de mariscos contaminados con toxinas de tipo diarreico (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008; Hernández-Becerril *et al.*, 2003; García-Mendoza *et al.*, 2014). *Protoceratium reticulatum* también ha sido registrado en el Golfo de California como una especie que puede producir yesotoxinas (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006; Gilmartin y Revelante, 1978). Específicamente en la Bahía de Todos Santos, los florecimientos de *Lingulodinium polyedrum* son un fenómeno recurrente que puede cubrir toda el área de la bahía (Peña-Manjarrez *et al.*, 2005).

Las toxinas paralizantes (PSP) son el síndrome tóxico más importante en México asociados a los FANS. Es así que sólo los florecimientos de *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamenses var. compressum* han sido asociados con muertes humanas por el consumo de mariscos contaminados (Ochoa *et al.*, 2002). Otra especie potencialmente tóxica que provocó florecimientos en la Bahía de Todos Santos, durante el 2007 fue *Pseudo-nitzschia australis* con una detección de 0.86 ppm de ácido domoico (AD) en material particulado (García-Mendoza *et al.*, 2009), no se registraron efectos biológicos adversos en el ambiente durante este evento (Lewitus *et al.*, 2012). Éstas toxinas amnésicas (AD) han ocasionado mortalidades masivas de aves marinas y mamíferos marinos en varios lugares de la costa este del Golfo de California, éste evento fue registrado en el reporte técnico realizado por la SEMARNAP (antigua Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales) (SEMARNAP-PROFEPA, 1997).

Debido a los impactos producidos por los florecimientos algales nocivos, varios países cuentan con planes de monitoreo, sistemas de prevención y regulación para salvaguardar la salud pública. En México, las toxinas diarreicas se monitorean desde el 2009 y la primeras vedas sanitarias asociadas a la presencia de este tipo de toxinas se implementaron en la región de Baja California en marzo y diciembre del 2010 (Lewitus *et al.*, 2012). Estas acciones sanitarias se implementaron al presentarse resultados positivos por bioensayo en ratón para ácido okadaico en pruebas realizadas por la Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), que es el

órgano gubernamental designado para el control y fomento sanitario en México. En el 2011 se establece en la normativa nacional (NOM-SSA1-242-2009) la concentración de 160 µg de ácido okadaico por kg de molusco como límite máximo permisible. Las pruebas para la detección de las toxinas lipofílicas en el país se realizan por medio del bioensayo en ratón (Secretaría de Salud, 2011).

2.2 Espirólidos

Los espirólidos son iminas macrocíclicas que fueron aisladas y caracterizadas por primera vez en 1995 en Nueva Escocia, Canadá de un extracto metanólico de glándulas digestivas de mejillones (*M. edulis*) y vieiras (*P. magellanicus*) (Hu *et al.*, 1995). Posteriormente en el 2000, se identificó a *A. ostentfeldii* como organismo productor de los espirólidos (Cembella *et al.*, 2000a). Los espirólidos se han registrado en Estados Unidos (Golfo de Maine) (Anderson *et al.*, 2005), Escocia (John *et al.*, 2003), Noruega (Aasen *et al.*, 2005), España (Villar González *et al.*, 2006), Dinamarca (Mackinnon *et al.*, 2006), Francia (Amzil *et al.*, 2007), Italia (Ciminiello *et al.*, 2006) y Chile (Álvarez *et al.*, 2010).

Se han aislado 14 clases de espirólidos tanto en los cultivos de *A. ostentfeldii* y *A. peruvianum* como en extractos de moluscos. Químicamente son compuestos poliéteres que contienen un grupo espiro unido a éteres tricíclicos. Las clases principales de espirólidos se dividen en A, B, C y D (Fig. 1A). Del espirólido C y D se derivan el 13 desmetil espirólido C, el 13, 19-didesmetil espirólido C y el 13 desmetil espirólido D y su análogo hidroxilado el 27 hidroxil-13, 19 didesmetil espirólido C. Adicionalmente están los espirólidos E y F (Fig. 1B) que contienen el mismo anillo poliéter en su estructura pero carecen de la imina cíclica. Por el contrario el espirólido G y su variante, el 20 metil espirólido G (Fig. 1C), tienen intacto el anillo de la imina cíclica pero contienen un inusual sistema de anillo tri espiroquetal que no se había observado antes en otras toxinas marinas (Mackinnon *et al.*, 2006)

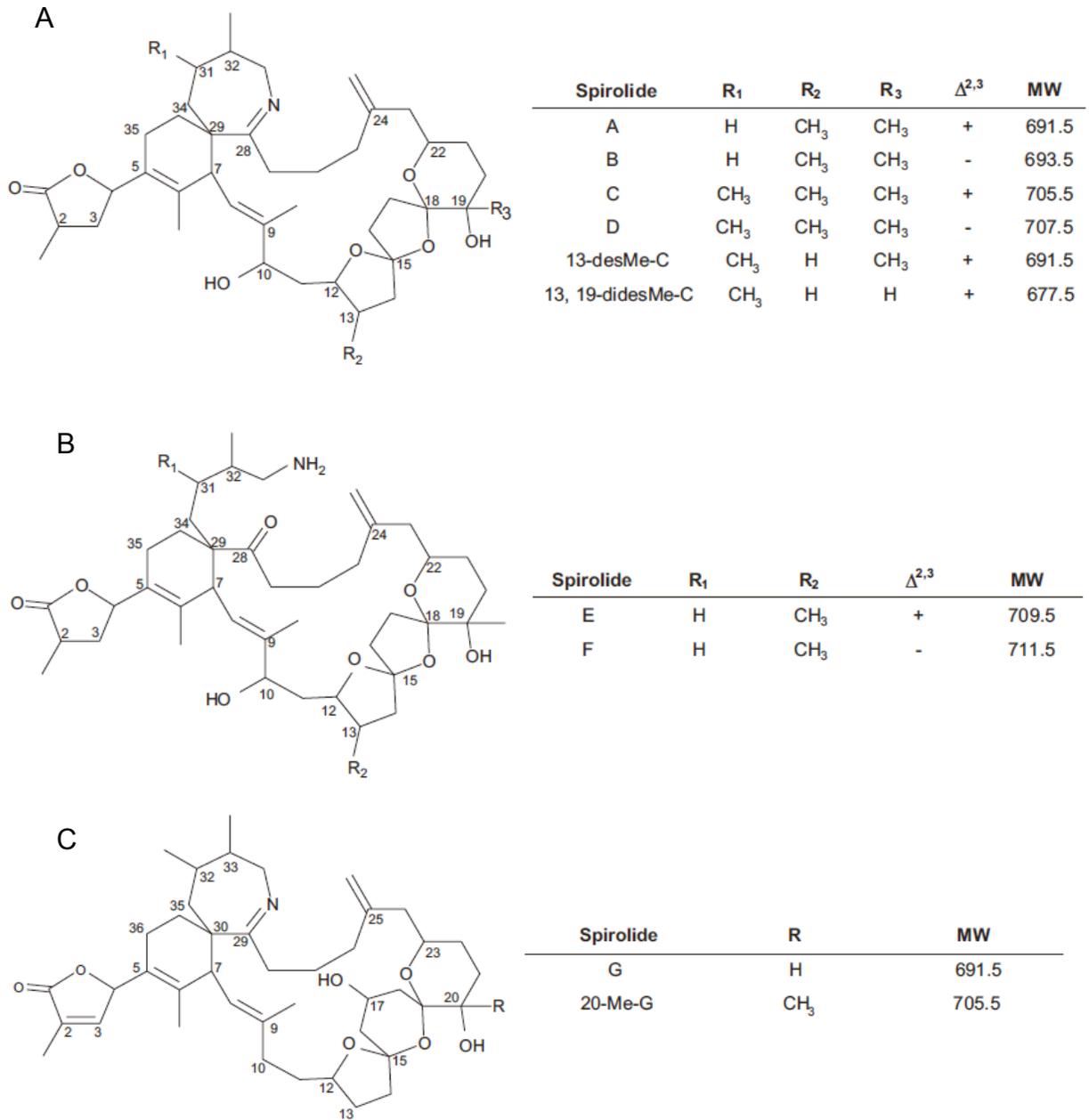


Figura 1. Estructura química de los espirólidos. En el panel A se observa la estructura básica de espirólidos que poseen un anillo de imina cíclica cerrado mientras que en el panel B, se observa el anillo de imina cíclico abierto en los espirólidos E y F. En el panel C se puede observar el anillo tri espiroquetal del espirólido G y su derivado. Tomado de Bernd *et al.*, (2008).

Se ha observado que ciertos espirólidos poseen la característica de ser toxinas de acción rápida (FAT) debido a la rapidez en la aparición de síntomas neurológicos que provoca la muerte rápida en el ratón. Sin embargo, no todos los espirólidos presentan ésta característica. Está propiedad es atribuida a la existencia del grupo imina en la estructura del espirólido, sugiriendo que éste grupo es esencial para que exista una actividad biológica. Por ejemplo, los espirólidos E y F son biológicamente inactivos y se

ha determinado que son compuestos derivados de la hidrólisis del anillo imina, convirtiéndolo en una cetoamina de los espirólidos A y B (Hu *et al.*, 1996). No se han encontrado trazas de éste tipo de compuestos en ninguna cepa o muestras de campo de *A. ostenfeldii* o *A. peruvianum*, pero sí se han detectado en los extractos de moluscos bivalvos, lo que sugiere que son productos hidrolizados formados en éstos organismos (Hu *et al.*, 1996; Cembella *et al.*, 1998).

La estabilidad de la imina cíclica a la hidrólisis ácida y enzimática podría estar involucrada con la toxicidad oral que poseen los espirólidos. Por lo tanto, es posible que los espirólidos C y D que contienen un grupo metil extra en el anillo de la imina sean resistentes a la hidrólisis con ácido oxálico comparados con los espirólidos A y B que en las mismas condiciones, se convierten en espirólidos cetoamina inactivos E y F (Hu *et al.*, 1996). Otros tres tipos de espirólidos poseen dos grupos metil cercanos al séptimo anillo, el 13-desmetil espirólido C, el espirólido G y su derivado el 20 metil espirólido G (Mackinnon *et al.*, 2006; Aasen *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Munday *et al.*, (2012) se determinó que la dosis letal media para el 13-desmetil espirólido C y el 20 metil espirólido G fue similar con 6.9 a 8.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, mientras que para el espirólido A fue aproximadamente 5 veces menor y para el espirólido B 13 veces menor. Los síntomas de intoxicación en ratón fueron los mismos para todos los espirólidos y sus derivados. En dosis letales los animales inmediatamente se vuelven hiperactivos, con movimientos inestables, sus patas traseras se extienden parcialmente y posteriormente los animales quedan postrados. La tasa de respiración disminuye progresivamente con jadeos ocasionales hasta que la respiración cesa por completo. Antes de que ocurra la muerte se observaron movimientos rápidos en las patas traseras y exoftalmo (proyección o salida hacia fuera del globo ocular) severo. El tiempo de muerte se produjo entre los 3 a 20 minutos después de administrar la inyección (i.p) o la alimentación forzada. Sin embargo en dosis subletales la recuperación fue rápida sin efectos perceptibles a largo plazo, lo que sugiere que la detoxificación o excreción de los espirólidos es rápida (Munday *et al.*, 2012).

A pesar de la alta toxicidad observada en ratón, los espirólidos no se encuentran regulados ya que no existe evidencia suficiente que permita asociar el consumo de espirólidos a intoxicaciones en humanos. Sin embargo, en Nueva Escocia individuos que consumieron mariscos durante un evento donde los espirólidos estuvieron presentes, mostraron molestias gástricas y taquicardia, sin embargo esto no pudo ser atribuido de manera definitiva a la presencia de éstas toxinas (Munday *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de estas toxinas es desconocido así como el entendimiento de su metabolismo en los humanos, lo que nos da una percepción de una aparente mínima toxicidad. En el estudio realizado por Munday *et al.*, (2012) usando un modelo celular de neuroblastoma humano el 13 desmetil espirólido C, mostró tener una actividad dirigida en los receptores muscárinicos-acetilcolina.

2.3 *Alexandrium ostenfeldii*

Es un dinoflagelado mixótrofo productor de espirólidos, con un tamaño celular de 40 a 56 μm de longitud y un diámetro de 40 a 50 μm . Las células presentan una apariencia globosa, tanto la epiteca como la hipoteca poseen márgenes ligeramente redondeados y la mayoría de éstas contienen vacuolas alimenticias (Almandoz *et al.*, 2014). El cíngulo es poco profundo y ligeramente desplazado. La primera placa apical (1') es estrecha y alargada y está dispuesta en dos segmentos rectos con un poro ventral prominente localizado en el punto de inflexión (Fig. 2D). La placa sulcal anterior (s.a) es aproximadamente tan larga como ancha y usualmente en forma triangular (Fig. 2E). La placa precingular 6'' es más ancha que larga, la placa del poro apical es mayoritariamente ocupada por una gran coma (Fig. 2G) (Almandoz *et al.*, 2014).

A. ostenfeldii fue descrito por primera vez por (Paulsen) (Balech y Tangen, 1985) en Islandia. Se pensaba que *A. ostenfeldii* era un organismos exclusivo de aguas frías y fue considerada una especie del "Boreal-Ártico", pero ahora se conoce que también está presente en aguas templadas del planeta (Gribble *et al.*, 2005).

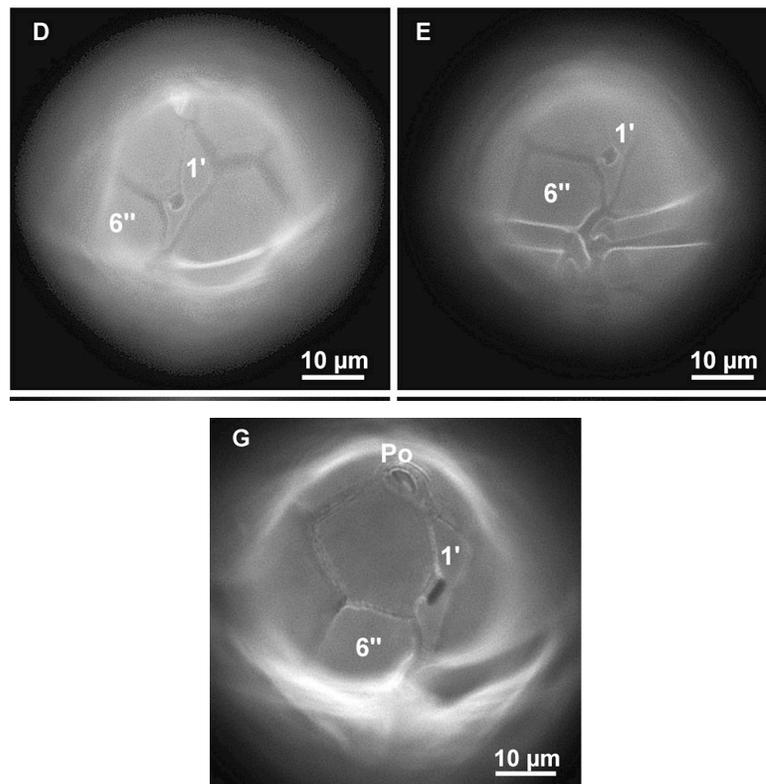


Figura 2. *A. ostenfeldii* teñido con calcoflúor y observado con microscopio de epifluorescencia. Morfología de la placa 1', con un prominente poro ventral (D, E). En el panel G se observa la epitheca mostrando la conexión entre la placa del poro apical (Po) y la placa 1'. Tomado de Almandoz *et al.* (2014).

Alexandrium spp. generalmente constituye un componente menor de la comunidad fitoplanctónica marina de las costas de California o esta ausente. Se ha detectado en 3500 muestras de un total de 24000 muestras colectadas dentro del programa de monitoreo del Departamento de Salud Pública de California (CDH) realizado desde 1993. Cuando estuvo presente, en el 93% de las muestras, *Alexandrium* spp. representó menos del 10% del ensamblaje fitoplanctónico y en el 55% de las observaciones obtuvo una abundancia relativa menor al 1% (datos de CDH). Los florecimientos algales de ésta especie son poco comunes en las costas de California, con un sólo evento visible del florecimiento de *A. spp.* registrado en Drakes Bay en julio de 1991 (Langlois, 2001).

Hay muy poca evidencia que sustente que los factores antropogénicos son promotores de los florecimientos de *Alexandrium* spp. En general los florecimientos ocurren cuando la temperatura superficial del agua aumenta, y se presenta una estratificación en la columna de agua. En California, los florecimientos son más intensos en estaciones

secas y al parecer empiezan afuera de la costa y son transportados hacia la costas cuando la surgencia provocada por los vientos se disipa (Langlois y Smith, 2001; Anderson *et al.*, 2008). En la actualidad, no se conoce el efecto de los pulsos de nutrientes locales en la estimulación de los florecimientos de *Alexandrium* spp (Lewitus *et al.*, 2012).

Existen dos escenarios posibles para la aparición de ésta especie en las costas de California. El primero es que puede ser transportado con aguas calientes que vienen costa afuera y se mueven hacia las costas bajo condiciones calmadas, provocando un florecimiento si el número de células transportadas es alto. El segundo escenario es la presencia de quistes resistentes de *Alexandrium* spp en sedimentos que bajo condiciones favorables pueden convertirse en células vegetativas (Langlois y Smith, 2001; Anderson *et al.*, 2008).

De las más de 30 especies de *Alexandrium* descritas, sólo *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* han sido identificados como productores de espirólidos (Cembella *et al.*, 2000a). *A. ostenfeldii* tiene un amplio rango de distribución, ha sido encontrado en Dinamarca (Moestrup y Hansen, 1988), Escocia (John *et al.*, 2003), Noruega (Balech y Tangen, 1985), España (Fraga y Sánchez, 1985), en Canadá y Estados Unidos (costa Atlántica) (Cembella *et al.*, 2000b; Gribble *et al.*, 2005), Suecia (Kremp *et al.*, 2009), Argentina (Almandoz *et al.*, 2014) y existe un reporte realizado para el Pacífico mexicano en las costas de Michoacán (Ceballos–Corona, 1988); sin embargo, según Okolodkov, (2004) éste reporte no es seguro, ya que pudo ser fácilmente confundido con *A. peruvianum* que es una especie que sí ha producido florecimientos en las costas de Mazatlán.

A. ostenfeldii y *A. peruvianum* son especies morfológicamente muy similares pero se diferencian principalmente por la forma de la teca 10 y de la placa sulcal anterior. Sin embargo, existe una alta variabilidad en la forma de estas dos tecas observadas tanto en poblacionales naturales como en cultivos de cepas aisladas de diferentes localidades (Lim *et al.*, 2005; Touzet *et al.*, 2008; Gu, 2011) lo que dificulta la identificación entre estos dos organismos. Estudios moleculares sugieren que *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* podrían representar a especies complejas con una

considerable diversidad críptica o especies con una única estructura genética y que presentan una alta variación morfológica (Kremp *et al.*, 2009).

Como otras especies de *Alexandrium*, *A. ostenfeldii* puede producir toxinas paralizantes (PSP) además de espirólidos. Se ha visto que los perfiles toxicológicos así como la toxicidad puede variar ampliamente según el tipo de cepa y la localidad geográfica donde se encuentran (Hansen *et al.*, 1992; MacKenzie *et al.*, 1996). Es así que organismos de *A. ostenfeldii* colectados en Dinamarca producen saxitoxinas y sus derivados de baja potencia (Hansen *et al.*, 1992) mientras que aquellas cepas de Nueva Zelanda producen niveles más altos de saxitoxina (MacKenzie *et al.*, 1996) y poblaciones del Atlántico Norte como Escocia no producen PSP sino espirólidos (Cembella *et al.*, 2000b).

2.4 Cultivo de bivalvos en México

En México la acuicultura de bivalvos se realiza casi exclusivamente en las costas del Pacífico de Baja California y en el Golfo de California, ocupando el cuarto lugar en América Latina después de Chile, Brasil y Perú. La mayor producción es prácticamente de ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y en menor grado de ostión de placer (*C. corteziensis*), mejillón (*M. galloprovincialis*), almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) y la ostra perlera (*Pteria sterna*) (Martínez, 2008).

La costa oeste de Baja California es una zona de alta productividad primaria, por tanto es una región con un alto potencial para el cultivo de moluscos filtradores, por lo que es el primer productor de moluscos bivalvos en México (Maeda Martínez, 2008). En el año 2013, se produjeron 150.3 toneladas de *M. galloprovincialis* (mejillón mediterráneo) y 1249.5 toneladas de *C. gigas* (ostión japonés) (CESAIBC, 2013). La Bahía de Todos Santos en Ensenada, Baja California, México es una zona certificada sanitariamente para la exportación de *M. galloprovincialis* (mejillón mediterráneo) donde el 70% de la producción se exporta a Estados Unidos y el resto es para consumo local de Baja California (CESAIBC, 2013). La empresa Acuicultura Oceánica, S. de R.L., es una de las empresas encargadas de cultivar el mejillón mediterráneo en la Bahía de Todos Santos mediante el uso de líneas largas sumergidas (Maeda Martínez, 2008).

En México no existen reportes de florecimientos algales nocivos producidos por *A. ostefeldii* y tampoco se ha asociado la presencia de la especie a pérdidas económicas en el sector acuícola. Sin embargo como se cita en el documento algunas cepas de *A. ostefeldii* son productoras de toxinas paralizantes (PSP), por tanto es necesario un monitoreo continuo de la especie.

2.5 Taxonomía Molecular

Como una respuesta al incremento en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de los florecimientos algales nocivos se han establecido programas de monitoreo a nivel mundial de especies productoras de toxinas. Conjuntamente con esto, se han desarrollado y mejorado métodos para la identificación y cuantificación de éstas especies. El método tradicional para esto, se basa en la examinación de características morfológicas usando un microscopio de luz o microscopia electrónica de barrido. Sin embargo, el tiempo que se debe emplear para éste análisis es muy extenso y se requiere un experto en taxonomía para poder discriminar entre especies estrechamente relacionadas (Richlen y Barber, 2005), especies crípticas, especies con difícil identificación de su morfotipo (Penna y Galluzi, 2013). Además como éste análisis consume un tiempo considerable, limita el número de muestras que se pueden analizar. Por tanto se reduce dramáticamente una rápida identificación de especies con potencial nocivo (Penna y Galluzi, 2013).

Los métodos moleculares están siendo empleados para la detección y cuantificación de especies tóxicas (Scholin y Anderson, 1998; Godhe *et al.*, 2002). Asimismo, se usan para investigar relaciones filogenéticas y de evolución de las especies. Por otro lado, se han usado marcadores moleculares para distinguir entre cepas tóxicas y no tóxicas (Richlen y Barber, 2005). El reto de la investigación de algas nocivas con el empleo de técnicas moleculares, es que éstas técnicas puedan analizar muestras ambientales y que sean capaces de detectar un mínimo número de células (Richlen y Barber, 2005).

El objetivo de utilizar éste tipo de métodos moleculares que son más rápidos en la detección específica y precisa de especies nocivas es que puedan ser incluidos dentro de los programas de monitoreo como un sistema de prevención o mitigación de los

efectos de los FANS en la salud pública, en los ecosistemas marinos y en las actividades pesqueras y acuícolas (Penna y Galluzi, 2013).

El análisis de fragmentos de genes del ARN ribosomal (ADNr) ayudó a mejorar la comprensión de la filogenia y la taxonomía de organismos que con los estudios morfológicos se encontraban muy limitada (Howards *et al.*, 2009). El operón del ADNr comprende las regiones del genoma que codifican para los componentes del ARN de los ribosomas y consisten en subunidades grandes ó gen 28S (LSU) y subunidades pequeñas ó gen 18S (SSU); entre los genes 18S y 28S, están los genes 5.8S, este último ligado por regiones internas espaciadoras transcritas 1 y 2 (ITS 1 e ITS 2) (Fig. 3). Los genes de ARNr son utilizados en estudios filogenéticos ya que los ribosomas están universalmente presentes en los organismos vivos y las limitaciones funcionales han resultado en una alta conservación de las secuencias dentro de estos dominios (Howards *et al.*, 2009).

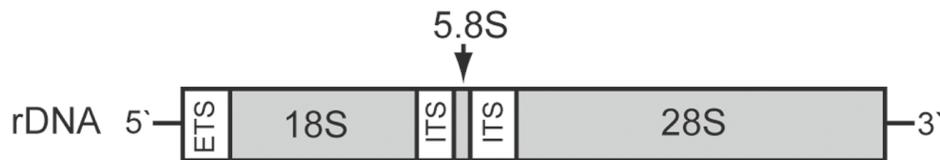


Figura 3. Esquema del ADNr de un organismo eucariota que contiene los genes 18S, 28S, 5.8S con las regiones internas espaciadoras transcritas (ITS) y las regiones externas espaciadoras transcritas (ETS). Tomado de Gillespie *et al.*, (2006).

Por otra parte el diseño de oligonucleótidos en los genes 5.8S con su región ITS, para la detección de especies tóxicas han sido ampliamente utilizados como por ejemplo en la detección y cuantificación de *Alexandrium minutum* (Galluzzi *et al.*, 2004), así también en la identificación de especies de dinoflagelados y para establecer relaciones filogenéticas entre dinoflagelados productores de una toxina específica (Howard *et al.*, 2009; Litaker *et al.*, 2007). Estas regiones son utilizadas debido a sus secuencias repetidas en tándem en un elevado número de copias y que tienen una alta variabilidad incluso entre especies estrechamente relacionadas. Esto puede explicarse debido a la baja presión evolutiva que actúa sobre esta secuencia que no es funcional (Benna *et al.*, 1998).

Capítulo 3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Justificación

La frecuencia, intensidad y distribución geográfica de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas ha aumentado en la última década. Se presume que el cambio climático, así como las actividades antropogénicas son las causas del aumento de floraciones algales nocivas a nivel mundial.

La producción de moluscos bivalvos en el estado de Baja California es una de las principales actividades económicas en la región. De ahí la importancia de realizar este tipo de estudios que contribuyen a ampliar el conocimiento de las toxinas presentes en las zonas de cultivo. Así como sustentar la implementación de métodos analíticos (LC – MS/MS) y moleculares a los programas nacionales de sanidad de moluscos bivalvos, que permitan minimizar las pérdidas económicas en las actividades costeras por la implementación de vedas por falsos positivos; pero al mismo tiempo, que sean efectivos en proteger la salud pública.

Los espirólidos son toxinas que no se encuentran reguladas debido a que se desconoce su efecto en humanos. Sin embargo, es importante su estudio, ya que se coextraen con otras toxinas lipofílicas reguladas como el ácido okadaico y los azaspirácidos. Los espirólidos al pertenecer al grupo de toxinas de acción rápida (FAT) pueden interferir con los resultados obtenidos en la prueba de bioensayo en ratón, provocando un falso positivo, lo que puede causar el cierre innecesario de las zonas de extracción y producción de moluscos, ocasionando pérdidas económicas.

En el 2012 se detectaron, entre otras toxinas de tipo lipofílico, a los espirólidos en el mejillón mediterráneo cultivado en la Bahía de Todos Santos (Sánchez Bravo, 2013) pero no se pudo identificar al agente causal. Así como existe la necesidad de un monitoreo continuo de las ficotoxinas acumuladas en moluscos bivalvos para proteger la salud pública, de igual manera es fundamental identificar a las especies responsables de la acumulación de las toxinas. Por lo tanto se plantea evaluar si *Alexandrium ostenfeldii*, como especie potencialmente productora de los espirólidos, está presente

en la Bahía de Todos Santos y si su presencia está asociada con la acumulación de espirólidos en el mejillón mediterráneo cultivado en la región.

3.2 Hipótesis

Alexandrium ostenfeldii, está presente en la Bahía de Todos Santos y es responsable de la acumulación de espirólidos en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* cultivado en la zona.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo General

- Identificar a *Alexandrium ostenfeldii* en muestras de agua, como especie productora de espirólidos y evaluar la acumulación de ésta toxina en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* cultivado en la Bahía de Todos Santos de julio del 2013 a junio del 2014.

3.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a *Alexandrium ostenfeldii* mediante PCR y a *Alexandrium* spp. por medio de microscopía óptica.
- Monitorear la temperatura y estratificación de la columna de agua y asociar estas variables con la presencia de *Alexandrium* spp.
- Asociar la detección de *Alexandrium ostenfeldii* por PCR con la abundancia celular de *Alexandrium* spp. y la concentración de espirólidos acumulados en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

Capítulo 4. Metodología

4.1 Área de estudio

La Bahía de Todos Santos se localiza en la costa noroccidental de la península de Baja California, entre los 31° 41' y 31° 56' N y 116° 34' y 116° 51' W. Los límites naturales, punta San Miguel al norte, punta Banda al sur y las islas de Todos Santos en la porción central, definen 2 entradas y salidas a la bahía que permiten una circulación continua de agua oceánica (Meillo y Álvarez, 1997). Aproximadamente el 90% de su área se encuentra entre los 10 a 50 m de profundidad, el resto forma parte de un angosto canal submarino, situado entre punta Banda y las islas de Todos Santos, que alcanzan profundidades de 400 m (Álvarez-Sánchez *et al.*, 1988) (Fig. 4).

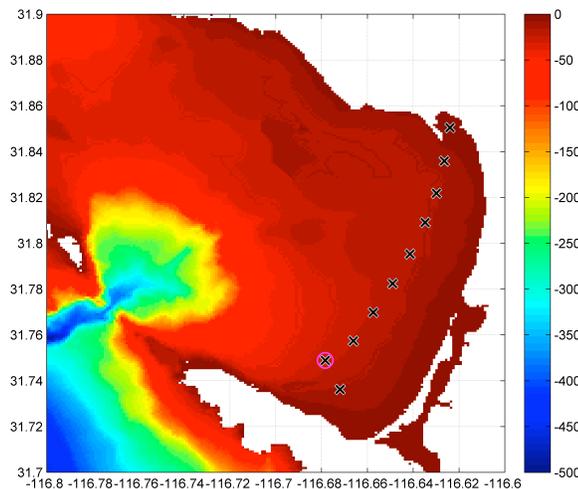


Figura. 4. Batimetría de la Bahía de Todos Santos y ubicación del punto de muestreo en la zona de cultivo de mejillón mediterráneo de la empresa Acuicultura Oceánica.

Para evaluar la comunidad fitoplanctónica se recolectaron muestras de agua quincenalmente de julio de 2013 a junio del 2014 en el área de cultivo de mejillón en la Bahía de Todos Santos (empresa Acuicultura Oceánica). El punto de muestreo se localizó (31°44.896 N, -116°40.742 W) aproximadamente en la mitad de las líneas de cultivo (Fig. 4). Las muestras de agua fueron colectadas en superficie y a 10 m de profundidad con una botella Niskin de 2 L. Además se realizó un arrastre vertical a 20 m de profundidad con una red de 20 μ de luz de malla.

Se evaluó la distribución continua de la temperatura, profundidad y salinidad con el empleo de un perfilador de conductividad, temperatura y profundidad (CTD) (CastAway, YSI).

4.2 Evaluación de la comunidad fitoplanctónica

Se tomaron muestras de agua (250 mL) y se fijaron agregando de 4 a 6 gotas de una solución de lugol-acetato y se almacenaron en frascos oscuros hasta su análisis. El análisis de la comunidad fitoplanctónica se realizó por medio de microscopía óptica de acuerdo al método de Utermöhl (Sournia, 1978) utilizando una cámara de sedimentación de 25 cm de altura para las muestras superficiales y de 10 m de profundidad y una de 10 cm para muestras de red. Se dejó sedimentar de 1 a 4 horas por cada cm de altura de la cámara.

Una vez sedimentada la muestra se realizó la identificación y el conteo de las especies, con el empleo de un microscopio invertido LEICA DM13000B (Leica Microsystems, Alemania). Se analizó el fondo completo de la cámara o cierto número de campos hasta alcanzar un conteo de 400 células si existía una alta abundancia celular (Fig.5).

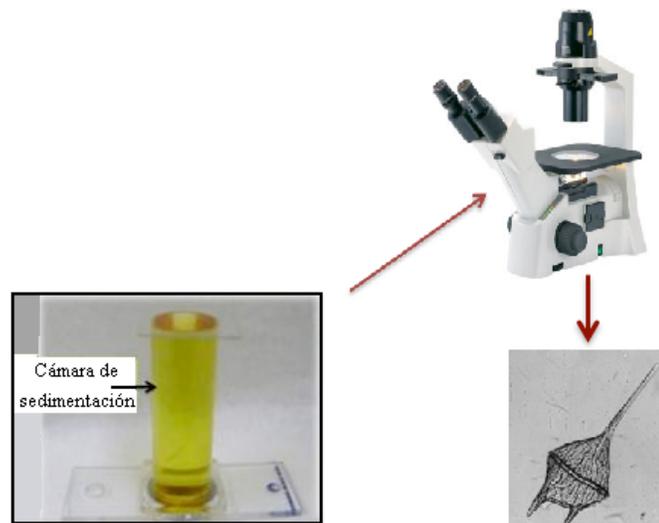


Figura. 5. Esquema de la técnica de Utermöhl 1958.

Cuando se revisó toda la cámara, la abundancia celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Cél/L} = [\text{NCE} \cdot 1000] / [\text{V columna}], \quad (1)$$

NCE = número de células contadas de cada especie.

V columna = volumen de la cámara de sedimentación.

Cuando se contaron solo algunos campos (que es el área visual que se observa y depende del objetivo que se está usando), se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cél/L} = [(\text{NCE} \cdot \text{NTC}) / \text{NCC}] \cdot [1000 / \text{V columna}], \quad (2)$$

NCE = número de células contadas de cada especie.

NTC = número total de campos en la cámara.

NCC = número de campos contados

V columna = volumen de la cámara de sedimentación.

La identificación de las especies fue realizada con la ayuda de claves taxonómicas.

4.3 Identificación de *Alexandrium ostenfeldii* por PCR

Las muestras de agua que fueron destinadas para la identificación de *Alexandrium ostenfeldii* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, fueron colectadas en frascos oscuros de 2 L de capacidad y transportadas en hieleras a 4 °C hasta llegar al laboratorio y procesarlas.

4.3.1 Protocolo de extracción de ADN (Penna *et al.*, 2007)

Se filtraron 200 mL de agua de las muestras de red y 300 mL de las muestras de 0 y 10 m de profundidad. Se utilizaron filtros de membrana de policarbonato (nucleopore - Whatman) con un tamaño de poro de 8 µm y 47 mm de diámetro y se usó una presión de vacío menor a 5 mm Hg para evitar el daño celular.

Una vez filtrada el agua, se realizó un lavado con 25 mL de Buffer PBS y el filtro se colocó en un tubo de microcentrífuga. Para las muestras de red la membrana se cortó a la mitad con una tijera estéril y se colocó cada pedazo en tubos de microcentrífuga independientes. Esto se llevó a cabo para evitar la degradación del ADN. Se probaron 3 métodos de preservación para los filtros de membrana: Con metanol al 100 %, etanol al 95 % y congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la extracción del ADN de los filtros de membrana preservados en etanol y en metanol, fue necesario primero evaporar los alcoholes en una campana de extracción. Una vez secos los filtros, a continuación se detallan las modificaciones realizadas en los primeros pasos de extracción utilizando el kit DNeasy Plant Mini kit (Quiagen). Se añadieron directamente los 600 μL del buffer de lysis del kit DNeasy Plant Mini kit a los filtros congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó adicionalmente una ruptura de las células utilizando un homogenizador mecánico de perlas (mini - bead beater 24, BIOSPEC) con pulsos de 20 segundos (tres pulsos) con un enfriamiento de la muestra en hielo entre cada pulso para evitar la degradación del ADN por calentamiento. Para eliminar contaminación con ARN se colocaron 4 μL de ARNasa, agitando vigorosamente por 30 segundos. Se incubaron las muestras por 10 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se mezcló el tubo invirtiéndolo dos veces durante la incubación en el minuto 7 y 3) (Fig.6).

Para continuar con la extracción de ADN, se siguió el protocolo de extracción del kit DNeasy Plant Mini kit (Quiagen) que se detalla en el anexo 1 y la Figura 6. Al finalizar el protocolo se tomó la columna Dneasy mini spin y se le adicionaron 100 μL de agua dietilpirocarbonato (DEPC) para la resuspensión del ADN, se incubó a temperatura ambiente por 5 min para luego centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Se tomaron los 100 μL del fluido eluido, y se pasaron de nuevo por las columnas para finalmente centrifugar y recuperar el ADN retenido en las mismas (Fig. 6).

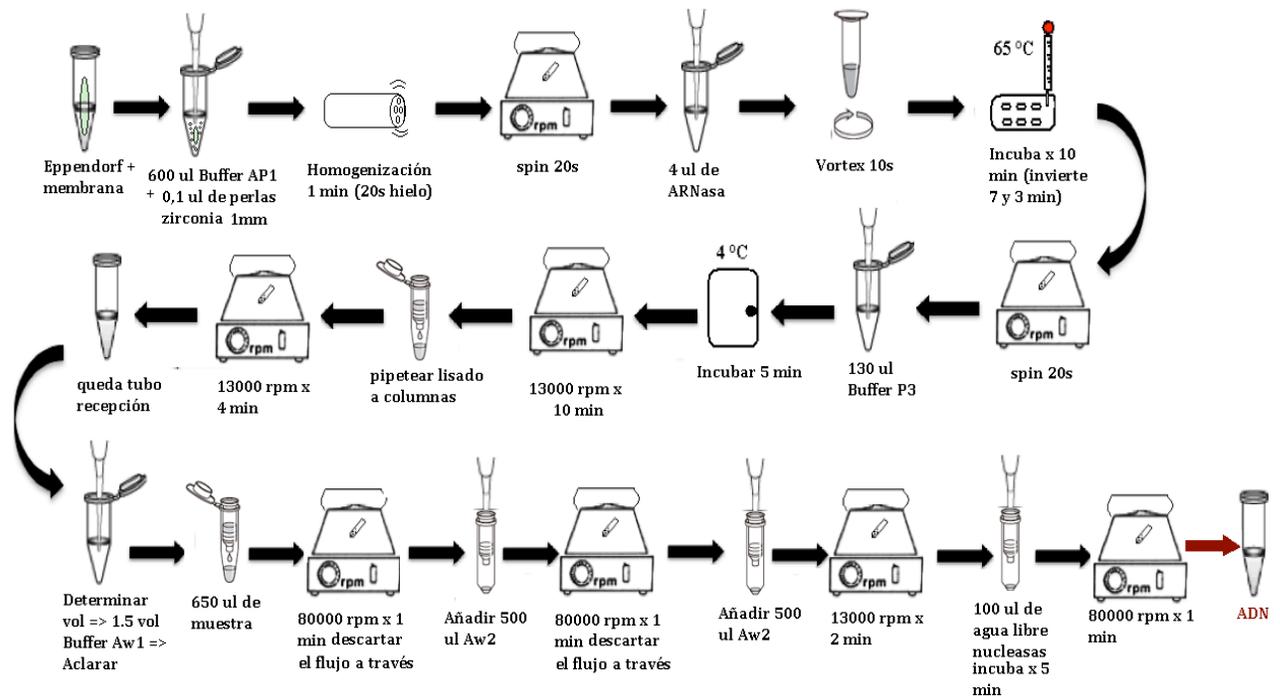


Figura. 6. Pasos a seguir para la extracción de ADN en muestras de campo.

Para la cuantificar el ADN, se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 2000). Se midió la densidad óptica (DO) del extracto a una longitud de onda de 260 y 280 nm para determinar la concentración del ADN y la pureza del ADN (relación de la DO a 260 nm/280 nm), respectivamente.

La integridad del ADN extraído, se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La preparación del gel de agarosa se realizó con buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) 1X (Anexo 2). Se cargaron 4 µL de muestra del ADN extraído más 1 µL de buffer de carga (azul de bromofenol + GelRed). Se corrió el gel a 80 V por 30 minutos. Posteriormente, se visualizaron los geles en un fotodocumentador con luz UV.

4.3.2 Oligonucleótidos empleados

Se realizó una búsqueda bibliográfica de oligonucleótidos diseñados en los genes 5.8S con su región ITS. Una vez obtenidos los oligonucleótidos específicos para *A. ostentfeldii* (Tabla 1), diseñados por Schwarz (2011). Se realizó un alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST) entre las secuencias de los oligonucleótidos con las secuencias encontradas de la especie en bases de datos como el GenBank, con la

finalidad de comprobar la especificidad de los oligonucleótidos con la especie de interés y corroborar que éstos no se alinean con otra especie para evitar un resultado erróneo que provoque un falso positivo. Además se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos reportados en la literatura con los programas bioinformáticos Bioedit, y Mega 6.06.

Tabla 1. Secuencia, posición para la amplificación, tamaño del producto esperado y acceso del oligonucleótido utilizado para la identificación de *Alexandrium ostenfeldii*

Nombre	Gen	Nombre	Secuencias	Posición	Tamaño	Acceso
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	ITS1 (5'-3')	AOF4	TGTCAATGCGTGTGCATTTCG	472 -492	99 pb	JX841279.1
	F					
	ITS2 (5'-3')	AOR3	CATTGCAACCAATGCACATGA	98 - 117		
	R					

Se realizó un análisis de la calidad de los oligonucleótidos utilizando en el programa PerlPrimer v1.1.21, se buscó que los oligonucleótidos elegidos tuvieran un porcentaje de G-C del 40%, una temperatura de hibridación con una diferencia entre ellos menor a 5 °C. Sin embargo, debido a que la especie *A. peruvianum* posee una alta similitud en la secuencia con *A. ostenfeldii*, y a que muchos autores manejan a las dos especies como una sola, sólo se encontraron un par de oligonucleótidos con tan sólo 4 pares de bases de diferencia que nos permitieron discriminar una especie de otra.

Además de las verificaciones con los programas bioinformáticos, se realizaron controles positivos de los oligonucleótidos con cepas monoespecíficas de *A. ostenfeldii* para comprobar su hibridación, especificidad y tamaño de producto esperado.

4.3.3 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Una vez extraído el ADN y verificada su concentración e integridad, se procedió a realizar la amplificación de las regiones ITS, por medio de un PCR utilizando el kit GoTaq PCR de Promega. En la Figura 7 se muestra un esquema de los pasos a seguir para realizar una reacción de PCR.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems 9600). Las reacciones se realizaron a un volumen final de 15 μL y el master mix se preparó con las siguientes concentraciones: 0.4 mM de cada desoxirribonucleótidos (dNTP'S), 0.12 μM de cada oligonucleótido (AOF4 y AOR3), 4 mM de cloruro de magnesio (MgCl_2), buffer 1 X GoTaq flexi y 1.25 U de polimerasa GoTaq. La concentración aproximada del ADN templado fue de 60 ng/ μL . Los volúmenes calculados por reacción se detallan en el anexo 3.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: (desnaturalización inicial a 94 °C x 4 min; 40 ciclos de 94 °C x 30 seg, 60 °C x 45 seg, 72 °C x 1 min y una extensión final 7 min a 72 °C)

Para verificar si existió la amplificación de un producto del tamaño esperado, se realizó un gel de agarosa al 1.5 % con una tinción del gel con GelRed, se cargaron 5 μL del producto de PCR + 1 μL del buffer de carga (azul de bromofenol) y se corrió el gel 50 minutos a 80 V. Las amplificaciones se visualizaron en un fotodocumentador con luz UV.

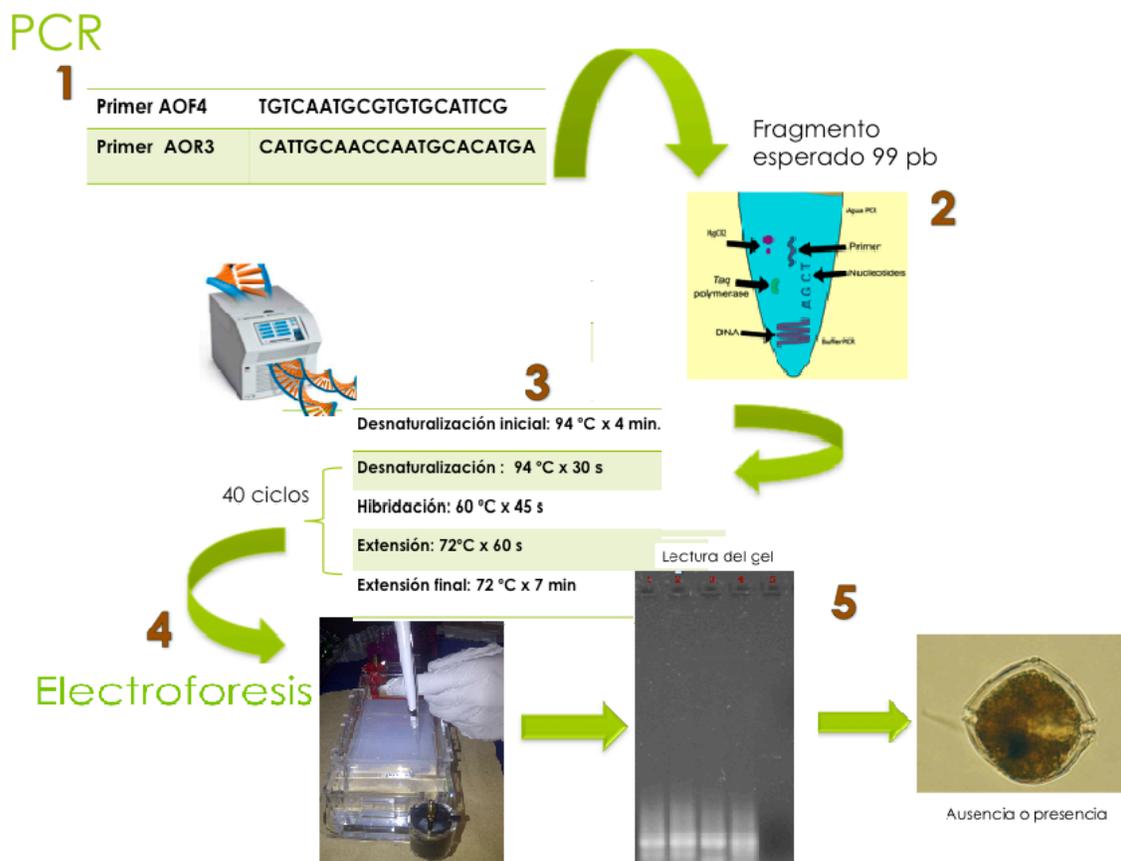


Figura. 7. Pasos a seguir para la realización de la técnica de PCR para la identificación de *A. ostenfeldii*.

4.3.4 Purificación de bandas y secuenciación

Para determinar las secuencias de los productos amplificados con los oligonucleótidos AOF4 y AOR3, se purificaron los fragmentos de los geles de agarosa con un tamaño de 99 pb (Fig. 8). Para la purificación de los productos se realizaron 4 reacciones de PCR de 15 μ L para obtener un volumen total aproximado de 60 μ L. Las condiciones utilizadas para la reacción de PCR fueron iguales a las descritas en el punto 4.3.3. Se realizó un gel de agarosa al 2 % teñido con GelRed y se cargó 40 μ L del producto de PCR. El gel se corrió a 60 V por 1 hora y 30 minutos, para luego ser observado en el fotodocumentador.

Se cortaron las bandas de interés con un bisturí estéril y se eliminó el exceso de agarosa, para luego colocarlas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL previamente pesado. Se registró el peso del tubo con la banda y se almacenó a -80 °C. Para la purificación se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system de Promega y se siguió el protocolo de purificación del kit que se detalla en el anexo 4.

Al finalizar el protocolo, la minicolumna SV se transfirió cuidadosamente a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL y se añadieron 70 μ L de agua libre de nucleasas para resuspender el ADN y se dejó incubando a 65 °C por 5 min, luego se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. Se tomaron los 70 μ L ya pasados por la columna y se los volvió a colocar sobre la membrana y se dejó incubar por 1 min a 65 °C. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por 1 min. El ADN eluido fue cuantificado en un espectrofotómetro de luz UV (Nanodrop 2000).

Los fragmentos purificados se enviaron al laboratorio Quimera Biolabs (Ensenada, Baja California) para su secuenciación. Esta se llevó a cabo por medio del método enzimático de Sanger.

4.3.5 Aplicación de la técnica de qPCR para la determinación de dímeros de oligonucleótidos.

Para descartar la existencia de productos inespecíficos se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) debido a que su

sensibilidad y especificidad nos permite identificar productos inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos mediante el análisis de la curva de disociación.

La curva de disociación es una corrida de rutina en el ensayo de qPCR donde se recolectan datos sobre un rango de temperatura de entre 65 – 95 °C con incrementos de 0.5 °C, esto nos permite observar el tamaño aproximado del producto y si éste es específico generando un único pico en todos los ciclos de la reacción. Si durante la curva de disociación se detectan más de un pico, se puede ver la formación de dímeros de oligonucleótidos o contaminación del ADN (Taylor *et al.*, 2010).

Para la reacción de qPCR se utilizó el kit de Affymetrix HotStart – IT SYBR Green, que utiliza en su Master mix un nuevo método donde una proteína de unión al oligo secuestra los oligonucleótidos a temperaturas más bajas, para que no esté disponible su uso por la Taq ADN polimerasa. Siguiendo el paso de desnaturalización inicial, la proteína de unión se desnaturaliza y los oligonucleótidos son liberados.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (CFX96 Touch Real – Time PCR Detection System, BIO-RAD). Las reacciones se realizaron a un volumen final de 10 µL y el master mix se preparó con las siguientes concentraciones: 1 X de HotStart IT SYBR Green y 0.3 µM de cada oligonucleótido (AOF4 y AOR3). La concentración aproximada del ADN templado fue de 60 ng/µL. Los volúmenes calculados por reacción se detallan en el anexo 5.

Las condiciones para el qPCR fueron las siguientes: (desnaturalización inicial a 94 °C x 2 min; 40 ciclos de 94 °C x 30 seg; 60 °C x 30 seg).

Para la curva de disociación que ayudará a determinar la formación de dímeros entre los oligonucleótidos, debido a la diferencia en las temperaturas de disociación entre los oligonucleótidos y el templado. Se estandarizaron las siguientes condiciones: (Desnaturalización: 94 °C x 10 seg; alineación: 60 °C x 15 seg; rampa: 60 – 95 °C (1 °C/ ciclo)

Los datos obtenidos fueron analizados con el software BioRad CFX Manager 3.0.

4.4 Mantenimiento de la cepa de *Alexandrium ostenfeldii*

Para tener controles positivos que validen la especificidad de los oligonucleótidos se adquirió la cepa CCMP1773 de *Alexandrium ostenfeldii* del cepario Provasoli–Guillard National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA), ésta cepa fue aislada en Dinamarca. La cepa se cultivó en medio F1 en los primeros desdobles y posteriormente se cultivó en medio GSe (Anexo 10). Con este último medio, se logró mantener cultivos estables con células sanas sin deformaciones. Los cultivos se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una irradiancia de $100 \mu\text{mol fotonos m}^2 \text{ s}^{-1}$ medida por con un radiómetro con sensor 4π (QSPL21–1, Biospherical Instruments) sumergido en un matraz de cultivo con medio y a una temperatura de 14 °C.

4.5 Medición de toxinas en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*)

Se colectaron aproximadamente 50 mejillones de talla comercial para la determinación de toxinas de tipo lipofílico. Los organismos fueron transportados al laboratorio en hieleras a 4 °C y congelados hasta su análisis.

La detección de toxinas se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC–MS/MS). Las toxinas lipofílicas fueron extraídas del organismo completo de acuerdo al procedimiento operativo estándar de la Unión Europea, EURL-SOP, para la determinación de toxinas lipofílicas en moluscos bivalvos (EURLMB, 2011). Como se muestra en la Figura 8, se realizó un homogenizado con 35 moluscos. Posteriormente, se tomaron 2.5 g del homogenizado y se le agregó 10 mL de metanol en un tubo tipo Falcon. La mezcla fue homogenizada con un vórtex a máxima velocidad por 3 min y se centrifugada a 3000 rpm por 10 min. (EURLMB, 2011). El sobrenadante se pasó a un matraz de aforación de 25 mL y al tejido que quedó en el fondo del tubo se le adicionaron otros 10 mL de metanol para posteriormente homogenizarlo con un sistema de dispersión de alto rendimiento tipo UltraTurrax por 1 min. Se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transvasó al matraz de 25 mL que contenía el producto de la primera homogenización y luego se aforó con metanol al 100%. El contenido fue colocado en un

tubo tipo Falcon y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su análisis (EURLMB, 2011)

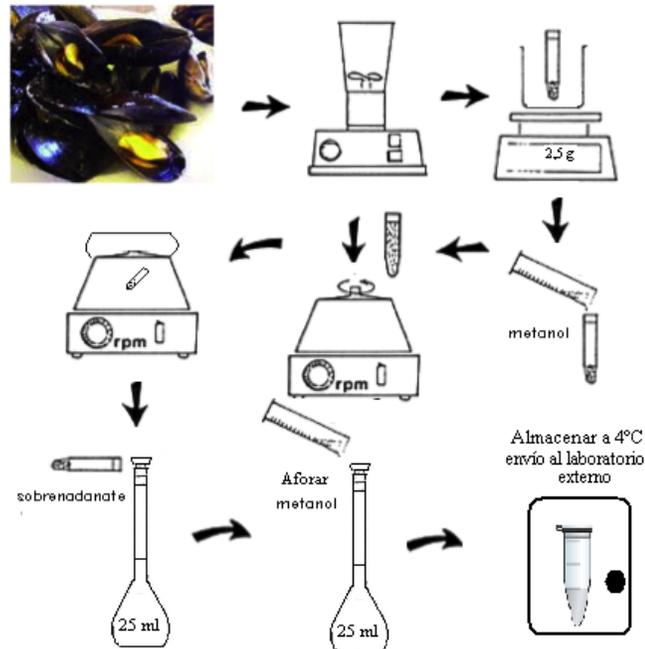


Figura. 8. Esquema para la obtención del extracto metanólico utilizado en la medición de toxinas de lipofílicas en el mejillón por medio LC–MS/MS.

La identificación y cuantificación de toxinas lipofílicas, fue realizada en el Centro de Investigaciones Mariñas en Vilanova de Arousa, España, con el grupo de investigación de episodios tóxicos. Allí se analizó el extracto metanólico por medio de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC–MS/MS).

Se utilizó un sistema de HPLC (Thermo Scientific, Accela) interconectado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Thermo Scientific TSQ Quantum Access Max) equipado con una sonda de ionización por electro spray calentado (HESI II). El software utilizado para el control de todo el sistema así como para la adquisición y el procesamiento de los datos fue el Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Para la interfase electro spray HESI II, de transferencia entre el HPLC y el espectrómetro de masas se fijó una polaridad positiva, con un voltaje de 3500V, una temperatura de vaporización de 110 °C, 40 unidades de presión de N₂ en “Sheath gas” y de 10 en el “Auxiliary gas”. La temperatura del capilar se fijó a 360 °C. El espectrómetro fue

operado en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM) que nos permite seleccionar varios iones producto de la fragmentación de iones precursores específicos.

La separación cromatográfica se realizó utilizando el método de Regueiro *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. Este método combina la extracción en fase sólida (SPE) en línea y la separación cromatográfica. En la primera fase del análisis, la muestra fue inyectada en una columna trampa de dimensiones reducidas (2x2 mm, Phenomenex Security Guard con cartucho GeminiNX C18) situada en una válvula Rheodyne de 6 vías. Dos posiciones están conectadas a una fase móvil de carga (mezcla 90:10 de fases cromatográficas A y B) proveniente de una bomba auxiliar (JASCO PU-2080). Después de 1.5 min la posición de la válvula cambió, de forma que el flujo proveniente de la bomba cromatográfica principal pasó por la columna trampa y eluyó las sustancias retenidas comenzando la separación en gradiente.

La cromatografía fue realizada en modo de fase reversa, con una columna Gemini-NX C18 (Phenomenex) de 50 x 20 mm de diámetro interno y con un tamaño de partícula de 3 μm , ésta fase estacionaria es muy estable en pH básico. Las fases móviles utilizadas fueron las descritas por Gerssen *et al.* (2009) que dan condiciones cromatográficas básicas (Anexo 11).

Condiciones cromatográficas: la columna se mantuvo a 40 °C y las muestras en el inyector automático a 10 °C. El volumen de inyección fue de 5 μL de muestra filtrada con un filtro MS Simple Pure PTFE/L de 0.22 μm . Al inicio de los análisis se empleó un flujo de 400 μL /min con el 50 % de fase A y 50 % de fase B aproximadamente por 30 minutos hasta observar que la presión se mantiene estable.

Una vez que la columna se encontró equilibrada, la separación se realizó mediante un gradiente de elución de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente de elución de la fase móvil utilizado para la medición de toxinas de tipo lipofílico de acuerdo a Regueiro *et al.* (2011) con modificaciones.

Tiempo (min)	Solución A %	Solución B %	µl/min
0.00	75	25	400
1.50	75	25	400
3.85	5	95	400
5.25	5	95	400
6.75	75	25	400
7.50	75	25	400

La identificación de las distintas toxinas se llevó a cabo por su relación masa/carga y los tiempos de retención característicos. El método utilizado para realizar la primera examinación general de las toxinas existentes en las muestras del extracto metanólico de *M. galloprovincialis* fue el de Regueiro *et al.* (2011) modificado, que se detalla en el anexo 6.

Los primeros análisis se realizaron con estándares de las distintas toxinas lipofílicas para verificar el correcto funcionamiento del equipo basándonos en los tiempos de retención característicos y en los valores *m/z* (masa/carga) de estas moléculas. Para la cuantificación de los espirólidos, se utilizó el factor de respuesta del instrumento calculado mediante una curva de calibración. El material de referencia utilizado se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Estándares de toxinas lipofílicas indicando el proveedor donde fueron adquiridas y concentración de las soluciones patrón.

Toxina	Proveedor	[µg/mL]
Ácido okadaico	National Research Council Canada	14.3 ± 1.5
Pectenotoxina 2	National Research Council Canada	8.6 ± 0.3
13-desmetil espirólido C	CIFGA	6.55 ± 0.53
Azaspirácido 1	CIFGA	2.085 ± 0.081
Azaspirácido 2	CIFGA	1.04 ± 0.14
Gymnodimina	National Research Council Canada	5.0 ± 0.2
Yesotoxinas	National Research Council Canada	5.5 ± 0.3
Dinofisistoxina 1	WAKO	100 µg (polvo)

Se realizó una mezcla de estándares a 4 niveles de concentración para cada una de las toxinas de acuerdo a la tabla 4. El nivel de concentración 2 es una dilución (Dil) 1/5 del nivel 1 y de la misma manera se obtuvieron las diluciones sucesivas para los tres niveles restantes. Las diluciones fueron realizadas con metanol grado HPLC.

Tabla 4. Concentración final de las diferentes toxinas lipofílicas (MixLipoDic 12) a 4 niveles de concentración utilizados en la estandarización del equipo de LC-MS/MS.

Toxina	Nivel 1 [final ng/mL)	Nivel 2 Dil 1/5 ng/mL	Nivel 3 Dil 1/5 ng/mL	Nivel 4 Dil 1/5 ng/mL
AO	1140.71	228.14	45.63	9.13
DTX1	5.07	1.01	0.20	0.04
YTX	5.08	1.02	0.20	0.04
AZA1	4.89	0.98	0.20	0.04
GYM	11.04	2.21	0.44	0.09
SPX	4.95	0.99	0.20	0.04
PTX2	5.24	1.05	0.21	0.04
AZA2	4.94	0.99	0.20	0.04

Abreviaturas:

AO = Ácido okadaico
Aza = Azaspirácidos
PTX = Pectenotoxina

DTX = Dinofisistoxinas
GYM = Gimnodiminas

YTX = Yessotoxinas
SPX = Espirólidos

Se obtuvieron las lecturas del estandar MixLipoDic12 por triplicado en sus distintos niveles de concentración (Fig. 9), se obtuvo un r^2 de 0.985. Debido a la baja concentración de los espirólidos en las muestras de mejillón se omitió la concentración más alta del MixLipoDic12 para graficar la curva. Los espirolidos se monitorearon en la transición 692.501 > 444.30 ya que presentó la relación señal/ruido más alta al realizar las lecturas tanto en los patrones como en las muestras de mejillón.

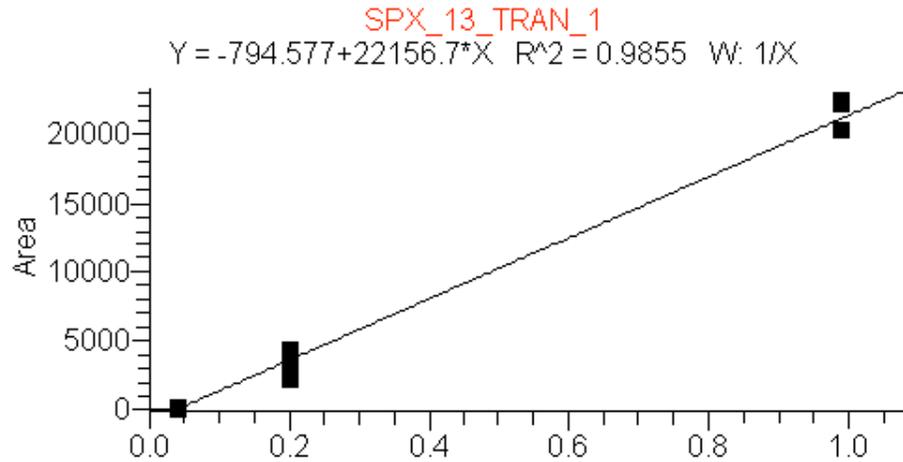


Figura 9. Curva de calibración para el 13 desmetil espirólido C. Los diferentes niveles de concentración se leyeron por triplicado.

Después de un análisis prospectivo de las diferentes toxinas lipofílicas, se realizó un segundo análisis cambiando el método para la identificación específica de los espirólidos. Específicamente, el método (Tabla 5) fue diseñado para la detección de 13 desmetil espirólido C, el 13 – 19 didesmetil espirólido y el espirólido B.

Tabla 5. Método utilizado para la identificación de espirólidos en el mejillón mediterráneo (*M. galloprovincialis*) donde se muestran las transiciones de cada analito, la energía de colisión aplicada para un monitoreo de reacciones múltiples (MRM) y los tiempos de retención.

Compuesto	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Energía colisión MRM	Tiempo inicio	Tiempo Final
13 – 19 didesm SPXC	678.500	430.300	36	3.50	4.30
13 – 19 didesm SPXC	678.500	164.000	50	3.50	4.30
13 desm SPXC	692.501	164.000	50	4.00	4.50
13 desm SPXC	692.501	444.300	36	4.00	4.50
SPX B	694.500	444.300	36	4.10	5.10
SPX B	694.500	150.000	36	4.10	5.10

Las condiciones tanto cromatográficas así como de espectrometría se mantuvieron iguales que las mencionadas para el análisis general de diferentes toxinas.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Comunidad fitoplanctónica

Se analizaron un total de 57 muestras de agua para evaluar la comunidad fitoplanctónica en Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos. Se colectaron muestras del 18 de julio del 2013 al 21 de junio del 2014, se analizaron 19 muestras de superficie, 19 muestras a 10 m de profundidad y 19 muestras de red. En la Figura 10 se presenta la variación temporal de la abundancia absoluta y relativa de las diatomeas y dinoflagelados como grupos más representativos de la comunidad fitoplanctónica en la región de estudio. Existe una estacionalidad típica para la dominancia y presencia de cada grupo, esto condicionado a las variables ambientales. En el presente estudio, las diatomeas fueron el grupo más abundante durante el periodo de muestreo representando un 97% de los organismos colectados en red en mayo del 2014 (Fig. 10C). La abundancia relativa más baja de este grupo se presentó en julio del 2013 con el 10.7%.

El máximo de abundancia relativa para el grupo de dinoflagelados fue del 61% detectado a finales de noviembre del 2013. El mínimo fue de 1.3% presentándose en mayo del 2014 (Fig. 10C). La baja abundancia se mantuvo desde este mes hasta finalizar el muestreo.

La abundancia absoluta máxima de las diatomeas fue de 163×10^3 cél. L^{-1} en muestras de superficie, mientras que a 10 m de profundidad fue de 210×10^3 cél. L^{-1} . Estas abundancias máximas se detectaron el 08 de mayo del 2014. En general, de febrero a julio de este año se presentaron las abundancias más altas de diatomeas para todo el periodo de muestreo. Por ejemplo, a finales de febrero (segundo pico más alto en abundancia) se detectaron 126×10^3 cél. L^{-1} en superficie y 185×10^3 cél. L^{-1} a 10 m. Antes de este mes, la abundancia celular no fue mayor de las 50×10^3 cél. L^{-1} tanto en la superficie como a los 10 m (Fig. 10A).

Los dinoflagelados presentaron una menor abundancia en comparación con el grupo de las diatomeas y no existió un patrón temporal de aparición. La abundancia fluctuó

alrededor de las 10×10^3 cél. L^{-1} durante el periodo de muestreo (Fig. 10B). La máxima abundancia de estos organismos se registró a finales de noviembre del 2013 con 15.8×10^3 cél. L^{-1} y 20.2×10^3 cél. L^{-1} a 0 y 10 m de profundidad, respectivamente (Fig. 10B). A finales de enero del 2014 se observó una abundancia de 13.8×10^3 cél. L^{-1} en la superficie y de éste registro, 8.2×10^3 cél. L^{-1} correspondieron a *Prorocentrum gracile*. El 08 de agosto del 2013 se registró la menor abundancia de dinoflagelados con 1.3×10^3 cél. L^{-1} a 0 m y 1.8×10^3 cél. L^{-1} a 10 m de profundidad (Fig. 10B).

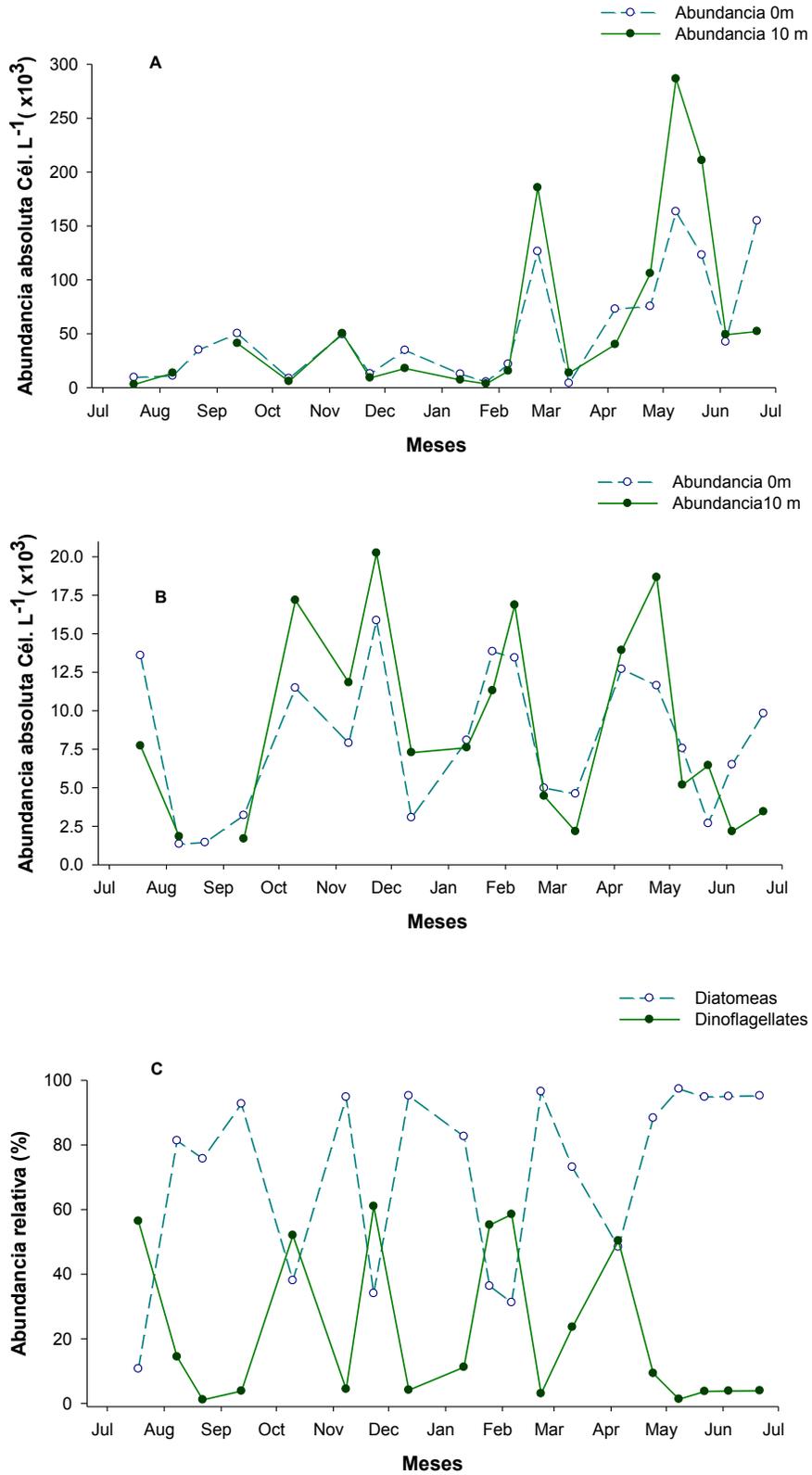


Figura 10. Variación temporal de la abundancia de diatomeas (panel A) y dinoflagelados (panel B) a 0 y 10 m de profundidad en Rincón de Ballenas durante julio del 2013 a junio del 2014. En el panel C se presenta la abundancia relativa de diatomeas y de dinoflagelados en las muestras de red.

5.2 Abundancia de *Alexandrium* spp. en las muestras de agua

A. spp. fue observado en el 44% de las muestras analizadas y representó en promedio el 5.5% del total de dinoflagelados registrados en las muestras de agua superficial y el 5.4% en las muestras a 10 m de profundidad. En cuanto al total de organismos identificados, *Alexandrium* spp. representó en promedio el 1.7% en la superficie y el 2.1% a 10 m de profundidad.

Se identificó a *Alexandrium* spp., en julio del 2013 en muestras de superficie y de 10 m de profundidad con una abundancia de 2831 cél. L⁻¹ y 3200 cél. L⁻¹, respectivamente (Fig. 11A). En las muestras de agosto solo se presentó a 10 m con una abundancia de 54 cél. L⁻¹. Posteriormente, en octubre del 2013 la abundancia se incrementa registrándose el máximo de abundancia para todo el periodo de muestreo con 3618 cél. L⁻¹ en la superficie y 3586 cél. L⁻¹ a 10 m (Fig. 11A). En este mes, la abundancia relativa de *Alexandrium* spp. con respecto al total de organismos presentes en la muestra de agua fue del 17.4% en la superficie y 12.1% a 10 m de profundidad. En el periodo desde finales de noviembre del 2013 hasta principios de mayo del 2014, solamente se detectó a *Alexandrium* spp. a principios de enero del 2014 (160 cél. L⁻¹ en superficie y 60 cél. L⁻¹ a 10 m; Fig. 11A).

A finales de abril y principios de mayo del 2014 se detectó un incremento en la abundancia de *Alexandrium* spp. alcanzando las 712 cél. L⁻¹ en superficie y 1051 cél. L⁻¹ a 10 m de profundidad el 05 de mayo del 2014. Al final del mes se registraron organismos únicamente en la superficie con 2324 cél. L⁻¹.

En el panel B de la Figura 11 se presentan los resultados de los análisis de la muestra de red. *Alexandrium* spp. representó el 1.8% de los organismos colectado en red en julio del 2013. La especie más abundante para esta fecha fue *Dinophysis fortii* con el 13% de abundancia relativa. Esto difiere con los resultados obtenidos en las muestras de agua tanto a superficie como a 10 m, donde los valores en la abundancia absoluta fueron mayores. Asimismo, en esta fecha los quistes de dinoflagelados presentaron la mayor abundancia relativa con 29.8%.

En octubre se registró la mayor abundancia relativa de *Alexandrium* spp. representando un 5.8% de los organismos colectados en red. Esta alta abundancia relativa concuerda con las abundancias absolutas altas en superficie y a 10 m para este mes. En la temporada de invierno, se detectó a *Alexandrium* spp. a finales de noviembre del 2013 y principios de enero del 2014 con abundancias muy bajas del 0.94 y 0.26 %, respectivamente. En abril del 2013 la abundancia relativa fue del 1.21% el 05 de abril del 2014 y del 1.19% para el 24 de abril del 2014.

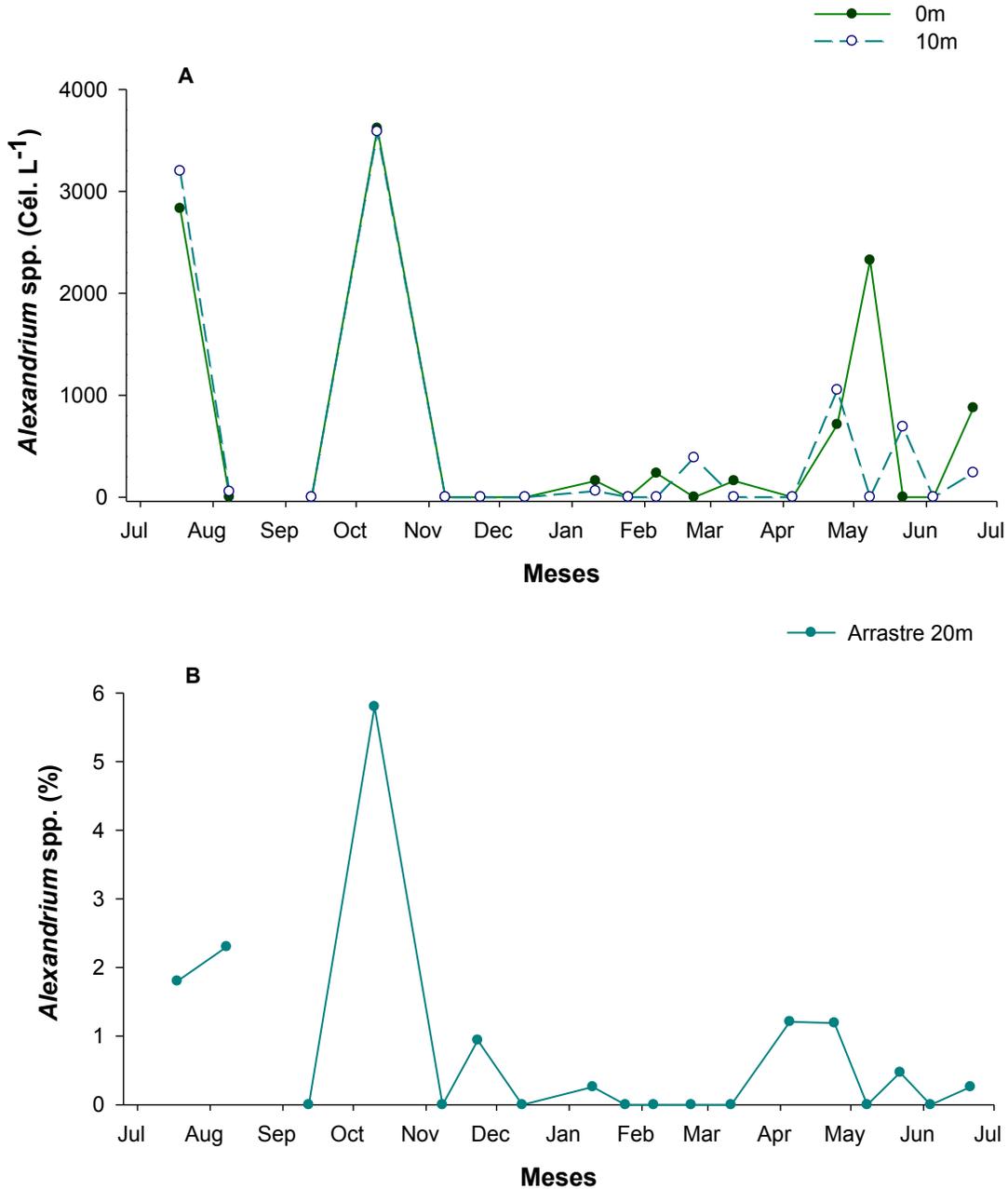


Figura 11. Variación temporal de la abundancia absoluta para *Alexandrium* spp. a 0 y 10 m de profundidad en Rincón de Ballenas durante julio del 2013 - junio del 2014 (panel A). En el panel B se presenta la abundancia relativa de *A. spp.* en las muestras de red.

5.3 Temperatura

En el punto de muestreo (31°44.896 N, -116°40.742 W), se realizó la medición de la temperatura de julio del 2013 a junio del 2014. La temperatura mínima superficial fue de 15.46 °C registrada el 11 de enero del 2014 y la máxima fue de 22.13 °C medida el 12 de septiembre del 2014.

Los perfiles de temperatura demuestran una marcada estratificación de la columna de agua, donde se detectó una diferencia de 6 °C entre la temperatura superficial y a 10 m de profundidad para agosto y julio del 2013 (Fig. 12A). En estos meses la capa de mezcla fue relativamente somera detectándose la termoclina entre los 5 y 8 metros de profundidad (Fig. 12A). En septiembre del 2013 continuó la estratificación, teniendo una diferencia de 8 °C entre la temperatura superficial y la temperatura a 10 m de profundidad (Fig. 12A) y desde octubre del 2013 hasta febrero del 2014 se rompió la estratificación prestándose una columna homogénea con aproximadamente 1 °C de diferencia entre la superficie y los 10 m (Fig. 12B,C). La temperatura superficial máxima registrada durante este periodo fue de 17.2 °C y la mínima de 15.46 °C registrada el 11 de enero del 2014 (Fig. 12B,C). Después de presentarse una columna de agua homogénea la mayor parte del otoño, a principios de abril del 2014 (muestreo del 5 de abril del 2014) se detectó la formación de la termoclina estacional, la cual se presentó aproximadamente a los 10 m de profundidad (Fig. 12C). Posteriormente, el 22 de mayo del 2014 se detectó un aumento en la temperatura de la superficie (19.5 °C) y una termoclina a menor profundidad (Fig. 12D). Al comienzo del verano la estratificación se fue haciendo más evidente teniendo una temperatura superficial de 20.7 °C en la superficie y 15.52 °C a 10 m para el 21 de junio del 2014 (Fig. 12D).

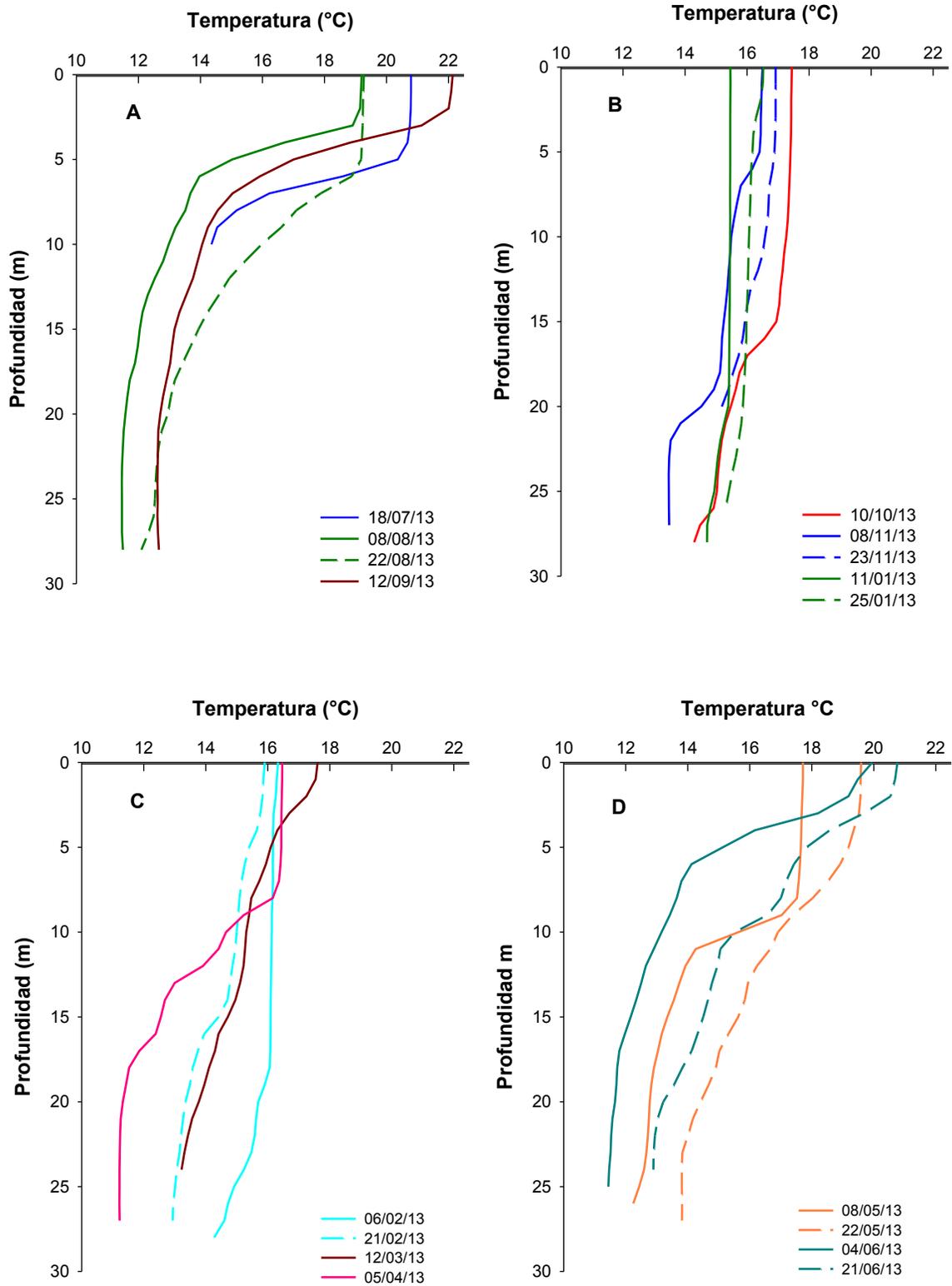


Figura 12. Perfiles de temperatura en la columna de agua para Rincón Ballenas en la Bahía de Todos Santos. Los resultados para los meses de verano y principios de otoño se presentan en el panel A, para otoño e invierno en el panel B, finales de invierno y principios de primavera en el panel C y finales de primavera y principios de verano en el panel D.

La temperatura es una de las variables ambientales más importantes que determina la distribución de las especies fitoplanctónicas. En la Figura 13 se presenta la variación de la temperatura superficial, a 5 y 10 m de profundidad y se relaciona con la abundancia de *Alexandrium* spp. en muestras de superficie, las cuales fueron similares con las abundancias registradas a 10 m, excepto para el 08 de mayo donde la abundancia en la superficie fue mucho mayor en comparación a la abundancia a los 10 m (Fig. 13A). El patrón más claro de este análisis es que *Alexandrium* spp. no está presente o su abundancia es mínima cuando existe una columna de agua homogénea (Fig. 13). Desde noviembre hasta finales de abril la abundancia de esta especie fue baja o no se detectó en las muestras, lo que coincide con una diferencia mínima entre la temperatura a 0, 5 y 10 m de profundidad. En contraste, se detectaron abundancias cercanas o mayores de las 1000 cél. L⁻¹ cuando existió estratificación en la columna de agua. A excepción de octubre, donde a pesar de existir una columna de agua homogénea se registró la abundancia celular más alta para el género con 3618 cél. L⁻¹ a una temperatura de 17.26 °C. Asimismo el 08 de mayo, se registró una temperatura de 17.71 °C y también se registró una abundancia alta con 2324 cél. L⁻¹. Sin embargo, no es claro que la abundancia tenga relación con una temperatura determinada (Fig. 13).

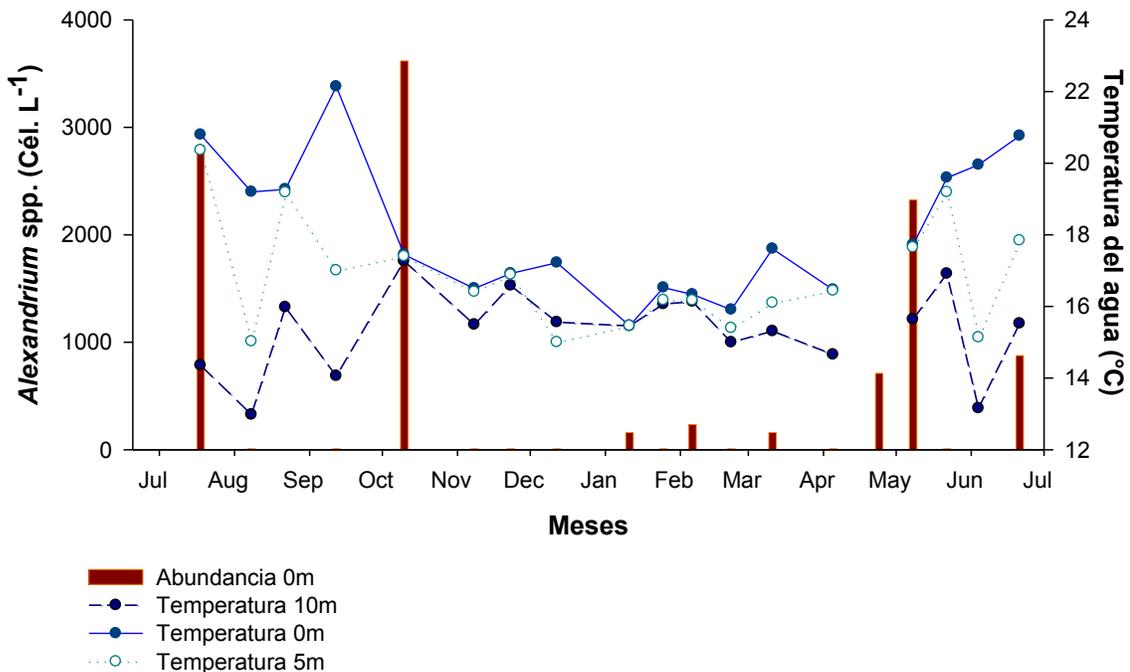


Figura 13. Variación de la temperatura a 0, 5 y 10 m de profundidad en Rincón Ballenas en la Bahía de Todos Santos y variación de la abundancia de *Alexandrium* spp. en muestras de agua colectadas en superficie durante julio del 2013 a junio del 2014.

5.4 Evaluación de la presencia de *Alexandrium ostenfeldii* por medio de PCR

Al utilizar los oligonucleótidos AOF4 y AOR3 diseñados por Schwarz (2011), se obtuvo la amplificación de un fragmento de la región ITS de 99 pb específico para la identificación de *A. ostenfeldii* por medio de la técnica de PCR.

5.4.1 Extracciones

Se probó la integridad del ADN extraído en diferentes muestras. Con el método de extracción empleado se obtuvo una banda de alto peso molecular mayor a 1500 pb, lo que nos indica un ADN íntegro (Figura 14). Se obtuvo una concentración de ADN similar con muestras de red, de superficie y de 10 m de profundidad (Tabla 6). La relación de absorción a 260 nm a 280 nm menor fue de 1.14 para la muestra de red del 8 de noviembre del 2013, lo que nos sugiere la presencia de proteínas en el extracto. Esto está asociado probablemente a que las microalgas tienen una pared celular muy resistente, con una gran cantidad de celulosa y pectina; así como también la presencia de proteínas estructurales. Por lo tanto se diluyeron las muestras de red para evitar la inhibición de la reacción de PCR por la presencia de proteínas en el extracto.

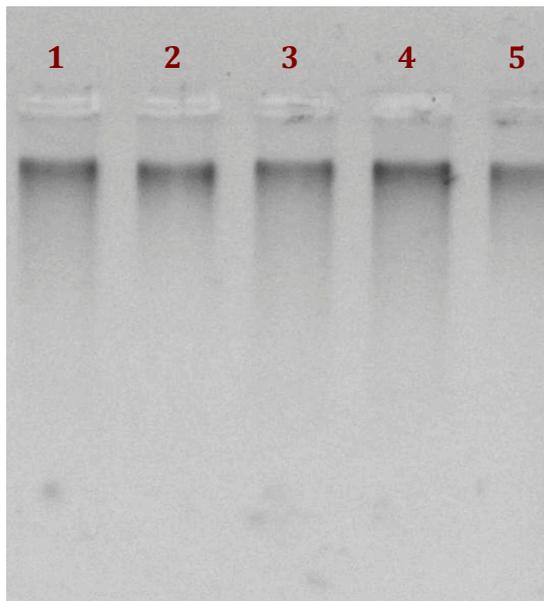


Figura 14. Gel de agarosa del ADN extraído de muestra de 10 metros (carril 1), red (carril 2,3,4), y superficie (carril 5). Colectadas en distintas fechas de muestreo (ver Tabla 6).

Tabla 6. Concentración, rendimiento total y pureza del ADN extraído en muestras de superficie, 10 m y red para distintas fechas de muestreo.

Carril	Muestra (d/m/a)	[ADN ng/ μ L]	Relación 260/280	Rendimiento ADN μ g
1	23-11-13 10m	12.7	1.28	1.27
2	23-11-13 red	11.4	1.54	2.28
3	08-11-13 red réplica	11.2	1.14	2.24
4	08-11-13 red	11.3	1.79	2.26
5	23-11-13 0m	16.1	1.52	1.61

5.4.2 Estandarización de condiciones de PCR para la identificación de *Alexandrium ostenfeldii*

En la Figura 15 se presenta el gradiente de temperatura que se realizó como parte de las pruebas de estandarización efectuadas para la identificación de *A. ostenfeldii*. La primera prueba fue realizada con las condiciones descritas en el artículo de Schwarz, 2011 (desnaturalización inicial a 94 °C x 4 min; 40 ciclos de 94 °C x 30 seg, 56 °C x 45 seg 72 °C x 90 seg y una extensión final 7 min a 72 °C). Adicionalmente a los 56 °C, se probaron dos temperaturas más a 58 y 60 °C; así también se probó las concentraciones del templado usando 131.2 ng/ μ L y 13.12 ng/ μ L (Fig. 15 corchetes azules). En la temperatura de 56 °C descrita por el autor, sí se observa la amplificación esperada de 99 pb; sin embargo, también se puede observar una banda inespecífica de 1000 pb, por lo que se descartó ésta temperatura, en contraste a 60 °C se obtuvo una mejor amplificación. También se puede observar que a bajas concentraciones de templado no ocurre una amplificación, por tanto se necesita una concentración mínima de templado.

Finalmente las condiciones para la amplificación estandarizadas en el presente trabajo utilizando los oligonucleótidos AOF4 y AOR3 fueron: (desnaturalización inicial a 94 °C x 4 min; 40 ciclos de 94 °C x 30 seg, 60 °C x 45 seg 72 °C x 1 min y una extensión final 7 min a 72 °C).

Estas condiciones difirieron con las condiciones publicadas por Schwarz (2011), en la temperatura de hibridación de 56 °C a 60 °C y el tiempo de extensión que se redujo de

90 seg a 60 seg. La amplificación bajo éstas condiciones, se muestran en la Figura 15 (corchetes verdes).

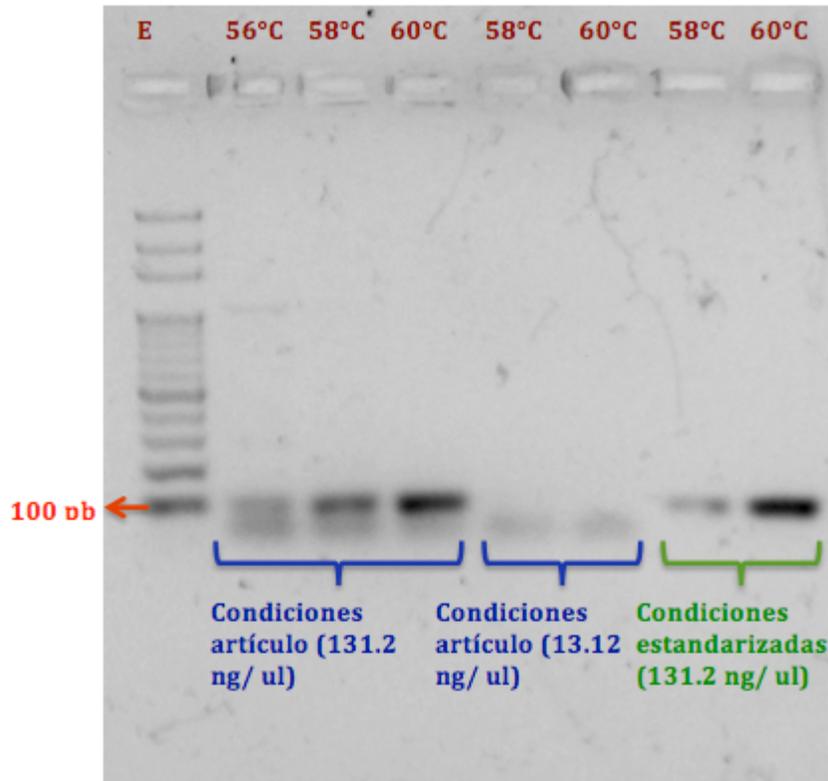


Figura. 15. Pruebas de estandarización de condiciones para la amplificación de un fragmento de la región ITS de 99 pb para la identificación *Alexandrium ostenfeldii*, utilizando como templado el ADN de la cepa. Las condiciones probadas del artículo de Schwarz, 2011 se muestran en corchetes azules y las condiciones estandarizadas en el presente trabajo se muestran en el corchete verde.

5.4.3 qPCR para descartar producto inespecífico y verificar la dimerización de oligonucleótidos.

Se realizaron pruebas con la técnica de qPCR para asegurarnos que la banda presente abajo del producto deseado en la amplificación de una región ITS para la especie de *A. ostenfeldii*, efectivamente sea un dímero formado entre los oligonucleótidos y no una amplificación inespecífica para otra especie. Se tomaron dos muestras de las cepas del cultivo de *A. ostenfeldii* como controles positivos que son los dos picos (verde y rojo) formados al lado derecho de la Figura 16 con una temperatura de disociación de 82 °C en las dos cepas, cada una con su respectiva réplica.

Adicionalmente se realizó la presente prueba con muestras de campo en las que habíamos observado en los geles de agarosa de los productos de PCR la presencia

únicamente de la banda por debajo de los 99 pb que es el caso de la muestra del 22 de agosto del 2013 a 0m que es el pico azul que se observa al lado izquierdo de la Figura 16, teniendo una temperatura disociación de 75 °C; al no tener templado de *A. ostenfeldii*, los oligonucleótidos tienden a formar los dímeros presentándose únicamente el pico de su dimerización. Se probó además con otra muestra de campo en la cual estuviesen presentes tanto la banda de amplificación de 99 pb; así como la banda que estaba por debajo del producto, como fue el caso de la muestra de red del 08 de agosto del 2013 que son los picos representados en color violeta, donde la amplitud del pico es muy ancha por la competencia entre los dímeros de los oligonucleótidos y el templado y la réplica de la misma muestra tienden a formar un pico más hacia el lado izquierdo, favoreciendo la dimerización entre los oligonucleótidos más que la hibridación del oligonucleótido con el templado. El control negativo produjo el pico negro al lado de la dimerización de los oligonucleótidos, esto pudo haber ocurrido por la concentración de oligonucleótidos con la que se realizó la reacción de 0,3 μM, al no haber templado, de igual manera los oligonucleótidos se dimerizan, teniendo un resultado positivo en el control negativo.

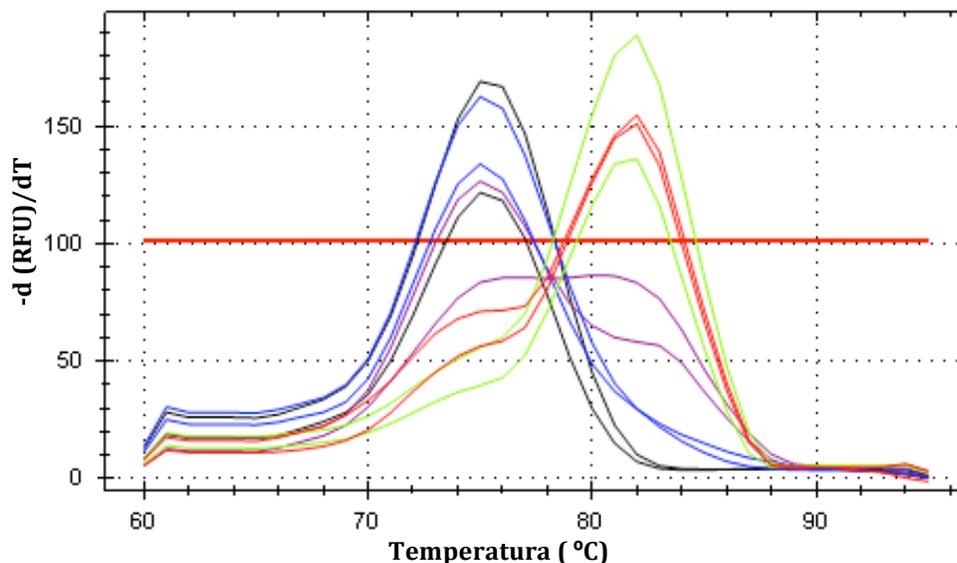


Figura. 16. Curva de disociación obtenida del programa Biorad de la reacción de qPCR con el fluoróforo SYBR en cepas de cultivo de *A. ostenfeldii* (amplificaciones de color rojo y verde) y muestras de campo del 22 de agosto del 2013 a 0m (amplificación color azul) y de red del 08 de agosto del 2013 (amplificación de color púrpura) y el control negativo (amplificaciones de color negro).

5.4.4 Secuenciación

Para verificar que los productos de 99 pb obtenidos de las reacciones de PCR con la utilización de los oligonucleótidos AOF4 y AOR3, corresponde a *A. ostenfeldii*, se enviaron a secuenciar los fragmentos que se encuentran remarcados en azul (Fig. 17) y que corresponde a una muestra de agua a 10 m de profundidad colectada el 8 de agosto del 2013 (M2) y a un control positivo obtenido de la cepa CCMP11773 de *A. ostenfeldii* en cultivo (A+).

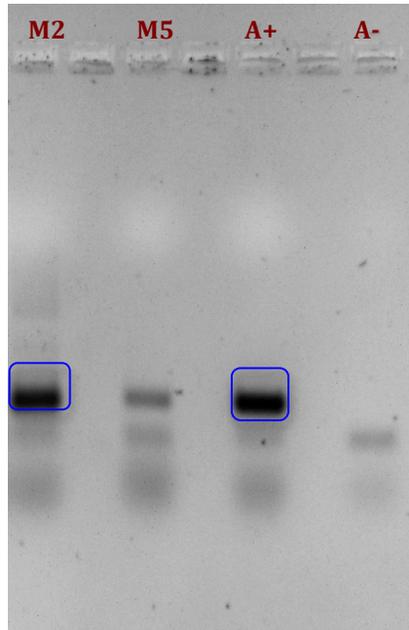


Figura. 17. Gel de agarosa con los productos de amplificación por PCR con los oligonucleótidos AOF4, AOR3 en muestras colectadas el 8 de agosto del 2013 a 10 m (M2) y el 10 de octubre del 2013 con red (M5). Muestras de un cultivo de *Alexandrium ostenfeldii* CCMP1773, control positivo (A+); agua, control negativo (A-).

Como resultado de la secuenciación realizada a la banda de 99 pb obtenida como producto de la reacción de PCR punto final de la cepa en cultivo de *A. ostenfeldii* CCMP1773, se obtuvo la secuencia descrita en el Anexo 7. Al realizar un BLAST (alineamiento de secuencias de tipo local) con la base de datos GenBank se obtuvo el 97 % de identidad con el alineamiento de 97 pb con las secuencias correspondientes a *A. ostenfeldii*. Dándonos un resultado positivo en nuestro control y asegurando que las amplificaciones realizadas corresponden a la especie de interés.

De igual manera la secuenciación de la banda de 99 pb obtenida de una muestra de campo (Anexo 7)(muestra del 08 de agosto del 2013 a 10 m) y posterior BLAST en la base de datos GenBank mostró el 98 % de identidad con el alineamiento de 98 pb con

la secuencia correspondiente a *A. ostenfeldii* (acceso JX 841278.1). Dándonos un resultado positivo y asegurando que las amplificaciones realizadas en las muestras de campo para la identificación de *A. ostenfeldii* corresponden a ésta especie.

5.4.5 Resultados de las reacciones de PCR en muestras ambientales

En la Figura 18 se presentan resultados representativos para la verificación del amplicon deseado en muestras de 0 m, 10 m y de red. La amplificación de una banda de 99 pb, que es el producto esperado al usar los oligonucleótidos específicos para detectar a *A. ostenfeldii*, permite corroborar por métodos moleculares la presencia de ésta especie en las muestras de agua. Un ejemplo de un resultado positivo esta representado por la muestras del 08 de abril del 2014 (Figura 18). Cuando la banda está ausente se tiene un resultado negativo que representa la ausencia de la especie como ocurrió el 22 de abril del 2014 (Figura 18). La especificidad de la reacción se probó utilizando como templado ADN del cultivo de *A. ostenfeldii* (A+; Figura 18) y se probó asimismo un control negativo que consistió en sustituir el ADN por agua ultrapura en la reacción de PCR (A-; Figura 18).

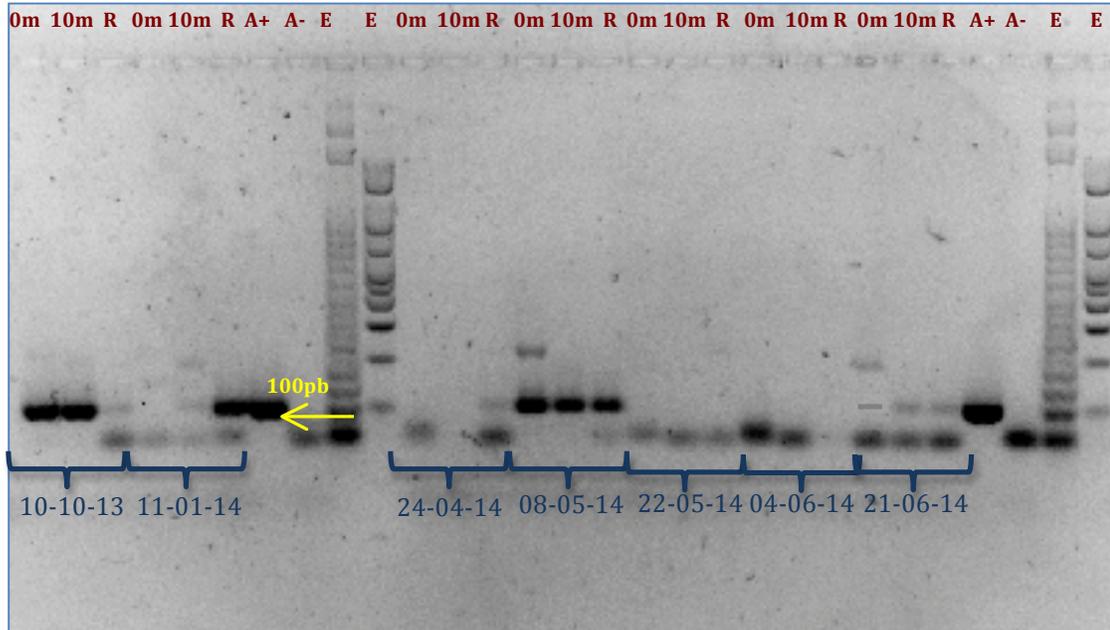


Figura. 18. Resultados de la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos AOF4 y AOR3 en ADN en muestras de agua colectadas en Rincón de Ballenas. La amplificación de un fragmento de 99pb de la región ITS representa un resultado positivo de la presencia de *Alexandrium ostenfeldii*. Se presentan los resultados de muestras de 0 y 10 m de profundidad y de muestras de red (R) colectadas el 10 de octubre del 2013, el 11 de noviembre del 2014, el 24 de abril del 2014, el 08 y 22 de mayo del 2014, el 04 y 21 de junio del 2014. A+ y A-, representan controles positivos y negativos, respectivamente. E representa la escalera de 50 a 100 pb.

Teniendo las condiciones de reacción estandarizadas, se analizaron un total de 57 muestras de agua para evaluar la presencia de *A. ostenfeldii*. Del total de muestras colectadas (Tabla 7) el 52.6% de éstas muestras dieron resultados positivos en la amplificación por PCR del fragmento ITS de 99 pb indicándonos la presencia de *A. ostenfeldii* en el área de estudio. La detección de la especie fue positiva en un 36.8% de las muestras colectadas en superficie mientras que a 10 m el 52.6% de las muestras fueron positivas. La mayor proporción de resultados positivos se presentó en muestras de red (68.42%; Tabla 7). En general, se detectó a *A. ostenfeldii* durante la mayor parte del periodo de muestreo por la técnica de PCR. Se registró a ésta especie en al menos una de las diferentes muestras colectadas en la columna de agua durante el presente estudio. Solamente en 5 de las 19 fechas de muestreo no se presentó un resultado positivo ni a 0m ni 10 m de profundidad o de red (Tabla 7). Por lo tanto, no se observó un patron claro de temporalidad para la presencia de *A. ostenfeldii* evaluado por PCR.

Tabla 7. Detección de *Alexandrium ostenfeldii* por medio de PCR en muestras de agua colectadas a 0m, 10m y red (arrastre vertical). En rojo se presentan las fechas de muestreo en donde se presentaron resultados negativos para los tres tipo de muestra colectadas.

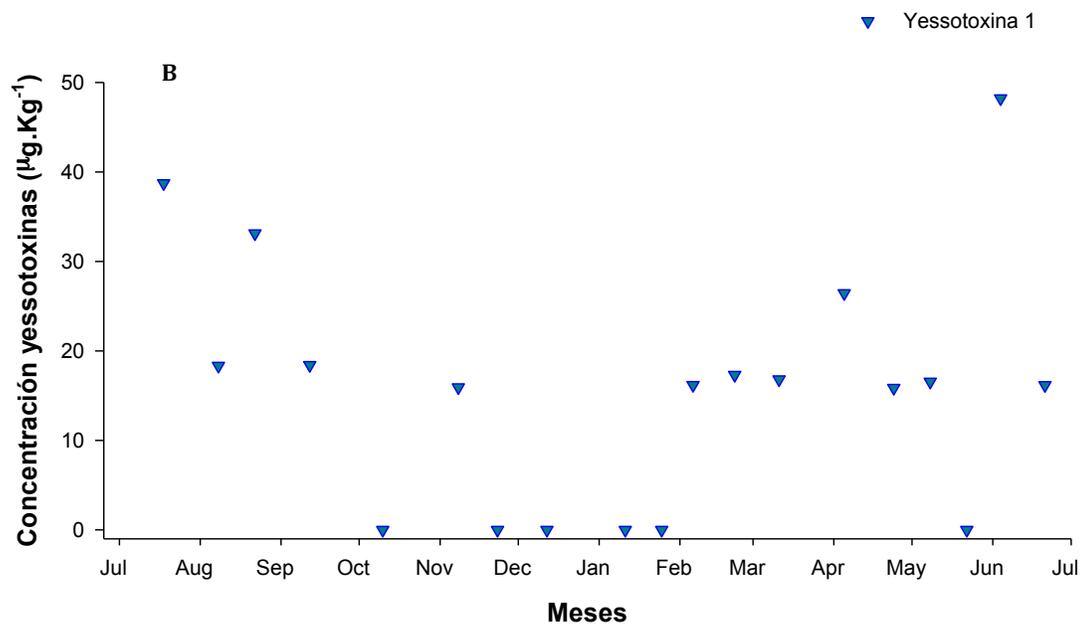
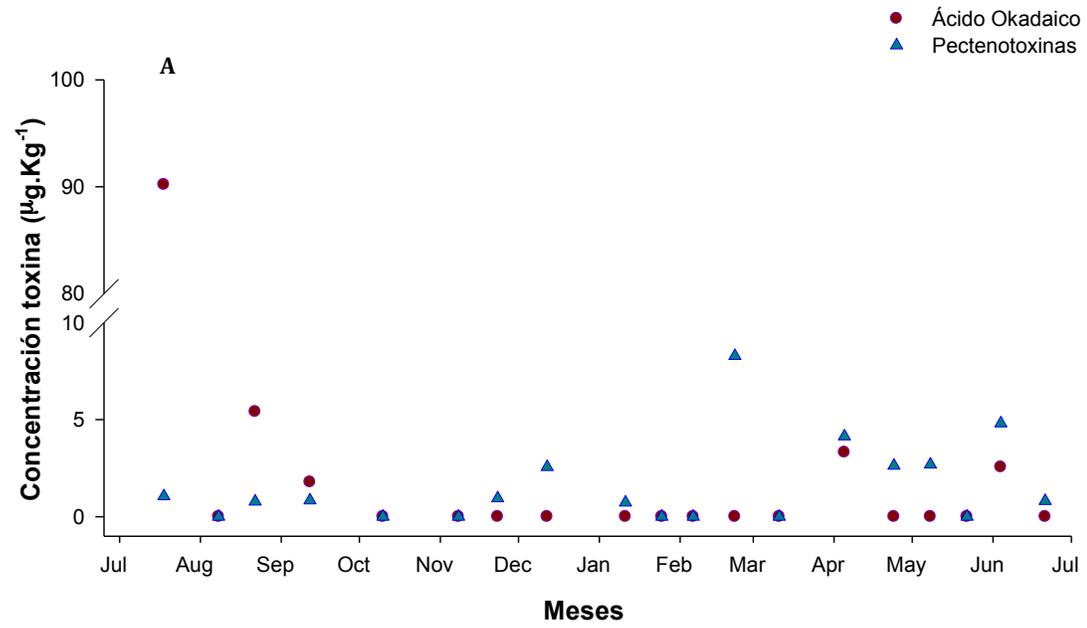
Día de colecta d/m/año	Botella 0 m	Botella 10 m	Red
18-07-13	Presencia	Presencia	Presencia
08-08-13	Ausencia	Presencia	Presencia
22-08-13	Ausencia	Ausencia	Presencia
12-09-13	Ausencia	Ausencia	Ausencia
10-10-13	Presencia	Presencia	Presencia
08-11-13	Ausencia	Ausencia	Presencia
23-11-13	Ausencia	Ausencia	Ausencia
12-12-13	Ausencia	Ausencia	Ausencia
11-01-14	Ausencia	Presencia	Presencia
25-01-14	Presencia	Presencia	Presencia
06-02-14	Presencia	Presencia	Ausencia
22-02-14	Presencia	Presencia	Presencia
11-03-14	Ausencia	Ausencia	Presencia
05-04-14	Ausencia	Presencia	Presencia
24-04-14	Ausencia	Ausencia	Presencia
08-05-14	Presencia	Presencia	Presencia
22-05-14	Ausencia	Ausencia	Ausencia
04-06-14	Ausencia	Ausencia	Ausencia
21-06-14	Presencia	Presencia	Presencia

5.5 Detección y cuantificación de Toxinas

Se detectaron diferentes toxinas de tipo lipofílico en el mejillón (*M. galloprovincialis*) por cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS). El ácido okadaico presentó una concentración máxima de $90.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ en julio del 2013, lo que es menor al el límite máximo permisible de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Fig. 19A). Posterior a esta fecha, la concentración del ácido okadaico disminuyó hasta los $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ y en septiembre y hasta el final del periodo de muestreo, la concentración fue mínima o por debajo del nivel de detección del método de medición (Fig. 19A). Se evaluó también la presencia de pectenotoxinas (PTXs), que son producidas por organismos del mismo género que producen el ácido okadaico (*Dinophysis*). La concentración de PTXs fue baja durante la mayor parte del periodo de estudio, con un máximo de $8.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ detectados en el mejillón a principios de febrero del 2014 (Fig. 19A).

Otro grupo de toxinas de tipo lipofílico detectado en las muestras fueron las yesotoxinas (YTX). Se detectaron concentraciones altas en la muestra de julio del 2013 con $38.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ y en agosto del 2013 con $33.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Fig. 19B), posteriormente las concentraciones disminuyeron encontrándose una variación entre los 15 a $19 \mu\text{g kg}^{-1}$ y específicamente en noviembre, diciembre y enero no se detectaron estas toxinas. A principios de junio del 2014 se detectó la concentración más alta de ésta toxina con $48.21 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Fig. 19B).

En el caso del azaspirácido 1 (AZA 1), su concentración se evaluó en el segundo análisis de toxinas lipofílicas utilizando un método específico para su detección y además se realizaron 3 inyecciones por cada muestra. En la Figura 19C se muestran el promedio de cada medición con su respectiva desviación estándar. El AZA 1 presentó una temporalidad clara de aparición al ser detectado solamente durante los meses de invierno. La concentración más alta se detectó a finales de enero y principios de febrero con 12.5 y $15.3 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Esta toxina estuvo presente también en la muestra del 22 de febrero del 2014 con $3.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ y del 11 de marzo del 2014 con $3.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Fig. 19C). Las gimnodiminas también se detectaron en el mejillón, aunque las concentraciones fueron muy bajas (Figura 19C). La concentración más alta de ésta toxina fue de $2.06 \mu\text{g kg}^{-1}$ y correspondió a la muestra del 12 de diciembre del 2013.



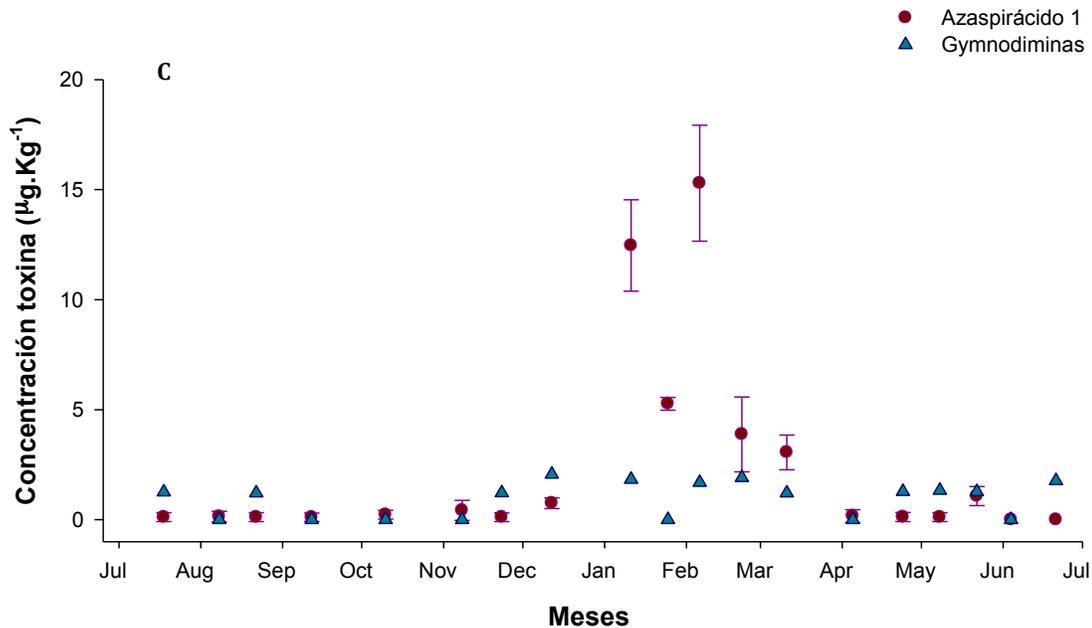


Figura. 19. Concentración de toxinas lipofílicas detectadas en *Mytilus galloprovincialis* cultivado de Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos empleando la técnica de (LC-MS/MS) durante julio del 2013 a junio del 2014. Se presenta la concentración de ácido okadaico y pectenotoxinas (panel A), concentración de yesotoxinas (panel B) y concentración de azaspirácidos y gimnodiminas (panel C).

Los resultados del primer análisis, que fue una prospección para evaluar la presencia de diferentes tipos de espirólidos, se presentan en la Figura 20. En este análisis se monitorearon las transiciones correspondientes de los distintos espirólidos que pudiesen estar presentes en las muestras de mejillón. Se detectó una señal, aunque muy baja, en la transición $678.500 > 164$ y $678.500 > 430.3$ que correspondería al 13–19 didesmetil espirólido C pero los tiempos de retención no coinciden entre éstas, por lo que su presencia es poco probable. El mismo caso ocurrió para el espirólido B ya que se detectó una señal muy baja y con tiempos de retención diferentes entre la transición $694.500 > 150$ y $694.500 > 444.30$ (Fig. 20). Se descartó la presencia de los espirólidos A, C y D debido a que no existió señal (relación masa/carga) o que los tiempos de retención entre las transiciones fueron muy distantes entre sí. Para el 13 Desmetil espirólido C, se obtuvo una mayor concordancia en los tiempos de retención entre sus transiciones ($692.501 > 164$ y $692.501 > 444.30$) con 4.4 minutos aunque el nivel de señal fue también bajo.

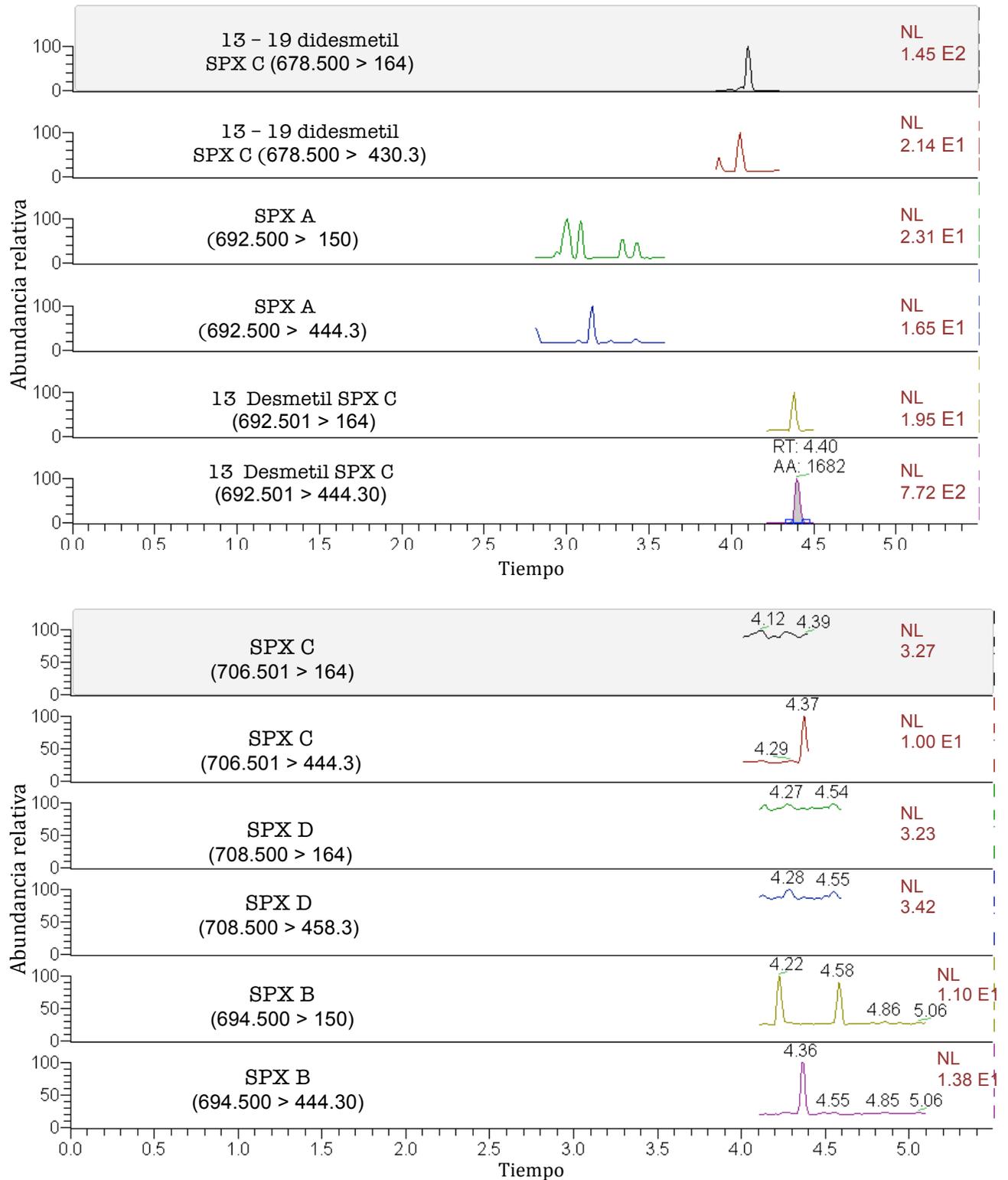


Figura 20. Cromatograma del primer análisis general de los espirólidos acumulados en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) por LC – MS/MS. Se presenta como ejemplo los resultados de la muestra del 09 de septiembre del 2013.

El segundo análisis consistió en monitorear un menor número de transiciones para la identificación específica de los espirólidos que se detectaron o que probablemente estén en la muestras de acuerdo a los resultados del primer análisis. Al reducir el número de transiciones simultáneas que se monitorearon existió una mayor frecuencia de muestreo y se pudo visualizar la presencia de las toxinas de manera más clara (aumentó la señal de los analitos). En este segundo análisis se confirmó la presencia del 13 desmetil espirólido C (Fig. 21) ya que el tiempo de retención del analito coincidió con el tiempo de retención del estándar de referencia y los tiempos de retención de las dos transiciones características para el 13 desmetil espirólido C (692.501 > 164 y 692.501 > 444.3) fueron iguales. Por otro lado, se confirmó que las muestras no contenían el 13-19 didesmetil espirólido C ni el espirólido B (Fig. 21).

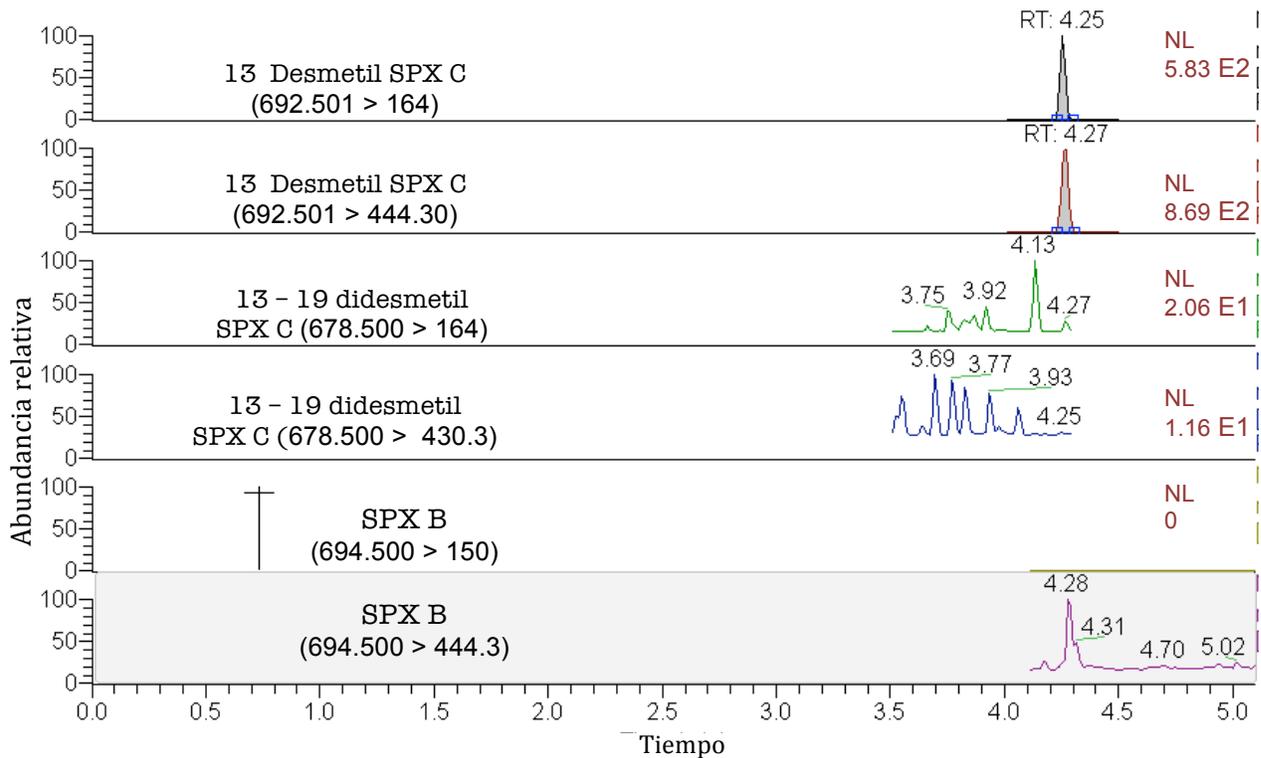


Figura. 21 Cromatograma del segundo análisis por LC – MS/MS para la confirmación de la presencia del 13 desmetil espirólido C, del 13-19 didesmetil espirólido C y el espirólido B. Se presenta como ejemplo los resultados de la muestra del 09 de septiembre del 2014.

Se realizaron tres inyecciones de la misma muestra para determinar la concentración del 13 desmetil espirólido C (13 desm SPX C). Las concentraciones fueron muy bajas, presentándose valores menores de $0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ que fue la concentración del estándar

en su nivel 4, por lo que fue considerada como el nivel mínimo de detección. Cuando la toxina presentó concentraciones menores a éste valor, se consideró como no detectada.

La variación de la concentración del 13 desmetil espirólido C en mejillón se presenta en la Figura 22. Se presenta asimismo, la abundancia de *A. spp.* a 10 m y los resultados de la detección de *A. ostenfeldii* por PCR. La presencia del 13 desm SPX C no mostró una temporalidad clara de aparición durante el periodo de estudio. En otoño se detectaron las concentraciones más altas de la toxina, con 0.92 y 1.02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en las muestras del 12 de septiembre y del 10 de octubre del 2014, respectivamente (Fig. 22). En invierno las concentraciones de la toxina fueron bajas. Se detectaron 0.38 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en la muestra del 12 de diciembre del 2013 y 0.63 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en la muestra del 22 de febrero del 2014. En primavera la concentración de la toxina fluctuó entre 0.37 y 1.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$, ésta última concentración se registró al finalizar la primavera el 22 de mayo del 2014. (Fig. 22).

La abundancia de *Alexandrium spp.* de 3200 cél.L^{-1} detectada en julio del 2013 no concuerda con la concentración del 13 desm SPX C en el mejillón. La toxina fue detectada en esta fecha pero no es una de las concentraciones más altas detectadas para el periodo de estudio. En ésta muestra se realizó un análisis para la detección de toxinas de tipo paralizante (saxitoxinas y sus derivados), ya que tanto *A. ostenfeldii* como otras especies del género *Alexandrium* pueden producir este tipo de toxinas. Sin embargo, no fueron detectadas las toxinas (PSP) en la muestra.

Otro punto que no concuerda entre la concentración del 13 desm SPX C y la abundancia celular de *A. spp.* fue para la muestra del 12 de septiembre del 2013. En esta fecha, se registró una de las concentraciones más altas de la toxina con 1.025 $\mu\text{g kg}^{-1}$ mientras que no se detectó a *A. ostenfeldii* por PCR ni al género por medio de microscopía.

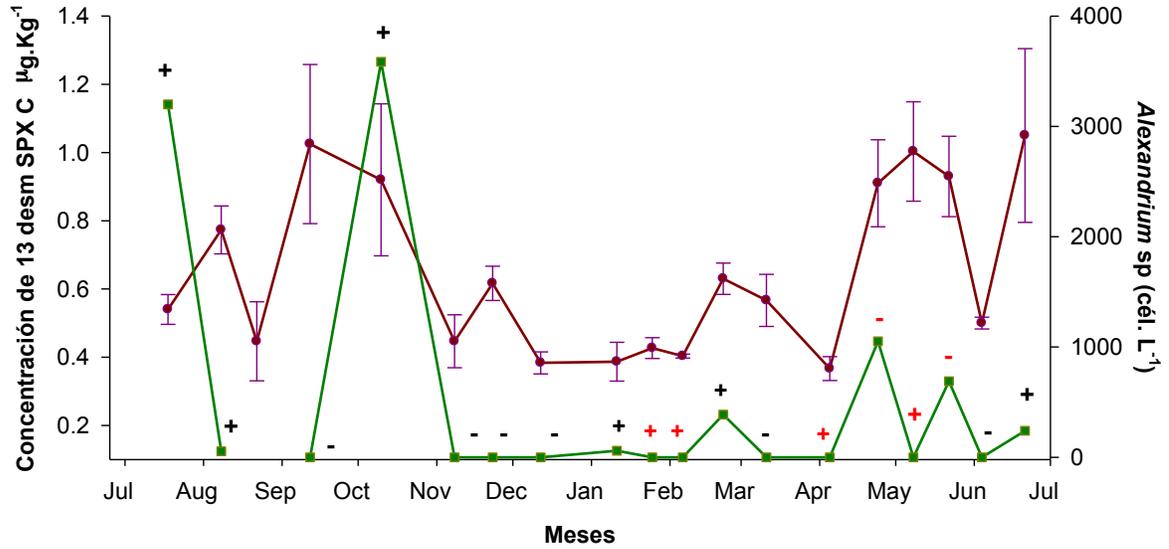


Figura. 22. Concentración del 13 desm SPXC C acumulado en *M. galloprovincialis* colectado del 17 de julio del 2013 al 22 de junio del 2014 y su relación con la abundancia de *Alexandrium* spp. en las muestras de agua colectadas a 10 m de profundidad. Los símbolos positivos (presencia) y negativos (ausencia) colocados sobre la abundancia, corresponden a los resultados de la evaluación de la presencia de *A. ostenfeldii* por PCR. Si los resultados por PCR coinciden con los resultados de microscopía el símbolo es negro y si el resultado difiere el símbolo es rojo.

Capítulo 6. Discusiones

6.1 Comunidad fitoplanctónica

El grupo de las diatomeas fue el más abundante durante el periodo de muestreo alcanzando una abundancia máxima de 286×10^3 cél. L^{-1} detectada a 10 m de profundidad el 8 de mayo del 2014. La abundancia de este grupo y en general de la comunidad fitoplanctónica, fue relativamente baja comparada con otros años. Por ejemplo, durante el 2012 se registraron abundancias de hasta 1200×10^3 cél. L^{-1} para el grupo de las diatomeas (Sánchez Bravo, 2013). Asimismo, durante el 2007 García-Mendoza *et al.* (2009) reportaron que las diatomeas fueron el grupo más importante de la comunidad fitoplanctónica dentro de la Bahía de Todos Santos, contribuyendo con la mayor parte de la biomasa del fitoplancton y solamente especies del género *Pseudo-nitzschia*, alcanzaron una abundancia máxima de 302×10^3 cél. L^{-1} .

La dinámica de las poblaciones de diatomeas en el Sistema de la Corriente de California (SCC) depende del aporte de nutrientes por procesos de surgencia (Venrick *et al.*, 2000; Trainer *et al.*, 2000). Las surgencias se pueden presentar todo el año, pero son más intensas en primavera y verano en la región sur del SCC (Pérez-Brunius *et al.*, 2006; Trainer *et al.*, 2000). El aumento de las diatomeas después de abril del 2014 coincide con el inicio de la estratificación de la columna de agua, presentándose una capa de mezcla bien definida y agua fría en el fondo (≥ 14 °C). Esto indica la presencia de surgencias fuera de la bahía. En general, la entrada de agua fría se presenta en la boca norte y dentro de la bahía se forma un lente cálido en la superficie, ya que esta actúa como un trampa de agua de surgencia (Calva, 2014). Este proceso físico está asociado con entrada de nutrientes a la bahía y un incremento de la biomasa fitoplanctónica. Las diatomeas responden primeramente a los pulsos de nutrientes y posteriormente se presenta una sucesión de las poblaciones fitoplanctónicas dominando los dinoflagelados (Margalef, 1978; Venrick *et al.*, 2000; Trainer *et al.*, 2000).

En el verano del 2013 se observaron condiciones similares de estratificación; sin embargo, existió una baja abundancia de diatomeas y en general de fitoplancton. Esta baja abundancia se puede atribuir a una baja intensidad de surgencias o ausencias de

las mismas durante éste periodo. Por otro lado, Cabrales Talavera (2010) reporta que la concentración de fosfatos limitó la acumulación de fitoplancton en la bahía durante el 2012. El aporte principal de este nutriente esta asociado con el deslave de material terrígeno hacia la bahía (Cabrales Talavera, 2010). Se ha documentado que existe una asociación entre la presencia de florecimientos en primavera-verano con la intensidad de lluvias durante el invierno (Peña-Manjarrez *et al.*, 2005). Por lo tanto, existen diferentes factores y no solo la intensidad y frecuencia de surgencias, que determinan la dinámica de las poblaciones fitoplanctónicas dentro de la Bahía de Todos Santos.

Con respecto al grupo de los dinoflagelados, su abundancia fue asimismo, relativamente baja con un máximo de 20.2×10^3 cél. L^{-1} detectada a 10 m de profundidad el 23 de noviembre del 2013. En este año no se registró una acumulación significativa de los dinoflagelados que comunmente florecen en la Bahía de Todos Santos. Sánchez Bravo (2013) reportó abundancias de hasta 60×10^3 cél. L^{-1} en el 2012. Esta abundancia estuvo asociada a la presencia de *Lingulidinum polyedrum*. En otros estudios, se ha visto que durante florecimientos algales éste organismo puede alcanzar abundancias arriba de las 10^6 cél. L^{-1} (Peña-Manjarrez *et al.*, 2009). De igual manera, otras especies como *Ceratium divaricatum* pueden alcanzar densidades en este orden de magnitud (García-Mendoza *et al.*, 2009) .

Durante el periodo de estudio no existió un patrón claro de variación en la abundancia de dinoflagelados y el aumento de la biomasa fitoplanctónica estuvo asociada a la variación de la abundancia de las diatomeas. En los meses muestreados del 2013, no existió una clara variabilidad estacional de la biomasa fitoplanctónica. En general la baja abundancia del fitoplancton y la falta de temporalidad en la variación de la abundancia de dinoflagelados y diatomeas probablemente se asoció a que el 2013 no fue un año típico y se presentaron temperaturas más altas en la región. Hayward *et al.* (1994), menciona que antes de un evento del Niño existen anomalías positivas en la temperatura del agua. Durante el verano las temperaturas fueron altas en comparación a las registradas durante el 2012. En julio del 2012 Sánchez Bravo (2013) reportó temperaturas superficiales entre 17.20 y 18.70 °C y en el presente estudio para este mes se registró una temperatura superficial de 20.79 °C. Adicionalmente, Sánchez Bravo (2013) reporta que se registraron periodos cortos de descenso de la temperatura

superficial inducidos por la intrusión de agua de surgencia, el descenso más importante ocurrió en julio con una disminución de 18.5 °C a 14 °C. Asimismo, Granados–Guzmán *et al.* (1995) reportaron que las temperaturas superficiales más bajas en la bahía se registraron en verano y primavera con 11.2 °C en mayo y 12.5 °C en julio, lo que indica entrada de aguas frías de surgencias y rompimientos de la estratificación durante estos eventos. Durante el presente estudio no se registraron temperaturas bajas durante el verano, ni una fuerte estratificación durante el otoño. Se requiere realizar un análisis más detallado de la variación de la temperatura durante 2013 y 2014 para evaluar si durante éste periodo efectivamente existió una anomalía positiva y la magnitud de ésta. El efecto de la misma sobre la comunidad fitoplanctónica debe asimismo, analizarse. Esta aproximación va más allá de los objetivos del presente trabajo.

6.2 Presencia de *Alexandrium* spp. en muestras de agua

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la presencia de *A. ostenfeldii* en la Bahía de Todos Santos, como especie productora de espirólidos. El uso de diferentes técnicas analíticas permitió identificar a *A. ostenfeldii* en la bahía. Los resultados de microscopía óptica y la detección por medio de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para ésta especie, además de la detección de los espirólidos en muestras de mejillón, confirmó la presencia de ésta especie en la región.

La presencia de *A. ostenfeldii* representa un registro nuevo en la región. Se pensaba que ésta especie era exclusiva de aguas frías, por lo que fue considerada como una especie del “Boreal–Ártico”; sin embargo, ahora se conoce que también está presente en aguas templadas a través del mundo con rango de distribución mucho más amplio (Gribble *et al.*, 2005). Los registros más cercanos a nuestra área de estudio corresponden a Canadá (en las costas de Nueva Escocia) (Cembella *et al.*, 2000b), en el Pacífico norte, cerca de Tacoma, Washington (Balech, 1995). En la costa este de los Estados Unidos (Golfo Maine) (Gribble *et al.*, 2005). En el Pacífico mexicano, *A. ostenfeldii* se reportó en las costas de Michoacán (Ceballos–Corona, 1988). Sin embargo, la presencia de esta especie en esta zona no ha sido confirmada (Okolodkov, 2004).

Es necesario puntualizar que la identificación por medio de microscopía óptica se realizó hasta el nivel de género, ya que la identificación a nivel de especie requiere el empleo de microscopía de barrido y la disección de las placas para observar las diferencias entre las especies de éste género. Es necesario realizar este análisis para confirmar por medio de microscopía la presencia de ésta especie en la región. De acuerdo a lo anterior, las abundancias celulares reportadas en el presente trabajo corresponden a *Alexandrium* spp. La presencia de especies del género *Alexandrium* no fue constante durante el periodo de muestreo y tampoco presentaron una clara temporalidad de aparición. La abundancia máxima fue de 3618 cél. L⁻¹ registrada el 10 de octubre del 2013 en muestras de superficie. Otra fecha de muestreo con abundancias importantes fue el 18 de julio del 2013 con 3200 cél. L⁻¹ a los 10 m de profundidad. Autores como Balechi y Tangen, (1985); Moestrup y Hansen, (1988); Gribble *et al.* (2005), describen a *A. ostenfeldii* como una especie presente en bajas concentraciones en la comunidad fitoplanctónica, con abundancias celulares de 10² a 10³ cél. L⁻¹ en condiciones normales. Hakanen *et al.* (2012) registraron un florecimiento de *A. ostenfeldii* en el mar Báltico en julio del 2009 con una abundancia de 1.7 a 2.1 x 10⁵ cél. L⁻¹. En otras regiones se han reportado concentraciones celulares menores para ésta especie. Por ejemplo, en la costas de Nueva Escocia (Canadá), *A. ostenfeldii* está presente de manera críptica en capas subsuperficiales en agregaciones celulares con abundancias menores a 4000 cél. L⁻¹ (Cembella *et al.*, 2001). Asimismo, en la Bahía Casco (Estados Unidos) se registró una abundancia celular máxima de 244 cél. L⁻¹ durante junio del 2001 (Gribble *et al.*, 2005). Las abundancias celulares registradas durante el presente estudio son concentraciones bajas, típicas para la especie en condiciones normales y que están por debajo de las concentraciones reportadas en otras regiones durante un florecimiento.

Las bajas abundancias de esta especie y su forma de vida dificultan su detección. Se han reportado que *A. ostenfeldii* está en “semilleros” de quistes en el sedimento cuando hay poca abundancia en la columna de agua como células vegetativas; por lo tanto esta especie, es capaz de provocar florecimientos aperiódicos bajo la estimulación de condiciones ambientales que hacen germinar sus quistes (MacKenzie *et al.*, 1996). En el estudio realizado por Anderson *et al.* (2012) se menciona que la germinación de los quistes ocurre tanto por factores exógenos (temperatura, agotamiento de fósforo y

nitrogéno, bacterias específicas que pueden inducir o inhibir el enquistamiento) como endógenos (reloj anual). La alta variación de la presencia de esta especie registrada en el presente trabajo, probablemente este asociada al cambio entre células vegetativas y quistes. Ostergaard y Moestrup (1997) reportaron variaciones en la concentración celular debido a cambios rápidos entre los estadios pelágicos y bentónicos de *A. ostenfeldii* por la producción activa de quistes temporales.

6.3 Relación de la temperatura con la abundancia de *Alexandrium* spp.

La temperatura tiene una influencia directa sobre los procesos fisiológicos celulares y determina la tasa metabólica de los organismos por lo que es una de las variables ambientales más importantes que condiciona la distribución de las especies fitoplanctónicas. Durante el presente estudio, no se observó una clara asociación entre la presencia de *Alexandrium* spp. y una temperatura específica. Se detectaron dos picos de alta abundancia de *A. spp.* a una temperatura superficial de 17 °C en octubre del 2013 y el 08 de mayo del 2014. Sin embargo, el 18 de julio del 2013 en donde se obtuvo una temperatura superficial de 20.79 °C, también se registró una abundancia alta con 2831 cél. L⁻¹. Aparentemente la estratificación en la columna de agua favorece la presencia del género ya que durante los meses donde el agua estaba mezclada y homogénea no hubo el registro de la especie o sus concentraciones fueron menores a 500 cél. L⁻¹, a excepción de octubre. Garneau *et al.* (2011) registró que las máximas abundancias para *A. catenella*; así como las concentraciones más altas de STX se observaron en verano – otoño en las costas de Oregón; así también en regiones del norte de California. Estos periodos están caracterizados por ser secos y calientes con surgencias débiles y bajos en niveles de nutrientes. La estratificación de la columna de agua, con una capa superficial estable al parecer favorece el crecimiento de *Alexandrium* spp., estos periodos son coincidentes con periodos en donde los nutrientes están limitados (Horner *et al.*, 1997).

El calentamiento oceánico influye en la ampliación de la distribución espacial y estacional de las especies fitoplanctónicas de aguas templadas y tropicales (Hallegraeff *et al.*, 2010). Se ha registrado que la mayoría de los florecimientos recientes de *A. ostenfeldii* han ocurrido durante el verano en áreas costeras del mar Báltico norte y están asociados a periodos con aguas calientes con una temperatura entre los 19 a 23

°C, con incrementos cortos en la abundancia de la especie aunque las condiciones permanezcan iguales en la columna de agua (Hakanen *et al.*, 2012). Moestrup y Hansen, (1988) detectaron a *A. ostenfeldii* en las costas de Dinamarca cuando la temperatura estuvo por debajo de los 20 °C. De manera similar, durante el presente estudio, las abundancias más altas del género estuvieron asociadas a periodos con aguas cálidas (17 y 20 °C).

La persistencia y la fuerza de la estratificación es una de las condiciones más importantes que favorecen el desarrollo del fitoplancton y, en algunos casos, la selección de taxones de especies tóxicas. (GEOHAB, 2013). En el presente estudio se registraron abundancias altas en condiciones de estratificación del agua; sin embargo, la presencia de ésta especie no está directamente relacionada al proceso de estratificación. La acumulación de células vegetativas en la columna es fuertemente afectada por la circulación del agua, nutrientes, factores químicos y físicos de las masas de agua y no sólo se ven beneficiados por la estratificación (Anderson *et al.*, 2012). El equilibrio de los procesos biológicos junto con el acoplamiento de las condiciones físicas y químicas influyen en la ganancia (división celular, agregación) o pérdidas (dispersión, sedimentación, pastoreo) de las especies fitoplanctónicas (GEOHAB, 2013). Por lo tanto, aunque se haya registrado una fuerte estratificación en la columna, existen otros factores (nutrientes, salinidad, irradiancia, entre otros) que están influenciando la presencia de *Alexandrium* spp. en la región.

6.4 Identificación de *Alexandrium ostenfeldii* por PCR punto final

Del total de muestras analizadas por la técnica de PCR, en el 52.6% se detectó la amplificación del fragmento ITS de 99 pb, indicándonos la presencia de *Alexandrium ostenfeldii* en el área de estudio. Se detectó a *A. ostenfeldii* en un 36.8% de las muestras colectadas en superficie mientras que a 10 m el 52.6% de las muestras fueron positivas. La mayor proporción de resultados positivos (presencia) se presentó en muestras de red con un 68.42%. Las muestras fitoplanctónicas provenientes de un arrastre vertical son una integración de la comunidad a diferentes niveles de profundidad hasta los 20 m, por lo que la probabilidad de encontrar a *A. ostenfeldii* es mayor que en muestras colectadas a profundidades específicas. En el análisis por

microscopía no se detectó una diferencia entre las abundancias de *Alexandrium* spp. en la superficie, a 10 m de profundidad y en muestras de red. Sin embargo, con el empleo de la técnica molecular sí se detectó una diferencia en la presencia de *A. ostenfeldii* en la columna de agua. Se registró un 15.8% más de muestras positivas a 10 m de profundidad en comparación a la detección en superficie. Esta diferencia probablemente esta relacionada al patrón de migración vertical que tienen los dinoflagelados que les permite bajar durante la noche a mayores profundidades para obtener nutrientes y migrar hacia la superficie durante el día para realizar la fotosíntesis; sin embargo Anderson *et al.* (1998) observaron que las células de *A. tamarense* pueden permanecer a una profundidad en una capa subsuperficial aún durante el día para evitar el transporte fuera de las ensenadas, por el flujo costa afuera de la capa superficial de agua.

Penna *et al.* (2007) en su estudio para monitorear especies fitoplanctónicas tóxicas en el mar Mediterráneo mediante métodos moleculares encontraron que la detección de las especies con la técnica de PCR dio resultados positivos incluso cuando éstas no pudieron ser observadas durante el análisis por microscopia, sobre todo estos resultados se presentaron en géneros como el de *Alexandrium*. Estos resultados están relacionados al límite de detección que posee cada una de las técnicas. Edler y Elbrächter (2010) reportaron que el rango de detección en el análisis de muestras fitoplanctónicas por el método de Utermöhl contando todas las células que están presentes en la cámara y con un volumen de sedimentación de 25 mL es de 10 cél. L⁻¹ mientras que en un volumen de sedimentación de 10 mL es de 4 cél. L⁻¹, disminuyendo la probabilidad de detección de una especie específica. Penna *et al.* (2007) reportaron que la sensibilidad de la reacción de PCR en su estudio fue la amplificación de 1 pg de ADN genómico. Por otra Kremp *et al.* (2009) determinaron que el contenido de ADN nuclear estimado para *A. ostenfeldii* es de 115 pg de ADN por célula. En base a estos reportes se puede deducir que la técnica de PCR es capaz de detectar 1 célula de *A. ostenfeldii*. Bott *et al.* (2010) menciona que la técnica de PCR puede amplificar cantidades mínimas de templado de ADN y multiplicar incluso una sola copia de ADN. Debido a la sensibilidad de la técnica es que se pudo registrar una mayor detección para *A. ostenfeldii* por PCR en comparación con los resultados de microscopia.

En el presente estudio de un total de 57 muestras analizadas, se obtuvo un 19.29% de mayor detección para la especie empleando la técnica molecular en comparación con el método de microscopía. Esto concuerda con el estudio realizado por Penna *et al.* (2007) quien reporta una identificación positiva mayor para *A. catenella* en un 38%, para *A. minutum* en un 36% y para *Alexandrium* spp en un 20% por PCR comparada con el método por microscopía. La diferencia entre las dos técnicas esta asociada principalmente a la dificultad de identificar morfológicamente a las especies de dinoflagelados por microscopía ya que presentan diferentes estadios de vida (quistes y células vegetativas) y existe un alto grado de similitud entre especies estrechamente relacionadas (Touzet *et al.*, 2008). Por tanto, el empleo de técnicas moleculares basados en el ADNr son una herramienta sensible y específica para la detección de especies tóxicas que provocan los florecimientos algales nocivos (Ebenezer y Medlin, 2012).

Por otra parte, existieron muestras en las que se pudo registrar la presencia de *Alexandrium* spp. (24 de abril del 2014) por microscopía pero no se obtuvo amplificación del producto esperado de 99 pb, lo que sugiere que la especie detectada por microscopía no corresponde a *A. ostenfeldii*. Por lo tanto, este resultado sugiere que otras especies del género *Alexandrium* se encuentran presentes en la zona. En la Bahía de Todos Santos se ha reportado la presencia de *A. catenella* (Peña-Manjarrez, 2005), el cuál ha sido responsable de la acumulación alta de toxinas de tipo paralizante en las costas del Pacífico de Norteamérica, principalmente del centro de California hasta Alaska (Lewitus *et al.*, 2012). Esta especie pudo estar presente en la bahía durante el periodo de muestreo. Otra posibilidad, es que *A. peruvianum*, que morfológicamente tiene un alto grado de similitud con *A. ostenfeldii*, estuvo presente en las muestras. Estudios moleculares sugieren que *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* podrían representar un complejo de especies con una considerable diversidad críptica o una sola especie estructurada genéticamente con alta variación morfológica (Kremp *et al.*, 2009). Éstas dos especies han sido reconocidas como productoras de espirólidos. Por tanto, la presencia de *A. peruvianum* explicaría la detección de la toxina en meses donde *A. ostenfeldii* estuvo ausente como se discutirá más adelante.

6.5 Toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*)

Se detectaron diferentes toxinas de tipo lipofílico por medio de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC- MS/MS) en el mejillón (*M. galloprovincialis*). Se detectó al ácido okadaico y pectenotoxinas (toxinas de tipo diarreico), yesotoxinas, azaspirácidos tipo 1 (AZA 1), gimnodiminas y espirólidos. En general las concentraciones de éstas toxinas lipofílicas fueron bajas a excepción de los azaspirácidos, donde se obtuvieron mayores concentraciones en comparación con las detectadas durante el 2012 (García–Mendoza *et al.*, 2014). La baja concentración de las toxinas de tipo lipofílico está relacionada a una baja abundancia de las especies productoras de éstas toxinas.

Sánchez Bravo, 2013 durante julio del 2012 registró una concentración de $700 \mu\text{g kg}^{-1}$ para las toxinas diarreicas, sobrepasando el límite permisible establecido por la norma de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ y estuvo asociada a la presencia de *Dinophysis* sp. En el presente estudio también se encontró un pico en la concentración de ácido okadaico en julio con $90.19 \mu\text{g kg}^{-1}$ y también estuvo asociada a la misma especie. Sin embargo a diferencia del estudio realizado por Sánchez Bravo, 2013 no se registraron concentraciones que sobrepasen los límites permisibles establecidos en la NOM-SSA1-242-2009.

Las yesotoxinas estuvieron presentes con una temporalidad para los meses de verano, presentando en junio del 2014 una concentración máxima de $48.21 \mu\text{g kg}^{-1}$. La detección de las yesotoxinas estuvo relacionada con la presencia de *Protoceratium reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum* como especies productoras de éstas toxinas. En el estudio realizado por Lee *et al.*, 2012 se comprueba la variación estacional de las toxinas lipofílicas (AO, DTX, YTX), teniendo como resultado que se encuentran predominantes en primavera–verano, lo que concuerda con el presente trabajo. García–Mendoza *et al.*, 2014 reportó durante el 2012 en la Bahía de Todos Santos la concentración más altas para las yesotoxinas en junio con $1081 \mu\text{g kg}^{-1}$, sobrepasando los límites permisibles.

Barcebux, 2008 menciona que la aparición de los azaspirácidos ocurre en invierno de noviembre–abril, presentándose en éstos meses una mayor toxicidad; esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio donde encontramos a los azaspirácidos (AZA1) con una temporalidad marcada a finales de enero y febrero correspondientes a los meses de invierno con una concentración de 12.46 y 15.29 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. García–Mendoza *et al.*, 2014 reporta por primera vez la presencia de AZA 1 en la bahía de Todos Santos con una concentración máxima de 6.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en noviembre. A diferencia del resto de toxinas, las concentraciones de los azaspirácidos se duplicaron con respecto a las concentraciones reportadas por García–Mendoza *et al.* (2014).

Las gimnodiminas no presentaron una temporalidad; sino más bien su acumulación en el mejillón fue durante casi todo el año. La concentración más alta se registró en diciembre con 2.06 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

De los diferentes tipos de espirólidos, sólo se detectó al 13 desmetil espirólido C el mejillón mediterráneo de la región. Esta toxina se presentó en el 78.94% de las muestras analizadas y no se observó una temporalidad clara de aparición de ésta toxina. En general, la concentración del 13 desmetil espirólido C fue baja durante todo el periodo de estudio. La concentración más alta fue de 1.02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ detectada en septiembre. En éste muestreo no se observó la presencia del *Alexandrium* spp. por microscopia ni tampoco se detectó a *A. ostenfeldii* por PCR. Esta inconsistencia entre la detección de la toxina y la ausencia de la especie productora, pudo estar asociada a una proliferación rápida de quistes que por la remoción de sedimento, fueron levantados a la columna de agua. Dentro del área de cultivo del mejillón mediterráneo, como una operación de rutina está el levantar líneas que se hundan con producto (módulos de ostión, calcetines con mejillón), lo que provoca el levantamiento de sedimento del fondo, por tanto días previos a la realización del muestreo, *A. ostenfeldii* pudo estar disponible para ser filtrado y acumular su toxina en el mejillón, sin que se registrara su presencia durante el muestreo. Como se había mencionado anteriormente, los “semilleros” de quistes en el sedimento son lugares donde pueden estar las poblaciones de *A. ostenfeldii* y esto ocasiona florecimientos rápidos y localizados más que poblaciones persistentes en la columna de agua a lo largo del año (Anderson, 1997).

Por otro lado, en octubre se detectó una concentración baja de espiróolidos ($0.92 \mu\text{g kg}^{-1}$) pero se registró la abundancia celular más alta de *Alexandrium* spp a 10 m de profundidad con 3586 cél. L^{-1} y en la superficie con 3618 cél. L^{-1} , que correspondió al 12.10 % y el 17.47 % respectivamente, de la abundancia relativa con respecto al total de la comunidad fitoplanctónica registrada para ésta muestra. Adicionalmente, las pruebas por PCR confirmaron la presencia *A. ostenfeldii*. A pesar de ser abundancias importantes dentro de la comunidad fitoplanctónica de la región, son menores a las abundancias registradas durante florecimientos de la especie. Kremp *et al.*, (2009) reportó concentraciones celulares para *A. ostenfeldii* de 10^5 y 10^6 cél. L^{-1} en el archipiélago Åland en la costa sur este de Finlandia durante un florecimiento.

En julio se observó una de las densidades celulares más altas para *Alexandrium* spp. con 2831 cél. L^{-1} a 0 m y 3200 cél. L^{-1} a 10 m y mediante PCR se confirma la presencia de *A. ostenfeldii*. Sin embargo, los espiróolidos se encuentran en concentraciones trazas, cerca del límite de detección con $0.54 \mu\text{g kg}^{-1}$. La concentración de toxinas que produce una célula puede ser muy variable. Por ejemplo, la composición de toxinas PSP es una característica estable, fijada genéticamente para cada clona de la cepa de *Alexandrium* spp, pero pueden existir variaciones significativas en la concentración celular de toxinas relacionado a las estado fisiológico de los organismos de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes, temperatura, irradiancia, salinidad o incluso depende de la fase de crecimiento (Boczar *et al.* , 1998; Anderson *et al.* , 2012). Por lo tanto, las condiciones ambientales en fechas específicas del muestreo pueden influenciar en la producción de toxinas de las especies de *Alexandrium* spp. tóxicas presentes en la bahía. Además es necesario recordar que la identificación de *Alexandrium* spp. podría estar abarcando diferentes especies del género y la abundancia reportada no se puede correlacionar con la concentración de toxina detectada en el mejillón. Específicamente, diferentes cepas de *A. ostenfeldii/peruvianum* aisladas de diferentes localidades presentan una tasa de crecimiento, producción y perfiles de toxinas diferentes al ser cultivadas a distintas salinidades (Suikkanen *et al.*, 2013).

En los resultados del análisis de las toxinas acumuladas en el mejillón mediterráneo sólo se encontró al 13 desmetil espirólido C, lo que indica que la cepa toxica presente en la bahía solo esta produciendo este tipo de espirólidos y ningún otro análogo. Estudios filogenéticos han revelado que *A. ostentfeldii* y *A. peruvianum* forman agrupaciones por distinciones genéticas y estos grupos formados también reflejan diferencias entre grupos, por su composición de toxinas, particularmente en los perfiles de espirólidos (Kremp *et al.*, 2014). Es así que la cepa que se encuentra presente en la bahía debe estar relacionada con ciertas cepas que produzcan mayoritaria o exclusivamente el 13 desm SPXC como es el caso de la cepa LS AO6 de *A. ostentfeldii/peruvianum* aislada de Irlanda (Suikkanen *et al.*, 2013) o la cepa AOF0901 de *A. ostentfeldii* aislada en Finlandia (Kremp *et al.*, 2014). Estas cepas están dentro del grupo 1 y 2 caracterizado en el estudio de Kremp *et al.*, (2014). La distribución de cepas que producen el 13 desmetil espirólido C dominan en las costas de Canadá, Estados Unidos, España e Irlanda (Cembella *et al* 2000; Mackinnon *et al.*, 2004; Percy *et al.*, 2004).

Ciertas cepas de *Alexandrium ostentfeldii/peruvianum* pueden producir toxinas de tipo paralizante (PSP), además de espirólidos y gimnodiminas (Wiese *et al.*, 2010). En las muestras de mejillón de julio, octubre y abril, donde sí se detectó a *Alexandrium* spp. por microscopía y *A. ostentfeldii* por PCR pero no se encontraron concentraciones significativas de espirólidos, se realizó el análisis para la detección de saxitoxina (STX) y sus derivados. Sin embargo no se detectó en ninguna de las muestras la presencia de éste tipo de toxinas, confirmando la producción exclusiva del 13 desm SPXC en la cepa de *A. ostentfeldii* que se encuentra presente en la bahía.

El estado de Baja California es el primer productor de moluscos bivalvos en México, en esta región se implementaron tres vedas sanitarias en el año 2012, por la presencia de toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo, detectadas por medio de bioensayo en ratón que es la técnica aprobada en la normativa nacional (NOM-SSA1-242-2009). La guía técnica para el control sanitario de moluscos bivalvos establece que para el levantamiento de una veda sanitaria se necesitan dos resultados negativos consecutivos, considerando un muestreo con intervalos de cuatro días (COFEPRIS, 2011). En el estudio realizado por Sánchez Bravo (2013), se estableció que de las tres

vedas sanitarias implementadas en el 2012, el primer cierre de la zona de cosecha en la Bahía de Todos Santos, correspondiente al 4 de abril hasta el 16 de abril fue implementado en base a falsos positivos al comparar los resultados obtenidos con el bioensayo en ratón con los resultados de la técnica analítica de LC – MS/MS. Chapela *et al.* (2008) encontró que la detección de toxinas lipofílicas por medio del bioensayo en ratón obtuvo el 26% de falsos positivos al analizar siete diferentes especies de moluscos en comparación con la detección realizada por LC – MS/MS. Los espirólidos son toxinas de acción rápida que pueden interferir en los resultados para la detección de toxinas lipofílicas reguladas (A.O; YTX; AZA) y por lo tanto provocar la implementación de vedas innecesarias como fue el caso de la primera veda establecida en el año 2012 que conlleva a pérdidas económicas en el sector productor. Este estudio aportó al conocimiento de las concentraciones promedio del espirólido (13 desm SPXC) presente en el área de cultivo del mejillón mediterráneo, pero sobre todo contribuyó a la identificación de la especie productora de ésta toxina, lo que permitirá enfocarse a la detección de esta especie durante los monitoreos de rutina de la comunidad fitoplanctónica en las zonas de cultivo, para poder identificar posibles falsos positivos durante la detección de toxinas lipofílicas reguladas.

Capítulo 7. Conclusiones

- Se registró la presencia de *Alexandrium* spp. por medio microscopía óptica en muestras de agua colectadas en Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos. *Alexandrium* spp. fue detectado en el 44% de las muestras analizadas (57 muestras) y con una abundancia máxima registrada de 3618 cél. L⁻¹.
- La presencia de *Alexandrium ostenfeldii* en la región se comprobó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos diseñados contra la región ITS de ésta especie. Se presentaron resultados positivos en un 52.6 % del total de muestras analizadas (57 muestras).
- Las mayores abundancias para *Alexandrium* spp. estuvieron asociadas a aguas cálidas (temperaturas superficiales entre los 17 a 20 °C). Sin embargo las mayores abundancias para *Alexandrium* spp. no estuvieron claramente asociadas a una columna de agua estratificada.
- Se detectó la presencia de ácido okadaico y pectenotoxinas (toxinas diarreicas), yesotoxinas, azaspirácidos, gimnodiminas y espirólidos en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en Rincón de Ballenas. Los espirólidos estuvieron presentes en bajas concentraciones de 0.38 a 1.02 µg kg⁻¹ y el único análogo detectado fue el 13 desmetil espirólido C.
- La identificación de *Alexandrium* spp. en muestras de agua, la detección positiva por PCR de *Alexandrium ostenfeldii* y la detección de espirólidos en el mejillón cultivado en Rincón de Ballenas sustentan que ésta especie se presentó durante julio del 2013 a junio del 2014 en la Bahía de Todos Santos. Esto representa un registro nuevo de *Alexandrium ostenfeldii* para la región.

Lista de referencias

- Aasen, J., MacKinnon, S.L., LeBlanc, P., Walter, J.A., Hovgaard, P., Aune, T., and Quilliam, M.A. (2005). Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 509–515.
- Almandoz, G., Montoya, N., Hernando, M., Benavides, H., Carignan, M., and Ferrario, M. (2014). Toxic strains of the *Alexandrium ostenfeldii* complex in southern South America (Beagle Channel, Argentina). *Harmful Algae*, 37, 100–109.
- Alonso Rodríguez, R. A., Hernández-Becerril, D. U., y Gárate-Lizárraga, I. (2008). Catálogo de microalgas de las lagunas costeras de Sinaloa. Serie Lagunas Costeras de Sinaloa. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM. México, 198 p.
- Álvarez Sánchez, G., Hernández Walls, R y Durazo–Arvizu, R. (1988). Patrones de deriva de trazadores lagrangianos en la bahía de Todos Santos. *Ciencias Marinas*, 14, 135–162.
- Álvarez, G., Uribe, E., Ávalos, P., Mariño, C., and Blanco, J. (2010). First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon*, 55, 638–641.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., and Abadie, E. (2007). Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-a and their derivatives in French shellfish. *Mar. Drugs*, 5, 168–179.
- Anderson, D. (1998). Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, 41, 29–40.
- Anderson, D., Kulis, D., Sullivan, J., Hall, S., and Lee, C. (1990). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Marine Biology*, 104, 511–524.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Keafer, B.A., Gribble, K.E., Marin, R., and Scholin, C.A. (2005). Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep-Sea Res*, 52 (II), 2467–2490.
- Anderson, D.M., Burkholder, J.M., Cochlan, W.P., Glibert, P.M., Gobler, C.J., Heil, C.A., Kudela, R.M., Parsons, M.L., Rensel, J.E., Townsend, D.W., Trainer, V.L., and Vargo, G.A. (2008). Harmful algal blooms and eutrophication: examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae*, 8, 39–53.
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., and Montresor, M. (2012). The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*, 14, 10–35.
- Balech, E. and Tangen, K. (1985). Morphology and taxonomy of toxic species in the Tamarensis group (Dinophyceae): *Alexandrium excavatum* (Braarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) comb. nov. *Sarsia*, 70 (4), 333–343.

- Balech, E. (1995). The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island. Sherkin Island marine station, Sherkin Island, Co, Cork, Ireland, 151 p.
- Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Núñez-Vázquez, E., y Hernández-Sandoval, F. E. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Revista Hidrobiológica*, 21, 381–413.
- Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Haskard, K.A., and Hallegraeff, G.M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40 (1), 78–87.
- Boczar, B., Beitler, M., Liston, J., Sullivan, J., and Cattolico, R. (1998). Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiology*, 88, 1285–1290.
- Botana, L. (2014). *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, physiology and detection*. (3th ed) New York, CRC Press Taylor and Francis Group, 773 p.
- Bott, N.J., Ophel-Kellener, K.M., Sierp, M.T., Rowling, K.P., McKay, A.C., Loo, M.G.K., Tanner, J.E., and Deveney, M.R. (2010). Toward routine, DNA-based detection methods for marine pests. *Biotechnol Adv*, 28, 706–714.
- Calva, M. (2014). Variación estacional sinóptica de la trampa de surgencia en la Bahía de Todos Santos B.C. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 47 p.
- Cabral Talavera, G. (2010). Distribución espacial y temporal de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia spp* y concentración de ácido domoico en la región de la Bahía de Todos Santos, B.C, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 88 p.
- Camacho, G., Gallardo, J., Sánchez, A., García, M., Belarbi, E., and Molina, E. (2007). Research review paper. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, 25, 176–194.
- Ceballos-Corona, J.G. (1988). Contribución al conocimiento de la composición y distribución del fitoplancton de la Bahía de Maruata, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia. México, 110 p.
- Cembella, A., Quilliam, M., Lewis, N., Baunder, A., and Wright, J. (1998). Identifying the planktonic origin and distribution of spirolides in coastal Nova Scotian waters. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M., and Wyatt, T. (Eds.). Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Santiago de Compostela, 481–484 p.
- Cembella, A., Lewis, N., and Quilliam, M. (2000a). The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*, 39, 67–74.

- Cembella, A.D., Bauder, A.G., Lewis, N.I., and Quilliam, M.A. (2000b). Population dynamics and spiroside composition of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in coastal embayments of Nova Scotia. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, J.S., and Lewis, R.J (Eds.) IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission, Hobart, Australia, 173–176 p.
- CESAIBC. (2013). Informe técnico de las acciones sanitarias en el cultivo de moluscos programa 2012. Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California (CESAIBC). México, 26 p.
- Chapela, M.J., Reboreda, A., Vieites, J.M., and Cabado, A.G. (2008). Lipophilic toxins analyzed by liquid chromatography – mass spectrometry and comparison with mouse bioassay in fresh, frozen and processed molluscs. *J. Agric. Food Chem*, 56 (19), 8979–8986.
- Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S., Tartaglione, L., Cingini, M., Pompei, M., Guerrini, F., Boni, L., and Pistocchi, R. (2006). Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography–mass spectrometry. *Toxicon*, 47, 597–604.
- COFEPRIS. (2011). Programa mexicano de sanidad de moluscos bivalvos: Guía técnica para el control sanitario de moluscos bivalvos. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). México, 144 p.
- Ebenezer, V and Medlin, L. (2012). Molecular detection, quantification and diversity evaluation of microalgae. *Marine Biotechnology*, 14, 129–142.
- Edler, L. and Elbrächter, M. (2010). The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: Karlson, B., Cusack, C., and Bresnan, E. (Eds). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, UNESCO, Paris, 110 p.
- Fraga, S. and Sánchez, F.J.(1985). Toxic and potentially toxic dinoflagellates found in Galacian Rias (NW Spain). In: Anderson, D.M., White, A., Baden, D. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier Science, New York, January 01, 1985, 51–54 p.
- Galluzzi, L., Penna, A., Bertozzini, E., Vila, M., Garces, E., and Magnanis, M. (2004). Development of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantification of *Alexandrium minutum* (Dinoflagellate). *American Society for Microbiology*, 70, 1199–1206.
- García-Mendoza, E., Sánchez-Bravo, Y., Turner, A., Blanco, J., O’Neil, A., Mancera-Flores, J., Pérez-Brunius, P., Rivas, D., Almazán-Becerril, A., and Peña-Manjarrez, J.L. (2014). Lipophilic toxins in cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Baja California, México. *Toxicon*, 90, 111–123.
- GEOHAB, 2013. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in the stratified systems. Workshop on “Advances and challenges for understanding physical – biological interactions in HABs in stratified environments”. McManus, M.A., Berdalet, E., Ryan, J., Yamazaki, H., Jaffe, J.S., Ross, O.N., Burchard, H., and Chávez, F.P. (Eds). IOC and SCOR, Paris, Newark, Delaware, 62 p.

- Gillespie, J., Cannone, J., and Gutell, R. (2006). Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): Structure, organization and retrotransposable elements. *Insecta Molecular Biology*, 15 (5), 657–686.
- Gilmartin, M and Revelante, N. (1978). The phytoplankton characteristics of the Barrier Island lagoons of the Gulf of California. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 7, 29–47.
- Granados-Guzmán, A., Hidalgo-González, R.M. y Álvarez-Borrego, S. (1995). Variabilidad temporal de la temperatura en las islas de Todos Santos y San Jerónimo, Baja California, durante mayo 1992 a marzo de 1993. Informe Técnico CTECT9501. Comunicaciones Académicas, Serie Ecología, CICESE, 24 p.
- Gribble, K., Keafer, B., Quilliams, M., Cembella, A., Kulis, D., Manahan, A., and Anderson, D. (2005). Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep Sea Research*, 52, 2745–2763.
- Godhe, A., Rehnstam-Holm, A.S., and Karunasagar I (2002) PCR detection of dinoflagellate cysts in field sediment samples from tropic and temperate environments. *Harmful Algae*, 1, 361–373.
- Gu, H. (2011). Morphology, phylogenetic position and ecophysiology of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Bohai Sea, China. *J. Syst. Evol*, 49, 606–616.
- Hakanen, P., Suikkanen, J., Frazén, J., and Frazén, H. (2012). Bloom and toxin dynamics of *Alexandrium ostenfeldii* in shallow embayment at the SW coast of Finland, northern Baltic Sea. *Harmful Algae*. 15, 91–99.
- Hallegraedd, G.M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms a formidable predictive challenge. *J. Phycol*, 46, 220–235.
- Hansen, P.J., Cembella, A.D., and Moestrup, Ø. (1992). The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *Journal of Phycology*, 28, 597–603.
- Hernández Becerril, D. U., Meave, del Castillo, M. E., and Flores Granados, C. (2003). Dinoflagelados del orden Dinophysiales en las costas mexicanas, pp. 19-42. In: Barreiro, M. T., Meave del castiilo, M. E., Figueroa- Torres, G., and Signoret, M (Eds). Planctología Mexicana. Sociedad Mexicana de Planctología, A.C. (SOMPAC), 284 p.
- Hernández-Becerril, D.U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora, C., Barón-Campis, S.A., Ceballos-Corona, G., Herrera-Silveira, J., Meave del Castillo, M.E., Juárez-Ruiz, N., Merino-Virgilio, F., Morales-Blake, A., Ochoa, J.L., Orellana-Cepeda, E., Ramírez-Camarena, C., Rodríguez-Salvador, R. (2007). Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. *Journal of Environmental Science and Health*, Part A, 42, 1349–1363.
- Horner, R.A., Garrison, D.L., and Plumley, F.G. (1997). Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S west coast. *Limnol. Oceanogr*, 42, 1076–1088.

- Howard, D.A., Smith, J., and Kudela, R. (2009). Phylogenetic relationships of yessotoxin – producing dinoflagellates, based on the large subunit and internal transcribed spacer ribosomal DNA domains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (1), 54–63.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., and Wright, J.L.(1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, 37, 7671–7674.
- John, U., Cembella, A.D., Hummert, C., Elbrächter, M., Groben, R., and Medlin, L.K.(2003). Discrimination of the toxigenic dinoflagellate species *Alexandrium tamarens* and *Alexandrium ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *European Journal of Phycology*, 38, 25–40.
- Kremp, A., Lundholm, T., Drebler, N., Erler, K., Gerdt, G., Eirtovaara, S., and Leskinen, E. (2009). Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland Archipelago Northern Baltic Sea. *Harmful Algae*, 8, 318–328.
- Kremp, A., Tahvanainen, P., Litaker, W., Krock, B., Suikkanen, S., Leaw, C.P., and Tomas, C. (2014). Phylogenetic relationships, morphological variation and toxin patterns in the *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) complex: implications for species boundaries and identities. *J. Phycol*, 50, 81–100.
- Langlois, G. (2001). Marine biotoxin monitoring in California, 1927–1999. In: RaLonde, R. (Ed.), *Harmful Algal Blooms on the North American West Coast*. University of Alaska Sea Grant, AK-SG-0105, Fairbanks, AK, 31–34 p.
- Langlois, G. and Smith, P. (2001). Phytoplankton. In: Karl, H.A., Chin, J.L., Ueber, E., Stauffer, P.H., and Hendley III, J.W. (Eds.), *Beyond the Golden Gate – Oceanography, Geology, Biology and Environmental Issues in the Gulf of the Farallones*. California. Geological Survey Circular 1198, 123–132 p.
- Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Iddya, K., and Ababouch, L. (2011). Technical paper: Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Italia, 99–108 p.
- Lee, K., Mok, J., Song, K., Yu, H., Lee, D., Jung, J., and Kim, J. (2012). First detection and seasonal variation of lipophilic toxins okadaic acid, dinophysistoxins – 1 and yessotoxin in Korean gastropods. *Journal of Food Protection*, 11, 1912–2090.
- Lewitus, A., Horner, R., Caron, D., García-Mendoza, E., Hickey, B., Hunter, M., Huppert, D., Kudela, R., Langlois, G., Largier, E., Lessard, E., Raymond, R., Rensel, J., Srtutton, P., Trainer, J., and Tweddle, J. (2012). Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes and impacts. *Harmful Algae*, 19, 133–159.
- Lim, P., Usup, G., Leaw, C., Ogata, T. (2005). First report of *Alexandrium taylori* and *Alexandrium peruvianum* (Dinophyceae) in Malaysia waters. *Harmful Algae*, 4, 391–400.
- Litaker, W., Vandersea, M., Kibler, S., Reece, K., Stokes, N., Lutzoni, F., Yonish, B., West, M., Black, M., and Tester, P. (2007). Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences. *J. Phycol*, 43, 344–355.

- MacKinnon, S., Cembella, A., Quilliam, M., LeBlanc, P., Lewis, N., Hardstaff, W., Burton, I., and Walter, J. (2004). The characterization of two new spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., and Vargo, G.A. (Eds). Proceedings of the 10th International Conference on Harmful Algae, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 186–188 p.
- MacKinnon, S.L., Cembella, A.D., Burton, I.W., Lewis, N., LeBlanc, P., and Walter, J.A. (2006). Biosynthesis of 13-desmethyl spirolide C by the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Journal of Organic Chemistry*, 71, 8724–8731.
- MacKenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J. (1996). The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia*, 35, 148–155.
- Maeda Martínez, A.N (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: Lovatelli, A., Farías, A., y Uriarte, I. (Eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller técnico regional de la FAO, Puerto Montt, Chile, 20-24 de agosto del 2017, 91–100 p.
- Margalef, R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*, 1 (4), 493–509.
- Méndez, M. (2008). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria. Departamento de farmacología, 111 p.
- Meilert, K., and Brimble, M. (2006). Synthesis of the bis-spiroacetal moiety of the shellfish toxins spirolides B and D using an iterative oxidative radical cyclization strategy. *Org. Biomol. Chem*, 4, 2184–2192.
- Meillon-Menchaca, O y Álvarez-Borrego, J. (1997). Análisis del comportamiento espacial del oleaje en la bahía de Todos Santos, Baja California, mediante imágenes de superficies marinas. *Ciencias Marinas*, 23, 23–41.
- Moestrup, Ø. and Hansen, P.J. (1988). On the occurrence of the potentially toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* (= *Gonyaulax excavata*) and *A. ostenfeldii* in Danish and Faroese waters. *Ophelia* 28, 195–213.
- Munday, R., Quilliam, M., LeBlanc, P., Lewis, N., Gallant, P., Sperker, S., Ewart, S., and MacKinnon, S. (2012). Investigations into the toxicology of spirolides, a group of marine phycotoxins. *Journal Toxins*, 4, 1–14.
- NCCOS (2014). Harmful algal bloom research in California. National Centers for Coastal Ocean Science. Recuperado el 30 de agosto del 2014 de:
<http://www.cop.noaa.gov/stressors/extremeevents/hab/features/hab-california.pdf>

- Ochoa, J.L., Hernández-Becerril, D.U., Lluch-Cota, L., Arredondo-Vega, B.O., Nuñez-Vásquez, E., Heredia-Tapia, A., Pérez-Linares, J., Alonso-Rodríguez, R. (2002). Marine biotoxins and harmful algal blooms in México's Pacific littoral. In: Taylor, F.J.R. and Trainer, V.L. (Eds), Harmful algal blooms in the PICES region of the North Pacific. PICES Scientific Reports, No. 23, 119–128 p.
- Okolodkov, Y.B. (2005). The global distributional patterns of toxic, Bloom dinoflagellates recorder from the Eurasian Artic. *Harmful Algae*, 4, 351–369.
- Okolodkov, Y.B and Gárate-Lizárraga, I. (2006). An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botánica Mexicana*, 74, 1-154.
- Otero, A., Chapela, M.J., Atanassoya, M., Vieites, J.M., and Cabado, A.G. (2011). Cyclic imines: chemistry and mechanism of action: A review. *Chemical Research in Toxicology*, 11, 1817–1829.
- Penna, A. and Galluzzi, L. (2013). The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species. *Environmental Science Pollution Research*, 20 (10), 6851–6862.
- Penna, A., Bertozzini, E., Battocchi, C., Galluzzi, L., Giacobbe, M., Vila, M., Garces, E., Luglie, A., and Magnani, M. (2007). Monitoring of HAB species in the Mediterranean sea through molecular methods. *Journal of Plankton Research*, 29, 19–38.
- Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J. (2009). Factores ambientales que influyen en la variabilidad de la producción de quistes de *Lingulodinium polyedrum* y *Scripsiella trochoidea* (Dinophyceae). *Ciencias Marinas*, 35 (1), 1–14.
- Peña-Manjarrez, J.L., Helenes, J., Gaxiola-Castro, G., and Orellana-Cepeda, E. (2005). Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay, Baja California, México, 1999–2000. *Continental Shelf Research*, 25, 1375–1393.
- Pérez Cruz, B., Gárate Lizárraga, I., Díaz Ortiz, J., Alarcón Tacuba, M., Alarcón Romero, M. A., López Silva, S., and Salgado Sales, P. (2010). Florecimientos Algales Nocivos en la Bahía de Acapulco, Guerrero (1991-2009). Resúmenes de la XVI Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología y IX International Meeting of the Mexican Society of Planktology. La Paz, B. C. S., México. 27-30 de abril del 2010, 45 p.
- Pérez-Brunius, P., López, M., Pineda, J. (2006). Hydrographic conditions near the coast of northwestern Baja California: 1997 – 2004. *Cont. Shelf. Res*, 26, 885–901.
- Richlen, M.L and Barber, P.H. (2005) A technique for the rapid extraction of microalgal DNA from single live and preserved cells. Technical note. *Molecular Ecology Notes*, 5, 688 – 691.
- Sánchez Bravo, Y. (2013). Concentración de toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) asociadas a la presencia del dinoflagelado del género *Dinophysis* durante enero a diciembre del 2012, en la Bahía de Todos Santos, B.C, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. México, 109 p.

- Scholin, C.A. and Anderson, D.M. (1998) Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives. In: Reguera, J.B., Fernández, M.L., and Wyatt, T. (Eds.). *Harmful Algae Proceedings of the 8th International Conference on Harmful Algae*, UNESCO, Paris, 253–257 p.
- Secretaria de Salud. (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario Oficial. México.
- SEMARNAP-PROFEPA (1997). Mortandad de mamíferos marinos cuyos cadáveres arribaron a las costas de Sinaloa. Informe técnico interno, México.
- Sierra-Beltrán, A., Cruz, A., Núñez-Vázquez, E., Del Villar, L. M., Cerecero, J., and Ochoa J. L. (1998). An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon*, 36, 1493–1502.
- Sournia, A. (1978). *Phytoplankton manual UNESCO. Monographic on oceanographic methodology*, 6, 376–377.
- Suikkanen, S., Kremp, A., Hautala, H., and Krock, B. (2013). Paralytic shellfish toxins or spirolides? The role of environmental and genetic factors in toxin production of the *Alexandrium ostenfeldii* complex. *Harmful Algae*, 26, 52–59.
- Torres, V., Delgadillo, F., Camacho, V., Huerta, H., Segovia, J., Hernández, J., and Galindo, B. (2012). Dinámica de nutrientes inorgánicos [(NO₃, PO₄, Si (OH)₄] en la Bahía Todos Santos, Baja California: Una región influenciada por surgencias costeras. *Geos*, 32 (1), 139.
- Taylor, S., Scott, R., Kurtz, R., Fisher, C., Patel, V., and Bizouarn, F. (2010). A practical guide to high resolution melt analysis genotyping. Bio – Rad Laboratories. Bulletin 6004, 2.
- Tillmann, U., John, U., and Cembella, A. (2007). On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protist. *J. Plankton Res*, 29 (6), 527–543.
- Trainer, V., Moore, L., Bill, B., Adams, N., Harrington, N., Borchert, J., da Silva, D., and Eberhart, B. (2013). Diarrhetic shellfish toxins and other lipophilic toxins of human health concern in Washington state. *Marine Drugs*, 11, 1816–1817.
- Trainer, V.L., Adams, N.G., Bill, B.D., Stehr, C.M., Wekell, J.C., Moeller, P., Busman, M., Woodruff, D. (2000). Domoic acid productios near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr*, 25, 1818–1833.
- Touzet, N., Keady, E., Raine, R., and Maher, M. (2009). Evaluation of taxa-species real timePCR, whole-cell FISH and morphotaxonomy analyses for the detection and quantification of the toxic microalgae *Alexandrium minutum* (Dinophyceae), global clade ribotype. *Federation of European Microbiological Societies*, 67, 329–341.
- Venrick, E.L. (2000). Summer in the Ensenada front: the distribution of phytoplankton species, July 1985 and September 1988. *J. Plankton Res*, 22, 813–841.

- Vicente, E., Hoyos, C., Sánchez, P., and Cambra, J. (2005). Metodología para el establecimiento del estado ecológico según la directiva marco del agua: Protocolo de muestreo y análisis para fitoplancton. Confederación Hidrográfica del Ebro. España.
- Wiese, M., D'Agostino, P., Mihali, T., Moffitt, M., and Neilan, B. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, 8, 2185–2211.

ANEXOS

Anexo 1

Aquí se detalla el protocolo de extracción de ADN del kit DNeasy Plant Mini kit. Una vez colocados los 600 μL del Buffer de lysis y homogenizados los filtros de membrana. Se dio un pulso de centrifugación para bajar el contenido de la tapa del tubo y se colocó 130 μL de Buffer P3 del kit DNeasy Plant Mini kit y se incubó la muestra en hielo por 5 minutos (en este paso se precipitaron las proteínas, los polisacáridos y el detergente). Posteriormente, se centrifugó la muestra por 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante fue colocado en las columnas Quiashreder y posteriormente se centrifugaron las columnas a 13000 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga, evitando tomar las partículas del fondo. Se determinó el volumen de sobrenadante transferido, ya que se necesita añadir 1.5 volúmenes del Buffer AW1, por cada volumen de sobrenadante.

Una vez colocado el Buffer AW1 se procedió a mezclar inmediatamente por medio de pipeteos y finalmente se procedió a colocar 650 μL de la muestra en la columna Dneasy mini spin y se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. Se descarta el fluido que pasa por la columna y si aún queda muestra del lisado con el buffer AW1, se repitió el mismo procedimiento de pasar la muestra por la columna Dneasy mini spin. Se sacó la columna Dneasy mini spin y fue colocada dentro de un tubo de recolección nuevo, posteriormente se añadieron 500 μL de buffer AW2 a las columnas y se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. Se descarta el fluido que paso por la columna y se añadió 500 μL más de Buffer AW2 a la misma y se centrifugó nuevamente por 4 min a 14000 rpm para secar la membrana. Debido a que en este paso se elimina el etanol se descartó tanto el fluido como el tubo de colección y posteriormente se sacó la columna cuidadosamente y se colocó en un tubo de recepción nuevo. Finalmente se realizó la resuspensión del ADN como se detalla en el apéndice 4.3.1.

Anexo 2

Preparación de 1 L de buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) 50 X

Se pesan 242g de Tris Base + 57.1 mL de ácido acético + 100 mL de ácido etil diamino tetraacético (EDTA) + 750 mL de agua desionizada. Se debe ajustar el pH a 8.5 y finalmente aforar a 1 L con el agua desionizada.

Para preparar 1 L de buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA) 1 X

Se coloca 20 mL de buffer TAE 50 X y se afora a 1 L con agua desionizada.

Anexo 3

En la siguiente tabla se describe el volumen usado para cada uno de los componentes del máster mix para realizar una reacción de PCR, así como también las concentraciones finales de los componentes.

Tabla 8. Componentes para la preparación del master mix, con la concentración final y volumen correspondiente a una reacción de 15 μ L para la identificación de *Alexandrium ostenfeldii*.

Componente	1 Rx	[final]
Go Taq flexi buffer	3 μ L	1 X
MgCl ₂	2.4 μ L	4mM
dNTP'S	0.3 μ L	0.4 mM
Oligonucleótido F	0.15 μ L	0.12 μ M
Oligonucleótido R	0.15 μ L	0.12 μ M
Go Taq polimerasa	0.15 μ L	1.25 U
Templado ADN	1 μ L	Aprox. 60 ng/ μ L
Agua Mili Q	7. 85 μ L	-----

Anexo 4

Aquí se detalla el protocolo para la purificación de ADN proveniente de geles de agarosa, para lo cual se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system de Promega.

Primero la banda cortada del gel de agarosa, fue colocada en un tubo de microcentrifuga y se colocó en una relación de 10 μ L de solución de unión a la membrana por cada 10 mg de gel de agarosa. Se agitó vigorosamente para mezclar la solución y se incubó a 65 °C por al menos 10 min, hasta que el gel de agarosa estuvo completamente disuelto. Se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 2 min a temperatura ambiente para bajar al fondo el contenido del tubo. Se transfirió la mezcla con el gel disuelto a una minicolumna SV y se incubó 1 min a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 14000 rpm por 1 min, se removió la columna a un tubo nuevo.

Para lavar la columna se adicionaron 700 μ L de la solución de lavado de membrana y se centrifugó la minicolumna SV por 1 min a 14000 rpm, se descartó el flujo que quedó en el tubo y se lavó de nuevo la membrana con 500 μ L más de la solución de lavado, se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. Se removió con cuidado la columna sin tocar el líquido y se vació el fluido que quedó en el tubo. Finalmente se volvió a centrifugar con los tubos abiertos para permitir la evaporación del etanol residual. Y se resuspendió el ADN como se detalla en el apéndice 4.3.4.

Anexo 5

En la siguiente tabla se describe el volumen usado para cada uno de los componentes del máster mix para realizar una reacción de qPCR, así como también las concentraciones finales de los componentes.

Tabla 9. Componentes para la preparación del master mix, con la concentración final y volumen correspondiente a una reacción de 10 μL para la identificación de *A. ostenfeldii*.

Componente	1 Rx	[final]
HotStart IT SYBR Green	5 μL	1 X
Oligonucleótido F	0.3 μL	0.3 μM
Oligonucleótido R	0.3 μL	0.3 μM
Templado ADN	3 μL	Variable
Agua Mili Q	1.4 μL	-----

Anexo 6

En la siguiente tabla se indica el método de Regueiro *et al.* (2011) modificado que se utilizó para la primera examinación general de las toxinas acumuladas en el mejillón mediterráneo por medio de la técnica LC- MS/MS.

Tabla 10. Método utilizado para la identificación de las distintas toxinas en muestras de mejillón (*M. galloprovincialis*) donde se muestran las transiciones de cada analito, la energía de colisión aplicada y los tiempos de retención.

Compuesto	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Energía colisión MRM	Tiempo inicio	Tiempo Final
PLTX	327.000	76.100	15	1.50	3.00
Pinna A 2-2.5	712.500	164.000	50	1.70	3.00
Pinna A 2-2.5	712.500	440.300	36	1.70	3.00
Pinna A 2-2.5	712.500	538.300	36	1.70	3.00
Pinna BC (2.6)	741.500	164.000	50	2.00	2.80
Pinna BC (2.6)	741.500	458.300	36	2.00	2.80
Pteria ABC (2.4)	831.500	164.000	50	2.00	2.80
Pinna D (2.48)	782.500	164.000	50	2.30	2.80
Pinna D (2.48)	782.500	446.300	36	2.30	2.80
AO	827.500	571.500	55	2.40	2.90
AO	827.500	723.500	55	2.40	2.90
Pinna E 2.66	784.500	164.000	57	2.50	3.10
Pinna E (2.66)	784.500	446.300	41	2.50	3.10
AZA- 4 (2.86)	844.457	658.400	43	2.70	3.30
AZA- 4 (2.86)	844.457	826.500	43	2.70	3.30
DTX1 (2.94)	841.500	585.500	55	2.80	3.30
DTX1 (2.94)	841.500	737.500	55	2.80	3.30
SPX A (3.05)	692.500	150.000	50	2.80	3.60
SPX A (3.05)	692.500	444.300	36	2.80	3.60
AZA-3 (3.08)	828.457	658.400	43	2.85	3.40
AZA-3 (3.08)	828.457	810.500	28	2.85	3.40
AZA 36	846.450	810.400	43	2.85	3.60
AZA 36	846.450	828.400	28	2.85	3.60
AZA-5 (2.97)	844.458	674.400	43	2.90	3.40
AZA-5 (2.97)	844.458	826.500	43	2.90	3.40

AZA-1-6 (3.17)	842.459	824.500	28	3.00	3.40
AZA-1 (3.27)	842.456	654.400	44	3.10	3.60
AZA-1 (3.27)	842.456	672.400	43	3.20	3.60
AZA-1 (3.27)	842.456	824.500	28	3.10	3.60
AZA-2 (3.32)	856.457	672.400	43	3.20	3.60
AZA-2 (3.32)	856.457	838.500	28	3.20	3.60
13 – 19 didesm SPX C (3.99)	678.500	430.300	36	3.90	4.30
13 – 19 didesm SPX C (3.99)	678.500	164.000	50	3.90	4.30
GYM-A	508.332	136.000	36	3.90	4.60
GYM-A	508.332	392.000	36	3.90	4.60
GYM-A	508.332	490.000	36	3.90	4.60
13 desm SPXC + SPXG (4.11)	692.502	164.000	50	4.00	4.40
13 desm SPX C + SPX G (4.11)	692.502	378.000	36	4.00	4.40
SPX C (4.12)	706.501	164.000	50	4.00	4.40
SPX C (4.12)	706.501	440.300	36	4.00	4.40
SPX D (4.27)	708.500	164.000	50	4.10	4.60
SPX D (4.27)	708.500	458.300	36	4.10	4.60
SPX B	694.500	150.000	50	4.10	5.10
SPX B	694.500	444.300	36	4.10	5.10
PbTX-2	877.500	319.000	20	4.10	5.50
PbTX-2	877.500	326.900	28	4.10	5.50
PbTX-2	877.500	455.200	26	4.10	5.50
PbTX-2	877.500	841.500	20	4.10	5.50
PbTX-2 (4.22)	876.458	213.100	36	4.15	4.60
PbTX-2 (4.22)	876.458	805.500	21	4.15	4.60
PbTX-2 (4.22)	876.458	823.500	23	4.15	4.60
13 desm SPXC (4.24)	692.501	164.000	50	4.20	4.50
13 desm SPXC (4.24)	692.501	444.300	36	4.20	4.50

20 Me SPX G	706.500	164.000	50	4.20	4.50
(4.25)					
20 Me SPX G	706.500	346.000	36	4.20	4.50
(4.25)					
SPXC2 (4.44)	706.502	164.000	50	4.40	4.70
SPXC2 (4.44)	706.502	458.300	36	4.40	4.70
Pinna F (4.48)	766.500	164.000	50	4.40	5.00
Pinna F (4.48)	766.500	446.300	36	4.40	5.00
Pinna G (4.98)	694.501	164.000	50	4.80	5.40
Pinna G (4.98)	694.501	440.300	36	4.80	5.40

Abreviaturas:

Pinna = Pinnatoxinas
 Aza = Azaspirácidos
 GYM = Gimnodiminas
 Me = metil

PLTX = Palitoxinas
 DTX = Dinofisistoxinas
 PbTX = Brevetoxinas
 Desm = desmetil

AO = Ácido okadaico
 SPX = Espirólidos
 Dides = didesmetil

Anexo 7

A continuación se presentan las secuencias obtenidas de la amplificación de un fragmento de 99 pb para la identificación de *Alexandrium ostenfeldii*. La cepa cultivo 1.2 corresponde a la amplificación de la cepa CCMP1773 adquirida en el Centro Provasoli (NCMA) y que fue utilizada como control positivo en la detección de la especie en muestras de campo.

```
>Cepacultivo.1.2
GTTGACACTG GTTGAAGGC TTGCCCCCTT ATCGTGTCTG CTTAGGTTGA ACCTCTGTCA
TGTGCATTGG TTGCAATGAA GAGGTATAACC CCTGCAGATA CGATAAGGAA GTCGGTGTG
AAAAGCGCGA GAGTCTCAG CCCACAAGAT CTTTTTACCC CACGCTCGAC ATCATCTTCC
TTTTTTTTTCC AAACCAGAAG CGAAGGCACT AACCCCCCCC TCCCTACCCC CTCCGTTGCC
TCCCTGCCTT CCACCCCATC CTCACCCCCA AGCTCTGGGA CCTGAAATTA CCTCGTCTCC
AGCCTTTCTC CTCC
```

Y la secuencia cepa campo 1.2 corresponde a un resultado positivo en la muestra del 08 de agosto del 2013 a 10 m de profundidad. La obtención de éstas secuencias confirman la especificidad de los oligonucleótidos y la presencia de *Alexandrium ostenfeldii* en las muestras ambientales.

```
>Cepacampo.1.2
GCAGTCTTTT GCACGCCTTG CTCCTCACCG TGTTTGCTTA GGTCGAACCT CTGTCATGTG
CATTGGTTGC AATGACGAGG TTTGATCCAG CCCCCGGTGA GGATGCAAGG CGTTTGCAAG
CGCGTGAGTC TAATGCACAC GCATTGACAT CCCCCTCTCC ACGATGGACT CCATCATGCA
TCTCTTCCTC AGCACACTGA GCATGCTCTT TAGCTTTCTC TCCCTCACTC CCTCCATAAT
AATTACTCCC TTTTAAACCC CTTCAACTCC TTCTGCTCTT CCCTGTGAAC AACGTCTGTA
CCAATCCGA
```

Anexo 8

En la Figura 23A se presenta el cromatograma del 13 desmetil espirólido C en la muestra mejillón de septiembre con un tiempo de retención RT = de 4.25 minutos en la transición 164 y un RT= de 4,27 minutos en la transición 444.30, ésta última transición obtuvo un mayor nivel de señal de 8.69 E2 con respecto a la transición 164 donde se obtuvo un nivel de señal de 5,83 E2. En la Figura 23B se presenta el espectro de 13 desmetil espirólido C, donde la transición con valor m/z de 164 tiene una menor abundancia relativa con respecto a la transición m/z de 444.30; sin embargo la diferencia es mínima. Para realizar la cuantificación del espirólido 13 desmetil espirólido C se utilizó la transición 444.30 debido a que es más estable al tener un valor más elevado de la relación señal – ruido, obteniendo una mejor cuantificación.

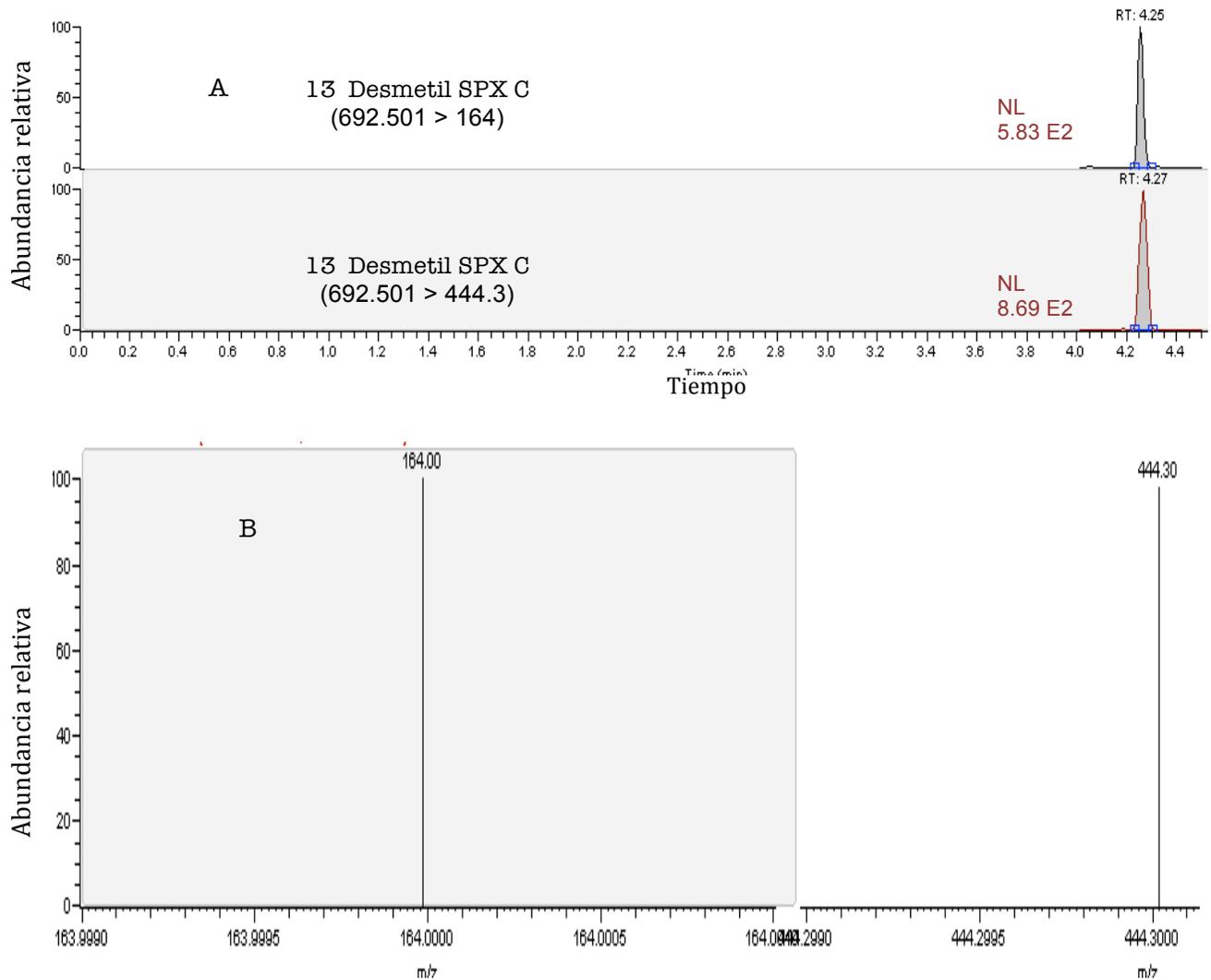


Figura. 23. Cromatograma del 13 desmetil espirólido C con sus transiciones características (692.501 > 164 y 692.501 > 444.30) (panel A). Espectro de las dos transiciones con un valor m/z de 164 y un m/z de 444.30 (panel B) presentes en las muestras de mejillón mediterráneo (*M. galloprovincialis*) del 12 de septiembre del 2014

En la Figura 24 se presenta el cromatograma obtenido del estándar MixLipoDic12 utilizado para la cuantificación del 13 desmetil espirólido C. Para cada uno de los niveles se presenta primero la transición 444.30 y después la transición 164. La concentración del nivel 2 es de 0.99 ng de 13 desmetil espirólido C por mililitro, en el nivel 3 la concentración corresponde a 0.20 ng mL⁻¹ y en el nivel 4 de 0.04 ng mL⁻¹. En todas las diluciones los tiempos de retención son coincidentes y se presentan entre 4.25 y 4.23 minutos. Los picos se encuentran claramente formados, sin picos cercanos que interfieran con la medición del ancho y alto del pico para obtener los tiempos de retención consistentes y teniendo eficiencia en la separación de la toxina de interés. Únicamente en la dilución del nivel 4 que posee la más baja concentración, se observa la deformación del pico en la transición 164, esto se debe a la baja concentración del espirólido, llegando al límite de detección del analito donde el ruido ya resulta significativo.

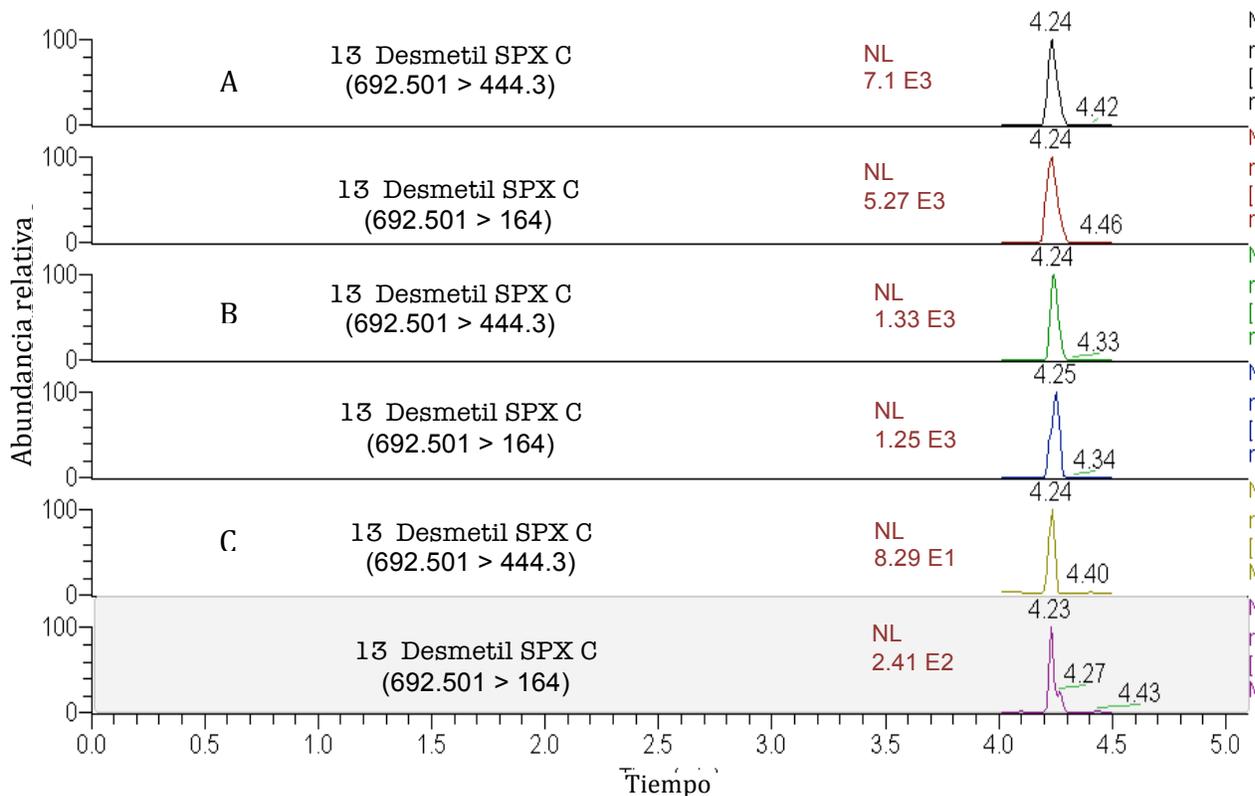


Figura. 24 Se presenta el cromatograma correspondiente a los patrones utilizados para la cuantificación del 13 desm SPXC, en el panel A se observa la mayor concentración (nivel 2) del MixLipoDic 12 para las dos transiciones, primero la 692.501 > 444.30 y después la 692.501 > 164.0 con una concentración de 0.99 ng mL⁻¹. En el panel B se encuentra la segunda concentración (nivel 3) con 0.20 ng mL⁻¹ de 13 desm SPX C y el panel C corresponde a la menor concentración (nivel 4) con 0.04 ng mL⁻¹ del 13 desm SPX C.

Anexo 9

Se presentan las fotos de *Alexandrium* spp. en muestras ambientales de agua durante el monitoreo realizado de julio del 2013 a junio del 2014. En la Figura 25, se observan imágenes obtenidas del análisis de las muestras en un microscopio invertido LEICA DM13000B (Leica Microsystems, Alemania). Son células con apariencia globosa con márgenes ligeramente redondeados, la disposición de las placas por medio de éste tipo de microscopía no pudieron ser observadas con claridad.

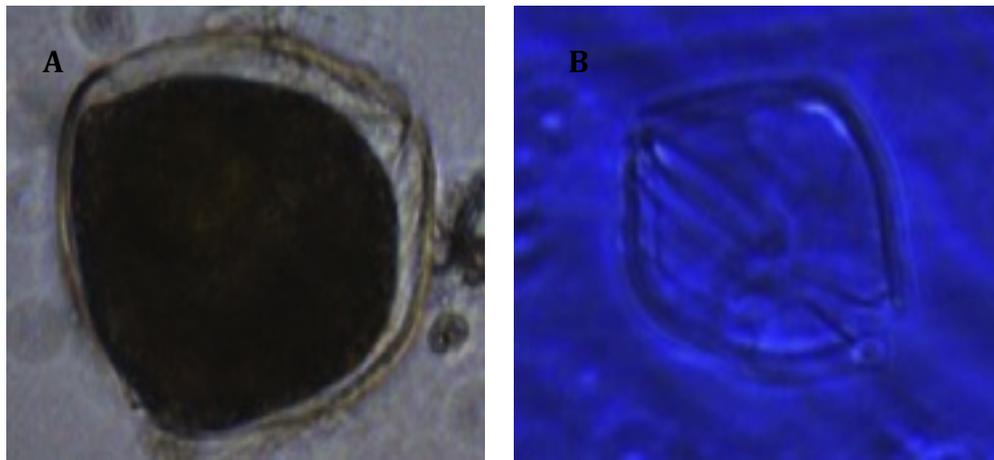


Figura. 25 Células de *Alexandrium*. spp. vistas a 40 X con un microscopio invertido DM 13000B (Leica Microsystems). En el panel A se muestran las células vivas del organismo y en el panel B se muestran las células vacías de las muestras del 18 de julio del 2013 a 10 m de profundidad.

En la Figura 26 se presentan células de *Alexandrium* spp. teñidas con calcoflúor y vistas con un microscopio de epifluorescencia (Fig. 26A), se puede distinguir un cíngulo poco pronunciado ligeramente desplazado hacia la derecha; sin embargo debido a la tinción del ADN no se pudo distinguir claramente la disposición de las placas. En la Figura 26B se presenta la imagen obtenida de un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Fluoview) donde se observa una vista latero ventral de una célula de la cepa de *A. ostenfeldii* donde se observa el cíngulo y un prominente poro ventral.

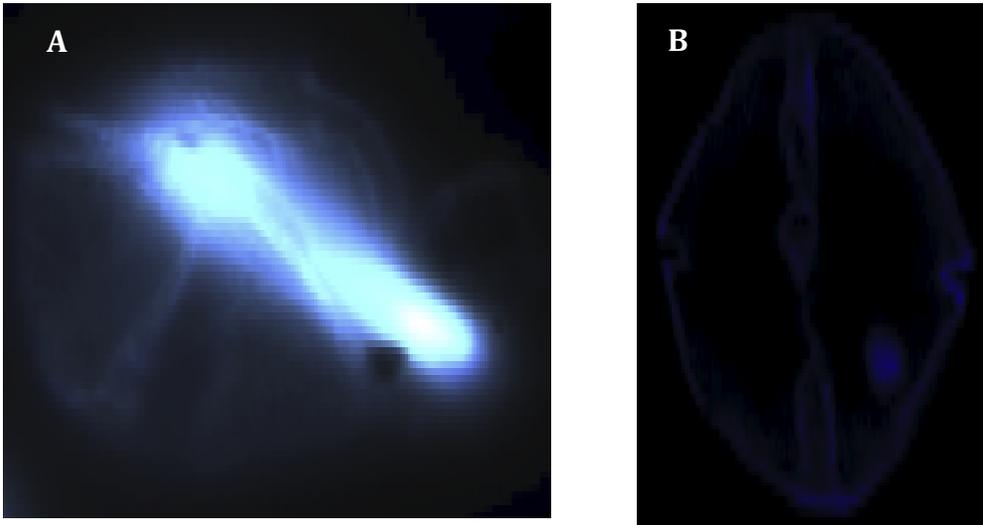


Figura. 26. Células de *Alexandrium*. spp. correspondiente a la muestra de superficie del 10 de octubre del 2013, teñida con calcoflúor y vistas con un microscopio de epifluorescencia (panel A). Células de *A. ostendeldii*, de la cepa de cultivo, vista latero ventral, donde se puede distinguir el cíngulo y un prominente poro ventral, visto con un microscopio confocal FV1000 (Olympus, Fluoview) (panel B).

Anexo 10

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

Tabla 11. Preparación de la solución madre de los distintos componentes que contiene el medio de cultivo GSe.

Solución madre	Agua destilada (dH ₂ O) por Litro	
1. KNO ₃		100.0 g
2. K ₂ HPO ₄		34.8 g
3. Vitaminas: Solución madre de trabajo, se debe preparar en 100 mL de agua destilada		
Biotina	2.0 mL (stock primario)	
Vitamina B12	1.0 mL (stock primario)	
Tiamina HCL	100.0 mg (solución nueva cada 3 meses)	
Stock primario		
Vitamina B12		10.0 mg/100 mL dH ₂ O
Biotina		10.0 mg/100 mL dH ₂ O
4. Mezcla de metales traza	g/L	Añadir el Na ₂ EDTA en 750 mL de dH ₂ O en un balón aforado. El resto de componentes añadirlos en 200 mL de dH ₂ O, cuando estén disueltos, se añade a la solución de Na ₂ EDTA y se ajusta a 1 L
Na ₂ EDTA	6.0 g	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.29 g	
H ₃ BO ₃	6.85 g	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.86 g	
ZnCl ₂	0.06 g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.026 g	
	Ajustar pH 7.8 – 8.0	
5. Extracto de suelo		
6. Selenio H₂SeO₃	1.29 mg	

Nota: Este medio debe ser mezclado agua de mar y agua destilada en una relación 3:1 ó 4:1. Por lo tanto la salinidad final es de aproximadamente 28 psu, que es óptima para especies de dinoflagelados costeros y estuarinos.

Tabla 12. Componentes para la preparación del medio de cultivo GSe para *A. ostenfeldii* a un volumen final de 5 L.

Componentes	Volumen para preparar 5 L
Solución madre de nitratos	20 mL
Solución madre de fosfatos	10 mL
Solución madre de vitaminas	10 mL
Solución madre de metales traza	50 mL
Solución madre de selenio	10 mL
Solución de extracto de suelo	25 mL
Agua de mar estéril	4 L
Agua destilada estéril	875 mL

Anexo 11

Preparación de las soluciones y tampones descrita por Gerssen *et al.*, (2009) que constituyen la fase móvil de las condiciones cromatográficas utilizadas con el método de Regueiro *et al.*, (2011) en el presente estudio.

Tampón Gerssen: Se colocaron 12.5 mL de NH₃ al 25 % (Merck) en un matraz de 250 mL y se aforó con agua tipo Milli-Q alimentado con un sistema Elix Advantage 10 (ambos sistema de Millipore). La concentración final fue de 0.67 M.

Solución A: Consistió en una dilución al 10% del tampón Gerssen con agua tipo Milli – Q.

Solución B: 10 % de Tampón Gerssen en acetonitrilo (MeCN) grado HPLC (Rathburn).

Solución de carga: 10 % de Fase B y 90 % de Fase A.

Para eliminar el aire de las muestras y evitar la formación de burbujas en las líneas que provoquen problema en el funcionamiento de las bombas cromatográficas las soluciones se desgasificaron mediante sonicación por 10 min.

Anexo 12

En el presente anexo se esquematiza el ciclo de vida de *Alexandrium* spp. En la Figura 27, se muestran las distintas etapas de vida en donde los organismos presentan diferente morfología, fisiología y funciones.

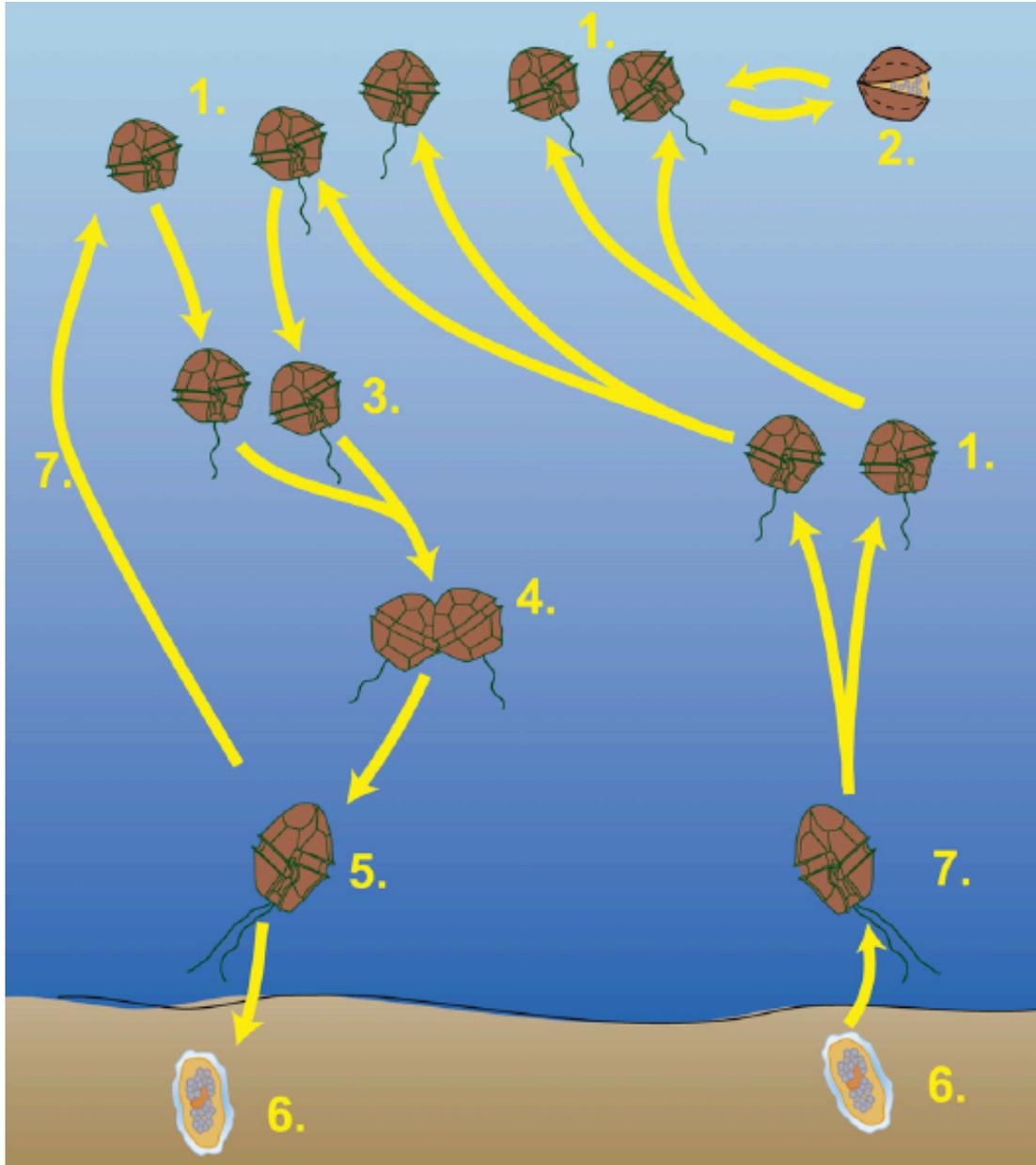


Figura. 27. Esquema del ciclo de vida de *Alexandrium* spp. (1) células vegetativas móviles haploides. Bajo condiciones de stress algunas células vegetativas pueden transformarse en quistes no móviles (2) que pueden regresar rápidamente a ser células vegetativas cuando las condiciones mejoran. La fase del ciclo sexual, comienza con la formación de gametos (3) cuando estos se unen (4) y forman un planozigoto diploide (5). Dependiendo de las condiciones ambientales, el planozigoto puede transformarse en un quiste resistente (hipnozigoto) (6) o puede efectuarse la meiosis y producir una célula vegetativa (1). Los quistes pueden permanecer en el sedimento por periodos variables hasta germinar, liberando una célula móvil llamada planomeiosito (7) la cual se divide para producir una célula vegetativa (1). Tomado de Anderson et al. (2012).

