

TESIS DEFENDIDA POR
IVONNE SANDRA SANTIAGO MORALES
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Ernesto García Mendoza
Director del Comité

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Miembro del Comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dra. Christine Johanna Band Schmidt
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del programa de posgrado
en ciencias de la vida*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

14 de Septiembre de 2011

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



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

**POTENCIAL TÓXICO DE CEPAS DE *Pseudo-nitzschia* AISLADAS DE LA
COSTA OCCIDENTAL DE BAJA CALIFORNIA**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

IVONNE SANDRA SANTIAGO MORALES

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2011.

RESUMEN de la tesis de **IVONNE SANDRA SANTIAGO MORALES**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California. Septiembre 2011.

POTENCIAL TÓXICO DE CEPAS DE *Pseudo-nitzschia* AISLADAS DE LA COSTA OCCIDENTAL DE BAJA CALIFORNIA

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de Tesis

El ácido domoico (AD) es una potente neurotoxina producida por diversas especies del género *Pseudo-nitzschia* (*Pn*) que puede afectar la salud pública, las pesquerías comerciales y recreacionales, y causar efectos nocivos en aves y mamíferos marinos. En la parte sur del Sistema de la Corriente de California (SCC), el envenenamiento por AD ha sido asociado principalmente con florecimientos de *Pseudo-nitzschia multiseries* y *P. australis* que se presentan generalmente durante eventos de surgencia. Sin embargo, los factores ambientales específicos que afectan el crecimiento y producción de AD han sido difíciles de identificar. Existe poca información acerca del potencial tóxico y distribución de especies del género *Pn* en la parte mexicana del SCC, por lo que uno de los objetivos del presente trabajo fue el de identificar y aislar cepas de *Pn* de la costa noroeste de Baja California, México y evaluar su potencial tóxico (producción de AD). Se aislaron varias cepas de las cuales la única que produjo AD, fue la identificada como *P. australis*. Se caracterizó el crecimiento y producción de AD en *P. australis* (BTS-1, BTS-2) cultivada en una razón de silicatos a nitratos alta (2.5) y baja (0.5) a 10, 12, 14, 15, 18 y 20 °C. No se detectaron diferencias en el crecimiento y contenido de AD celular (cAD, fase estacionaria) con respecto a la razón Si:NO₃ utilizada. La temperatura tampoco se relacionó con el contenido de cAD. El crecimiento óptimo se presentó en un intervalo estrecho de temperatura (12 y 14 °C). Se investigó asimismo, la relación entre la actividad fotosintética y contenido de AD (celular y disuelto) en cultivos de *P. australis* (BTS-1) mantenidos a la temperatura óptima de crecimiento (14 °C) a una alta (HL; 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja irradiancia (LL; 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a las dos razones nutricionales evaluadas anteriormente (Si:NO₃ 2.5 y 0.5) Se detectó AD en diferentes condiciones de cultivo donde el contenido mayor de AD disuelto (dAD) se detectó en la fase de acondicionamiento (lag) del cultivo. En esta fase se detectó asimismo altas tasas fotosintéticas. Los organismos expuestos a una alta irradiancia (HL) presentaron tasas fotosintéticas menores que células mantenidas en baja irradiancia (LL). Las células cultivadas en estas dos condiciones presentaron una concentración de pigmentos fotoprotectores similar. Ya que la luz está relacionada con la producción e AD, se evaluó posteriormente el efecto de la fuente de nitrógeno, nivel de luz y cambios en condiciones de iluminación (periodos de oscuridad y luz) sobre la producción de esta toxina. Se observaron niveles de AD mayores en presencia de luz y nitrato que con ácido glutámico, y se observó un incremento en la respuesta fotosintética de células incubadas en oscuridad al re-exponerlas a iluminación, pero sin cambios en la concentración de AD. Por lo tanto, se hipotetiza que la biosíntesis de esta

toxina puede actuar como un consumidor de electrones para reducir la presión de excitación en el aparato fotosintético, por lo que la producción y liberación de AD en células de *P. australis* puede ayudar a mantener un balance entre la energía producida por la fotoquímica y consumo de la misma metabólicamente.

Palabras Clave: Ácido domoico, *Pseudo-nitzschia australis*, temperatura, razón Si:NO₃, fotosíntesis, pigmentos.

ABSTRACT of the thesis presented by **IVONNE SANDRA SANTIAGO MORALES** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF LIFE SCIENCES degree in Marine Biotechnology, Ensenada, Baja California, México, September, 2011.

TOXIC POTENTIAL OF *Pseudo-nitzschia* STRAINS ISOLATED FROM THE WEST COAST OF BAJA CALIFORNIA.

Domoic acid (DA) is a potent neurotoxin produced by several species of the genus *Pseudo-nitzschia*. DA can affect public health, commercial and recreational fisheries, and causes harmful effects to marine mammals and birds. DA poisoning in the southern part of the California Current System (CCS) has been associated mainly with blooms of *P. multiseriata* and *P. australis*. Blooms of these species have been associated with environmental conditions present during coastal upwelling, but the exact environmental factors that promote the accumulation (growth) of toxic species and the production of DA have been difficult to identify. There is scarce information about the distribution of *Pseudo-nitzschia* toxic species in the Mexican part of the CCS. In this study, we isolated and identified different strains of *Pseudo-nitzschia* from the Pacific coast of northern Baja California, Mexico. *P. australis* was the only strain that produced DA. The influence of a high (2.5) and a low (0.5) silicate to nitrate ratio on the growth and production of DA was characterized in two *P. australis* strains (BTS-1, BTS-2) cultured at different temperatures under batch conditions. A narrow temperature range for optimal growth was observed, with high biomass accumulation at 12 and 14 °C. No difference in growth and cellular DA content (cDA) was observed in cells cultivated at the two nutrient ratios. Also, cDA content in cells at the stationary phase of growth was not related to temperature. In order to investigate the relationships of photosynthesis and toxin production, changes in the concentration of DA (cellular and dissolved), photosynthetic physiology and pigment concentrations were characterized in *P. australis* (BTS-1) at different stages of growth in cultures maintained at the optimal growth temperature (14 °C) in high (HL; 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and low light (LL; 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high (2.5) and low (0.5) Si:NO₃ ratio. We found that *P. australis* produced DA at different photosynthetic conditions. The highest DA content in the culture was detected during in the lag phase of growth mainly in the medium (dDA), when the cells presented high maximum photosynthetic rates. Cells cultivated at HL produced more DA than LL cultured cells. *P. australis* cultured in HL presented lower photosynthetic rates than LL cells and similar concentrations of photoprotective pigments. The effects of nitrogen source, light level and light fluctuations on production of DA were determined for *P. australis*. High levels of domoic acid were observed in *P. australis* exposed to light and nitrogen in the form of nitrate, in contrast, the addition of glutamic acid resulted in lower concentrations of the toxin. The photosynthesis of dark adapted *P. australis* cells was enhanced following the exposure to light, and patterns of domoic acid occurred during light fluctuation. Therefore, we hypothesized that the production and release of DA in *P. australis* could be a strategy to maintain adequate photosynthetic rates since the biosynthesis of this toxin could act as an electron sink to reduce the excitation pressure in the photosynthetic apparatus.

Keywords: Domoic acid, *Pseudo-nitzschia australis*, temperature, Si:NO₃ ratio, photosynthesis, pigments.

Dedicatoria

*A mi familia:
De quienes siempre he recibido apoyo incondicional*

Agradecimientos

A la vida, por la oportunidad de haber conocido personas invaluableles en este trayecto, a pesar de los tropiezos.

*Al **Dr. Ernesto García** por aceptarme como estudiante en un proceso tan complicado, y permitirme formar parte de este proyecto y del selecto grupo del CONocimiento alGAL.*

*Agradezco a mis sinodales, **Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dra. Pilar Sánchez Saavedra y Dra. Christine Band Schmith**, por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo, por las sugerencias y comentarios realizados.*

*A la **Dra. Ma. Teresa Viana y Emmanuel Martínez**, (IIO-UABC), por la oportunidad y apoyo para el desarrollo de una idea fugaz, que llevo a concretar el último capítulo de la tesis.*

*Agradezco a **Antonio Almazan, José Luis Peña, Nadine Schubert, Edna Sánchez, Francisco López –Gordo-, Tanya Camacho, Pavel Lugo, Guadalupe Cabrales y Carolina Castañeda** por el tiempo que dejaron de prestar a sus respectivos proyectos para apoyarme en el desarrollo de la presente tesis... toma de muestras en campo, metodologías empleadas, material y equipo indispensable, consultas académicas y médicas... y sobre todo su amistad.*

*A la **Familia de la Cruz Fierro** por hacerme sentir siempre en casa, gracias **Sashenka y Wencel**.*

*A **Lizbeth Meza, Amayali, MaryCarmen, Mildred, Karla, Anita, Jushiro, Tiago, Héctor, Luis, Ricardo, Emiliano, Erasmo, Ruth, Getse, Marisol, Soco, Haydee, Gretel, ...** por compartir su tiempo en este trayecto, y por su invaluable apoyo.*

*A los **Doctores Facundo Márquez y Margarito Martínez (ITO)** por la confianza y oportunidad brindada en el inicio fallido de este camino.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica e Inmunología del ITO, **Emma, Checo, Liliana, Carlos, Lino, Luis, Heriberto**.*

*En la gran travesía de este proyecto recibí apoyo de diferentes áreas, tanto dentro del **CICESE** como fuera del mismo, por lo que quisiera incluir al....*

***Depto. de Biotecnología Marina** por permitirme continuar trabajando en sus instalaciones y hacer uso del sistema de HPLC, agradezco de manera especial al **M.C. Manuel Acosta, Dr. Alexei Licea, M.C. Eduardo Morales y Dr. Leonardo Lizárraga**.*

Depto. de Ecología agradezco a la *Dra. Sharon Herzka*, *Dr. Helmut Maske*, *Dra. Lucy Lares* y *M.C. Carmen Bazán*.

Depto. de Acuicultura agradezco al *Dr. Eugenio Díaz*, *M.C. Lourdes Trujillo*, *M.C. Yanet Guerrero*, *M.C. Norberto Acevedo*, *Dr. Benjamín Baron*, *Dr. JP Lazo* y *Dra. Beatriz Cordero*.

Asimismo agradezco el apoyo que recibí del *Dr. Isaí Pacheco (IIO-UABC)*, *Dr. David Hernández Becerril (ICMyL-UNAM)*, *Ing. Israel Gradilla (CNyN-UNAM)*, *Melissa Carter (Scripps Institution of Oceanography)*, *Dr. José Luis Stephano* y *Dra. Refugio González (UABC)*.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* por la beca otorgada (No. 171341) para la realización de estos estudios, al *CICESE* por haberme albergado estos años y a la *Universidad del Mar* por permitir la realización de estos estudios en el marco de *Estancia Académica*.

"Creí que era una aventura y en realidad era la vida"
Joseph Conrad

CONTENIDO

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tablas	xix
Capítulo I. Introducción general	1
I.1. Intoxicación de tipo amnésica (ASP)	3
I.2. <i>Pseudo-nitzschia</i> : Taxonomía y ciclo de vida	5
I.3. Biosíntesis del ácido domoico (AD)	8
I.4. Toxicidad de especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	10
I.5. Factores que afectan el crecimiento y producción de AD en especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	11
I.6. Fotosíntesis y su regulación en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales	14
I.7. Transporte y absorción del ácido domoico	16
I.8. Antecedentes	17
I.8.1. Importancia del ASP en el Sistema de la Corriente de California	17
I.8.2. <i>Pseudo-nitzschia australis</i>	18
I.9. Planteamiento del problema y estructura de la tesis	19
I.9.1. Hipótesis general	21
I.9.2. Objetivo general	21
I.9.3. Objetivos particulares	21
Capítulo II. Identificación, crecimiento y capacidad de producción de ácido domoico de cepas del género <i>Pseudo-nitzschia</i> aisladas de la región de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México	22
II.1. Introducción	22
II.2. Materiales y métodos	24
II.2.1. Aislamiento y cultivo de especies de <i>Pseudo-nitzschia</i>	24
II.2.2. Caracterización morfométrica	25
II.2.3. Identificación de especies mediante hibridación fluorescente <i>in situ</i> de células completas (FISH-WC)	25

CONTENIDO (continuación)

	Página
II.2.4. Efecto de la temperatura y relación silicatos a nitratos en las características de crecimiento y contenido de AD en <i>P. australis</i>	26
II.2.5. Cuantificación de ácido domoico	27
II.2.6. Análisis de datos	28
II.3. Resultados	28
II.3.1. Aislamiento y cultivo	28
II.3.2. Caracterización morfométrica	29
II.3.3. Identificación por hibridación fluorescente <i>in situ</i> de células completas (FISH-WC)	32
II.3.4. Cuantificación de la toxina	32
II.3.5. Efecto de la temperatura y relación silicatos:nitratos en las características de crecimiento y contenido de AD en células de <i>P. australis</i>	34
II.4. Discusión y conclusión	39
Capítulo III. Producción de ácido domoico y fisiología fotosintética de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> en diferentes estadios de crecimiento en cultivos estáticos	
III.1. Introducción	43
III.2. Materiales y métodos	44
III.2.1. Condición experimental	44
III.2.2. Cuantificación de ácido domoico	45
III.2.3. Actividad fotosintética (curvas P-E)	45
III.2.4. Análisis de pigmentos	46
III.2.5. Análisis de datos	47
III.3. Resultados	47
III.4. Discusión y conclusión	54
Capítulo IV. Producción de ácido domoico en respuesta a la alternancia entre crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad	
IV.1. Introducción	59
IV.2. Materiales y métodos	61
IV.2.1. Condiciones experimentales	61
IV.2.2. Cuantificación de ácido domoico	62

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV.2.3. Actividad fotosintética (curvas P-E)	62
IV.2.4. Análisis de pigmentos	62
IV.2.5. Análisis de datos	62
IV.3. Resultados	63
IV.3.1. Respuesta al cambio en la condición de irradiancia y disponibilidad de N-orgánico	63
IV.3.2. Alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad	67
IV.4. Discusión y conclusión	75
IV.4.1. Respuesta al cambio en la condición de irradiancia y disponibilidad de N-orgánico	75
IV.4.2. Alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad	76
Capítulo V. Evaluación <i>in vitro</i> de la absorción del ácido domoico en atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>) utilizando el modelo del intestino invertido	78
V.1. Introducción	78
V.2. Materiales y métodos	80
V.2.1. Obtención de extractos de ácido domoico	80
V.2.2. Obtención de la región intestinal	81
V.2.3. Absorción intestinal del ácido domoico	82
V.2.4. Cuantificación de ácido domoico	83
V.2.5. Análisis estadístico	83
V.3. Resultados	83
V.4. Discusión y conclusión	89
Capítulo VI. Discusión General	93
VI.1. Especies del género <i>Pseudo-nitzschia</i> en la Bahía de Todos Santos	93
VI.2. Factores relacionados al crecimiento de <i>Pseudo-nitzschia australis</i>	93
VI.3. Factores relacionados a la producción de AD en <i>Pseudo-nitzschia australis</i> ..	95
VI.4. Absorción del ácido domoico en peces	97
Referencias	99

CONTENIDO (continuación)**Página****Anexo**

- I. Datos morfométricos de especies del género *Pseudo-nitzschia*
- II. Niveles de ácido domoico asociados a diferentes especies de *Pseudo-nitzschia (in situ)*
- III. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. Tomado de Jeffery et al. (2004).	4
2	Morfología característica de la frústula de una diatomea del género <i>Pseudo-nitzschia</i> y estructura del himen de poroides (F= Sectores: dos, cuatro, diversos; G= Patrón: circular, hexagonal, disperso). Modificado de Lundholm et al. (2003).	7
3	Crecimiento vegetativo y reproducción sexual en <i>Pseudo-nitzschia australis</i> . A) División de una célula vegetativa. B) Cigotos obtenidos después de la fusión de gametos. C) Auxosporulación, célula inicial (flecha) más corta que la auxospora formada.	8
4	Ruta biosintética propuesta para el ácido domoico, basada en experimentos de incorporación de ¹³ C-acetato (Douglas et al. 1992; Subba Rao et al. 1998; Kalaitzis et al. 2010).	9
5	Curva de respuesta fotosíntesis-irradiancia (P-E). Donde α^β representa la pendiente de la región limitada por luz (α^β), P_m^β representa la tasa fotosintética máxima en luz saturante. E_k es el parámetro de saturación por luz ($E_k = P_m^\beta / \alpha^\beta$) y β^β describe la reducción de la tasa fotosintética a alta irradiancia.	15
6	Crecimiento poblacional de cepas de <i>Pseudo-nitzschia</i> (D1, D2, D3, BTS-1 y BTS-2) aisladas de la Bahía de Todos Santos. Las células fueron cultivadas a 14 °C en medio L1 más 245 μ M silicatos (Guillard y Hargraves, 1993), a 260 μ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. La línea representa un ajuste al modelo Gompertz, los símbolos son la media \pm desviación estándar (n=3).	29
7	<i>Pseudo-nitzschia decipiens</i> (D1). <i>Pseudo-nitzschia decipiens</i> (D1). Los paneles A, B y C muestran micrografías SEM de la punta de la valva (A); valva completa (B) y parte media de la valva mostrando el nódulo central (C). La micrografía TEM mostrada en el panel D, muestra parte de la valva donde se identifica el patrón hexagonal de perforación y estructura del manto proximal.	30

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
8	<i>Pseudo-nitzschia decipiens</i> (D2). Los paneles A, B y C muestran micrografías SEM de la punta de la valva (A); parte media de la valva mostrando el nódulo central (B) y valva completa (C). Las micrografías TEM mostradas en los paneles D y F, muestran la punta de la valva e hileras de poroides (D) y los detalles de la banda del cíngulo (F).	31
9	<i>Pseudo-nitzschia decipiens</i> (D3). Los paneles A y C muestran micrografías TEM de la valva completa (A) y los detalles de la banda del cíngulo (C). Los paneles B, D y E muestran micrografías SEM de la valva completa (B); parte media de la valva mostrando el nódulo central (D) y la punta de la valva (E).	31
10	Caracteres morfológicos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> . Cadena de células en vista valvar a 400x mostrando el traslape celular (A). Los paneles B y D muestran micrografías SEM de la valva completa y parte media de la valva mostrando la ausencia del nódulo central, fibulas (f), interestrias (i), estrias (s) y poroides (p). La micrografía de epifluorescencia de <i>P. australis</i> hibridizada con la sonda auD1 es mostrada en el panel C.	33
11	Tasa de crecimiento máximo (a, b), duración de la fase exponencial (c, d) y número de células (e, f) de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> cultivada a diferentes temperaturas y dos razones de silicatos:nitratos. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n = 3).	37
12	Concentración de ácido domoico celular (cAD) (a, b), disuelto (dAD) (c, d) y total (tAD) (e, f), en <i>Pseudo-nitzschia australis</i> cultivada a diferentes temperaturas y dos razones de silicatos:nitratos, durante la fase estacionaria. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n = 3).	38
13	Cambios en la abundancia celular (A, B) y tasas específicas de crecimiento (C, D) de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1) cultivada en dos relaciones Si:NO ₃ a 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (HL, símbolos vacíos) y 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LL, símbolos oscuros). Los símbolos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	48

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14	Cambios en la concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) durante el periodo de cultivo de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1). Las condiciones de cultivo, son como las descritas en la figura 13. Se presenta la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	50
15	Relación fotosíntesis vs. irradiancia (P-E) en <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1) durante diferentes días de cultivo. Las células fueron cultivadas en la relación 2.5 de Si:NO ₃ con una irradiancia de 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las líneas representan el ajuste al modelo de Platt et al. (1980).	51
16	Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) durante el periodo de cultivo de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1). La tasa fotosintética máxima (P_s^β) y la eficiencia de utilización de luz (α^β) normalizados a la concentración de chlorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>), se presentan en el panel A y B, respectivamente. En el panel C se presenta el parámetro de saturación por luz (E_k). Las condiciones de cultivo, son como las descritas en la figura 13.	52
17	Cambios en la concentración de pigmentos en <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1) durante el periodo de cultivo. La concentración de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>) se presenta en el panel A y la concentración del carotenoide fucoxantina (Fx) se presenta en el panel B. La concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx), se muestran en el panel C y D. Las condiciones de cultivo se describen en la figura 13. Los símbolos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	54
18	Abundancia celular y tasa específica de crecimiento (μ) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , expuestos a cambios en la condición de irradiancia (LL = 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico (AG) como fuente de N-orgánico (Símbolos vacíos= presencia, Símbolos oscuros = ausencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	63

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
19	Concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL= 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG = presencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	64
20	Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL = 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG = presencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	66
21	Concentración celular de pigmentos en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL = 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG= presencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	67
22	Cambios de abundancia celular y tasas específicas de crecimiento en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> y <i>Thalassiosira pseudonana</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, símbolos vacíos) y en oscuridad (símbolos oscuros). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	68
23	Cambios en la concentración de ácido domoico disuelto (dAD) y celular (cAD) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	69

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
24	Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> y <i>Thalassiosira pseudonana</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	70
25	Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> y <i>Thalassiosira pseudonana</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	72
26	Cambios en la concentración de chlorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>) y fucoxantina (Fx) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> y <i>Thalassiosira pseudonana</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, símbolos vacíos) y en oscuridad (símbolos oscuros). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	73
27	Cambios en la concentración de los pigmentos diadinoxantina (Ddx), diatoxantina (Dtx), β -caroteno (β -car) y zeaxantina (Zx) en cultivos de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> y <i>Thalassiosira pseudonana</i> , expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz (30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.	74
28	Absorción específica en diferentes extractos de ácido domoico, utilizando la región proximal del intestino invertido de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos representan la media \pm error estándar de tres réplicas.	84

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
29	Absorción de ácido domoico en presencia de diferentes concentraciones de ácido glutámico, en la región proximal del intestino de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control. Se presenta la media \pm error estándar de tres réplicas.	86
30	Absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico, ácido aspártico o prolina, en la región proximal del intestino de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control. Se presenta la media \pm error estándar de tres réplicas, excepto para el ácido aspártico (valor único).	88
31	Absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico, ácido aspártico o prolina, utilizando la región íleocecal del intestino de conejo. Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control, y representan la media \pm error estándar de tres réplicas.	89

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencias de oligonucleótidos empleados en la técnica de FISH-WC.	26
II	Caracteres morfológicos de las cepas D1, D2, y D3. El valor entre paréntesis representa la desviación estándar (n=60).	30
III	Caracteres morfológicos de las cepas BTS-1 y BTS-2. Los valores entre paréntesis representa una desviación estándar (n=60).	33
IV	Concentración de ácido domoico celular (cAD) y parámetros poblacionales de las cepas BTS-1 y BTS-2 en los días de muestreo. Las células fueron cultivadas a 14 °C en medio L1 más 245 μM silicatos (Guillard y Hargraves, 1993), a 260 μmol quanta m ⁻² s ⁻¹ bajo un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. Los valores entre paréntesis representan la desviación estándar (n=3).	34
V	Parámetros fotosintéticos estimados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) durante el periodo de cultivo de <i>Pseudo-nitzschia australis</i> (BTS-1). La tasa máxima fotosintética (P_s^β , μmolO ₂ mgChl a ⁻¹ h ⁻¹), la eficiencia de utilización de luz y parámetro de fotoinhibición (α^β y β^β , ambos en μmolO ₂ mg Chl a ⁻¹ h ⁻¹)(μmol quanta m ⁻² s ⁻¹) ⁻¹ están normalizados en base a la concentración de chlorofila a (Chl a). E _k , es el parámetro de saturación por luz (μmol quanta m ⁻² s ⁻¹). Los valores son la media (desviación estándar) de tres determinaciones.	53
VI	Absorción específica máxima y tasa media de absorción en diferentes extractos de ácido domoico, utilizando intestino proximal de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos representan la media ± error estándar de tres réplicas.	84
VII	Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico a diferentes concentraciones, en intestino proximal de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos son la media ± error estándar de tres réplicas.	85

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VIII	Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico (0.25 mg mL ⁻¹), ácido aspártico (0.08 mg mL ⁻¹) y prolina (0.10 mg mL ⁻¹), utilizando la región proximal del intestino de atún aleta azul (<i>Thunnus orientalis</i>). Los datos son la media ± error estándar de tres réplicas, excepto para el ácido aspártico (*valor único).	87
IX	Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico (0.25 mg mL ⁻¹), ácido aspártico (0.08 mg mL ⁻¹) y prolina (0.10 mg mL ⁻¹), utilizando la región íleocecal del intestino de conejo. Los datos son la media ± error estándar de tres réplicas.	88

Capítulo I

Introducción general

Se han reconocido aproximadamente 300 especies de microalgas formadoras de florecimientos algales (acumulación significativa de biomasa) y solo una pequeña porción de estas producen compuestos tóxicos (Petry et al. 2007). Los florecimientos algales se asocian a eventos de surgencias costeras, eutrofización de ecosistemas costeros y tormentas invernales (Smayda, 1990; Hallegraeff, 1993, 2003; Anderson et al. 2002; Glibert et al. 2005a, 2005b; Heisler et al. 2008; Howarth, 2008). A su vez, la producción de toxinas en las especies algales nocivas está asociada a factores ambientales. Sin embargo, no se conoce con exactitud los factores ambientales que promueven la formación, mantenimiento y decaimiento de florecimientos de la mayoría de las especies tóxicas, asimismo las condiciones específicas que inducen a la producción de la toxina son poco comprendidas (Granéli y Flynn, 2006). En las tres décadas pasadas, la incidencia de los florecimientos algales nocivos (FANs) y episodios tóxicos se ha incrementado tanto en frecuencia, como en su distribución geográfica, ocasionando un efecto adverso en el ambiente. Específicamente, la acumulación de toxinas en diferentes organismos y su transferencia al ser humano es el riesgo más importante de estos fenómenos (Anderson et al. 2002; FAO, 2004).

Las ficotoxinas son producidas por especies de microalgas de distintos grupos filogenéticos como cianobacterias, dinoflagelados y diatomeas principalmente. Los florecimientos de cianobacterias tóxicas se presentan generalmente en sistemas dulceacuícolas y pocas especies forman florecimientos en ambientes marinos. Los dinoflagelados son el grupo con el mayor potencial tóxico, ya que se han identificado aproximadamente a unas 60 especies productoras de compuestos bioactivos hidrofílicos o liposolubles que pueden presentar efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos (Zaccaroni y Scaravelli, 2008; FAO, 2004). En contraste, en el grupo de las diatomeas, pocas especies que pertenecen a un solo género (*Pseudo-nitzschia*) han causado intoxicaciones humanas y muerte de aves y mamíferos marinos (Bates y Trainer, 2006). De

los cinco síndromes de envenenamiento inducidos por toxinas marinas producidas por microalgas (paralítico, diarreico, amnésico, neurotóxico y envenenamiento por ciguatera), el envenenamiento amnésico por consumo de moluscos (ASP, por sus siglas en inglés: Amnesic Shellfish Poisoning) es la intoxicación asociada a florecimientos algales de *Pseudo-nitzschia* (Zaccaroni y Scaravelli, 2008). Específicamente, el ácido domoico (AD) fue el agente causal de la muerte de tres personas en un evento de intoxicación ocurrido en 1987 en Canadá (Wright, 1989). Desde este primer evento reconocido de ASP, se han creado programas de monitoreo e investigación en varias partes del mundo y se ha reconocido al envenenamiento por AD como uno de los síndromes tóxicos más importantes causado por microalgas en el Sistema de la Corriente de California (GEOHAB, 2005). En este sistema, los FAN asociados a especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas han causado mortalidades masivas y recurrentes de pelícanos, cormoranes y leones marinos, así como pérdidas económicas importantes al afectar a la acuicultura, pesquerías y turismo en varias áreas costeras desde el sur de Canadá y regiones de la costa Oeste de Estados Unidos (Jeffery et al. 2004; Torres et al. 2009).

En la región norte de la península de Baja California se han presentado casos de mortandad de mamíferos y aves marinas, que se ha supuesto que fueron causados por envenenamiento por AD, aunque esto no se ha confirmado. Se pensaba que no había acumulación de AD la región ya que no existían reportes de la presencia de especies tóxicas ni mediciones de la concentración de esta toxina en el ambiente. Sin embargo, en el 2007 se detectó un florecimiento de *P. australis* y presencia de AD en material particulado en la región de la Bahía de Todos Santos (García-Mendoza et al. 2009). Esto indica que existe la probabilidad de ocurrencia de eventos de envenenamiento por AD en la región. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuáles son los factores que influyen sobre el crecimiento y producción de AD de *P. australis*. Por otro lado, existe poca información de los mecanismos de incorporación de AD en organismos de niveles tróficos superiores, lo que limita conocer el potencial de intoxicación por AD en la región. Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca a entender los mecanismos de control de la producción de AD en *P. australis* como principal especie responsable de la acumulación de esta toxina en nuestra región. Aunado a lo anterior, se caracterizó el crecimiento poblacional de *P. australis* a

diferentes temperaturas y condiciones de nutrientes para entender el efecto de estas variables sobre la acumulación esta especie en la región.

I.1. Intoxicación de tipo amnésica (ASP)

Los síndromes causados por ficotoxinas marinas se clasifican generalmente, por el tipo de intoxicación y sintomatología asociada. La intoxicación tipo amnésica o envenamiento amnésico por consumo de molusco es ocasionada por el ácido domoico que es producida principalmente por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*. El AD, aislado e identificado en 1950 del alga roja *Chondria armata*, fue el agente causal de una evento de ASP que ocurrió en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, en donde la diatomea *Pseudo-nitzschia multiseriis* (*Nitzschia pungens* f. *multiseriis*) fue el organismo responsable (Bates et al. 1989; Hallegraeff, 1995; Hasle y Fryxell, 1995; Ravn, 1995). Desde entonces, se han registrado florecimientos tóxicos de otras especies del género *Pseudo-nitzschia* (Martin et al. 1990; Todd, 1993; Lundholm et al. 1994; Rhodes et al. 1998; Kotaki et al. 2000; Sarno y Dahlman, 2000). La intoxicación por AD ocasiona hiperexcitación neuronal seguida por pérdida crónica de función en sistemas neurales y susceptibilidad a degeneración excitotóxica (Bell, 2003). El AD es un aminoácido no proteico ((3S,4S)-3-carboximetil-4-[(1Z,3R,5R)-(5-carboxi-1-metilhexa-1,3-dien-1-il)]-L-prolina) que presenta 8 isómeros (A, B, C, D, E, F, G y H) (Fig. 1), los cuales son análogos estructurales del ácido glutámico, neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central (CNS), responsable de diversas funciones dentro del cerebro (Wright y Quilliam, 1995; Holland et al. 2005; Trainer et al. 2008). No obstante a que el AD es estructuralmente más complejo que el ácido glutámico, este presenta una alta afinidad por los receptores glutamato (GluR) causando un desequilibrio del Ca^{+2} citosólico de la neuronas y por consiguiente la despolarización de la membrana (Johnson y Koerner, 1988; Mabry, 2001; Pulido, 2008). Particularmente, el AD presenta mayor afinidad de enlace a los receptores glutamato en comparación a los isómeros que carecen del doble enlace 1'-2' con la configuración Z (Holland et al. 2005). El AD también presenta afinidad con los receptores 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPArs) y kainato (KARs) produciendo

disturbios iónicos celulares persistentes, hinchazón y neurodegeneración en el hipocampo. De los diferentes isómeros, el diastereoisómero C5', posee casi la misma capacidad de unión al receptor kainato que el AD (Wright y Quilliam, 1995).

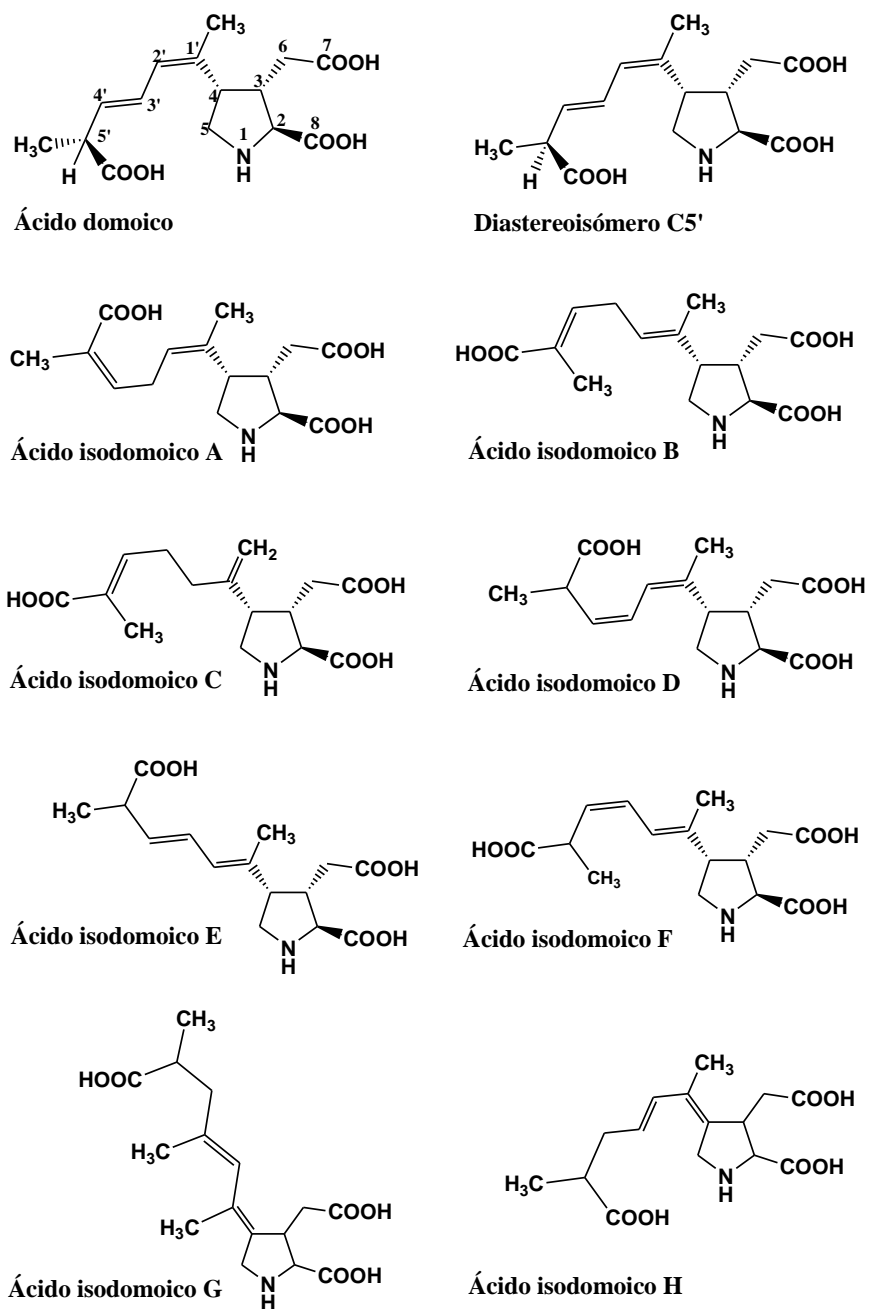


Figura 1. Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. Tomado de Jeffery et al. (2004).

La activación neuronal es controlada de manera normal por la reabsorción o inactivación rápida del glutamato por enzimas específicas. Sin embargo, la carencia de un sistema de remoción para el AD que controle la activación neuronal, causa la liberación secundaria de óxido nítrico y glutamato endógeno, exacerbando la muerte neuronal (Nijjar y Nijjar, 2000; Qiu et al. 2006).

Se ha sugerido que el mecanismo de excitotoxicidad inducido por el AD en diferentes organismos incluyendo a los humanos, involucra el paso del AD a través de la barrera sangre-cerebro (Lefebvre et al. 2001). Sin embargo, a pesar de que el mayor riesgo de exposición al AD se origina del consumo dietario (Kvitek et al. 2008), muy pocos estudios han examinado el efecto de la administración oral del AD (Jeffery et al. 2004). Se han utilizado tratamientos intravenosos e intraperitoneales en diferentes modelos animales, observándose cambios neuroconductuales que dependen de la dosis y ruta de asimilación, siendo las consecuencias de la incorporación intraperitoneal y intravenosa mayores que aquellas asociadas con la exposición oral (Jeffery et al. 2004; Grant, 2010). A su vez, las diferencias en tolerancia al AD entre distintos organismos se han atribuido a la variación en absorción, distribución, metabolismo y excreción del AD (Jeffery et al. 2004; Lefebvre et al. 2010). Por ejemplo, los ratones son menos susceptibles que las ratas, las cuáles a su vez, son menos susceptibles que los monos y humanos; en contraste, los moluscos y los peces aparentemente son resistentes a la exposición dietaria de AD en dosis altas (Trainer et al. 2008; Lefebvre et al. 2010).

I.2. *Pseudo-nitzschia*: Taxonomía y ciclo de vida

La clasificación taxonómica de las diatomeas se basa principalmente en características morfológicas de la estructura de su esqueleto silíceo (Fig. 2). Las características del género *Pseudo-nitzschia* son: células elongadas, rectangulares o fusiformes en vista cingular. Asimismo, se presentan como células solitarias o forman cadenas escalonadas unidas por traslapes de las puntas valvares y presentan un rafe excéntrico no elevado arriba del nivel general de la valva; a su vez, la valva es poco lanceolada a fusiforme y lineal con terminaciones redondeadas con ausencia de poroides en la pared del canal del rafe.

Las características específicas que definen a las diferentes especies son la longitud (Fig. 2B) y amplitud de la valva (Fig. 2C), longitud del traslape de las puntas valvares (Fig. 2A), forma de las puntas valvares (Fig. 2E), densidad lineal de interestrías y fíbulas y presencia del interespacio central (Fig. 2D). En la mayoría de los casos, la identificación de las especies es difícil ya que se necesita analizar la ultra-estructura del himen de los poroides, específicamente el número de sectores (Fig. 2F) y su patrón de distribución (Fig. 2G) (Anexo I). Recientemente, se han utilizado técnicas moleculares para identificar especies difíciles de diferenciar mediante características morfológicas (Lundholm y Møestrup 2000; Lundholm et al. 2002, 2003, 2006; Orsini et al. 2002, 2004; Evans et al. 2004, 2005; Cerino et al. 2005; Amato et al. 2007), lo cual ha permitido la rápida detección de especies específicas que originan florecimientos tóxicos (Janson y Hayes, 2006; Litaker y Tester, 2006).

Las diatomeas presentan un ciclo de vida complejo, se encuentran la mayor parte del tiempo en crecimiento vegetativo, tienen la capacidad de producir estados de reposo (células y esporas de reposo) y contrario a la mayoría de los otros grupos algales, el proceso de reproducción de tipo sexual no es un factor normal en latencia (Round et al. 1990; Edlund y Stoermer, 1997).

El crecimiento vegetativo está caracterizado por la disminución de tamaño de los organismos al existir división celular. Esto es provocado por la formación de dos nuevos componentes dentro de la célula parental, que resultan en la reducción del eje apical, sin cambios significativos en los ejes trans-apical y pervalvar (Amato et al. 2005; Chepurnov et al. 2005). En el proceso de reproducción del tipo sexual se lleva a cabo la restauración del tamaño celular, en donde a partir de la formación de auxosporas se desarrolla una célula vegetativa de gran tamaño, llamada célula inicial. Se han sugerido como factores importantes para la inducción de la sexualidad una reducción del tamaño celular de 30 a 40% del tamaño celular máximo, condiciones ambientales adecuadas, y la fase del ciclo celular (Round et al. 1990; Mann, 1993; Edlund y Stoermer, 1997).

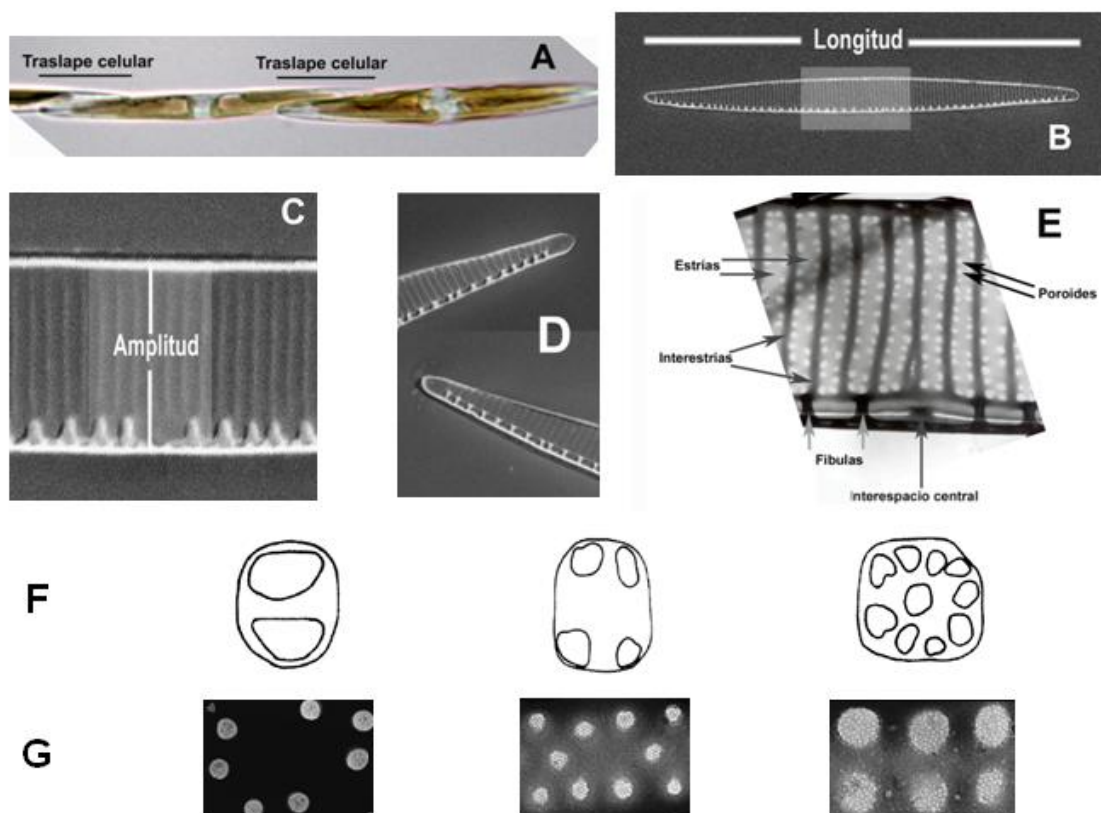


Figura 2. Morfología característica de la frústula de una diatomea del género *Pseudo-nitzschia* y estructura del himen de poroides (F= Sectores: dos, cuatro, diversos; G= Patrón: circular, hexagonal, disperso). Modificado de Lundholm et al. (2003).

La reproducción del tipo sexual típica en especies del género *Pseudo-nitzschia* (Fig. 3), se inicia entre dos células de tipo sexual opuesto (heterotálicas) en buena condición fisiológica con potencial de transformación en gametangios ubicadas lado a lado, las cuáles producen dos gametos carentes de flagelos, morfológicamente idénticos, pero conductualmente diferentes, diferenciados en “masculino” (gameto activo) y “femenino” (gameto pasivo) (Davidovich y Bates, 1998; Chepurnov et al. 2004; Amato et al. 2005). Los gametos activos se mueven por acción amiboide hacia los gametos pasivos, obteniéndose como resultado de la fusión dos cigotos conectados débilmente a la frústula de la célula “madre”, y cuya elongación en auxospora permite obtener células iniciales largas con nuevas frústulas, que al ser liberadas de la auxospora representan la parte vegetativa del ciclo de vida (Round et al. 1990; Davidovich y Bates, 1998; Hiltz et al. 2000; Kaczmarska et al. 2000; Amato et al. 2005; Chepurnov et al. 2005). La formación de

células de reposo, como un medio de sobrevivencia a periodos prolongados de oscuridad y bajas temperaturas, se ha documentado en diatomeas. Las células de reposo, a diferencia de una espora de reposo que produce una frústula modificada, poseen la masa del citoplasma granular contraída dentro de una frústula no-modificada, manteniendo su mecanismo fotosintético viable, lo cual les permite retomar el crecimiento en condiciones ambientales adecuadas (Smayda y Mitchell-Innes, 1974; Anderson, 1975; Hargraves y French, 1983).

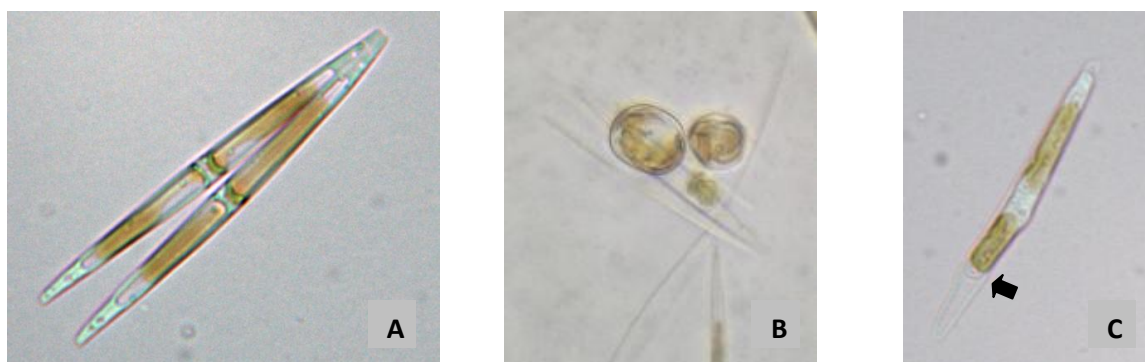


Figura 3. Crecimiento vegetativo y reproducción sexual en *Pseudo-nitzschia australis*. A) División de una célula vegetativa. B) Cigotos obtenidos después de la fusión de gametos. C) Auxosporulación, célula inicial (flecha) más corta que la auxospora formada.

I.3. Biosíntesis del ácido domoico (AD)

La ruta biosintética del ácido domoico, la cual se elucidó con ^{13}C -acetato como molécula trazable, comprende una vía de ensamble del anillo de prolina (Fig. 4A). Este anillo es el resultado de la condensación de un análogo del ácido glutámico derivado del ácido cítrico y una unidad de geranil pirofosfato (GPP) derivada del ácido mevalónico, el cual forma al precursor del ácido domoico, cuya subsecuente ciclización genera el ácido domoico. Sin embargo, la baja incorporación de acetato en la unidad de geranil, sugiere que los bloques de construcción de acetato utilizado para la síntesis de mevalonato provienen de otras rutas metabólicas (Fig. 4B) (Douglas et al. 1992; Subba-Rao et al. 1998; Kalaitzis et al. 2010).

La síntesis de AD requiere nitrógeno y una cantidad importante de energía representada por el consumo de ATP y NADPH. Por lo tanto, los factores que reducen la incorporación y/o asimilación de nitrógeno afectan su síntesis (Bates, 1998; Bates et al. 2000). Asimismo, la irradiancia afecta indirectamente la producción de AD ya que la asimilación de nitrógeno depende en gran manera del trabajo fotosintético (Cochlan et al. 2008). Por lo tanto se ha sugerido que la clorofila a (Chl *a*), responsable de la captura de energía para el trabajo fotosintético es esencial para la producción de AD (Bates et al. 1991; Pan et al. 1998), y que existe un acople entre la actividad fotosintética y la producción de esta toxina (Bates et al. 1991).

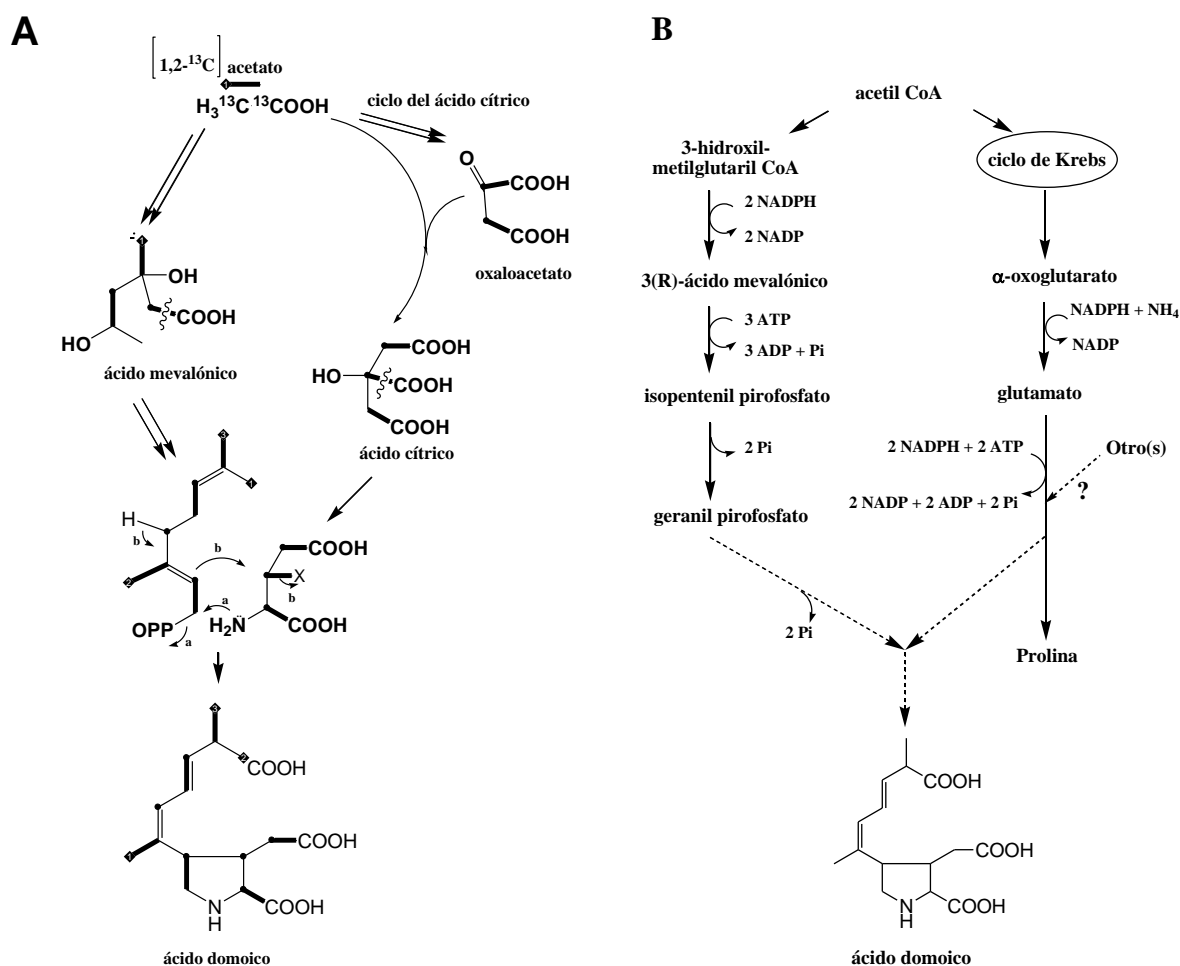


Figura 4. Ruta biosintética propuesta para el ácido domoico, basada en experimentos de incorporación de ¹³C-acetato (Douglas et al. 1992; Subba Rao et al. 1998; Kalaitzis et al. 2010).

I.4. Toxicidad de especies del género *Pseudo-nitzschia*

Se han reconocido hasta ahora a 12 especies del género *Pseudo-nitzschia* como productoras de AD: *P. australis*, *P. seriata*, *P. multiseriata*, *P. pungens*, *P. cuspidata*, *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. turgidula*, *P. galaxiae*, y *P. multistriata* (Bates, 2000; Bates y Trainer 2006; Møeststrup y Lundholm 2007).

Los niveles celulares de AD de las diferentes especies medidos tanto en campo como en laboratorio son muy variables y difieren entre ellos (Anexo II). De las diferentes especies tóxicas, se ha considerado a *P. australis* como la especie con mayor potencial tóxico por su alto contenido celular de AD. Por lo tanto, los niveles más altos de esta toxina en el ambiente ($3.8-12.7 \mu\text{g L}^{-1}$ ó $78-117 \text{ pg cel}^{-1}$) han estado asociados a la presencia de esta especie en las costas de California, E.U.A. (Scholin et al. 2000; Trainer et al. 2000; Schnetzer et al. 2007). Asimismo, *P. cuspidata* ha sido reconocida recientemente (Trainer et al. 2009a, 2009b) como una especie con alto potencial tóxico al alcanzar altas densidades durante florecimientos y producir niveles importantes de AD ($63-80 \text{ pg cel}^{-1}$). *P. multiseriata* y *P. pungens* son consideradas de moderada a altamente tóxicas, aunque ésta última especie no siempre produce AD (Bates et al. 1998; Aifeng et al. 2005). El contenido celular de AD en *P. multiseriata* se ha reportado entre 6 y $32 \text{ pg AD cel}^{-1}$ (Waltz et al. 1994; Trainer et al. 2000), en tanto que *P. pungens* exhibe diferente capacidad para producir esta toxina de acuerdo al área geográfica de procedencia (Rhodes et al. 1996; Vrieling et al. 1996; Bates et al. 1998; Trainer et al. 2000). Especies como *P. pseudodelicatissima*, *P. turgidula*, producen menos de la décima parte ($0.7-4.6 \text{ pg cel}^{-1}$) del nivel de AD registrado para *P. australis* (Rhodes et al. 1996; Rhodes, 1998; Bates, 2000; Trainer et al. 2002; Marchetti et al. 2004). Por otra parte se han aislado clones tóxicos y no-tóxicos de *P. calliantha* (Martin et al. 1990; Lundholm et al. 2003).

La capacidad de producir AD entre especies y cepas es difícil de comparar en cultivo, debido a las diferentes condiciones de crecimiento de las mismas y a que la concentración celular de AD es evaluada durante diferentes fases de crecimiento (Bates et al. 1989; Cusack et al. 2002). Asimismo, se ha observado que la producción de AD en algunas especies de *Pseudo-nitzschia* se pierde en células mantenidas durante periodos

prolongados en cultivo (Baugh et al. 2006; Schnetzer et al. 2007). Se ha propuesto que la pérdida de la capacidad de producción de AD esta relaciona con la disminución en el tamaño celular (Bates et al. 1999).

I.5. Factores que afectan el crecimiento y producción de AD en especies del género *Pseudo-nitzschia*

Los factores ambientales y las condiciones fisiológicas que promueven la producción de AD en especies del género *Pseudo-nitzschia* no se conocen en su totalidad (Horner et al. 1997; Bates et al. 1998; Maldonado et al. 2002; Kudela et al. 2004a; Lundholm et al. 2004). Por ejemplo, existe evidencia de que la producción de AD está asociada a un estrés fisiológico, ya sea por limitación en la disponibilidad de macronutrientes (Bates et al. 1991; Pan et al. 1996a, 1996b) y/o micronutrientes (Rue y Bruland 2001; Maldonado et al. 2002; Wells et al. 2005), la forma de nitrógeno disponible para crecimiento (Bates et al. 1993; Armstrong-Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008) y pH elevado (Lundholm et al. 2004). Asimismo, temperaturas e irradiancias estresantes afectan la producción de AD, directamente por impacto en la ruta metabólica de síntesis de este metabolito, o indirectamente por regulación de las tasas de división celular (Pan et al. 1998; Cochlan et al. 2008). Una concentración alta de silicatos en el ambiente parece ser un factor importante que permite el crecimiento y producción de AD en especies de *Pseudo-nitzschia* (Hutchins y Bruland, 1998). Asimismo en cultivos se ha observado que concentraciones no limitantes de nitrógeno son un pre-requisito para el crecimiento celular y producción de la toxina (Bates, 1998; Bates et al. 1991; Kudela et al. 2004a, 2004b). Sin embargo, parece ser que la razón de estos dos micronutrientes en lugar de su concentración absoluta es más importante sobre el crecimiento y producción de AD en *P. australis*, *P. multiseriata*, *P. pungens* y *P. cuspidata* (Trainer et al. 2000, 2009; García-Mendoza et al. 2009). Específicamente estas especies se acumulan en el ambiente cuando existe una razón alta de silicatos a nitratos (García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). De manera contraria, las especies de *Pseudo-nitzschia* del grupo *delicatissima* (ligeramente silificadas), presentan una ventaja aparente en su crecimiento con otras diatomeas cuando

existe una razón baja de silicatos a nitratos (Parsons et al. 2002; Cusak et al. 2004; Kaczmarek et al. 2007; Quijano-Scheggia et al. 2008).

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* pueden utilizar fuentes de N tanto orgánicas como inorgánicas (Dortch, 1990; Cochlan et al. 2008); sin embargo, las tasas de incorporación dependen del estado fisiológico de las células (Eppley et al. 1977; McCarthy, 1972). Se ha generalizado que el amonio es asimilado más fácilmente que el nitrato (McCarthy et al. 1977; Syrett, 1981). Las diatomeas en particular, incorporan grandes cantidades de nitrato en condiciones de alta luz, y en condiciones de temperatura baja (Dortch et al. 1979; Collos, 1980, 1982; Lomas y Glibert, 1999). La urea es considerada como la mejor fuente de nitrógeno para diversas especies de fitoplancton, sin embargo en el laboratorio el crecimiento de diatomeas no mejora con este nutriente (Glibert et al. 2006, 2008).

Al igual que los macronutrientes la disponibilidad de hierro puede afectar el crecimiento de especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* (Hutchins y Bruland 1998; Wells et al. 2005). Durante experimentos de enriquecimiento por hierro en el océano se ha observado la proliferación de especies de *Pseudo-nitzschia*, llegando a dominar la comunidad y representar una proporción importante de la biomasa fitoplanctónica (Assmy et al. 2007; Marchetti et al. 2008), sin embargo, ninguno de los aislados de estos experimentos produjo ácido domoico (Marchetti et al. 2008). Por otra parte, Trainer et al. (2009b) encontraron una mayor concentración de AD en zonas con una baja disponibilidad de Fe disuelto, lo que sugiere que este metal puede tener un control sobre los niveles celulares de AD. El probable efecto del Fe sobre la producción de AD también se ha observado en cultivos. En la fase exponencial de crecimiento de *P. australis*, *P. multiseriata* y *P. fraudulenta*, en células limitadas por disponibilidad de hierro o estresadas con cobre se documentó un aumento en la concentración de AD disuelto y disminución del AD celular, lo que ha llevado a hipotetizar que la excreción de esta toxina sirve para acomplejar metales traza y facilitar su transporte hacia la célula (Maldonado et al. 2002; Wells et al. 2005). Sin embargo, las constantes de enlace del AD a hierro y a cobre son demasiado bajas para competir efectivamente con otros ligandos en el ambiente (Rue y Bruland, 2001).

Por otro lado, se ha propuesto que las bacterias juegan un papel importante, pero no esencial en la producción de AD, por lo que se ha sugerido que la incorporación de precursores bacterianos por *Pseudo-nitzschia* promueve la producción de AD (Douglas y Bates 1992; Osada y Stewart, 1997; Stewart et al. 1997; Bates et al. 2004; Kaczmarska et al. 2005; Hagström et al. 2007). Asimismo, Kobayashi et al. (2003), proponen que bacterias intracelulares están involucradas en la producción de AD en *P. multiseriis*.

La irradiancia puede afectar los niveles celulares de AD debido a que la energía fotosintética es requerida para la producción de AD (Bates et al. 1991). Por ejemplo, cultivos mantenidos a una alta irradiancia producen más AD (15 a 26 pg cel⁻¹) que cultivos expuestos a una baja irradiancia (0.98 a 7.0 pg cel⁻¹) (Lewis et al. 1993; Cusack et al. 2002). Asimismo, el periodo de exposición a luz puede afectar la producción de AD, por ejemplo cultivos de *P. australis* expuestos a luz constante no produjeron AD, mientras que sí se observó la producción de esta toxina en células expuestas a un ciclo de 12:12 h luz:oscuridad (Villac et al. 1993).

Se tiene la idea generalizada de que al finalizar la fase estacionaria de crecimiento, se reduce el contenido celular de AD y se incrementa la proporción de AD disuelto, ya que existe liberación de la toxina debido a defectos en la membrana celular ocasionados por deficiencias nutricionales (Bates et al. 1991; Pan et al. 1996a; Bates, 1998). Sin embargo, la liberación de AD se ha observado también en la fase inicial de crecimiento del cultivo cuando no hay limitación por nutrientes (Douglas y Bates, 1992; Bates et al. 1993; Osada y Stewart, 1997; Bates, 1998). Aunado a esto, el desfase entre la producción de AD y la división celular sugiere que la toxina se produce específicamente cuando las células no están en división (Bates y Richard, 1996). Se ha observado que cultivos de *P. multiseriis* limitados por Si o P, producen normalmente solo AD durante la fase estacionaria, una vez que la división celular ha cesado. Asimismo, la mayor producción de AD en *P. seriata* se presenta al final de la fase exponencial y principalmente durante la fase estacionaria (Subba Rao et al. 1990; Bates et al. 1991, 1993; Douglas y Bates, 1992; Lundholm et al. 1994, 2004; Pan et al. 1996a; Bates, 1998; Kotaki et al. 1999; Fehling et al. 2004; Marchetti et al. 2008; Thessen et al. 2009). Por otra parte, la producción de AD en *P. australis* se presenta al inicio y en casi toda la fase exponencial y no solamente durante la fase estacionaria

(Garrison et al. 1992; Cusack et al. 2002) al igual que en *P. pseudodelicatissima* (Pan et al. 2001) y *P. calliantha* (Besiktepe et al. 2008).

1.6. Fotosíntesis y su regulación en respuesta a variaciones en las condiciones ambientales

La fotosíntesis, es el proceso por el cual la luz capturada por organismos autótrofos es convertida en energía química y representa un proceso que es altamente regulado en respuesta a las condiciones ambientales (Allen, 1998; Biswal, 2005). Los organismos responden a los cambios ambientales mediante el ajuste de su aparato fotosintético, eficientizando, por un lado la captura de luz o protegiendo de esta cuando se encuentra en exceso. La plasticidad de los organismos fotosintéticos define su tolerancia hacia el estrés y contribuye a mantener una eficiencia fotosintética óptima y utilización de recursos en condiciones ambientales cambiantes. Diferentes factores de estrés pueden influenciar uno o más eventos asociados con el proceso fotosintético como captura de luz, conversión de energía, transporte de electrones, translocación de protones y fijación de carbono (Anderson et al. 1995).

La tasa de fotosíntesis está definida como la tasa de evolución de O_2 por las reacciones luminosas de la fotosíntesis o la tasa de fijación de CO_2 y/o HCO_3^- por las reacciones oscuras. La curva de respuesta fotosíntesis a diferentes irradiancias (P-E) refleja la condición fisiológica de los organismos fotosintéticos asociada a su aclimatación o características adaptativas en respuesta a factores externos. En su forma y magnitud se integran la biofísica, bioquímica y procesos metabólicos que regulan la fotosíntesis (Platt et al. 1977; Falkowski, 1992; Geider y Osborne, 1992; Falkowski y Raven, 1997). La relación P-E se obtiene al graficar la tasa fotosintética normalizada por un descriptor de biomasa (P^b) contra la irradiancia (E), y se caracteriza en una región limitada por luz, en la cual la fotosíntesis aumenta respecto al incremento en la irradiancia, una región saturada por luz, en la cual la fotosíntesis es máxima e independiente de la irradiancia y, una región de fotoinhibición, en la cual la fotosíntesis disminuye con el aumento en la irradiancia (Fig. 5) (Platt et al. 1977; MacIntyre et al. 2002).

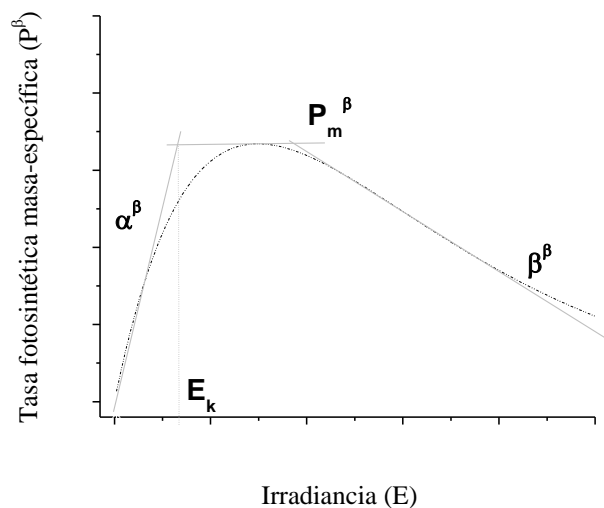


Figura 5. Curva de respuesta fotosíntesis-irradiancia (P-E). Donde α^β representa la pendiente de la región limitada por luz (α^β). P_m^β representa la tasa fotosintética máxima en luz saturante. E_k es el parámetro de saturación por luz ($E_k = P_m^\beta / \alpha^\beta$) y β^β describe la reducción de la tasa fotosintética a alta irradiancia.

Las microalgas utilizan diversos mecanismos fisiológicos en la regulación de la actividad fotosintética, para mantener el crecimiento en un amplio intervalo de irradiancias, temperaturas y nutrientes (Laws y Bannister, 1980).

Se ha reportado que la energía de la fotosíntesis es requerida directamente para la producción de AD en *Pseudo-nitzschia* (Pan et al. 1996c). Las especies del género *Pseudo-nitzschia*, presentan historias de vida típicas de otras diatomeas planctónicas, se pueden hallar tanto en la capa superior de la columna de agua, como a una profundidad donde se presentan irradiancias extremadamente bajas (Rines et al. 2002). Estas especies forman florecimientos tóxicos en tres de los principales sistemas de surgencias costeras (Corriente de California, Canaria y Benguela), por lo que deben de poseer mecanismos que les permita responder a un régimen fluctuante tanto de irradiancia como de nutrientes, ya que los eventos de florecimientos de fitoplancton en estos sistemas están asociados principalmente a ciclos de surgencia-relajación-hundimiento (Kudela et al. 2010).

I.7. Transporte y absorción del ácido domoico

La probabilidad ocurrencia de un evento de intoxicación depende, además de la presencia y acumulación de las toxinas en el medio ambiente, del flujo y acumulación de las mismas en diferentes niveles tróficos. Las ficotoxinas pueden acumularse y sufrir transformación en ciertos organismos que puede causar intoxicación a consumidores de niveles tróficos superiores (Mariën, 1996; Lefebvre et al. 1999, 2001; Costa y Garrido, 2004; Vigilant y Silver, 2007; Bargu et al. 2008; Goldstein et al. 2008). Aunque una pequeña fracción de aminoácidos puede pasar el tracto digestivo por simple difusión, la mayoría son transportados del intestino a la sangre por transportadores dependientes o independientes de sodio (Mailliard et al. 1995). El ácido domoico está relacionado al grupo de aminoácidos excitatorios para los cuales existe una familia de transportadores específicos de alta afinidad (EAAT; Seal y Amara, 1999). Se han identificado cinco miembros de la familia EAAT, de los cuales los EAAT1 a EAAT4 son altamente expresados en tejido del cerebro y tienen distintos patrones de distribución cada uno, el EAAT5 presenta el patrón más restringido de toda la familia, encontrándose solamente en el tejido retinal. Los transportadores EAAT1 y EAAT3 son expresados fuera del cerebro y este último es el más ampliamente distribuido entre diferentes tejidos (duodeno, yeyuno, íleo, corazón, hígado o pulmón) por lo que se piensa que es el responsable del abastecimiento de aminoácidos aniónicos para procesos metabólicos celulares generales (Seal y Amara, 1999; Danbolt, 2001).

La presencia de aminoácidos en la sangre depende, al menos parcialmente, de la tasa de absorción de estos compuestos en el intestino. El sistema de transporte intestinal de aminoácidos es capaz de adaptarse a cambios en los niveles de aminoácidos dietarios, asimismo las interacciones entre diferentes aminoácidos pueden interferir con la absorción de alguno de estos individualmente (Maenz et al. 1993). Por lo tanto, se ha sugerido que los diferentes mecanismos de absorción celular *in vivo* afectan el transporte de ciertos aminoácidos hacia la sangre, afectando su acción como excitotoxinas (Mayer y Westbrook, 1987).

I.8. Antecedentes

I.8.1. Importancia del ASP en el Sistema de la Corriente de California

Existe un número extenso de reportes de la presencia de especies con potencial tóxico del género *Pseudo-nitzschia* en aguas costeras alrededor del mundo. Después del primer registro de envenenamiento por ácido domoico detectado en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, la toxina ha sido relacionada con varios eventos tóxicos en la costa Oeste de Estados Unidos entre Washington y el Sur de California (Bates et al. 1989; Wright et al. 1989; Fritz et al. 1992; Scholin et al. 2000; Trainer et al. 2000; Anderson et al. 2006; Busse et al. 2006; Schnetzer et al. 2007). Debido a su frecuencia y magnitud, se ha reconocido al envenenamiento por AD como uno de los principales síndromes tóxicos causados por microalgas en el Sistema de la Corriente de California (GEOHAB, 2005). La ausencia de barreras geográficas importantes que afecten el flujo de la Corriente de California de norte a sur, y la tendencia de aparición de eventos tóxicos (norte a sur en la costa oeste de USA) sugiere que especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* se encuentren o se dispersen en tiempo en toda la parte sur de la Corriente de California.

Los registros de *Pseudo-nitzschia* en México incluyen especies con potencial tóxico como *P. australis*, *P. seriata*, *P. mutiseries*, *P. pungens*, *P. pseudodelicatissima* y *P. fraudulenta* (Hernández-Becerril, 1998; Hernández-Becerril y Díaz-Almeyda, 2006; Hernández-Becerril et al. 2007; Gárate-Lizárraga et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009; Barocio-Leon et al. 2008). Sin embargo, en la región Mexicana de la Corriente de California no existe ningún reporte de envenenamiento por ácido domoico, a pesar del registro de eventos de mortalidad masiva de aves y mamíferos marinos en la región. Solo se ha confirmado un evento de envenenamiento por ácido domoico en México, el cual ocurrió en la región de los Cabos, Baja California Sur (Sierra-Beltrán et al. 1997), en donde se documentó la muerte de aves marinas alimentadas con pescado contaminado por AD, pero no se identificó a la especie de *Pseudo-nitzschia* responsable de la producción de esta toxina. Por otro lado, solo dos trabajos en México reportan concentraciones de AD en el medio identificando la especie responsable. En la Bahía de La Paz Gárate-Lizárraga et al. (2007) identificaron a *P. fraudulenta* como productora del AD, y en la Bahía de Todos

Santos, Baja California, se identificó a *P. australis* como principal especie asociada a la presencia de AD en la zona (García-Mendoza et al. 2009).

I.8.2. *Pseudo-nitzschia australis*

Pseudo-nitzschia australis fue inicialmente identificada por Hasle (1972), como componente regular del fitoplancton en áreas del hemisferio sur (Chile, Perú, Argentina, Sudeste de África, y Nueva Zelanda), posteriormente se registro su presencia en la costa Oeste de E.U.A. (Buck et al. 1992; Horner y Postel, 1993; Villac et al. 1993), y en España, Irlanda y Escocia, en Europa (Míguez et al. 1996; Rhodes et al. 1996; McMahon y Silke 2000; Gallacher et al. 2001). *P. australis* ha sido responsable de la muerte masiva de aves (cormoranes y pelícanos) y mamíferos marinos (leones marinos) en las costas de California (Fritz et al. 1992; Scholin et al. 2000). Asimismo, se ha identificado como la fuente de AD en cultivos de mejillones y ostras en Nueva Zelanda, Escocia, Irlanda y España (Míguez et al. 1996; Rhodes et al. 1996; McMahon y Silke 2000; Gallacher et al. 2001).

A pesar de que *Pseudo-nitzschia australis* es considerada la principal especie productora de AD del género, existen relativamente pocos estudios en condiciones controladas que abordan las condiciones que favorecen su crecimiento y producción de toxinas. Se ha documentado que la producción de la toxina inicia durante la fase exponencial y aumenta en la fase estacionaria a una alta irradiancia (Garrison et al. 1992; Cusack et al. 2002). Asimismo, esta especie produce el ácido iso-domoico C, isómero con menor potencial neurotóxico (Rhodes et al. 2004; Holland et al. 2005). Se conoce que *P. australis* puede liberar AD al medio bajo condición de estrés por hierro o cobre, como un posible sistema de adquisición de estos compuestos para la célula (Maldonado et al. 2002; Wells et al. 2005). Además esta especie puede utilizar formas de nitrógeno orgánicas e inorgánicas, con preferencia por nitrato, pero con mayor producción de AD y tasas menores de crecimiento al utilizar urea (Armstrong-Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008). Por último, se ha documentado que la limitación del crecimiento por silicatos está asociada a una disminución del desempeño fotosintético, y se correlaciona con el incremento en la producción del AD medido en la fase estacionaria del cultivo (Kudela et al. 2004b).

I.9. Planteamiento del problema y estructura de la tesis

En la región norte de la Península de Baja California han existido casos no verificados de eventos de envenenamiento por ácido domoico que han causado la muerte de aves marinas, así como también varamientos y muerte de mamíferos marinos. Recientemente se confirmó la presencia de de AD y se identificó a *Pseudo-nitzschia australis* en material particulado (fracción retenida en filtros) de la columna de agua. Por lo tanto, se considera que en la región existe la probabilidad de ocurrencia de envenenamiento por ácido domoico (EAD) relacionado a florecimientos de diatomeas tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*. La falta de información de las especies con potencial tóxico que existen en la región, de las características de crecimiento asociado a factores ambientales específicos, así como el desconocimiento de los factores que influyen en la producción del AD limitan la evaluación del potencial de ocurrencia de EAD en la región. Por lo tanto el objetivo principal del presente trabajo es: Caracterizar el potencial tóxico de especies de *Pseudo-nitzschia* aisladas en la región de la Bahía de Todos Santos.

En latitudes más al norte de la región de la Bahía de Todos Santos existen eventos recurrentes de envenenamiento por AD causados por distintas especies de *Pseudo-nitzschia*. Específicamente, en la parte central y sur del Estado de California los eventos de intoxicación han sido causados por florecimientos tanto monoespecíficos como multiespecíficos donde *P. australis* y *P. multiseries* son las principales especies productoras de AD. En nuestra región, exceptuando a *P. australis* no se han identificado a otras especies tóxicas. Sin embargo, debido a que no existen barreras geográficas importantes que afecten el flujo de la Corriente de norte a sur se hipotetiza que en la región de la Bahía de Todos Santos se pueden encontrar además de *P. australis* a otras especies productoras de AD. Por consiguiente, en el capítulo II del presente trabajo se evaluó la capacidad de producción de AD de diferentes cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas de la región.

No se conoce cuál es la función fisiológica del ácido domoico. Se ha caracterizado como metabolito secundario ya que es producido bajo condiciones de estrés fisiológico inducido por condiciones sub-óptimas de crecimiento. Por lo tanto, se tiene el concepto

general que la producción máxima de AD se presenta en la fase estacionaria de cultivos estáticos de especies tóxicas o en la fase de decaimiento de un florecimiento algal. Considerando que la producción de AD está ligada a una condición fisiológica específica, en el capítulo III se investigó la relación entre la síntesis de ácido domoico y la actividad fotosintética de *P. australis*. Se evaluaron estas variables en diferentes días de crecimiento de cepas mantenidas en cultivos estacionarios a diferentes irradiancias y razones silicatos a nitratos (Si:NO₃). Esta aproximación se diseñó considerando que en este tipo de cultivos, la actividad fotosintética varía con el tiempo y depende de factores como intensidad de luz y disponibilidad de nutrientes.

Uno de los resultados importantes del capítulo III fue que la mayor producción de AD se detectó durante fase de acondicionamiento (lag) de los cultivos. Por lo tanto, considerando que la estrategia de supervivencia por alternancia entre un estado de rápido crecimiento (irradiación) y un estado de reposo (oscuridad) inducen una fase de aclimatación en el capítulo IV, se planteó la evaluación de la producción de AD y actividad fotosintética de cultivos de *P. australis*, como respuesta a la alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad, en ausencia y presencia de una fuente de nitrógeno orgánico, y su respuesta en comparación con la diatomea *Thalassiosira pseudonana*, durante el periodo de incubación en oscuridad.

Durante la presencia de florecimientos algales nocivos, la acumulación de AD en peces planctívoros puede impactar niveles tróficos superiores. En la región norte de Baja California, el cultivo de atún representa una actividad económica importante en la que se utiliza sardina (vector de la toxina) como alimento para el mantenimiento de los cultivos. Por lo el AD puede ser acumulado por los atunes y ser afectado al alimentarse de sardinas contaminadas. Sin embargo, no se ha reportado algún efecto negativo de esta toxina sobre los atunes, probablemente debido a que esta no es asimilada. Por lo tanto, en el capítulo V se evaluó la absorción del ácido domoico utilizando la técnica del saco intestinal invertido, lo cual nos permitió conocer si se presentaba la absorción de la toxina en el atún y si existe interferencia por la presencia de otros aminoácidos. Esto se contrastó con la absorción en el intestino de conejo, en el cual se ha reportado la presencia de transportador EAAT3 en

intestino y por lo tanto tiene la capacidad de absorber aminoácidos de tipo excitatorio como el AD.

Por último, el capítulo VI se presenta la integración de los resultados de los capítulos anteriores y se discute el estado del conocimiento de la fenomenología y ecotoxicología asociada a los florecimientos algales nocivos de especies de *Pseudo-nitzschia* productoras del ácido domoico.

I.9.1. Hipótesis general

Debido a la ausencia de barreras geográficas importantes que afecten el flujo de la corriente de California de Norte a Sur, en la región de la costa occidental de Baja California se pueden encontrar además de *Pseudo-nitzschia australis* otras especies productoras de AD, y las condiciones ambientales específicas afectarán la dinámica de crecimiento y producción de la toxina.

I.9.2. Objetivo general

Caracterizar el potencial tóxico de especies de *Pseudo-nitzschia* aisladas en la región de la Bahía de Todos Santos y en particular los factores ambientales que afectan el crecimiento y contenido de ácido domoico de *P. australis*.

1.9.3. Objetivos particulares

1. Identificar y evaluar la capacidad de producción de AD de diferentes cepas aisladas de la región de la Bahía de Todos Santos (Capítulo II).
2. Evaluar la relación entre síntesis de AD y actividad fotosintética de *P. australis*, en diferentes fases de crecimiento (Capítulo III).
3. Evaluar la producción de AD en respuesta a la alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad (Capítulo IV).
4. Evaluar la absorción del ácido domoico utilizando el modelo del saco intestinal invertido (Capítulo V).

Capítulo II

Identificación, crecimiento y capacidad de producción de ácido domoico de cepas del género *Pseudo-nitzschia* aisladas de la región de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México

II.1. Introducción

Pseudo-nitzschia es un género cosmopolita de diatomeas penadas presentes solo en ambientes marinos, compuesto de al menos 31 especies (Hasle, 1994; Hasle y Syvertsen, 1997; Lundholm et al. 2002, 2006), de las cuáles 12 producen ácido domoico (AD) (Bates, 2000; Bates y Trainer, 2006; Møestrup y Lundholm, 2007). El AD afecta tanto a humanos como a diferentes vertebrados marinos, ya sea por envenenamiento agudo o tóxicosis crónica ocasionada por exposición repetitiva durante largo plazo a niveles bajos de la toxina. El incremento en la frecuencia y magnitud de florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de AD a nivel mundial representa una amenaza a la salud y seguridad alimentaria (Mariën, 1996; Lefebvre et al. 1999, 2001; Costa et al. 2004; Vigilant et al. 2007; Bargu et al. 2008; Goldstein et al. 2008; Lefebvre y Robertson, 2010). Las especies con potencial tóxico que se han registrado en México, son *P. australis*, *P. seriata*, *P. mutiseries*, *P. pungens*, *P. pseudodelicatissima* y *P. fraudulenta* (Hernández-Becerril, 1998; Hernández-Becerril y Díaz-Almeyda, 2006; Hernández-Becerril et al. 2007; Gárate-Lizárraga et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009; Barocio-León et al. 2008). De estas, solo dos especies (*P. fraudulenta* y *P. australis*) se han asociado con la concentración de AD en el medio (Gárate-Lizárraga et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009; Cabrales-Talavera, 2010). El aislamiento e identificación de especies del género *Pseudo-nitzschia* presentes en la región de la Bahía Todos Santos, permitirá evaluar si tienen la capacidad de producción de la toxina en cultivo y conocer el riesgo que representaría la presencia de florecimientos de estas especies en la zona. Las especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* se presentan principalmente en aguas costeras, en donde la concentración de nutrientes debido a eutrofización o eventos de surgencias estimulan su acumulación en altas densidades (Trainer et al. 2008). A pesar de que los factores ambientales y las

condiciones fisiológicas que promueven la producción de AD en estas especies no se conoce en su totalidad (Horner et al. 1997; Bates et al. 1998), en la mayoría de eventos tóxicos, los macronutrientes (silicatos y nitratos) y micronutrientes (hierro y cobre) juegan un papel importante en el desarrollo del florecimiento y control de la producción de AD (Trainer et al. 2008). Gran parte de los eventos de envenenamiento han ocurrido en regiones templadas, a pesar de que la mayor parte de especies tóxicas o potencialmente tóxicas pueden ser halladas también en regiones tropicales y subtropicales (Trainer et al. 2008). Experimentos de laboratorio han mostrado que las condiciones fisiológicas específicas que conducen a la producción de AD pueden diferir entre especies y/o cepas de una misma especie (Bates et al. 1998; Maldonado et al. 2002; Kudela et al. 2004b; Lundholm et al. 2004). Existe una gran cantidad de relaciones causa-efecto bajo los cuales *Pseudo-nitzschia* se encuentra en altas densidades y produce AD tanto en campo como en estudios de laboratorio. De manera general, se considera que se requieren tres condiciones para producir AD: a) suspensión de división celular, b) disponibilidad de nitrato u otra fuente de nitrógeno durante la fase estacionaria y c) presencia de luz (Bates et al. 1991).

Los florecimientos de *P. australis* ocurridos en las costas de California y Baja California, se han registrado en temperaturas de alrededor de los 14°C (Buck et al. 1992; Lange et al. 1994; Walz et al. 1994; Trainer et al. 2000; Busse et al. 2006; Schnetzer et al. 2007; Barocio-León et al. 2008; García-Mendoza et al. 2009). A su vez, la presencia del ácido domoico en estos florecimientos, se ha asociado a relaciones molares de Si a N (Si:N) mayores a 1.5 y menores a 6 (Trainer et al. 2000; Anderson et al. 2006; García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). Estudios de laboratorio, han sugerido que la irradiancia y el fotoperiodo pueden ser factores importantes que contribuyen al control de la producción de AD en *P. australis*, y aunque existen discrepancia en el establecimiento de la fase de mayor producción de la toxina, numerosos estudios, han reportado que las células fisiológicamente estresadas producen más AD, cantidades importantes de la toxina se han presentado cuando la división celular se detiene o declina, relacionándose a una condición de estrés originada por limitación de nutrientes (Garrison et al. 1992; Villac et al. 1993; Cusack et al. 2002; Kudela et al. 2004b; Armstrong-Howard et al. 2007), y esto es evidente durante la fase de crecimiento estacionaria en células cultivadas en cultivos de

lote (Bates et al. 1991, 1993; Pan et al. 1996a; Fehling et al. 2004a; Lundholm et al. 2004; Thessen et al. 2009).

A la fecha no se conocen las condiciones de crecimiento óptimas de esta especie en cultivo. Por lo tanto, la evaluación del crecimiento de *P. australis* a diferentes temperaturas bajo dos relaciones molares de silicatos a nitratos, permitirá comprender mejor el comportamiento de la especie ante factores de importancia ambiental. En este experimento la cuantificación de AD en el cultivo se evaluó cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento.

II.2. Materiales y métodos

II.2.1. Aislamiento y cultivo de especies de *Pseudo-nitzschia*

Las especies de *Pseudo-nitzschia* fueron aisladas de muestras de fitoplancton colectadas en la Bahía Salsipuedes y Bahía Todos Santos, Ensenada, B.C. Se realizaron arrastres verticales hasta una profundidad máxima de 15 metros de profundidad con una red de 20 μm de apertura de malla. Las células de *Pseudo-nitzschia* spp. se aislaron bajo microscopio con pipetas capilares. Los especímenes aislados se cultivaron en microplacas de titulación utilizando el medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993) enriquecido en silicatos (250 μM). Una vez verificado el crecimiento de los organismos se realizaron varios pasos de escalamiento hasta obtener cultivos en matraces Erlenmeyer en volúmenes de 250 mL. Los cultivos fueron mantenidos a 14 °C y 95 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bajo un ciclo de 12 h luz:12 h oscuridad. La densidad celular se monitoreó diariamente y se tomaron muestras para el análisis de la toxina en la fase de crecimiento estacionaria.

El crecimiento fue descrito por el modelo de crecimiento de Gompertz [$\ln N/N_0 = a \exp(-\exp(b - ct))$] (Zwietering et al. 1990), donde $y = \ln(N/N_0)$ es la concentración celular a diferentes tiempos de crecimiento, N_0 es la concentración celular inicial, t es el tiempo y los parámetros a , b y c describen la forma de la curva. El ajuste de la concentración celular se realizó utilizando el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Origin

software, OriginLab Corporation, Northampton, MA, E.U.A.). El cálculo se realizó por triplicado.

II.2.2. Caracterización morfológica

Se caracterizó mediante microscopio óptico las dimensiones celulares y la formación de cadenas en muestras de cultivo sin fijar. Se realizó asimismo, la caracterización ultraestructural mediante microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5300, Japan Electron Optics Laboratory Co. Ltd., Tokyo, Japón) y microscopio electrónico de transmisión (Phillips 501). El material orgánico fue removido por oxidación después de la adición de una solución saturada de KMnO_4 y HCl (Tomas, 1997), para el análisis de microscopía electrónica. La identificación de las especies se realizó de acuerdo a los criterios descritos por Hasle y Syvertsen (1997) y Lundholm et al. (2006).

II.2.3. Identificación de especies mediante hibridación fluorescente *in situ* de células completas (FISH-WC)

Se realizó un análisis de FISH-WC, a células identificadas previamente como *P. australis* por medio de microscopía electrónica. Para esto, se siguió la metodología descrita por Scholin et al. (1996) y Miller y Scholin (1996). A 5 mL de solución fijadora salina (etanol 70%) se adicionaron 100 μL del cultivo en fase de crecimiento exponencial, incubando por 12 h a temperatura ambiente. Las células se filtraron utilizando filtros de policarbonato de 1.2 μm de tamaño de poro (Millipore), se lavaron utilizando 1 mL del amortiguador de hibridación (5x SET, 0.1% IGEPAL-CA630, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poly A) y se resuspendieron en 0.5 mL del mismo amortiguador. Posteriormente se adicionaron 2.5 μL de la sonda fluorescente correspondiente, control positivo (uni-C), control negativo (uni-R), específica de *P. australis* (auD1) (Tabla I) y sin sonda. La hibridación se realizó en oscuridad a 45 °C durante 1.5 h, eliminando el exceso por lavado con 1 mL del amortiguador de hibridación precalentado a 45 °C. Una vez removido el amortiguador, se adicionaron 20 μL del fluido de montaje y se cubrieron con un portaobjetos para su análisis en microscopio de epifluorescencia (Olympus U-MCB, Tokyo, Japón) a una excitación de 465-495 nm, y una emisión de 515-555 nm.

Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la técnica de FISH-WC.

Sonda^a	Secuencia (5'-3')^b
Control positivo (uni-C)	GWA TTA CCG CGG CKG CTG (W=T y A; K=T y G)
Control negativo (uni-R)	CAG CMG CCG CGG TAA TWC (M=C y A; W=T y A)
<i>P. australis</i> (auD1)	AAA TGA CTC ACT CCA CCA GG

^a Control positivo, secuencia universalmente conservada SSU

Control negativo, complemento de uni-C

^b Complemento de rRNA

II.2.4. Efecto de la temperatura y relación silicatos a nitratos en las características de crecimiento y contenido de AD en *P. australis*

Las cepas tóxicas de *P. australis* se mantuvieron a las condiciones de cultivo descritas anteriormente, modificando la relación de silicatos (250 μM) y nitratos (100 y 500 μM) del medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993). Posteriormente los cultivos se transfirieron a diferentes temperaturas (10, 12, 14, 15, 18 y 20 $^{\circ}\text{C}$) a una irradiancia de 200 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bajo el ciclo 12 h luz: 12 h oscuridad, previa aclimatación de aproximadamente 4 días. Se evaluó la densidad celular durante el cultivo y se analizó el contenido de la toxina (celular y disuelto) en la fase de crecimiento estacionaria.

La densidad celular se evaluó en alícuotas previamente fijadas con Lugol utilizando microscopio óptico y cámaras de Neubauer (0.1 mm de profundidad) o Fuchs Rosenthal (0.2 mm de profundidad) (Lobban et al. 1988). Una vez calculada la densidad celular, se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) como $\mu (\text{día}^{-1}) = \ln (Nt_2/Nt_1) / t_2 - t_1$. En donde Nt_2 y Nt_1 son abundancias celulares medidas al tiempo t_2 y t_1 respectivamente. Para comparación entre los diferentes tratamientos la tasa de crecimiento máximo (μ_{max}) se calculó del cambio en la abundancia de células durante la fase exponencial. Nt_2 fue la abundancia celular al final de la fase exponencial de crecimiento y Nt_1 fue la abundancia celular al inicio de la fase exponencial de crecimiento, $t_2 - t_1$ fue la duración de esta fase en cada condición de cultivo. El cálculo se realizó por triplicado.

II.2.5. Cuantificación de ácido domoico

La concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) se cuantificó de acuerdo a Quilliam (2003). Para cAD, 75 mL del cultivo se filtraron utilizando filtros GF/F (Whatman). Los filtros se colocaron en viales conteniendo 1 mL de metanol al 50% y la extracción celular de la toxina se realizó por disrupción mecánica (Mini-BeadBeater™, Biospec Inc., E.U.A.). El cAD se midió en el sobrenadante después de que las muestras fueron limpiadas con dos pasos de centrifugación (13000 x g, 10 min) y diluídas antes de su inyección en el sistema de HPLC. El ácido domoico disuelto (dAD) se midió en el filtrado y fue inyectado directamente en el sistema de HPLC. El AD fue cuantificado utilizando el método de derivatización con fluorenilmetoxicarbonil y HPLC-fluorescencia, de acuerdo a Quilliam (2003), con modificaciones en el protocolo.

La derivatización con fluorenilmetoxicarbonil (FMOC) se llevó a cabo al mezclar por 1 min 200 µL de muestra, 50 µL de amortiguador de borato (1M, pH 6.2) y 250 µL de FMOC-Cl (15 mM). Después se adicionaron 500 µL de acetato de etilo (Sigma, grado HPLC), se mezcló y se dejó reposar durante 1 min. Posteriormente se descartó la capa superior y se repitió el procedimiento dos veces más. Al finalizar se transfirió la capa inferior a un vial para su análisis. Se utilizó un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, CA, E.U.A.) equipado con detector de fluorescencia (G1321A). La longitud de onda de excitación fue de 264 nm y la de emisión de 313 nm. La separación se realizó con una columna Zorbax-eclipse XDB C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). El gradiente lineal de elución fue (%B, min): 30, 0; 70, 16; 100, 17; 100, 19; 30, 20. Para equilibrar la columna, la condición inicial (30% B) fue mantenida por 5 min entre inyecciones (20 µL) de las muestras. El solvente A fue ácido trifluoracético (TFA) al 0.1% en agua y el solvente B fue acetonitrilo con 0.1 % de TFA. Se utilizó AD comercial (Sigma-Aldrich Química S.A., Toluca, México) para la calibración del sistema. El factor de calibración se obtuvo a partir de una curva de calibración (0.5 - 1250 ng AD mL⁻¹) (Pocklington et al. 1990; Quilliam, 2003). El límite de detección (relación señal:ruido > 3) fue de 0.2 ng AD mL⁻¹.

II.2.6. Análisis de datos

Para evaluar la asociación entre variables se utilizó la correlación de rangos de Spearman y la correlación de Pearson. Los datos fueron transformados (Log) antes de aplicar el análisis de varianza (ANOVA), para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos. La asociación entre los tratamientos fue analizada utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1999). Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el programa Statistica (StatSoft Inc.).

II.3. Resultados

II.3.1. Aislamiento y cultivo

Se aislaron cinco cepas de *Pseudo-nitzschia* spp. Tres de ellas (denominadas D1, D2 y D3) se aislaron en muestras colectadas a 15 m de profundidad en la Bahía Salsipuedes en Noviembre del 2007. Otras dos cepas (BTS-1 y BTS-2) fueron aisladas en muestras de agua superficial (0-5 m) colectadas de Febrero a Marzo de 2008 en la Bahía Todos Santos, B.C.

Durante el crecimiento poblacional las cepas D1, D2 y D3 mostraron una fase de acondicionamiento de tres días, y crecimiento exponencial de 5 días en las cepas D1 y D3 y 12 días en la cepa D2, antes de alcanzar la fase estacionaria (Fig. 6A). A su vez, las cepas BTS-1 y BTS-2, presentaron una fase de acondicionamiento de 2 días, y fase de crecimiento exponencial de 4 días (Fig. 6B). Se observaron valores altos de densidad celular (2.24×10^6 a 3.63×10^6 cel mL⁻¹) y tasas de crecimiento (1.55 a 2.63 día⁻¹) para las cepas D1, D2 y D3, en relación con las cepas BTS-1 y BTS-2 quienes mostraron valores menores (48.7×10^3 a 54.2×10^3 cel mL⁻¹, 0.59 a 0.63 día⁻¹) (Fig. 6).

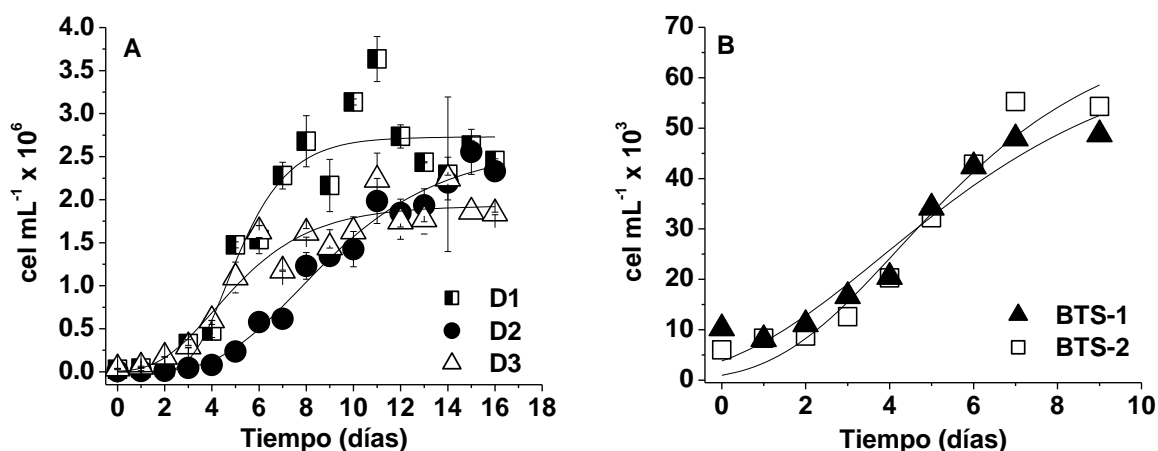


Figura 6. Crecimiento poblacional de cepas de *Pseudo-nitzschia* (D1, D2, D3, BTS-1 y BTS-2) aisladas de la Bahía de Todos Santos. Las células fueron cultivadas a 14 °C en medio L1 más 245 μM silicatos (Guillard y Hargraves, 1993), a 260 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz:12 h oscuridad. La línea representa un ajuste al modelo Gompertz, los símbolos son la media \pm desviación estándar ($n=3$).

II.3.2. Caracterización morfométrica

Las células de las cepas D1, D2 y D3 presentaron una longitud entre 33.5 y 47.2 μm y una amplitud de 2.6 a 2.9 μm (Tabla II). Estas células formaron cadenas escalonadas con traslapes celulares de 1/8 de su longitud. En el análisis de su ultraestructura (Figs. 7, 8, 9) se observó la presencia de un nódulo central, asimismo la presencia de 21 a 23 fíbulas y 36 a 40 estrías en 10 μm . Las células presentaron dos hileras de poroides con un patrón estructural hexagonal y ausencia de estos en la pared del canal del rafe. En el cingulo se observaron dos tipos de bandas abiertas bordeadas por un margen no perforado, la primera banda del cingulo presentó poroides grandes separados en diversos sectores perforados, en tanto que la segunda banda posee una sola línea de poroides dividido en pocos sectores. De acuerdo a las características descritas por Lundholm *et al.* (2006) las cepas D1, D2 y D3 se identificaron como *Pseudo-nitzschia decipiens*.

Tabla II. Caracteres morfológicos de las cepas D1, D2, y D3. El valor entre paréntesis representa la desviación estándar (n=60).

Estructura	D1	D2	D3	<i>P. decipiens</i> *
Longitud (μm)	33.5 (1.1)	47.2 (1.8)	37.6 (1.5)	28-64
Amplitud (μm)	2.9 (0.3)	2.6 (0.3)	2.7 (0.3)	1.4 - 2.5
Traslape celular	1/8	1/8	1/8	1/5 - 1/10
Nódulo central	+	+	+	+
Fíbulas en 10 μm	21	22	23	20-26
Estrías en 10 μm	40	36	37	41-46
Hileras de poroides	2	2	2	2
Poroides en 1 μm	8 - 10	8 - 10	8 - 10	9 - 13
Tipo de poroides	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Sectores del himen de poroides	Diversos	Diversos	Diversos	Diversos
Poroides en el rafe central	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

*Lundholm *et al.* (2006)

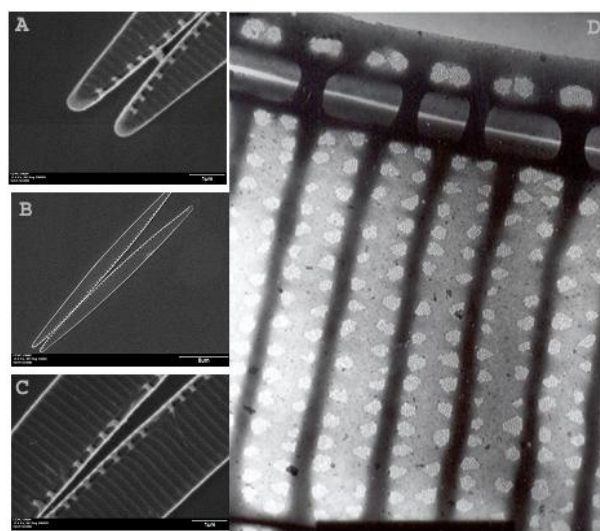


Figura 7. *Pseudo-nitzschia decipiens* (D1). Los paneles A, B y C muestran micrografías SEM de la punta de la valva (A); valva completa (B) y parte media de la valva mostrando el nódulo central (C). La micrografía TEM mostrada en el panel D, muestra parte de la valva donde se identifica el patrón hexagonal de perforación y estructura del manto proximal.

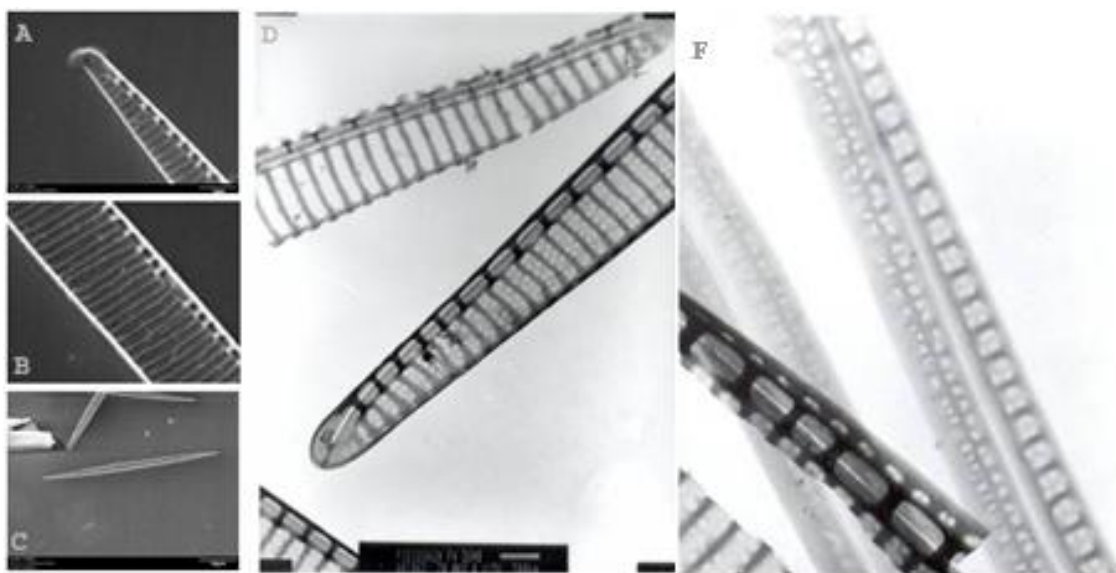


Figura 8. *Pseudo-nitzschia decipiens* (D2). Los paneles A, B y C muestran micrografías SEM de la punta de la valva (A); parte media de la valva mostrando el nódulo central (B) y valva completa (C). Las micrografías TEM mostradas en los paneles D y F, muestran la punta de la valva e hileras de poroides (D) y los detalles de la banda del cíngulo (F).

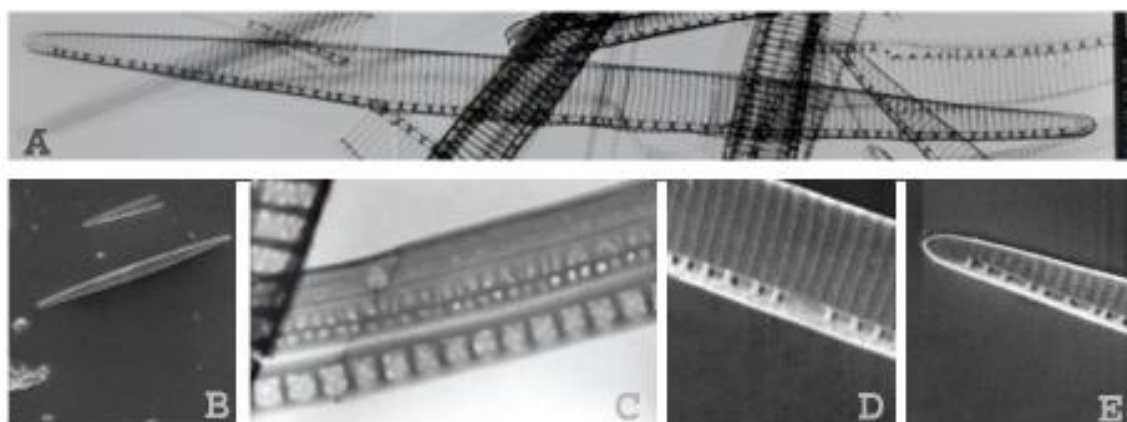


Figura 9. *Pseudo-nitzschia decipiens* (D3). Los paneles A y C muestran micrografías TEM de la valva completa (A) y los detalles de la banda del cíngulo (C). Los paneles B, D y E muestran micrografías SEM de la valva completa (B); parte media de la valva mostrando el nódulo central (D) y la punta de la valva (E).

Las cepas BTS-1 y BTS-2 presentaron una longitud celular de 64.16 a 70.41 μm y una amplitud entre 5.65 y 5.80 μm (Fig. 10, Tabla III). Las células formaron colonias escalonadas con traslapes celulares de 1/4 a 1/5 de su longitud (Fig. 10A), y también colonias en listón. No presentaron nódulo central, y se observaron de 14 a 15 fíbulas y de 15 a 16 estrías en 10 μm (Fig. 10D). Asimismo, se observaron dos hileras de poroides y la presencia de 4 poroides en 1 μm (Fig. 10D). Considerando las características descritas por Hasle y Syvertsen (1997), Hernández-Becerrill (1998) y Cusack et al. (2002), las cepas BTS-1 y BTS-2 se identificaron como *P. australis*. Con varios meses de cultivo se observaron deformaciones en las células como picos o prominencias similares a las descritas por Subba-Rao y Wohlgeschaffen (1990).

II.3.3. Identificación por hibridación fluorescente *in situ* de células completas (FISH-WC)

Los cultivos BTS-1 y BTS-2 identificados como *P. australis* por microscopia de barrido, se evaluaron también por la metodología de FISH-WC descrita por Miller y Scholin (1998). La sonda auD1, desarrollada para cepas de *P. australis*, aisladas en la región de la Bahía de Monterey (E.U.A.), resultó positiva para ambas cepas (Fig. 10). No se presentó señal con las sondas uni-R (control negativo) y sin sonda. En contraste se obtuvo un resultado positivo con la sonda universal para microalgas (uni-C), lo que indica la ausencia de interferencia no específica en el reconocimiento de *P. australis* por el marcador auD1.

II.3.4. Cuantificación de la toxina

Las mediciones de AD celular indicaron que las cepas D1, D2 y D3 no produjeron AD en la fase de crecimiento estacionaria bajo las condiciones de cultivo evaluadas. En contraste, las cepas BTS-1 y BTS-2 produjeron esta toxina, detectándose concentraciones entre 0.10 y 0.14 pg cAD cel^{-1} en diferentes fases del cultivo (Tabla IV). No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el contenido celular de AD entre las cepas BTS-1 y BTS-2.

Tabla III. Caracteres morfológicos de las cepas BTS-1 y BTS-2. Los valores entre paréntesis representa una desviación estándar (n=60).

Estructura	BTS-1	BTS-2	<i>P. australis</i> *
Longitud (μm)	70.41 (6.61)	64.16 (4.68)	63-144
Amplitud (μm)	5.65 (0.84)	5.80 (0.90)	4.6-10
Traslape celular	1/5	1/4	1/3-1/4
Nódulo central	ausente	ausente	ausente
Fíbulas en 10 μm	15	14	12-19
Estrías en 10 μm	16	15	12-19
Hileras de poroides	2	2	2
Poroides en 1 μm	4	4	3.5-6.0

* Hasle y Syvertsen 1997; Hernández-Becerrill 1998; Cusack et al. 2002.

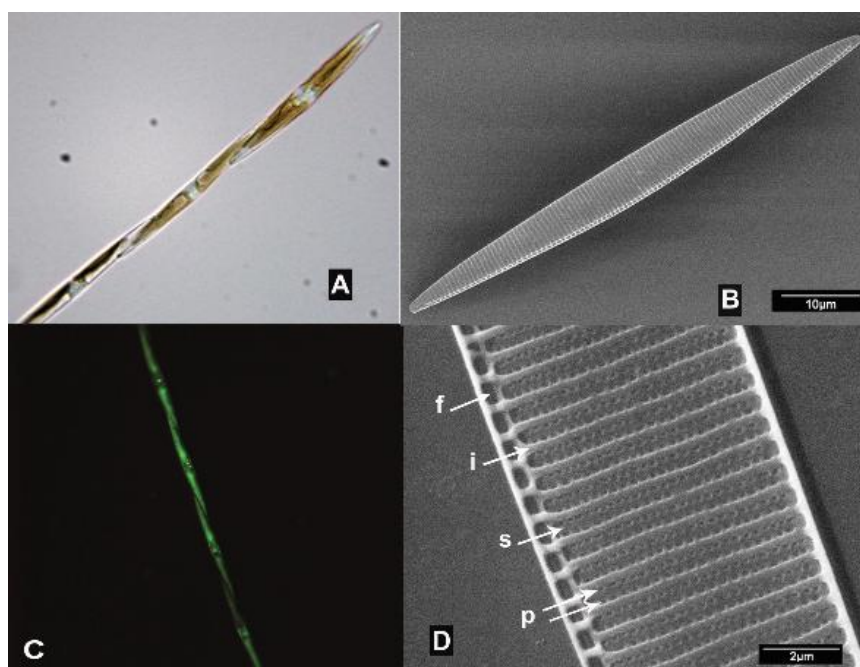


Figura 10. Caracteres morfológicos de *Pseudo-nitzschia australis*. Cadena de células en vista valvar a 400x mostrando el traslape celular (A). Los paneles B y D muestran micrografías SEM de la valva completa y parte media de la valva mostrando la ausencia del nódulo central, fíbulas (f), interestrías (i), estrías (s) y poroides (p). La micrografía de epifluorescencia de *P. australis* hibridizada con la sonda auD1 es mostrada en el panel C.

Tabla IV. Concentración de ácido domoico celular (cAD) y parámetros poblacionales de las cepas BTS-1 y BTS-2 en los días de muestreo. Las células fueron cultivadas a 14 °C en medio L1 más 245 μM silicatos (Guillard y Hargraves, 1993), a 260 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz :12 h oscuridad. Los valores entre paréntesis representan una desviación estándar (n=3).

Cepa	Tiempo de cultivo (Días)	Densidad celular (cel mL^{-1})	Tasa de crecimiento máxima (μ , día $^{-1}$)	pg cAD cel $^{-1}$
BTS-1	3	1.66×10^4 (4.40×10^3)	0.59	0.105 (0.02)
	6	4.23×10^4 (1.79×10^3)	0.31	0.116 (0.02)
	9	4.87×10^4 (0.24×10^3)	0.01	0.113 (0.20)
BTS-2	3	1.25×10^4 (2.26×10^3)	0.63	0.140 (0.006)
	6	4.28×10^4 (5.84×10^3)	0.38	0.117 (0.035)
	9	5.42×10^4 (5.57×10^3)	0.00	0.144 (0.050)

II.3.5. Efecto de la temperatura y relación silicatos a nitratos en las características de crecimiento y contenido de AD en células de *P. australis*

P. australis no mostró crecimiento a las temperaturas de 18 y 20 °C (Fig. 11). La degradación de los cloroplastos fue evidente en células mantenidas bajo estas condiciones. Hubo una reducción de este organelo después de que las células fueron transferidas a estas temperaturas y desapareció completamente entre los 2 y 6 días de cultivo. La tasa de crecimiento máxima (1.69 día^{-1}) se registró para la cepa BTS-2 cultivada a 15 °C (Fig. 11B). La cepa BTS-1 presentó una tasa de crecimiento de 0.32 día^{-1} a 10 °C y se incrementó hasta aproximadamente 1 día^{-1} en células mantenidas a 12, 14 y 15 °C (Fig. 11A). Para la cepa BTS-2, la tasa de crecimiento fue alta a 15 °C (1.69 día^{-1}). Con excepción de la alta tasa de crecimiento medida a 15 °C en células de la cepa BTS-2 cultivadas con una baja relación Si:NO₃, las tasas de crecimiento máximas fueron similares a 12, 14 y 15 °C entre las cepas BTS-1 y BTS-2 ($\rho > 0.05$; ANOVA-dos vías; Fig. 11A y B). La duración de la fase de crecimiento exponencial fue también diferente en las temperaturas evaluadas para BTS-1 ($\rho < 0.05$, ANOVA-dos vías). La fase de crecimiento

exponencial más larga (6 días) se observó en células de la cepa BTS-1 cultivadas a 14 °C, observándose una reducción en la duración de ésta a temperaturas menores y mayores (Fig. 11C). Esta tendencia también se observó para la cepa BTS-2. Sin embargo, en esta cepa la fase exponencial más larga se registró a 12 y 14 °C. No se observaron diferencias entre estas temperaturas (Fig. 11D). La temperatura óptima para la acumulación de biomasa (máxima abundancia celular) fue 14 °C para BTS-1 y 12 °C para BTS-2. Ambas cepas alcanzaron densidades celulares similares ($p > 0.05$; ANOVA - dos vías) a estas temperaturas (aproximadamente 76×10^3 cel mL⁻¹, Figs. 11E y F). Se observó una alta correlación entre el número de días de crecimiento exponencial y la acumulación de biomasa (Coeficiente de correlación de Pearson, $r = 0.90$; $p < 0.05$) para todas las condiciones de cultivo. En contraste, la correlación entre acumulación de biomasa y tasa de crecimiento máxima fue relativamente baja ($r = 0.20$; $p > 0.05$).

La concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) fue cuantificado después de que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 12). Los valores máximos de cAD (0.81 a 1.87 pg AD cel⁻¹) fueron detectados a 15 °C en ambas cepas, mientras que las concentraciones más bajas fueron medidas en células cultivadas a 14 °C (0.11 a 0.17 pg AD cel⁻¹) para la cepa BTS-1 y a 10 °C para la cepa BTS-2 (0.26 pg AD cel⁻¹). La concentración celular de AD fue relativamente baja a la temperatura donde se observó la máxima acumulación celular, 14 °C para BTS-1 y 12 °C para BTS-2. El ácido domoico en el medio (dAD) fue detectado en casi todas las condiciones de crecimiento para la cepa BTS-1, pero solo en células cultivadas a 15 °C para la cepa BTS-2. El valor máximo de dAD fue detectado en la cepa BTS-1 cultivada a 12 °C (1.16 pg AD cel⁻¹) y representó el 68% del total de AD detectado en esta condición de cultivo (Fig. 12). Para BTS-2, el valor máximo de dAD representó solo un 24% (0.13 pg AD cel⁻¹) del total de AD y fue medido en células cultivadas a 15 °C. Se observó una correlación significativa (Spearman's $r_s = 0.39$ y 0.62 , $p < 0.05$), entre el AD total y la temperatura, únicamente para la cepa BTS-2.

En cuanto a las relaciones de nutrientes evaluadas, no se observó un efecto claro de estas sobre las características de crecimiento de las cepas BTS-1 y BTS-2 (Fig. 11). Las

tasas de crecimiento máximo fueron similares en ambas cepas cultivadas a una relación Si:NO₃ de 0.5 o 2.5. La única diferencia observada fue que la densidad celular de la cepa BTS-1 cultivada a 14 °C en la relación Si:NO₃ 0.5 fue mayor que la cultivada en la relación Si:NO₃ 2.5 ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías). Tampoco se observó un efecto de la relación de nutrientes en la concentración de ácido domoico celular (cAD). Aunque, las células de la cepa BTS-2 cultivadas a 14 y 15 °C en la relación Si:NO₃ 0.5, presentaron una mayor concentración de cAD en comparación a las células crecidas con la relación Si:NO₃ 2.5, esta diferencia no fue observada a otras temperaturas. Para la cepa BTS-1 la concentración de cAD fue similar para ambas relaciones de nutrientes evaluadas a las diferentes temperaturas (Fig. 13). No existió correlación de cAD con las dos relaciones de nutrientes y las diferentes temperaturas evaluadas (Spearman's $r_s = -0.06$, $p > 0.05$).

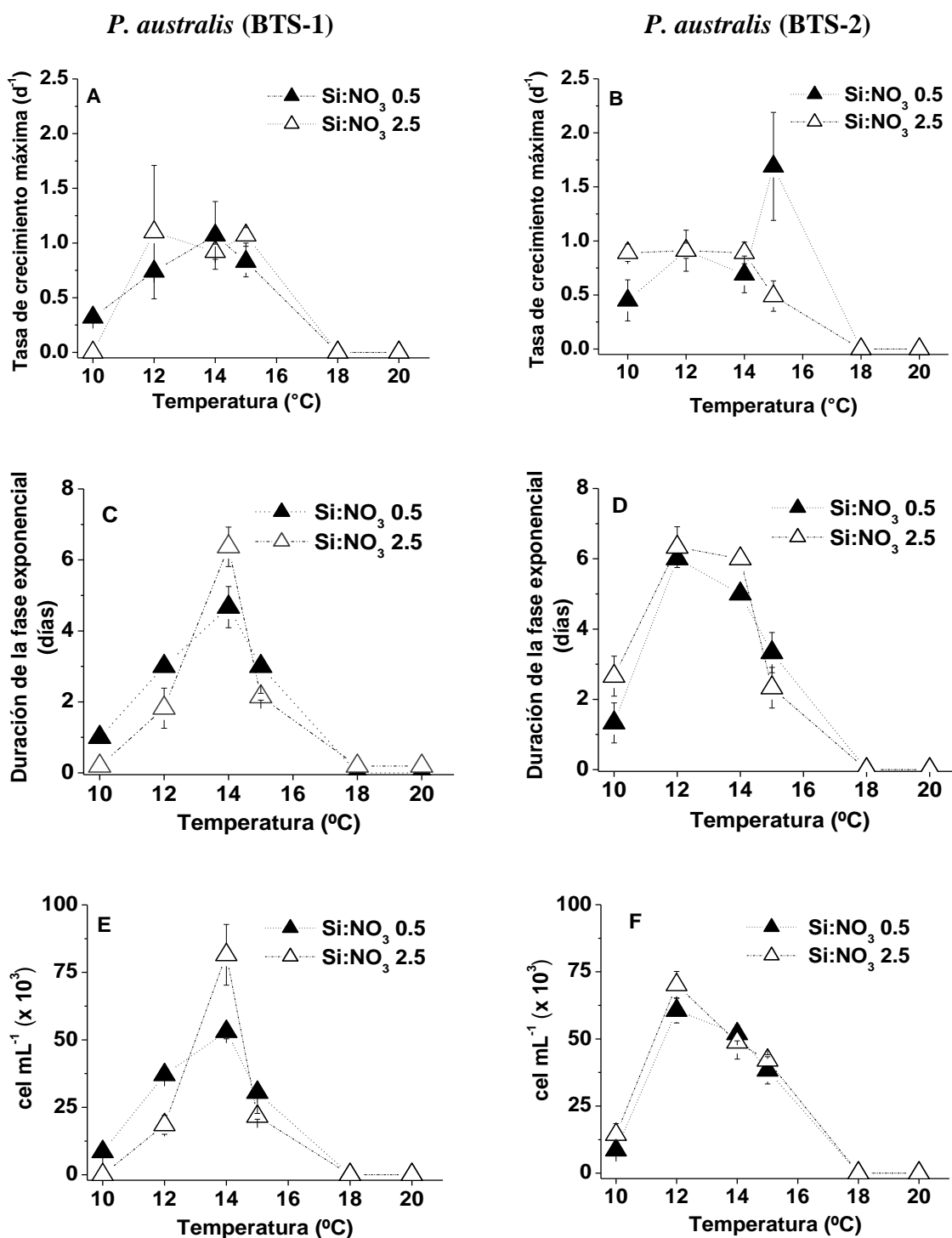


Figura 11. Tasa de crecimiento máximo (a, b), duración de la fase exponencial (c, d) y número de células (e, f) de *Pseudo-nitzschia australis* cultivada a diferentes temperaturas y dos razones de silicatos:nitratos. Los datos representan la media \pm desviación estándar ($n = 3$).

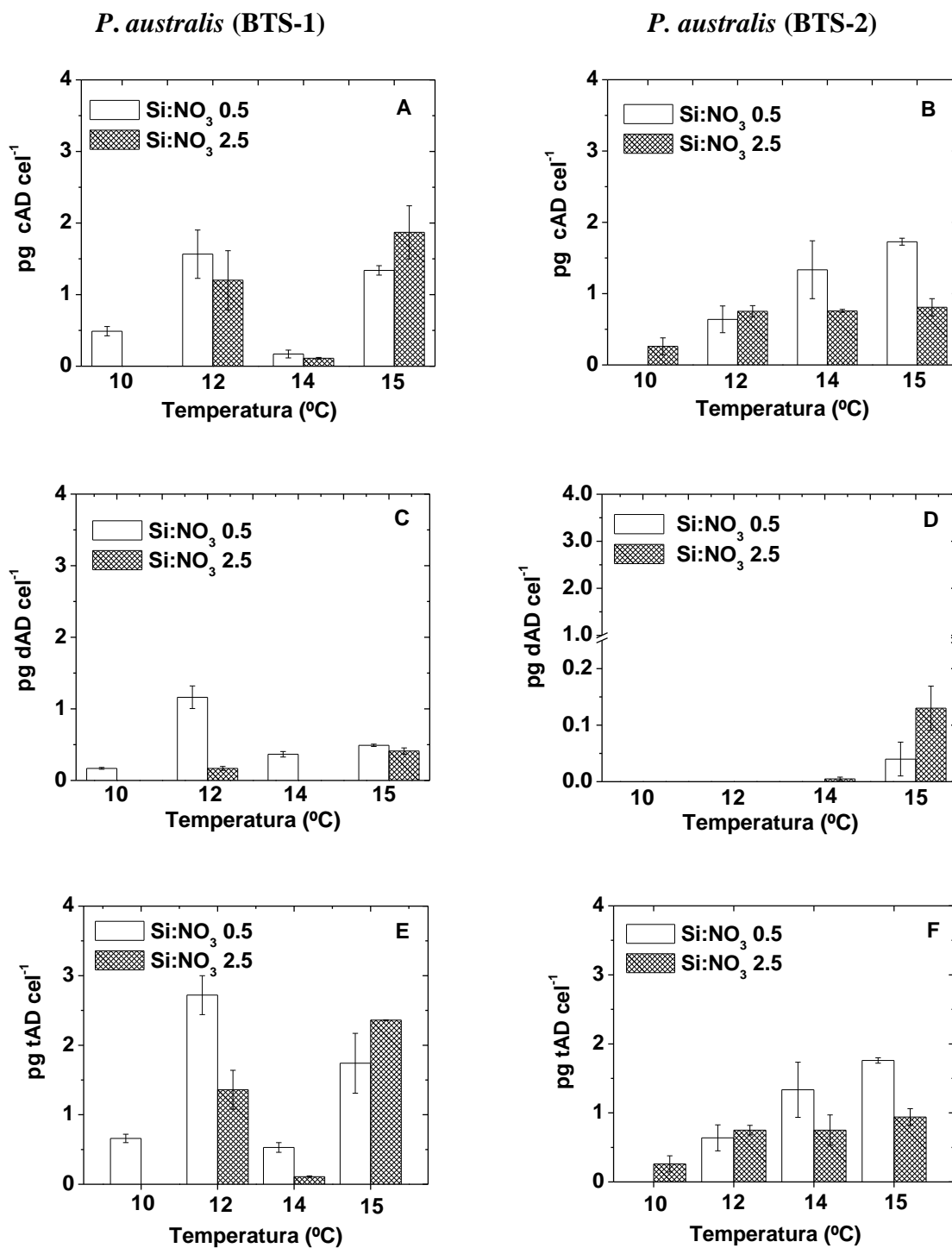


Figura 12. Concentración de ácido domoico celular (cAD) (a, b), disuelto (dAD) (c, d) y total (tAD) (e, f), en *Pseudo-nitzschia australis* cultivada a diferentes temperaturas y dos razones de silicatos:nitratos, durante la fase estacionaria. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n = 3).

II.4. Discusión y conclusión

Pseudo-nitzschia es uno de los géneros de diatomeas más comunes del fitoplancton marino. Este se encuentra en áreas polares, templadas, subtropicales y tropicales alrededor del mundo (Hasle, 1964, 1965, 1972; Kaczmarek et al. 1986; Fryxell et al. 1991). En México, los registros de especies de *Pseudo-nitzschia* incluyen a *P. australis*, *P. pungens*, *P. delicatissima*, *P. seriata*, *P. lineola*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. subfraudulenta*, *P. mutiseries* y *P. roundii* (Hernández-Becerril, 1998; Hernández-Becerril y Díaz-Almeyda, 2006; Hernández-Becerril et al. 2007; Gárate-Lizárraga et al. 2007; Barocio-León et al. 2008; García-Mendoza et al. 2009). En el presente estudio, los datos morfométricos de tres de las cepas de *Pseudo-nitzschia* aisladas (D1, D2 y D3) nos permitieron identificarlas como *P. decipiens*, una especie recientemente descrita y anteriormente clasificada dentro del complejo *P. delicatissima* (Lundholm et al. 2006). En la región, estudios previos habían registrado la presencia de *P. delicatissima* (Hernández-Becerril et al. 2007). Las dos cepas restantes (BTS-1, BTS-2) se clasificaron como *P. australis*. Sus caracteres morfológicos de longitud y amplitud fueron ligeramente menores a los descritos por Hasle y Syvertsen (1997), pero semejantes a los encontrados por Hernández-Becerril (1998), Cusack et al. (2002) y García-Mendoza et al. (2009) para cepas de la zona. Asimismo, ambas cepas dieron positivo a la hibridación fluorescente *in situ* en células completas (FISH-WC, Miller y Scholin, 1998) utilizando la sonda auD1, desarrollada para cepas de *P. australis* aisladas en la región de la Bahía de Monterey (E.U.A.).

Estudios previos han demostrado que las células de *Pseudo-nitzschia* spp. tienden a presentar deformaciones tanto en campo como después de periodos cortos en cultivo, lo cual dificulta su identificación con base a sus caracteres morfológicos (Subba-Rao y Wohlgeschaffen 1990; Subba Rao et al. 1991; Reap, 1991; Garrison et al. 1992; Hillebrand y Sommer 1996; Villac, 1996; Sommer, 1998). En el presente trabajo se utilizaron sondas moleculares, como una opción para eliminar errores en la identificación morfológica. Se observaron deformaciones en las especies aisladas después de dos meses de cultivo.

Son escasos los estudios del complejo *P. delicatissima* en cultivo. Fehling *et al.* (2005) observaron para *P. delicatissima* cultivada a 15°C, en medio f/2 más silicatos a 100 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bajo ciclos 9 h luz: 15 h oscuridad o 18 h luz: 6 h oscuridad, valores de densidad celular y tasas de división menores ($1.1\text{-}1.6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $0.49 - 0.89 \text{ día}^{-1}$) que los registrados para *P. decipiens* en el presente estudio ($2.2 - 3.6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ y $1.5 - 2.6 \text{ día}^{-1}$). En cuanto a *P. australis*, a pesar de su importancia como productor importante de AD son pocos los estudios que han evaluado su crecimiento en laboratorio. Se han reportado densidades celulares máximas de $6.3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ hasta $200 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ con tasas de crecimiento de 0.3 a 0.94 día^{-1} bajo diferentes condiciones de cultivo (Garrison *et al.* 1992; Cusack *et al.* 2002; Kudela *et al.* 2004b; Holland *et al.* 2005; Armstrong-Howard *et al.* 2007; Cochlan *et al.* 2008). Independientemente de la procedencia y condiciones de cultivo, la densidad celular máxima y tasas de crecimiento más altas ($48.7 \times 10^3 - 54.3 \times 10^3 \text{ cel mL}^{-1}$ y $0.59 - 0.63 \text{ día}^{-1}$) en la cepas de *P. australis* BTS-1 y BTS-2 se detectaron en un intervalo reducido de temperatura (12-15°C). Esto es consistente con las observaciones en campo de que en la parte sur del Sistema de la Corriente de California donde las abundancias mayores de *P. australis* se presentan cuando la temperatura del agua está entre 12 y 14 °C (Buck *et al.* 1992; Villac *et al.* 1993; Kudela *et al.* 2004a; Fehling *et al.* 2004b; Lange *et al.* 1994; Walz *et al.* 1994; Trainer *et al.* 2000; Busse *et al.* 2006; Schnetzer *et al.* 2007; Barocio-León *et al.* 2008; García-Mendoza *et al.* 2009). Probablemente, la distribución de *P. australis* en estas latitudes, está relacionada con la temperatura. Sin embargo, la características crecimiento a diferentes temperaturas reportado en este estudio puede ser un rasgo particular de las cepas de *P. australis* aisladas en la región. Otras cepas pueden tener diferentes preferencias de temperatura; por ejemplo, *P. australis* aislada de las costas de Nueva Zelanda puede crecer a temperaturas entre 17 y 19 °C (Rhodes, 1998; Holland *et al.* 2005).

La disponibilidad de nutrientes (silicatos y nitratos) es reconocida como un factor determinante para el crecimiento de comunidades naturales de *Pseudo-nitzschia*, sin embargo estudios de campo sugieren que la razón entre estos macronutrientes tiene una influencia mayor que su concentración absoluta en la formación de florecimientos de especies tóxicas (Trainer *et al.* 2000; Marchetti *et al.* 2004; Anderson *et al.* 2006; Schnetzer

et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). Los resultados del presente trabajo mostraron que el crecimiento y acumulación de biomasa a una temperatura específica es similar en las dos relaciones de nutrientes evaluadas, sugiriendo que la temperatura puede tener mayor influencia en la acumulación de biomasa que la condición de nutrientes (relación Si:NO₃) para cepas de *P. australis* aisladas en la región de la Bahía de Todos Santos.

De las diferentes especies del género *Pseudonitzschia* productoras de AD, se le ha atribuido a *P. australis* el mayor potencial tóxico (Walz et al. 1994). Las concentraciones celulares más altas de ácido domoico en muestras de campo se han detectado en *P. australis* (0.1-117 pg cel⁻¹) (Buck et al. 1992; Walz et al. 1994; Trainer et al. 2000; Scholin et al. 2000; Schnetzer et al. 2007), mientras que en cultivo los registros obtenidos tanto en la fase exponencial como estacionaria de crecimiento han sido menores (0.1 - 43 pg cel⁻¹) (Garrison et al. 1992; Cusack et al. 2002; Kudela et al. 2004b; Holland et al. 2005; Armstrong-Howard et al. 2007). En el presente estudio, la concentración de AD celular evaluado en la fase estacionaria (0.11 a 1.87 pg cel⁻¹), fue similar al reportado (0.15 a 2.0 pg cel⁻¹) para otras cepas cultivadas bajo condiciones diferentes (Villac et al. 1993; Rhodes, 1998; Campbell et al. 2001; Fehling et al. 2004b; Kudela et al. 2004b; Rhodes et al. 2004; Álvarez et al. 2009); pero inferior a lo reportado (12 a 37 pg cel⁻¹) por Garrison et al. (1992) y Cusack et al. (2002).

Aun cuando no se conoce con exactitud cuáles factores ambientales son los más importantes para la producción de ácido domoico, se ha reconocido que la limitación de crecimiento por disponibilidad de macronutrientes está asociada con un alto contenido de AD en algunas especies (Bates et al. 1991; Pan et al. 1996a; 1996b; Fehling et al. 2004a). En contraste, el efecto de la temperatura sobre la producción de esta toxina no es claro. En *P. multiseriata* se ha observado una relación directa entre la temperatura y el contenido de ácido domoico (Lewis et al. 1993); sin embargo, para *P. seriata* esta relación fue contraria (Lundholm et al. 1994), mientras que en *P. pseudodelicatissima*, el contenido de la toxina no se ve afectado por la temperatura (Lundholm et al. 1997).

Probablemente la producción de AD difiere durante el crecimiento poblacional y no está asociada únicamente a una condición en la cual no se presenta crecimiento, sino a una condición fisiológica particular de las células, influenciada por la combinación de varios factores.

Los resultados indican que la temperatura y diferentes razones de Si:NO₃ no afectaron el contenido de AD medido durante la fase estacionaria de crecimiento en cepas de *P. australis* aisladas del norte de Baja California, México. Por lo tanto, es importante evaluar la producción de la toxina en relación al estado fisiológico celular en las diferentes fases del crecimiento y bajo diferentes condiciones de cultivo.

Capítulo III

Producción de ácido domoico y fisiología fotosintética de *Pseudo-nitzschia australis* en diferentes estadios de crecimiento en cultivos estáticos.

III.1. Introducción

Desde el primer reporte de envenenamiento amnésico por moluscos en 1987 (Bates et al. 1988, 1989), se han identificado varias especies de diatomeas productoras de ácido domoico (AD). En su mayoría, éstas especies pertenecen al género *Pseudo-nitzschia*, ya que también se ha reportado la producción de AD en *Amphora coffeaeformis* y *Nitzschia navis-varingica* (Bates, 2000; Lundholm, 2011). Los factores ambientales y las condiciones fisiológicas que promueven el crecimiento y la producción de AD en especies del género *Pn* no se conocen en su totalidad (Bates et al. 1998; Pan et al. 1998; Kudela et al. 2004a).

El potencial tóxico mayor de las diatomeas productoras de AD se ha atribuido a *P. australis*, relacionándolo a su volumen celular (Garrison et al. 1992; Walz et al. 1994). Consecuentemente, la mayor concentración de AD en el ambiente ($12.7 \mu\text{g L}^{-1}$) ha sido asociada a la presencia de esta especie (Schnetzer et al. 2007; Caron et al. 2010). Se ha observado una alta variabilidad en el contenido celular de AD para esta especie en muestras de campo, registrándose concentraciones de 0.14 a 117 pg cel^{-1} (Buck et al. 1992; Scholin et al. 2000; Trainer et al. 2000; Anderson et al. 2006; Busse et al. 2006; Schnetzer et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009). En condiciones de cultivo la producción de AD se asocia a limitación del crecimiento por Si o P (Bates et al. 1991; Pan et al. 1996a, 1996b; Kudela et al. 2004b). Asimismo, se ha observado que diferentes fuentes de N (orgánicas e inorgánicas) afectan tanto el crecimiento como la producción de AD y específicamente, células cultivadas con urea presentan concentraciones inusualmente altas de la toxina en la fase exponencial que no pueden ser explicadas ni por una alta biomasa o tasas de crecimiento bajas (Armstrong-Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008). También se ha documentado que una baja disponibilidad de micronutrientes como hierro y cobre incrementan el AD disuelto y disminuyen el AD celular, lo que ha llevado a hipotetizar que

la excreción de esta toxina sirve para acomplejar metales traza y facilitar su transporte hacia la célula (Rue y Bruland, 2001; Maldonado et al. 2002; Wells et al. 2005).

Existe el consenso general de que la producción máxima de AD se presenta cuando el crecimiento poblacional disminuye o es nulo, principalmente durante la fase estacionaria de los cultivos y que el nivel de AD producido es mayor cuando existen condiciones estresantes de crecimiento (limitación). Los resultados del Capítulo I del presente trabajo difieren con estas observaciones, ya que condiciones de crecimiento cercanas a la óptima se asociaron a contenidos altos de AD durante la fase estacionaria. Por lo que en el presente capítulo se evaluó la relación entre la producción de ácido domoico y la fisiología fotosintética durante las diferentes fases de crecimiento poblacional bajo dos condiciones de irradiancia y dos relaciones de nutrientes.

III.2. Materiales y métodos

Para evaluar si *P. australis* acumula AD (cAD y dAD) en diferentes estados del cultivo y no solo durante la fase estacionaria de crecimiento, la cepa BTS-1 fue analizada a 14 °C y la concentración de la toxina fue medida durante el desarrollo del cultivo.

III.2.1. Condición experimental

P. australis (BTS-1) se cultivó a 14 ± 0.1 °C bajo cuatro condiciones experimentales diferentes. Las células fueron cultivadas en el medio L1 modificado en la concentración de silicatos (250 μM) y nitratos (100 y 500 μM) para obtener las relaciones Si:NO₃ 2.5 (alta) y 0.5 (baja). Los cultivos se mantuvieron a irradiancias de 30 (condición de baja luz, LL) y 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (condición de alta luz, HL) provistas con lámparas fluorescentes de luz de día, bajo un ciclo 12:12 h luz:oscuridad. Los inóculos utilizados en cada experimento se mantuvieron en las diferentes relaciones de nutrientes utilizadas, la aclimatación a la condición de irradiancia respectiva se realizó durante el escalamiento del cultivo, aproximadamente 15 días previos al experimento. La densidad celular se calculó diariamente mediante recuento al microscopio de alícuotas previamente fijadas con Lugol, utilizando la cámara de Fuchs-Rosenthal (Lobban et al. 1988).

El ajuste de los datos de concentración celular fue descrito por el modelo de crecimiento de Gompertz [$\ln N/N_0 = a \exp(-\exp(b-ct))$] (Zwietering et al. 1990), utilizando el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Origin software, OriginLab Corporation, Northampton, MA, E.U.A.). Donde, $y = \ln(N/N_0)$ representa la concentración celular a diferente tiempo de cultivo, N_0 representa la concentración celular inicial, t el tiempo y los parámetros a , b , y c describen la forma de la curva. Los cálculos se realizaron por triplicado.

III.2.2. Cuantificación de ácido domoico

La concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) se determinó de acuerdo a lo descrito en la sección II.2.5 de Materiales y métodos del Capítulo II del presente trabajo.

III.2.3. Actividad fotosintética (curvas P-E)

La fotosíntesis, como evolución de oxígeno, se midió a diversas irradiancias en células colectadas de las diferentes condiciones de cultivo. Alícuotas (60-200 mL) fueron retiradas de los cultivos y las células fueron concentradas por centrifugación (1500 x g, 7 min, 14°C). Después, las células se mantuvieron por 30 min en oscuridad antes de colocarlas en una cámara de incubación de 15 mL con temperatura controlada (Dubinsky et al. 1987) Para prevenir limitación por carbono, se adicionó NaHCO_3 a una concentración final de 2 mM. La respiración en oscuridad se midió como el consumo de oxígeno por 5 min antes de exponer a las células a la luz. La concentración de oxígeno se midió polarográficamente (YSI model 5331A, Yellow Spring Instruments, OH, E.U.A.). Las muestras se expusieron por 3 min a 12 diferentes irradiancias. La iluminación fue provista por una lámpara de halógeno, la temperatura (14 °C) en la cámara se mantuvo constante durante las mediciones de fotosíntesis-irradiancia (P-E), con un baño termocirculador. Los parámetros fotosintéticos fueron calculados por el ajuste de los datos a la función exponencial de Platt et al. (1980):

$$P^B = P_s^B \left[1 - \exp\left(\frac{-\alpha^B E}{P_s^B}\right) \right] \exp\left(\frac{-\beta^B E}{P_s^B}\right) \quad (1)$$

utilizando el algoritmo de de Marquardt-Levenberg (Origin software, OriginLab Corporation, Northampton, MA, E.U.A.). P^B ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) es la tasa de fotosíntesis normalizada por la concentración de clorofila a (Chl a) a una irradiancia E ; P_s^B ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) es la tasa de fotosíntesis máxima saturada por luz; α^B ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $^{-1}$ es la pendiente inicial de la relación P-E y β ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$) ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) $^{-1}$ describe el decremento en la fotosíntesis a irradiancias altas (parámetro de fotoinhibición). El parámetro de saturación por luz, E_k se calculó a partir de P_s^B y de α^B (P_s^B / α^B) derivados del ajuste de la curva.

III.2.4. Análisis de pigmentos

La separación y cuantificación de pigmentos se realizó de acuerdo a Van-Heukelem y Thomas (2001), con la modificación descrita por Colombo-Pallota et al. (2006). Se filtraron de 5 a 10 mL del cultivo en filtros de fibra de vidrio GF/F (Whatman) de 13 mm de diámetro, y se mantuvieron a una temperatura de -70 °C hasta su análisis. Los pigmentos fueron extraídos por disrupción mecánica (Mini-BeadBeater, Biospec Inc., E.U.A.) de los filtros con perlas de zirconia de 0.5 mm de diámetro en 1 mL de acetona al 100 % enfriada previamente. El proceso de extracción se realizó a 500 rpm en tres períodos de 10 s, con pasos intermedios de enfriamiento a -20 °C en oscuridad. La limpieza de las muestras se realizó por dos pasos de centrifugación (13,000 x g, 5 min, 4°C). Antes de la inyección el sistema cromatográfico, se añadió tetrabutil acetato de amonio (TBAA) a las muestras a una relación 3 a 1 (v:v).

El equipo utilizado fue un HPLC modelo Shimadzu de la serie AV-10 equipado con una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C-8 (150 mm x 4.6 diámetro interno, 3.5 μm de tamaño de partícula). La longitud de onda de detección fue de 436 nm. El gradiente de elución fue (%B,min): 5,0; 5,5; 95,22; 95, 27; 5,30. Para equilibrar la columna, la condición inicial (5% B) fue mantenida por 5 min entre inyecciones (20 μL) de las

muestras. Se utilizó como solvente A metanol:TBAAs 28 mM, (70:30, v/v), como solvente B metanol al 100%, con un flujo de 1 mL min^{-1} . Los análisis fueron realizados a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. La identificación de los pigmentos, se realizó por comparación del tiempo de retención (Tr) de cada pico con el Tr de estándares de pigmentos comerciales. El protocolo fue calibrado a partir de factores de calibración obtenidos de los siguientes estándares: Chl *a*, fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, violaxantina, zeaxantina y β -caroteno (DHI Inc., Hoersholm, Dinamarca).

III.2.5. Análisis de datos

Los datos fueron transformados (Log) antes de aplicar el análisis de varianza (ANOVA-dos vías), para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos. La asociación entre los tratamientos fue analizada utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1999). Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el programa Statistica (StatSoft Inc.).

III.3. Resultados

El cambio en la abundancia celular y tasas específicas de crecimiento de las células de *P. australis* (BTS1) durante el periodo de cultivo en condiciones diferentes de cultivo, se presentan en la figura 13. La acumulación de biomasa mayor ($160 \times 10^3\text{ cel mL}^{-1}$) se detectó en cultivos expuestos a la relación Si:NO₃ 0.5 a $200\text{ }\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (HL). Esta abundancia celular fue significativamente mayor ($p < 0.05$, ANOVA-dos vías) que la detectada en los cultivos mantenidos en la condición de baja irradiancia (LL; $30\text{ }\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) con la misma relación de nutrientes (Fig. 13A). En contraste, no se observó diferencia ($p > 0.05$, ANOVA-dos vías) en la acumulación de biomasa entre HL y LL con la relación 2.5 Si:NO₃ (Fig. 13B).

Las tasas de crecimiento no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$, ANOVA-dos vías) en las diferentes condiciones evaluadas, se observaron valores máximos (0.54 d^{-1}) después de la inoculación y un decremento gradual en los días siguientes (Figs. 13C y 13D).

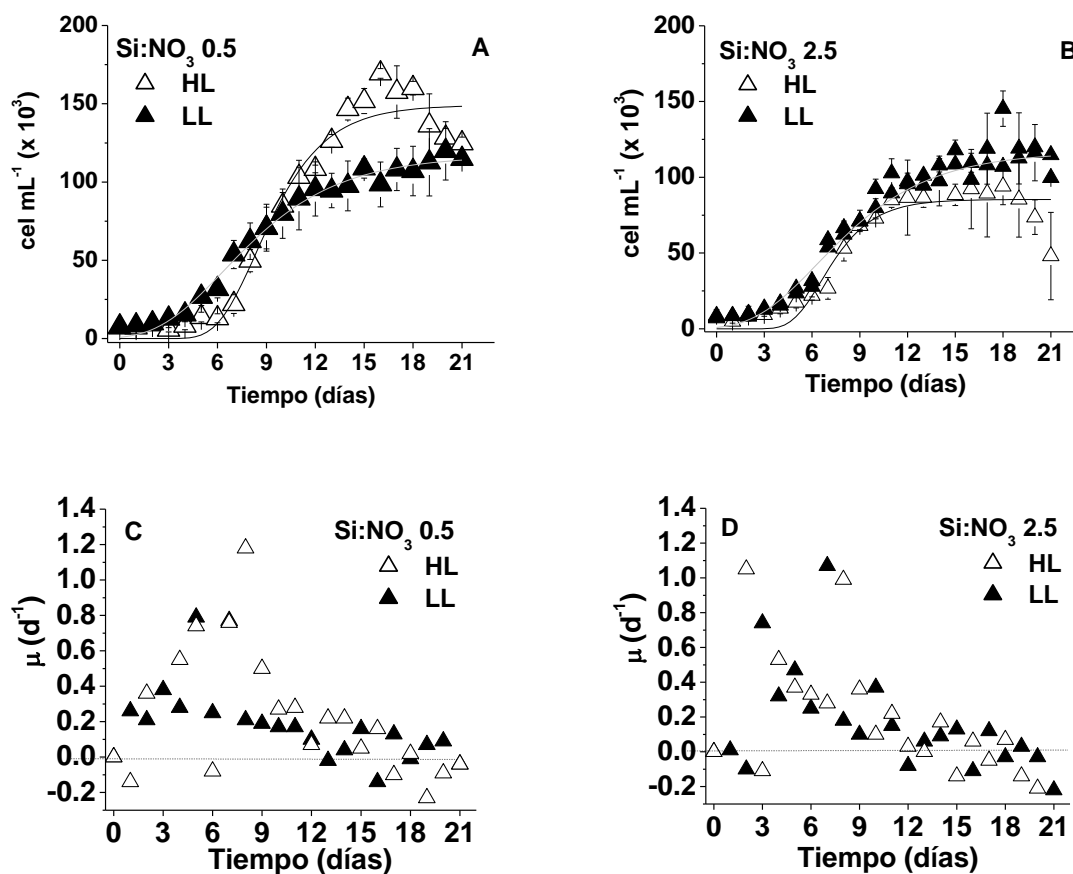


Figura 13. Cambios en la abundancia celular (A, B) y tasas específicas de crecimiento (C, D) de *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1) cultivada en dos relaciones Si:NO₃ a 200 μmol quanta m⁻² s⁻¹ (HL, símbolos vacíos) y 30 μmol quanta m⁻² s⁻¹ (LL, símbolos oscuros). Los símbolos representan la media ± desviación estándar de tres cultivos independientes.

El contenido de ácido domoico celular (cAD) se detectó en todos los puntos de muestreo durante el desarrollo de los cultivos (Fig. 14A y B). El valor mínimo de cAD fue de 0.5 pg cel⁻¹ y la concentración máxima de 3 pg cel⁻¹. En la mayoría de los días de muestreo (días 0, 9, 12, 15, 18 y 21 después de la inoculación) las células expuestas a una alta irradiancia presentaron mayor cAD (0.9 a 3.3 pg cel⁻¹) que las células creciendo a baja irradiancia (0.5 a 0.84 pg cel⁻¹) ($p < 0.05$, ANOVA-dos vías). También, la variación de cAD a través del desarrollo del cultivo fue diferente entre la condición de HL y LL. Independientemente de la relación de nutrientes utilizada, las células expuestas a la condición de LL presentaron

un alto contenido de AD (1.8 a 2.1 pg cel⁻¹) al inicio del periodo de cultivo (día 3 a 6) con una subsecuente reducción de la concentración de cAD. Las células expuestas a HL también presentaron un alto contenido de cAD al inicio del periodo de cultivo y una reducción en los siguientes días. Sin embargo, la concentración de cAD aumentó al finalizar el periodo de cultivo, alcanzando concentraciones de 2.9 y 3.3 pg cel⁻¹ en células cultivadas con la relación Si:NO₃ de 0.5 y 2.5, respectivamente (Figs. 14A y 15B). La concentración de ácido domoico disuelto (dAD) normalizado por la abundancia celular también varió con las condiciones de irradiancia. Se detectaron concentraciones mayores de dAD en cultivos expuestos a HL que a LL. El valor más alto (70.8 pg cel⁻¹) de dAD se detectó en cultivos expuestos a HL y relación 2.5 Si:NO₃ (Fig. 14D). En todas las condiciones de cultivo los valores más altos de dAD fueron detectados al tercer día después de la inoculación y disminuyeron abruptamente en los días siguientes (Figs. 14C y D).

La fisiología fotosintética de *P. australis* (BTS-1) se caracterizó durante el periodo de cultivo. Un ejemplo de la relación fotosíntesis-irradiancia medida en diferentes días del cultivo se presenta en la figura 15. En todos los tratamientos, la tasa fotosintética decrece a irradiancias superiores a 500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 15). Independientemente de la variable utilizada para la normalización (por concentración de clorofila *a* o por célula), la variación de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación P-E mostraron la siguiente tendencia: Al inicio del periodo de cultivo (Fase de acondicionamiento, del día 0 al tercer día), la tasa de fotosíntesis máxima (P_s^β) fue mayor ($p < 0.05$; ANOVA-dos vías) en células expuestas a LL que en HL (Figs. 16A y B, Tabla V). También al inicio del periodo de cultivo, los valores de eficiencia de utilización de luz (α^β) fueron mayores ($p < 0.05$; ANOVA-dos vías) en células expuestas a LL que en HL. P_s^β y α^β fueron más de tres veces mayores en células expuestas a LL que en HL durante los primeros días de cultivo. Después del día 6, P_s^β y α^β decrecieron en todas las condiciones de cultivo, excepto para las células mantenidas a LL en la relación 0.5 de Si:NO₃, perdiéndose la capacidad fotosintética al día 18 de cultivo (Fig. 16A y B). El parámetro de saturación por luz (E_k) fue mayor ($p < 0.05$; ANOVA-dos vías) en las células expuestas a HL que en LL al inicio del periodo de cultivo, independientemente de la relación de nutrientes utilizada (Fig. 16C, Tabla V).

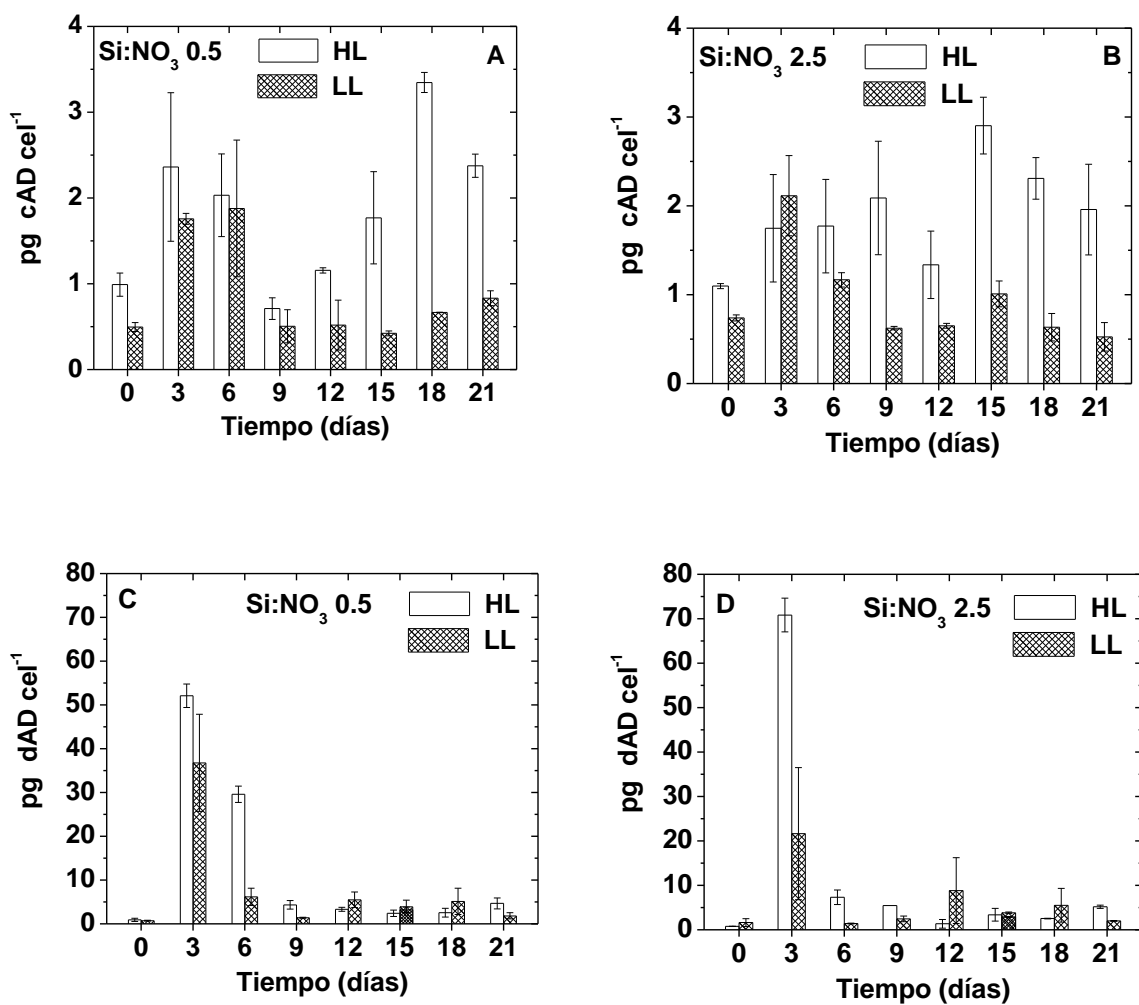


Figura 14. Cambios en la concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) durante el periodo de cultivo de *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1). Las condiciones de cultivo, son como las descritas en la figura 13. Se presenta la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

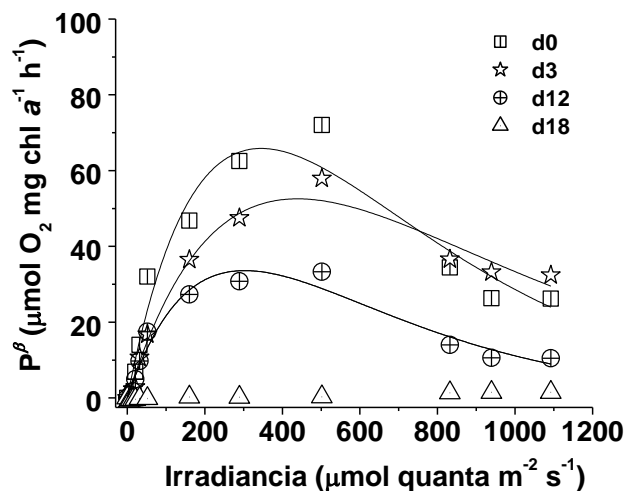


Figura 15. Relación fotosíntesis vs. irradiancia (P-E) en *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1) durante diferentes días de cultivo. Las células fueron cultivadas en la relación 2.5 de Si:NO₃ con una irradiancia de 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las líneas representan el ajuste al modelo de Platt et al. (1980).

El cambio de los pigmentos que tienen un papel importante en la aclimatación y fotoprotección se evaluó en las células expuestas a las diferentes condiciones de cultivo. La clorofila *a* (Chl *a*) fue similar entre las células cultivadas a LL y HL en la relación 0.5 Si:NO₃, los días 3, 6, 9 y 12 de cultivo (Fig. 17A). En contraste, en los días 0, 15 y 18 se observó diferencia significativa ($p < 0.05$; ANOVA-dos vías) entre las células cultivadas en LL y HL en ambas relaciones Si:NO₃. La concentración de Chl *a* fue mayor ($2.71 \text{ pg Chl } a \text{ cel}^{-1}$) en células cultivadas a LL en la relación 2.5 Si:NO₃, al inicio del periodo de cultivo y disminuyó al finalizar el cultivo. La concentración del pigmento accesorio fucoxantina no presentó una tendencia clara de variación durante el periodo de cultivo y no se observó diferencia entre la condición de HL y LL los días 3, 6, 9 y 12 de cultivo en ambas relaciones de nutrientes (Fig. 17B). No se detectó un cambio en la concentración del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (diadinoxantina + diatoxantina) en baja irradiancia (LL) y alta irradiancia (HL) en la relación 0.5 de Si:NO₃ durante casi todo el periodo de cultivo. Solamente se detectó un incremento de este conjunto al finalizar el cultivo (día 21) en las células cultivadas en la condición de HL y relación 2.5 de Si:NO₃ (Figs. 17C y D).

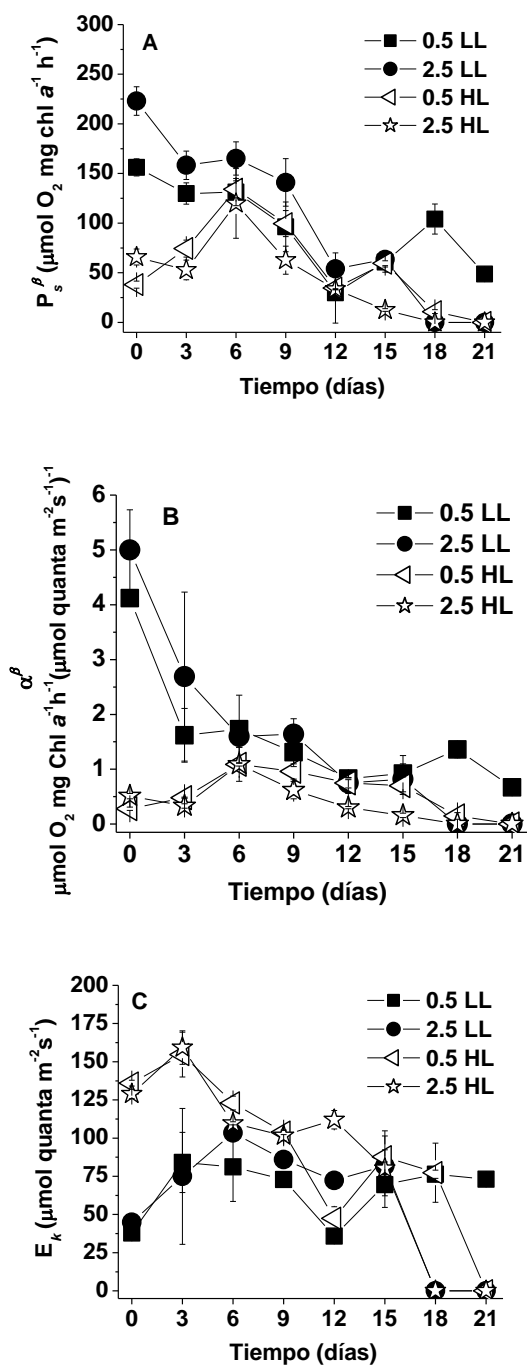


Figura 16. Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) durante el periodo de cultivo de *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1). La tasa fotosintética máxima (P_s^β) y la eficiencia de utilización de luz (α^β) normalizados a la concentración de clorofila *a* (Chl *a*), se presentan en el panel A y B, respectivamente. En el panel C se presenta el parámetro de saturación por luz (E_k). Las condiciones de cultivo son como las descritas en la figura 13.

Tabla V. Parámetros fotosintéticos estimados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) durante el periodo de cultivo de *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1). La tasa fotosintética máxima (P_s^β , $\mu\text{molO}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$), la eficiencia de utilización de luz y parámetro de fotoinhibición (α^β y β^β) ambos en $(\mu\text{molO}_2 \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1})(\mu\text{mol quanta } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$ están normalizados en base a la concentración de clorofila *a* (Chl *a*). E_k es el parámetro de saturación por luz ($\mu\text{mol quanta } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Los valores son la media (desviación estándar) de tres determinaciones.

Tratamiento	día	P_s^β	α^β	β^β	E_k
0.5 LL	0	156.12 (8.60)	4.12 (0.09)	0.12 (0.02)	37.87 (1.26)
	3	129.83 (10.7)	1.62 (0.49)	0.41 (0.22)	84.06 (19.7)
	6	131.31 (13.7)	1.73 (0.62)	0.40 (0.16)	81.19 (22.5)
	9	96.28 (25.1)	1.31 (0.26)	0.11 (0.03)	72.87 (4.79)
	12	29.76 (3.09)	0.83 (0.02)	0.03 (0.01)	35.81 (2.86)
	15	60.76 (10.1)	0.92 (0.33)	0.54 (0.44)	69.53 (14.9)
	18	104.11 (15.1)	1.36 (0.15)	0.12 (0.00)	76.35 (2.70)
	21	48.71 (5.53)	0.67 (0.11)	0.12 (0.00)	73.12 (3.80)
2.5 LL	0	223.00 (14.4)	5.00 (0.73)	0.17 (0.05)	44.96 (3.72)
	3	158.32 (14.3)	2.69 (1.54)	0.36 (0.27)	74.97 (44.4)
	6	165.14 (16.8)	1.60 (0.20)	0.36 (0.00)	103.42 (2.45)
	9	141.01 (24.0)	1.64 (0.28)	0.01 (0.00)	85.99 (0.05)
	12	53.99 (3.42)	0.75 (0.09)	0.11 (0.03)	72.32 (4.15)
	15	63.51 (7.74)	0.82 (0.28)	0.20 (0.08)	81.83 (19.6)
	18	ND	ND	ND	ND
	21	ND	ND	ND	ND
0.5 HL	0	38.03 (3.55)	0.28 (0.03)	0.050 (0.01)	135.96 (1.90)
	3	74.36 (8.59)	0.48 (0.01)	0.070 (0.01)	154.71 (14.6)
	6	134.1 (8.58)	1.09 (0.03)	0.180 (0.01)	122.97 (4.49)
	9	99.56 (13.1)	0.96 (0.14)	0.160 (0.02)	103.86 (1.52)
	12	34.69 (35.4)	0.75 (0.19)	0.090 (0.01)	47.52 (7.56)
	15	59.63 (2.44)	0.70 (0.16)	0.040 (0.01)	87.76 (17.0)
	18	10.85 (1.96)	0.15 (0.06)	0.005 (0.00)	77.37 (19.3)
	21	ND	ND	ND	ND
2.5 HL	0	65.85 (8.00)	0.51 (0.05)	0.065 (0.00)	128.92 (1.26)
	3	52.85 (9.95)	0.33 (0.04)	0.049 (0.01)	159.27 (1.26)
	6	119.82 (35.1)	1.09 (0.31)	0.137 (0.03)	109.73 (1.26)
	9	62.68 (14.2)	0.62 (0.16)	0.096 (0.02)	101.68 (1.26)
	12	33.53 (0.42)	0.30 (0.02)	0.030 (0.00)	112.04 (1.26)
	15	12.5 (1.31)	0.16 (0.04)	0.060 (0.01)	80.14 (1.26)
	18	ND	ND	ND	ND
	21	ND	ND	ND	ND

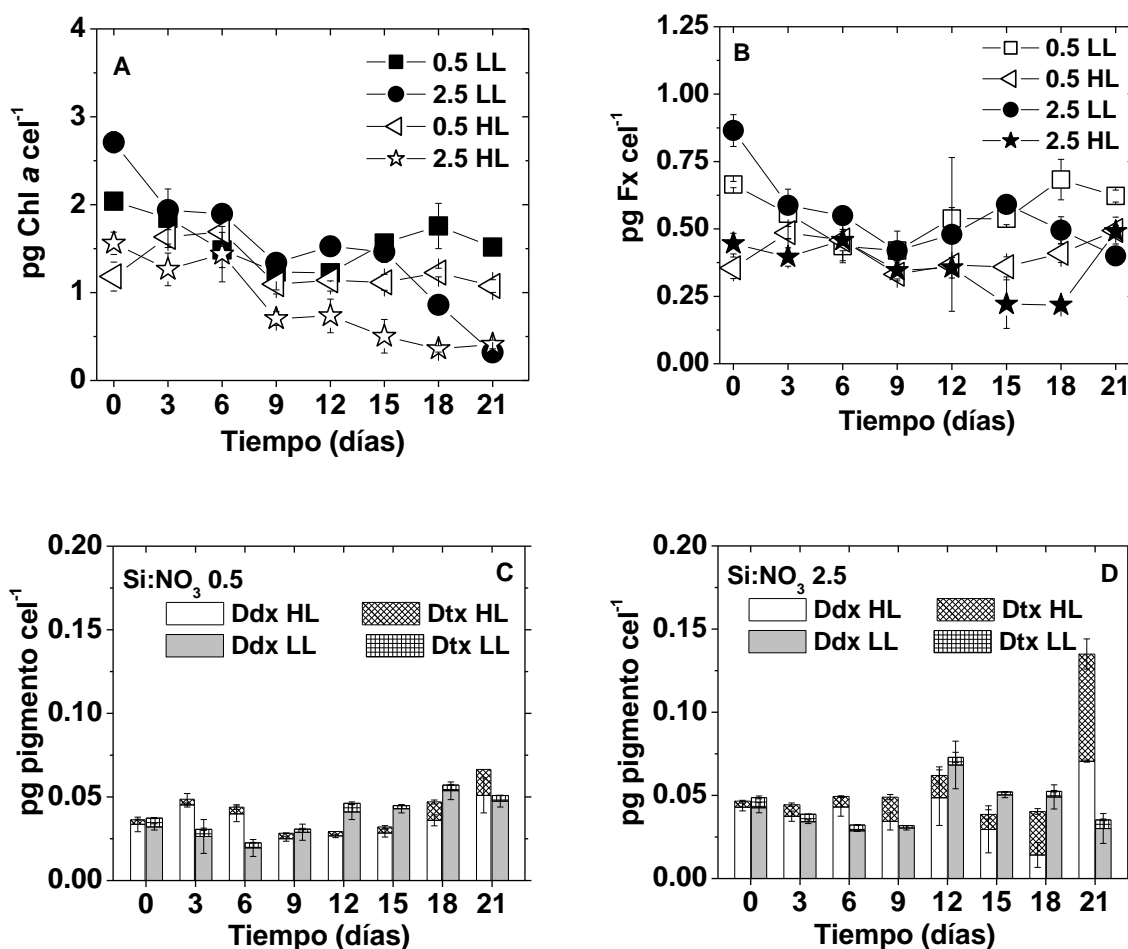


Figura 17. Cambios en la concentración de pigmentos en *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1) durante el periodo de cultivo. La concentración de clorofila a (Chl a) se presenta en el panel A y la concentración del carotenoide fucoxantina (Fx) se presenta en el panel B. La concentración de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, diadinoxantina (Ddx) y diatoxantina (Dtx), se muestran en el panel C y D. Las condiciones de cultivo se describen en la figura 13. Los símbolos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

III.4. Discusión y conclusión

El crecimiento de los organismos fotosintéticos requiere la coordinación entre la captura de luz, la fijación de carbono y asimilación de nutrientes, sobre escalas de tiempo asociadas con la división celular (Geider et al. 1998). Las diatomeas requieren de silicatos tanto para formación de la frústula como para otros procesos metabólicos (Pan et al. 1998). En

especies del género *Pseudo-nitzschia* se ha considerado la relación silicatos:nitrógeno como un factor importante en su crecimiento (Bates, 1998; Hutchins y Bruland, 1998; Bates et al. 1991; Trainer et al. 2000; Kudela et al. 2004a, 2004b). Algunos estudios de campo han relacionado la presencia de *P. australis* con la una razón silicatos:nitratos menor a 2 (Anderson et al. 2006), mientras que otros autores sugieren que una razón alta de estos nutrientes es un factor clave para la acumulación de esta especie (García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). En el presente estudio la acumulación máxima de biomasa se presentó en la condición de alta irradiancia ($200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a una razón silicatos:nitratos de 0.5. Se presentó una menor biomasa para esta misma razón en condición de baja irradiancia ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Eso sugiere que aunado a la disponibilidad de nitratos y silicatos la irradiancia es un factor importante para la acumulación de biomasa, coincidiendo con la teoría de que las diatomeas incorporan y asimilan grandes cantidades de nitrato en condiciones de alta luz (Dortch et al. 1979; Collos, 1980, 1982; Cochlan et al. 1991; Lomas y Glibert, 1999).

En campo, se ha observado que durante florecimientos de *Pseudo-nitzschia*, las células forman cadenas cortas para reducir su flotabilidad y descender fuera de aguas superficiales oligotróficas y absorber nutrientes para nuevamente ascender a zonas de alta iluminación sin pérdida importante de vitalidad (Frixell et al. 1997). Un comportamiento similar se reportó en cultivos de *P. multiseriata*, donde las células sobreviven por largos periodos en condición de baja irradiancia y estrés por nutrientes (Pan et al. 1996c). En el presente estudio, las células de *P. australis* expuestas a baja irradiancia presentaron una alta tasa fotosintética, sugiriendo una mayor eficiencia en la utilización de la luz absorbida en células aclimatadas a estas condiciones. Asimismo, las células cultivadas a una relación de 2.5 silicatos:nitratos (estrés por nitrógeno) se mantuvieron viables durante mayor tiempo en la fase estacionaria (10 días) sin registro de actividad fotosintética.

A pesar de que se ha considerado que la mayor producción de AD en especies del género *Pseudo-nitzschia* se presenta durante la fase estacionaria de crecimiento poblacional (Bates, 1998; Douglas y Bates, 1992; Bates et al. 1993; Pan, 1998; Pan et al. 2001; Bates y Trainer, 2006; Besiktepe et al. 2008; Amato et al. 2010). Para *P. australis* se ha registrado una producción de AD altamente variable con el tiempo, presentándose concentraciones

altas de esta toxina tanto al inicio de la fase exponencial (Garrison et al. 1992) como en la fase estacionaria (Cusack et al. 2002). En el presente estudio, las concentraciones mayores de AD (36.77 a 70.83 pg AD cel⁻¹) se presentaron en la forma disuelta y se registraron durante la fase de acondicionamiento (“lag”) del cultivo en los cuatro tratamientos evaluados. Se detectaron concentraciones de 18 a 35 veces mayores que en la fracción celular (cAD). De manera general los valores máximos de AD tanto en forma disuelta como celular, se detectaron en células creciendo bajo condiciones de alta irradiancia independientemente de la relación de nutriente evaluada. Se ha registrado en experimentos de laboratorio que el ácido domoico que escapa y/o es liberado activamente al medio circundante alcanza niveles de hasta un 95% de la cantidad total de la toxina, lo que sugiere que células fisiológicamente activas tienden a retener el ácido domoico, mientras que células con daños fisiológicos tienden a liberar la toxina en condición de estrés (Subba Rao et al. 1990; Bates et al. 1991; Pan et al. 1996b; Maldonado et al. 2002). En el presente estudio, para determinar el porcentaje de la cantidad de ácido domoico de la fase de acondicionamiento que es originada por cambios que se presentan en el metabolismo celular, se restó la cantidad de toxina proveniente del inóculo utilizado para el cultivo (3.91%) y la cantidad originada por muerte celular (1.43%), resultando en que el 94.66% del ácido domoico observado en esta fase es originado por cambios que se presentan en el metabolismo celular de células fisiológicamente activas, y no por daño celular.

Se ha reconocido que la producción de AD en especies del género *Pseudo-nitzschia* está asociada a la condición fisiológica de las células y que las células estresadas producen más AD, por lo que el mayor contenido de esta toxina se presenta normalmente durante el final de la fase estacionaria de los cultivos (Bates et al. 1998; Pan et al. 1998; Bates y Trainer, 2006). En el presente estudio, se encontró que células aisladas de la región de Baja California, México, producen AD en diferentes condiciones fisiológicas y no solamente cuando el crecimiento poblacional se ha detenido. El contenido mayor de AD en el cultivo (cAD+dAD) se detectó en la fase de acondicionamiento. En esta fase las células presentaron la mayor tasa fotosintética máxima (P_s^{β}). La producción de AD durante la fase de acondicionamiento e inicio de la fase exponencial ha sido reportada para *P. multiseriata*, *P. calliantha*, *P. multistriata* y *P. cuspidata* (2.0 fg cel⁻¹ a 4.2 pg cel⁻¹), cuando el

metabolismo primario celular es más activo y no hay limitación del crecimiento por nutrientes, lo que ha sugerido que la producción de la toxina puede ser una respuesta general a la detención del crecimiento (fase de acondicionamiento), a la toxicidad de un nutriente en particular (amonio) o a la disminución de las tasas fotosintéticas (Douglas and Bates, 1992; Bates et al. 1993; Pan et al. 2001; Besiktepe et al. 2008; Amato et al. 2010). Las concentraciones de AD registradas en este trabajo ($70.83 \text{ pg cel}^{-1}$) son mayores a las concentraciones reportadas anteriormente. Solo se ha reportado una concentración similar de AD (cAD + dAD) para cultivos de *P. multiseriis* ($67 \text{ pg AD cel}^{-1}$) durante la fase de crecimiento exponencial (Bates et al. 1999).

Los cambios en la concentración de AD durante el tiempo de desarrollo del cultivo en este estudio, estuvieron relacionados con la condición de luz. Las células cultivadas a una irradiancia alta (HL) produjeron más AD que las cultivadas en luz baja. También se detectó que el cAD aumenta al finalizar el periodo de cultivo en las células cultivadas en HL. Además, durante el crecimiento de la población se detectaron dos periodos de alta producción de AD en células expuestas a HL. En estudios anteriores, la luz ha sido identificada como un factor importante para la producción de AD en *P. australis* (Garrison et al. 1992; Cusack et al. 2002), reportándose que células cultivadas a alta irradiancia presentan una alta concentración de tAD en los cultivos ($12 \text{ a } 37 \text{ pg AD cel}^{-1}$) comparadas con las células en baja luz, que presentaron concentraciones entre no detectable y 2 pg AD cel^{-1} (Cusack et al. 2002). El efecto de la luz en la producción de AD ha sido asociada con la necesidad de energía fotosintética para la biosíntesis de la toxina (Bates, 1998). Por esto, se ha hipotetizado que la energía para el crecimiento celular y mantenimiento compite con la requerida para la producción de AD (Pan et al. 1998).

En las algas el desequilibrio entre la energía fotoquímica producida y su consumo a través de la fijación de carbono y rutas metabólicas contiguas, se refleja en la reducción de la capacidad de captura de luz e incremento en la capacidad de disipar el exceso de energía como calor a través de carotenoides fotoprotectores. En las diatomeas, la disipación del exceso de energía como calor para prevenir la fotoinhibición involucra la conversión del monoepóxido diadinoxantina (Ddx) a la forma de-epoxidada diatoxantina (Dtx), con presencia de bajas cantidades de los pigmentos violaxantina, anteraxantina y zeaxantina

(Demmig-Adams, 1990; Arsalane et al. 1994; Olaizola et al. 1994; Huner et al. 1998; Lohr y Wihelm 1999; Wingler et al. 2000; Lohr y Wihelm, 2001). En el presente estudio, a pesar de que los diferentes tratamientos evaluados mostraron una reducción en la capacidad de fijación de carbono a partir del noveno día de cultivo, la concentración del carotenoide Dtx solo presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) el día 21 del cultivo para la relación 2.5 silicatos nitratos en la condición de HL, lo que indica que en *P. australis* la disipación del exceso de energía fotoquímica no se regula mediante el ciclo de las xantofilas.

Los periodos de mayor contenido de la toxina correspondieron a la fase de acondicionamiento y estacionaria del cultivo, en donde la energía utilizada para el crecimiento fue mínima. En la fase de acondicionamiento, se presentaron valores de tasas fotosintéticas y contenido de ácido domoico (dAD + cAD) superiores a las registradas en la fase estacionaria, por lo que ante la ausencia de la disipación del exceso de energía mediante el ciclo de las xantofilas. Posiblemente la producción y excreción de la toxina representa una vía alterna de disipación del exceso de energía fotosintética, mientras que la reducción en su contenido una vez iniciado el crecimiento sugiere la posibilidad que la toxina producida sea re-asimilada.

Capítulo IV

Producción de ácido domoico en respuesta a la alternancia entre crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad

IV.1. Introducción

Las diatomeas tienen estrategias de crecimiento y mecanismos de sobrevivencia altamente eficientes y adaptables a los constantes cambios ambientales del hábitat marino (Bates y Trainer, 2006). Las diatomeas se pueden mantener viables por largos periodos al pasar de un estado de rápido crecimiento (células vegetativas) en aguas iluminadas a un estado de reposo (células de reposo) en aguas oscuras y frías o a la superficie del sedimento (Anderson, 1975; French y Hargraves, 1980; Hargraves y French, 1983). La ventaja de esta estrategia de sobrevivencia, es que su transformación a células vegetativas se presenta en pocas horas después de retornar a aguas iluminadas ricas en nutrientes (Peters y Tomas, 1996b).

En áreas oceánicas oligotróficas se ha observado que la disponibilidad de nitrato se asocia frecuentemente con el hundimiento o migración del fitoplancton de capas superiores agotadas en nutrientes a capas inferiores ricas en nutrientes (Collos, 1982), y que condiciones favorables, permiten el rápido desarrollo de estas poblaciones (Fryxell et al. 1997; Horner et al. 1997; Trainer et al. 2000). En regiones de surgencias, el fitoplancton no está aclimatado a una condición ambiental específica, ya que existe una alta variabilidad en las condiciones ambientales de nutrientes, disponibilidad de luz y variabilidad física, por lo que la respuesta a éstas condiciones cambiantes depende de la condición ambiental y del estado fisiológico de las células (Small y Menzies 1981; Dortch et al. 1985; MacIsaac et al. 1985).

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* presentan tendencia a flocular (Buck y Chavez, 1994) y hundirse a través de la columna de agua (Rines et al. 2002), formando poblaciones de células viables (semillas) en aguas profundas, que bajo condiciones favorables, permiten el desarrollo rápido de la población (Fryxell et al. 1997; Horner et al.

1997; Trainer et al. 2000; Rines et al. 2002; Ryan et al. 2005). Generalmente los florecimientos de *Pseudo-nitzschia* spp. se inician cerca de la costa, en áreas de surgencias de masas de aguas profundas ricas en nutrientes (Adams et al. 2000; Trainer et al. 2008, 2009). Estos florecimientos al parecer son favorecidos por altas concentraciones de nutrientes (Stolte et al. 1994; Stolte y Riegman, 1996), en donde el nitrógeno juega un papel importante tanto en el desarrollo del florecimiento, como en la producción de la toxina (Dortch, 1990; Smith et al. 1990; Bates et al. 1991; Cochlan et al. 2006). El nitrato ha sido identificado como la principal fuente inorgánica de nitrógeno, que mantiene el incremento de la biomasa (Smith, 1991; Dortch et al. 1985; Glibert et al. 1995; Clarke y Leavey, 1996). Cuando el nitrógeno es limitante para el crecimiento, una mayor afinidad de asimilación de sustratos reducidos de nitrógeno (amonio y urea) provee una ventaja competitiva a ciertas especies ya que estos compuestos son energéticamente menos costosos para su asimilación al requerir menor poder reductor (Raven, 1990; Cochlan et al. 2002).

Investigaciones sobre preferencias nutricionales de *Pseudo-nitzschia* spp. han mostrado la habilidad de este género para utilizar elementos orgánicos como fuente complementaria de nutrición (Hillebrand y Sommer, 1996; Armstrong-Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008) y como una estrategia de sobrevivencia en oscuridad (Mengelt y Prézelin, 2002b). En condiciones de cultivo, se ha reportado para *P. australis* que el orden de preferencia de especies nitrogenadas tanto inorgánicas como orgánicas es: $\text{NO}_3^- > \text{NH}_4^+$, glutamina > urea, que cultivos creciendo en nitrato o amonio producen cantidades equivalentes de AD durante la fase exponencial (Cochlan et al. 2008), y que la presencia de urea aumenta la producción de AD (Armstrong-Howard et al. 2007). Laycock et al. (1989) observaron la presencia de concentraciones altas de ácido glutámico durante la producción de AD para *Nitzschia pungens* forma *multiseries* (*P. multiseries*). A su vez, Osada y Stewart (1997) reportaron que durante el cultivo de *P. multiseries*, la adición de los aminoácidos ácido glutámico y prolina estimula la liberación de AD al medio.

Considerando que tanto la sobrevivencia en oscuridad como la disposición de elementos orgánicos como fuente complementaria de nutrición, pueden ser factores importantes para

el desarrollo de especies del género *Pseudo-nitzschia*. En el presente estudio se evaluó la producción de la toxina (AD), actividad fotosintética y composición pigmentaria de cultivos de *P. australis*, como respuesta a la alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad, en ausencia y presencia de una fuente de nitrógeno orgánico (ácido glutámico). La respuesta observada durante la transición entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad, se comparó con la respuesta de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* observada comúnmente en aguas costeras.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Condiciones experimentales

El cultivo de *Pseudo-nitzschia australis* (BTS-1) utilizado en el presente trabajo, se aisló de la Bahía Todos Santos, B.C., mientras que el cultivo de *Thalassiosira pseudonana* se obtuvo de la Colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE. Los cultivos se mantuvieron a $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, en medio L1 modificado en la concentración de silicatos ($250\text{ }\mu\text{M}$) y nitratos ($500\text{ }\mu\text{M}$) para obtener la relación silicatos:nitratos de 0.5. Se utilizaron irradiancias de $30\text{ }\mu\text{mol quanta s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ (baja, LL) y de $250\text{ }\mu\text{mol quanta s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ (alta, HL) provistas con lámparas fluorescentes de luz de día. La densidad celular se evaluó en alícuotas previamente fijadas con Lugol utilizando microscopio óptico y cámaras de Neubauer (0.1 mm de profundidad) o Fuchs Rosenthal (0.2 mm de profundidad) (Lobban et al. 1988).

Respuesta al cambio en la condición de irradiancia en ausencia o presencia de N-orgánico: Cultivos de *P. australis* aclimatados a $30\text{ }\mu\text{mol quanta s}^{-1}\text{ m}^{-2}$ por diversas generaciones se expusieron en la fase exponencial de crecimiento a oscuridad y alta irradiancia ($250\text{ }\mu\text{mol quanta s}^{-1}\text{ m}^{-2}$, HL) en presencia y ausencia de ácido glutámico (AG) como fuente de nitrógeno orgánico. El contenido de ácido domoico, eficiencia fotosintética y composición pigmentaria de las células expuestas a las diferentes condiciones, se evaluó por triplicado a las 48 horas.

Alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad: Cultivos en fase exponencial de *P. australis* y *T. pseudonana* aclimatados a baja irradiancia ($30 \mu\text{mol quanta s}^{-1} \text{m}^{-2}$, LL), se incubaron por triplicado en oscuridad durante 6 días. Posteriormente, se expusieron nuevamente a la condición de irradiancia inicial por tres días. El contenido de ácido domoico (*P. australis*), eficiencia fotosintética y composición pigmentaria (*P. australis* y *T. pseudonana*), fueron evaluados los días 0, 1, 2, 3 y 6 de exposición en oscuridad y día 3 de re-introducción a la condición de luz inicial (LL).

IV.2.2. Cuantificación de ácido domoico

La concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) se determinó de acuerdo a lo descrito en la sección II.2.5 de Materiales y métodos del Capítulo II del presente trabajo.

IV.2.3. Actividad fotosintética (curvas P-E)

La fotosíntesis, como evolución de oxígeno, se determinó de acuerdo a lo descrito en la sección III.2.3 de Materiales y métodos del Capítulo III del presente trabajo.

IV.2.4. Análisis de pigmentos

La separación y cuantificación de pigmentos se determinó de acuerdo a lo descrito en la sección III.2.4 de Materiales y métodos del Capítulo III del presente trabajo.

IV.2.5. Análisis de datos

Los datos fueron transformados (Log) antes de aplicar el análisis de varianza (ANOVA), para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos. La asociación entre los tratamientos fue analizada utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1999). Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el programa Statistica (StatSoft Inc.).

IV.3. Resultados

IV.3.1. Respuesta al cambio en la condición de irradiancia y disponibilidad de N-orgánico

A pesar de que el tratamiento de alta irradiancia en presencia de N-orgánico mostró un incremento en la densidad celular, los valores observados a las 24 h (HLAG, 50156 cel mL⁻¹) y 48 h (HLAG, 54895 cel mL⁻¹) no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) con respecto al valor de densidad celular de la condición inicial (LL, 0 h, 36250 cel mL⁻¹) (Fig. 18A). La condición de oscuridad en ausencia o presencia de N-orgánico, no mostró cambios significativos ($p > 0.05$) en la densidad celular durante el tiempo evaluado (Fig. 18A). Las tasas de crecimiento (Fig. 18B), solo mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) con respecto a la condición inicial (LL, 0 h, 0.18 día⁻¹) para el tratamiento de alta irradiancia en presencia de N-orgánico (HLAG, 48 h, 0.78 día⁻¹), siendo ésta condición significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a los diferentes tratamientos de oscuridad (Fig. 18B).

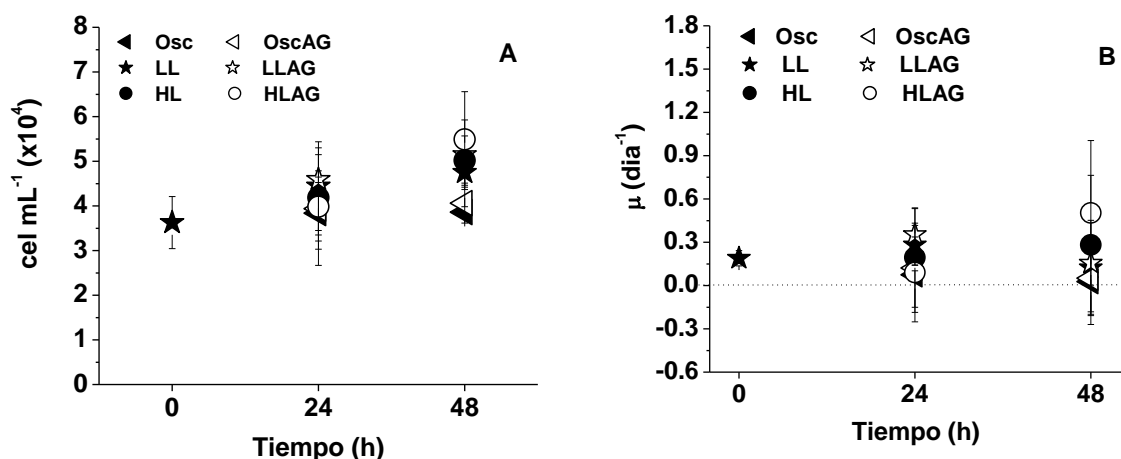


Figura 18. Abundancia celular y tasa específica de crecimiento (μ) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* expuestos a cambios en la condición de irradiancia (LL = 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico (AG) como fuente de N-orgánico (símbolos vacíos= presencia, símbolos oscuros = ausencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

En los diferentes tratamientos evaluados, la forma disuelta de ácido domoico (dAD) representó una proporción importante (72 a 89 %) del contenido total de la toxina (Fig.19A). La concentración más alta de dAD se registró para la condición control (14.22 pg cel⁻¹, LL) y debido a la alta variabilidad presentada, no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) con las condiciones de oscuridad (4.68 pg cel⁻¹, Osc) y alta irradiancia en presencia de ácido glutámico (4.87 pg cel⁻¹, HLAG), valores menores de dAD (53 a 77 %) se registraron para las condiciones de LLAG, OscAG y HL (Fig.19A). La concentración celular de la toxina (cAD), presentó el valor más alto para la condición de alta irradiancia (3.90 pg cel⁻¹, HL) y no mostró diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto a condición control (1.62 pg cel⁻¹, LL) (Fig. 19B). Al igual que en la forma disuelta, la presencia de ácido glutámico, resulto en valores bajos de la toxina, sin embargo, estos valores no fueron diferentes ($p> 0.05$) a la condición control (Fig. 19B).

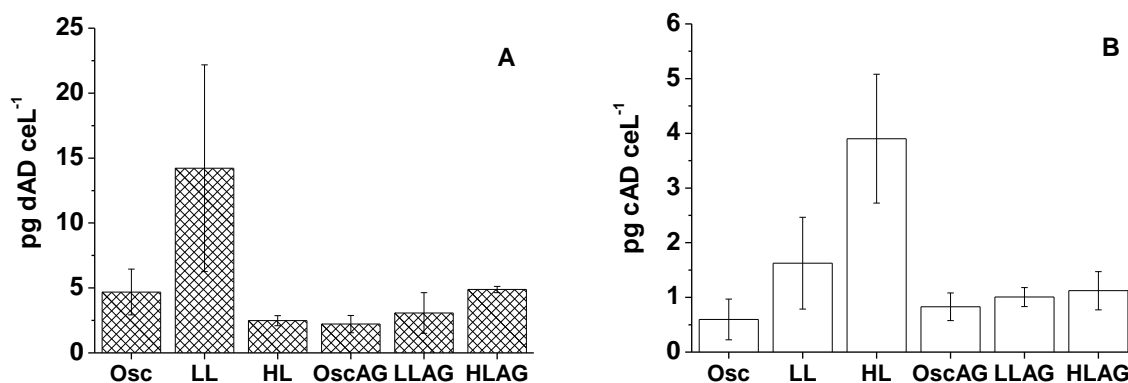


Figura 19. Concentración de ácido domoico celular (cAD) y disuelto (dAD) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis*, expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL = 30 μmol quanta m⁻² s⁻¹, HL= 250 μmol quanta m⁻² s⁻¹) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG = presencia). Los datos representan la media ± desviación estándar de tres cultivos independientes.

Los parámetros fotosintéticos derivados de la relación P-E en los diferentes tratamientos, mostraron mayores tasas de fotosíntesis máxima (P_s^β) ($p<0.05$) que la registrada para la condición de LL en las condiciones de Osc y LLAG, siendo P_s^β menor ($p<0.05$) en la

condición de alta irradiancia (HL) (Fig. 20A). El valor de eficiencia de utilización de luz (α^β), fue mayor ($p < 0.05$) que la condición control (LL) en las células expuestas a oscuridad, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) para los cultivos de HLAG y LLAG y se observaron valores menores ($p < 0.05$) en la condición de alta irradiancia (HL) (Fig. 20B). El parámetro de saturación por luz (E_{k_s}) no mostró diferencia significativa con respecto al control (LL) para las condiciones Osc y HL, mientras que los valores observados para las condiciones de HLAG y LLAG fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) (Fig. 20C). El parámetro de fotoinhibición (β^{chl}) fue mayor ($p < 0.05$) con respecto a la condición control (LL), solo para la condición de HLAG y no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) para los cultivos de LLAG (Fig. 20D). El cultivo mantenido en oscuridad no registró actividad fotosintética en presencia de AG.

Los cambios en la condición de irradiancia y disponibilidad de N-orgánico, no resultaron en diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de Chla (1.14 a 1.67 nmol Chla cel^{-1}), ni en la concentración de diadinoxantina (50.6 a 65.2 mmol Ddx mol Chla $^{-1}$) (Figs. 21A, C). Las concentración máxima de fucoxantina (0.50 mmol Fx mol Chla $^{-1}$) y β -caroteno (25.3 mmol β -car mol Chla $^{-1}$) correspondieron a la condición control (LL, Fig. 21B). La concentración de Fx solo presentó diferencia significativa ($p < 0.05$) con las células expuestas a alta irradiancia y presencia de ácido glutámico (HLAG, 0.356 mmol Fx mol Chla $^{-1}$) (Fig. 21B). A su vez, la concentración de β -caroteno solo fue similar ($p > 0.05$) a la condición de baja irradiancia y presencia de ácido glutámico (LLAG, 24.19 mmol β -car mol Chla $^{-1}$) (Fig. 21D). El valor máximo de zeaxantina medido para la condición de alta irradiancia y presencia del ácido glutámico (HLAG, 29.7 mmol Zx mol Chla $^{-1}$), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al valor de la condición control (LL) y demás tratamientos (Fig. 21D). La mayor variación en el contenido de pigmentos se observó para la diatoxantina (Fig. 21C). Las células incubadas en oscuridad (Osc) no presentaron diatoxantina, mientras que en presencia de ácido glutámico su concentración (OscAG, 0.94 mmol Dtx mol Chla $^{-1}$) resultó ser significativamente menor ($p < 0.05$) que la medida para la condición control (LL, 5.70 mmol Dtx mol Chla $^{-1}$), la cual no mostro diferencia

significativa ($p > 0.05$) con el valor máximo registrado para la condición de alta irradiancia y presencia de ácido glutámico (HLAG, $9.46 \text{ mmol Dtx mol Chla}^{-1}$) (Fig. 21).

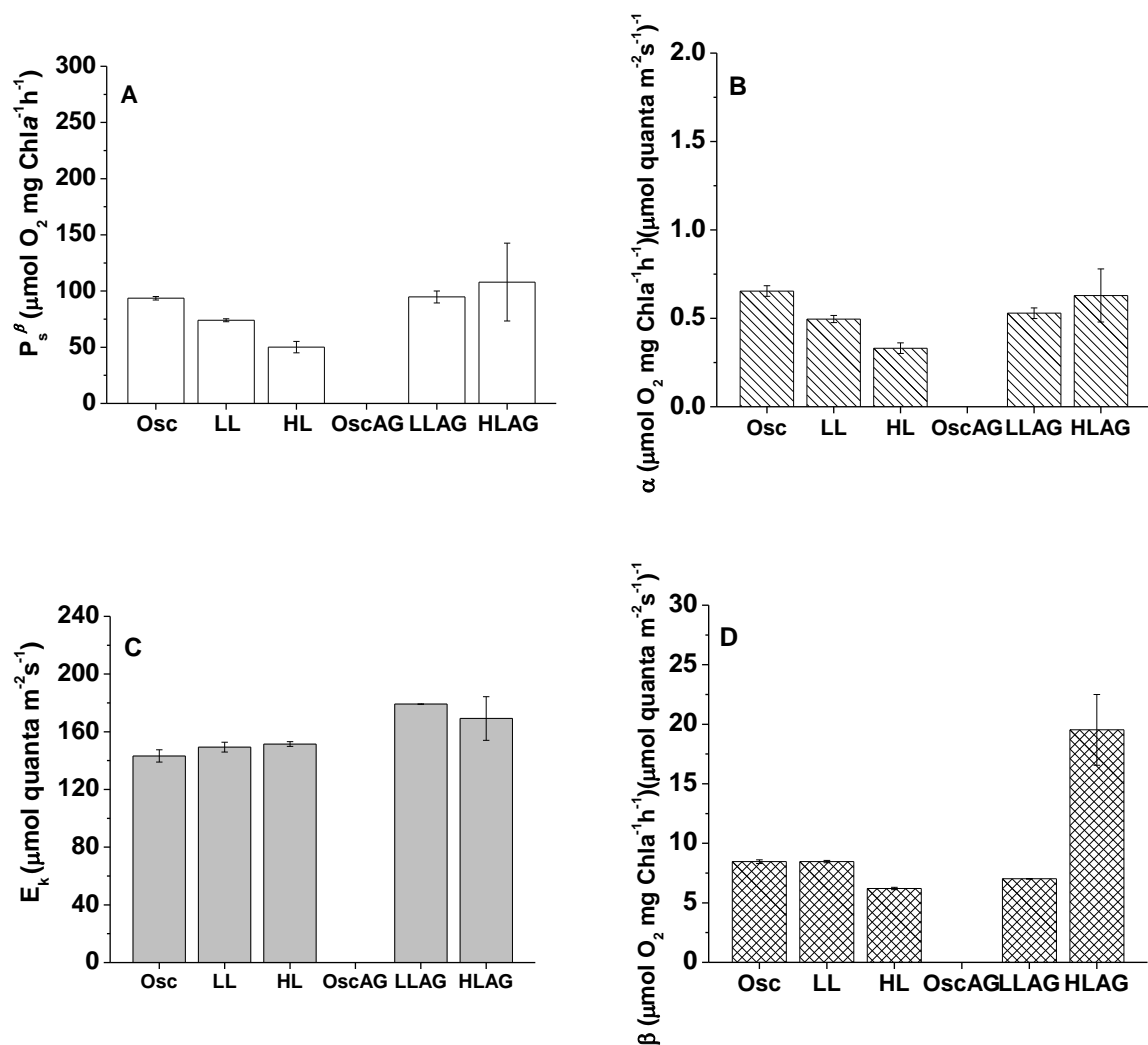


Figura 20. Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL = $30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL = $250 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG = presencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

IV.3.2. Alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad

Durante el periodo de incubación en oscuridad, tanto las células de *Pseudo-nitzschia australis* como *Thalassiosira pseudonana* permanecieron viables, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la densidad celular, la cual fue en promedio de $19697 \text{ cel mL}^{-1}$ y $52315 \text{ cel mL}^{-1}$ para *P. australis* y *T. pseudonana*, respectivamente (Figs. 22A, B). Después de su re-introducción a luz, se detectó una disminución del crecimiento en *T. pseudonana*, registrándose valores negativos de la tasa de crecimiento (-0.12 a -1.2 día^{-1}). *P. australis* mostró un incremento en su tasa de crecimiento de -0.3 a 0.32 día^{-1} al después de su re-exposición a luz (Figs. 22C, D).

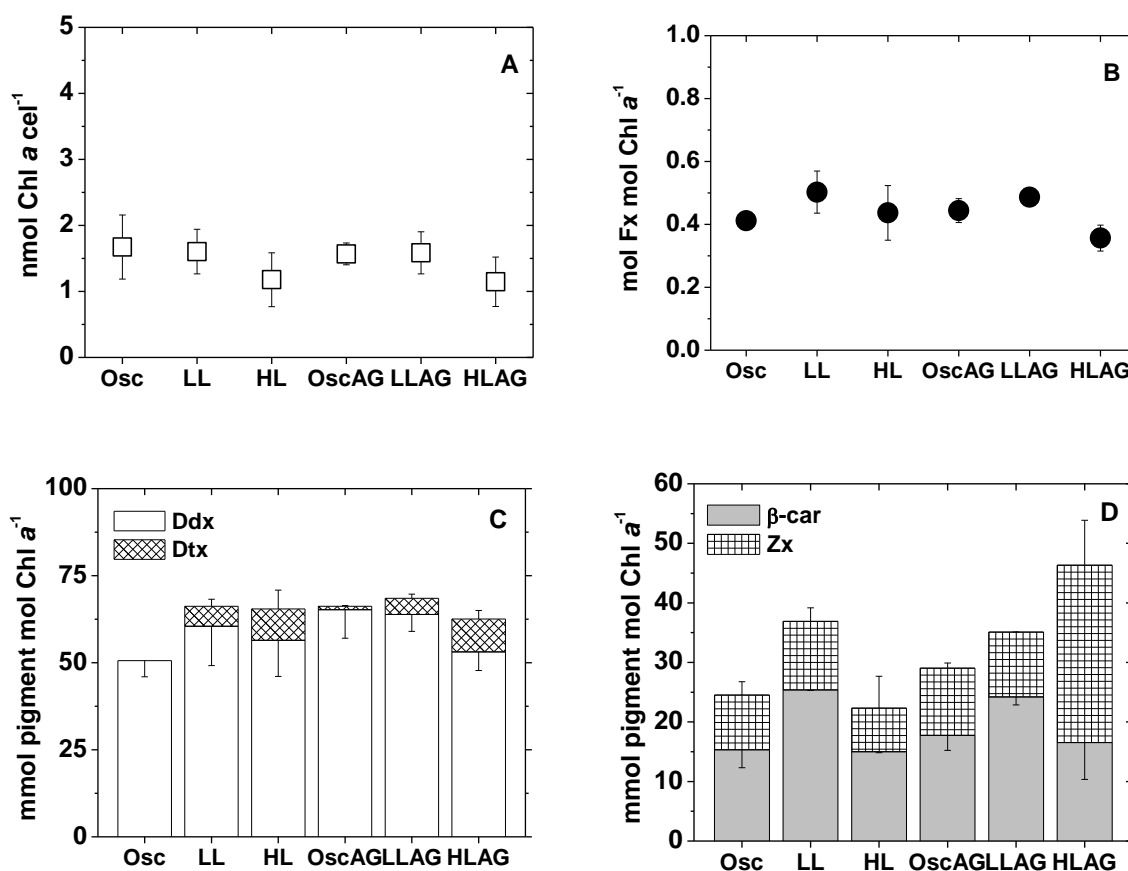


Figura 21. Concentración celular de pigmentos en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis*, expuestos a cambios en la condición de irradiancia (O = Oscuridad, LL = 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, HL = 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y disponibilidad de ácido glutámico como fuente de N-orgánico (AG= presencia). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

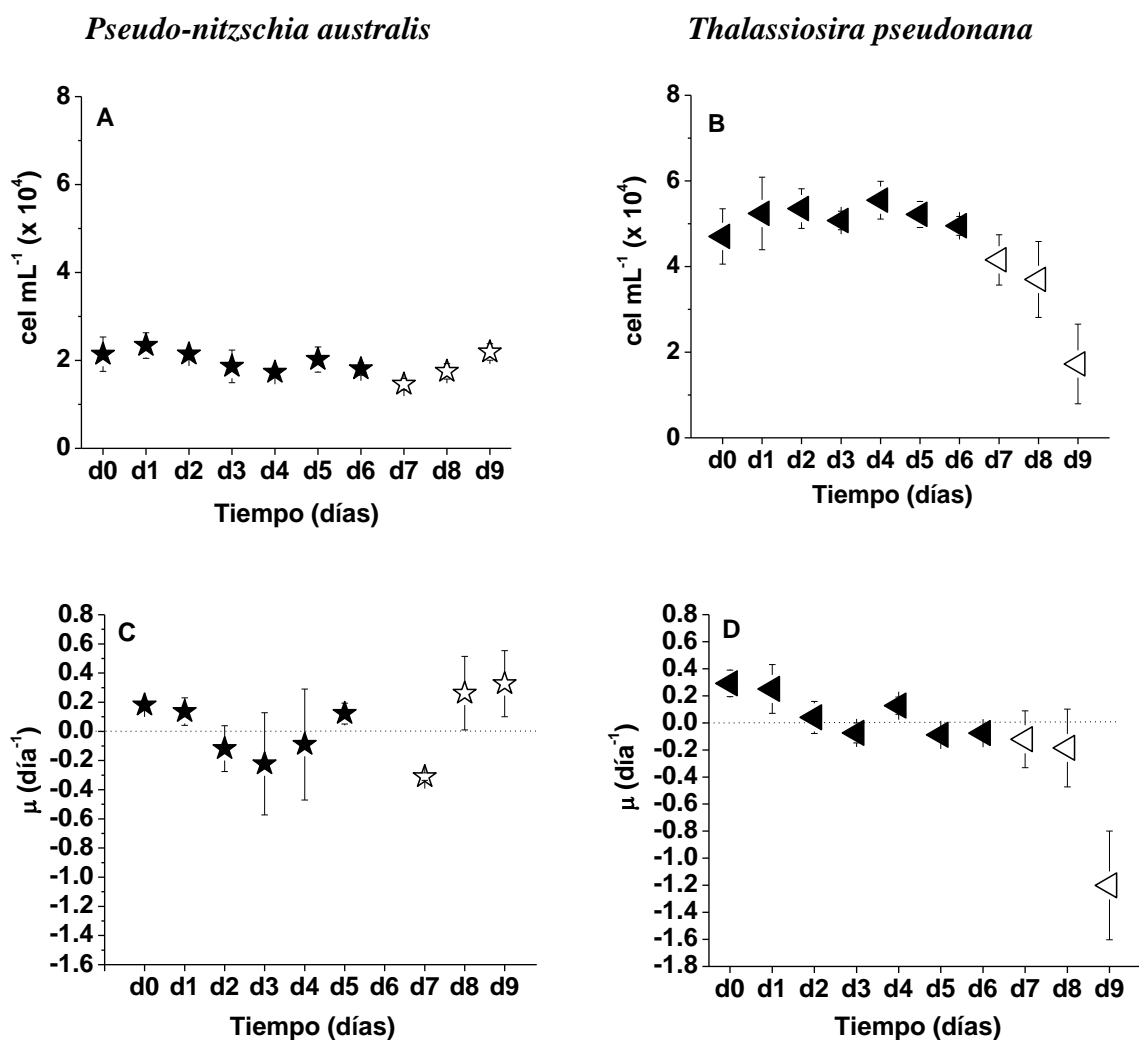


Figura 22. Cambios de abundancia celular y tasas específicas de crecimiento en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, símbolos vacíos) y en oscuridad (símbolos oscuros). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

Durante la alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad se encontró que la forma disuelta de la toxina (dAD), representó una proporción importante (82 a 94%) del contenido total en las células. El valor máximo de AD disuelto medido el sexto día de incubación en oscuridad ($34.69 \text{ pg cel}^{-1}$), no fue diferente ($p > 0.05$) del registrado a las 24 horas (d1) de incubación en oscuridad (Fig. 23A). La mayor ($p < 0.05$) concentración de AD

celular, se midió al tercer día de incubación en oscuridad (3.04 pg cel^{-1}), después de su re-exposición a luz el contenido de cAD presentó una reducción significativa ($p < 0.05$) con respecto al valor máximo, pero no mostró diferencia ($p > 0.05$) con respecto a las células expuestas a oscuridad en los días 1, 2 y 6 (Fig. 23B).

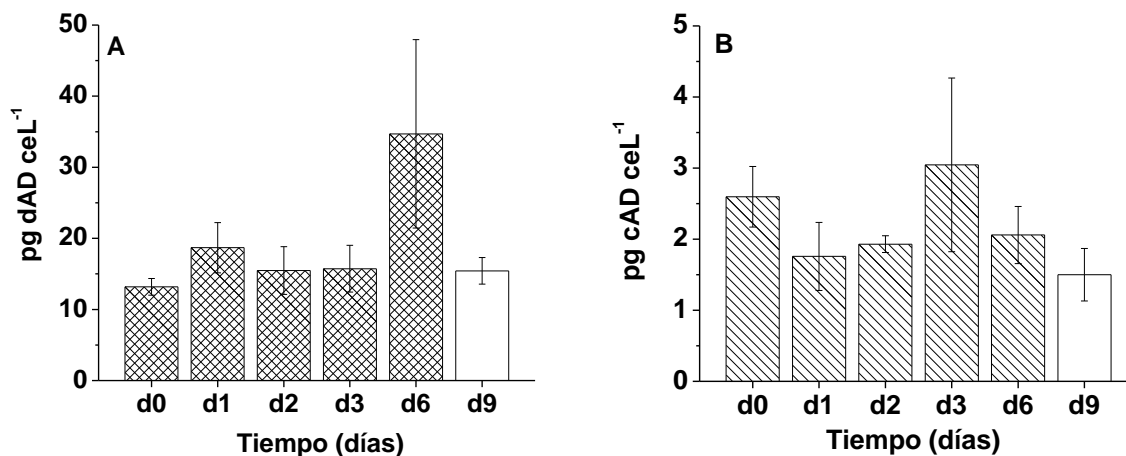


Figura 23. Cambios en la concentración de ácido domoico disuelto (dAD) y celular (cAD) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

Las características fotosintéticas de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana* mostraron tendencias diferentes (Figs. 24 y 25). La tasa fotosintética máxima (P_s^β) y eficiencia de utilización de luz (α^β) fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en *P. australis* comparado con *T. pseudonana* (20 y 50 veces, respectivamente) (Fig. 24). Durante el periodo de oscuridad, el valor de P_s^β se redujo en un 20% en células de *P. australis*, y en 53% en células de *T. pseudonana*, observándose una recuperación en ambas especies después de su re-introducción a luz; para *T. pseudonana* el valor se incrementó en un 430%, mientras que para *P. australis* el incremento fue de 140% (Fig. 24A, B). La eficiencia de utilización de luz (α^β) en *P. australis* no mostró cambios significativos

($p > 0.05$) entre el periodo de oscuridad y su re-introducción a luz, el valor de α^β para las células de *T. pseudonana*, al ser re-introducidas a luz fue cinco veces mayor ($p < 0.05$) que el observado durante el periodo de oscuridad (Figs. 24C, D).

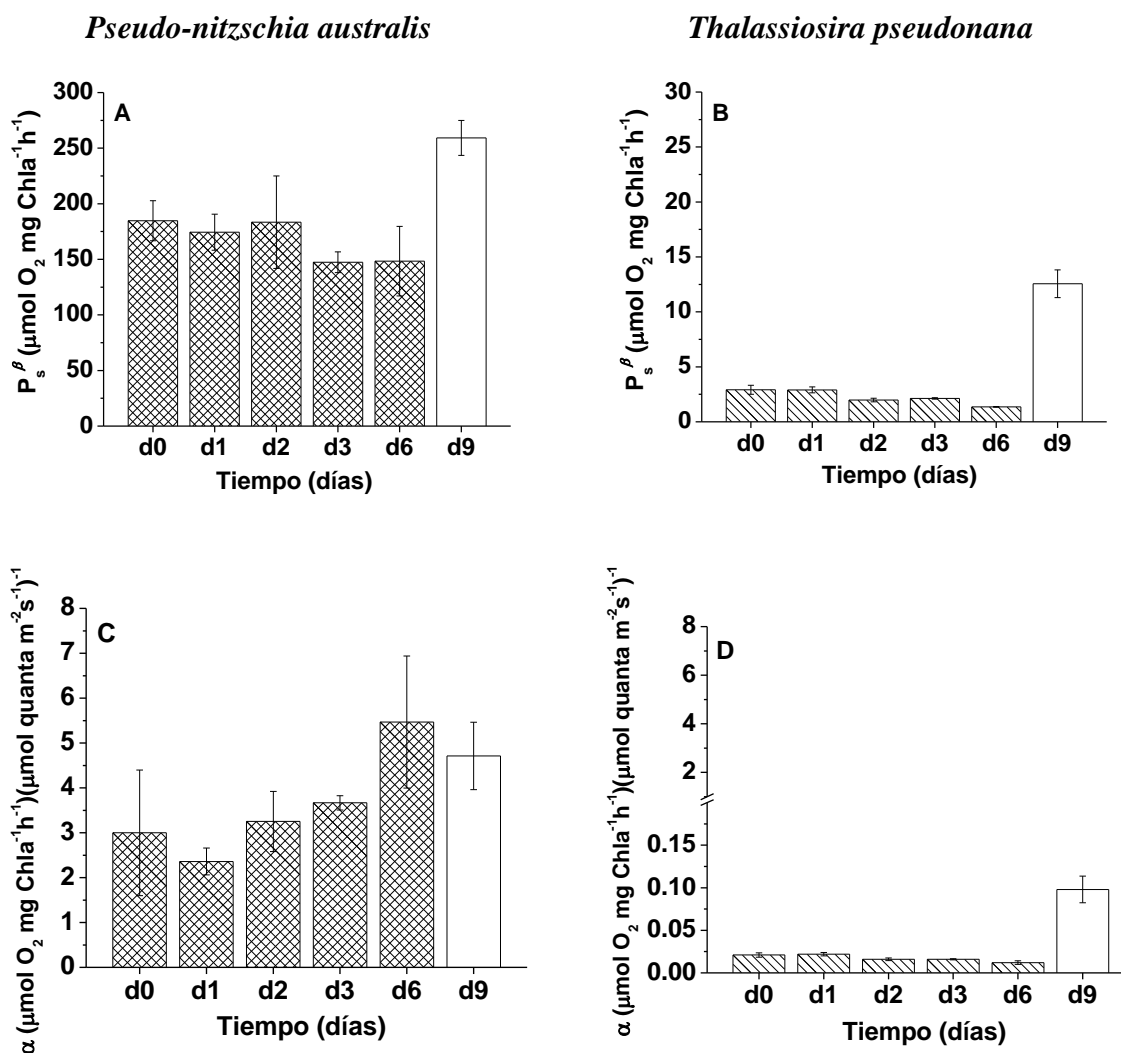


Figura 24. Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

Los valores del parámetro de saturación por luz (E_k) y del parámetro de fotoinhibición (β) fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en células de *T. pseudonana* que en células de *P. australis* (Fig. 25). El valor máximo de E_k medido en células de *T. pseudonana* ($128 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fue 1.8 veces mayor que el registrado para *P. australis* ($75 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El valor de E_k en *T. pseudonana* no mostró cambios significativos ($p > 0.05$) entre el periodo de oscuridad y su re-introducción a luz, para *P. australis* el valor de E_k disminuyó con el tiempo ($p < 0.05$) durante el periodo de oscuridad y se incrementó significativamente ($p < 0.05$) después de la re-introducción a la luz (Figs. 25A, B). El valor de β fue aproximadamente 8 veces más alto para *T. pseudonana* ($1.45 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{h}^{-1}$) ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$)⁻¹ comparado con el valor de β para *P. australis* ($0.18 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chla}^{-1} \text{h}^{-1}$) ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$)⁻¹. Los cambios en el parámetro de fotoinhibición (β) para *P. australis* fueron semejantes a los observados en E_k y para *T. pseudonana* se presentó una reducción ($p < 0.05$) en su valor al sexto día de incubación en oscuridad, y recuperación después de la re-introducción a la luz (Figs. 25C, D).

El análisis de la composición de pigmentos mostró que *P. australis* presentó un contenido máximo de Chla ($3.8 \text{ nmol Chla cel}^{-1}$) 5.7 veces mayor que el de *T. pseudonana* ($0.66 \text{ nmol Chla cel}^{-1}$). No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la concentración de este pigmento durante el periodo experimental, para ninguna de las especies evaluadas (Figs. 26A, B). La concentración de fucoxantina fue similar en ambas especies (0.26 a $0.32 \text{ mol Fx mol Chla}^{-1}$), y solo se observó un incremento ($p < 0.05$) para las células de *T. pseudonana*

al sexto día de su incubación en oscuridad (Figs. 26C, D). La concentración de los pigmentos diadinoxantina, diatoxantina y β -caroteno en *T. pseudonana* fue entre 2 y 5 veces mayor que la observada para *P. australis*. Estos pigmentos no presentaron cambios significativos ($p > 0.05$) en su concentración celular durante el periodo en oscuridad y su re-introducción a luz. (Fig. 27). Los valores de zeaxantina en *P. australis* (12.7 a $14.4 \text{ mmol Zx mol Chla}^{-1}$) fueron 13 veces superiores a los observados para *T. pseudonana* ($1.1 \text{ mmol Zx mol Chla}^{-1}$) durante el periodo de incubación en oscuridad (Fig. 27C, D). La concentración de zeaxantina en *P. australis* no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$)

durante el periodo experimental, para *T. pseudonana* la concentración de este pigmento se incrementó ($p < 0.05$) al re-introducirse a la condición de luz (Figs. 27C, D).

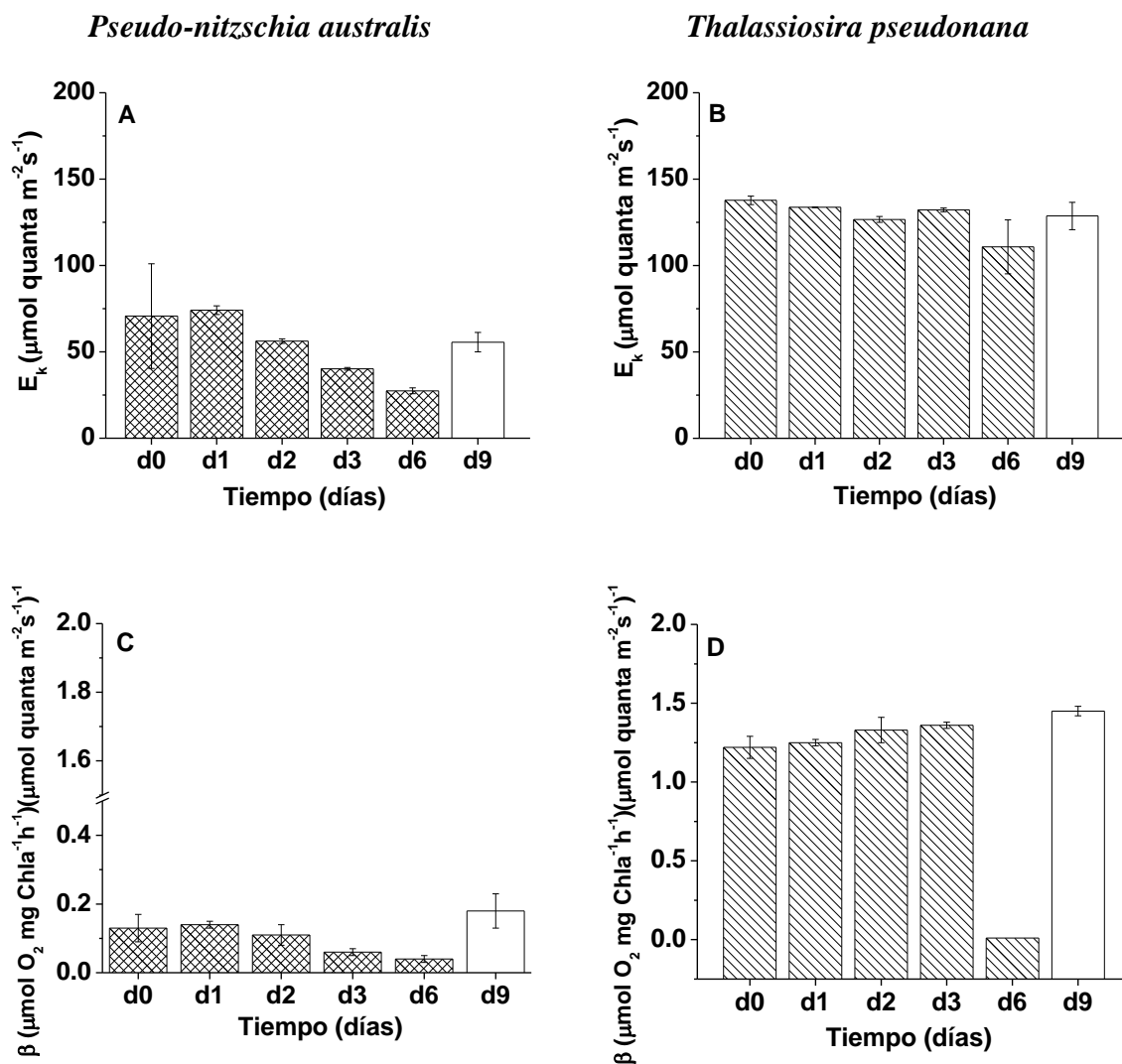


Figura 25. Cambios de los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis-irradiancia (P-E) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

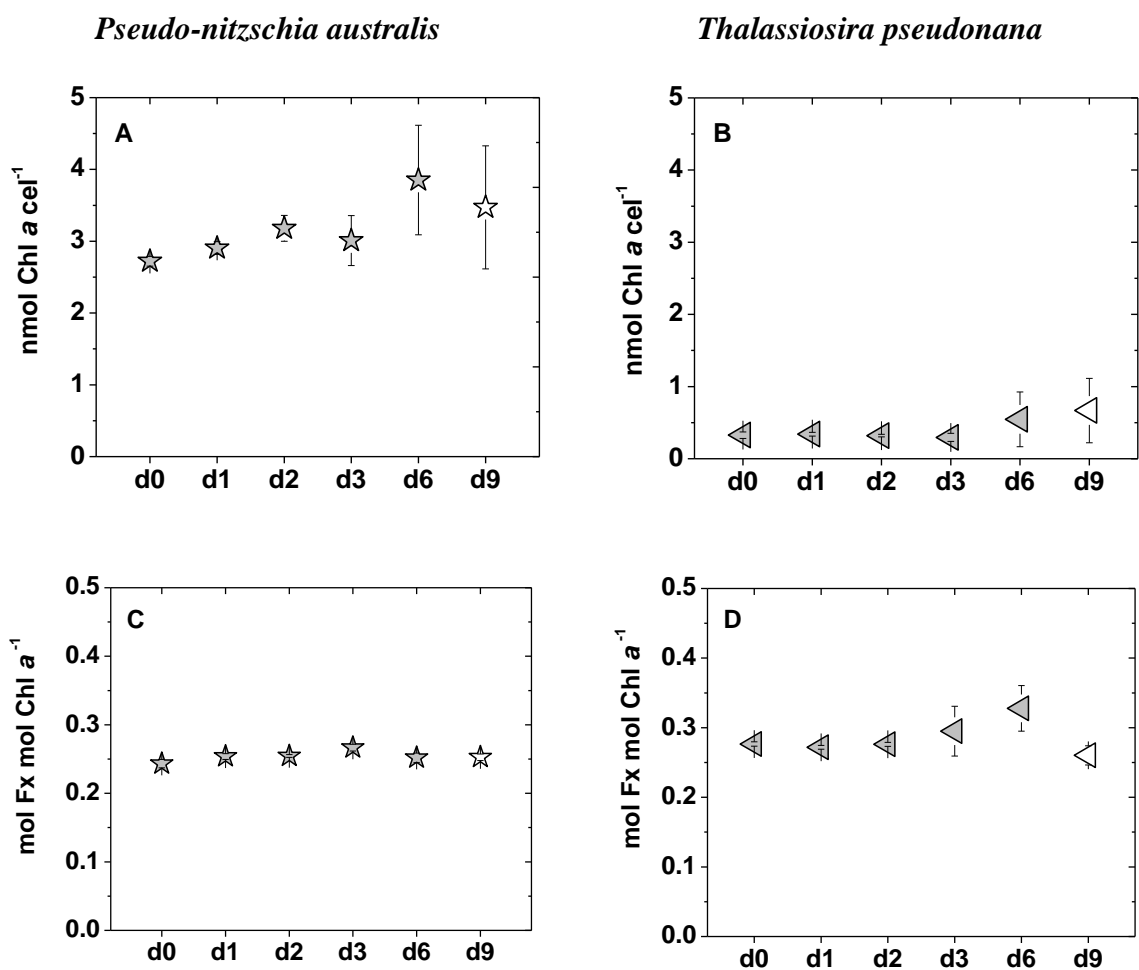


Figura 26. Cambios en la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) y fucoxantina (Fx) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, símbolos vacíos) y en oscuridad (símbolos oscuros). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

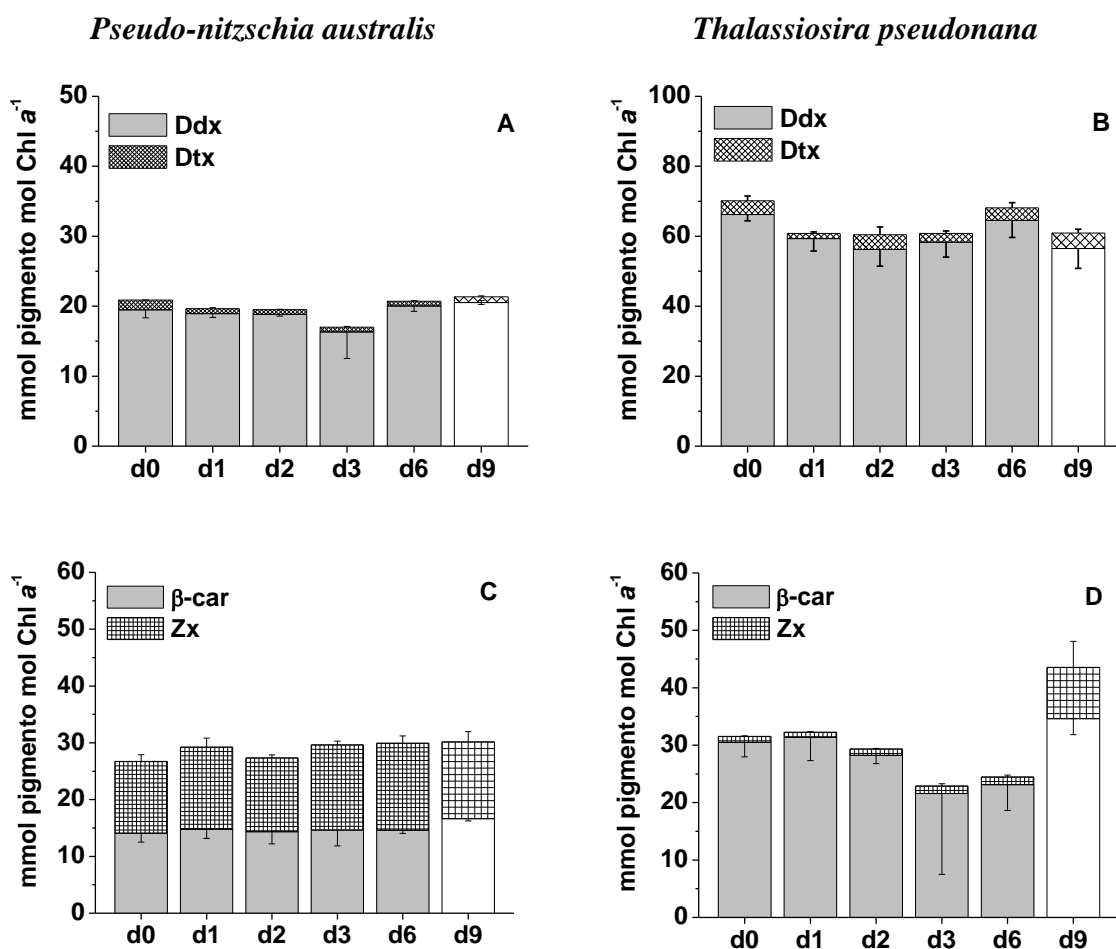


Figura 27. Cambios en la concentración de los pigmentos diadinoxantina (Ddx), diatoxantina (Dtx), β -caroteno (β -car) y zeaxantina (Zx) en cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Thalassiosira pseudonana*, expuestos a una alternancia entre el crecimiento en luz ($30 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, barras vacías) y en oscuridad (barras oscuras). Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres cultivos independientes.

IV.4. Discusión y conclusión

IV.4.1. Respuesta al cambio en la condición de irradiancia y disponibilidad de N-orgánico

Diversos estudios han identificado a la luz como un factor importante para la producción de AD en *Pseudo-nitzschia* spp. (Bates et al. 1991; Garrison et al. 1992; Cusack et al. 2002), asociando la biosíntesis de la toxina con la necesidad de energía fotosintética (Bates, 1998). En el presente trabajo, las condiciones de oscuridad (en ausencia o presencia de ácido glutámico) se asociaron a contenidos bajos de la toxina, y nulo crecimiento poblacional, posiblemente debidos a la ausencia de fotosíntesis neta durante esta condición. El mayor contenido de AD se presentó en la forma disuelta, y correspondió a la condición de LL (control), en tanto que la condición de HL presentó el mayor contenido de AD celular. Posiblemente la energía fotosintética en exceso en las condiciones de LL y HL, es utilizada en la producción de AD.

Osada y Stewart (1997) reportan que la presencia de los aminoácidos ácido glutámico o prolina estimula la liberación de AD en *P. multiseriis*. Contrario a esto, los resultados obtenidos mostraron que la presencia de ácido glutámico en condiciones de alta o baja irradiancia, resulta en concentraciones menores de la toxina. Posiblemente la menor producción de ácido domoico, esté relacionada al metabolismo de nitrógeno en presencia de una fuente orgánica, Parker y Armbrust (2005) reportan para *T. pseudonana* que la presencia amonio resulta en menor concentración de las enzimas nitrato reductasa (NR) y glutamina sintetasa (GSII), y por consiguiente en menor utilización de N comparado a la presencia de nitrato. Por consiguiente, la menor producción de toxina en presencia de ácido glutámico, puede estar relacionada a una disminución en la utilización de nitrógeno ocasionada por la presencia de esta fuente de nitrógeno. Se ha observado que cuando las algas están expuestas a niveles de irradiancia donde no existe fotosíntesis neta, detienen su crecimiento e incorporan materia orgánica disuelta para el mantenimiento de la integridad estructural y actividades metabólicas a niveles mínimos (Mock y Junge, 2007), y que después de un periodo de oscuridad su capacidad fotosintética se incrementa (Yentsch y Reichert, 1963; Talling, 1966; Jorgensen, 1968; Griffiths, 1973; Smayda y Mitchell-Innes

1974; Cota, 1985; Peters, 1996; Peters y Thomas 1996a, 1996b; Berges y Falkowski, 1998). Los resultados observados para la condición de oscuridad coincidieron con estas observaciones, al presentar disminución en la concentración de la toxina, y altas tasas de fotosíntesis máxima (P_s^{β}) y eficiencia de utilización de luz (α^{β}). En la condición control (LL), los valores de P_s^{β} y α^{β} fueron mayores que los observados en alta irradiancia (HL) y no se observaron diferencia en estos valores en presencia de ácido glutámico.

La concentración de los pigmentos fotoprotectores diadinoxantina y diatoxantina en los diferentes tratamientos de irradiancia no presentaron diferencias significativas, por lo que posiblemente la disipación del exceso de energía a través de pigmentos fotoprotectores no representa una respuesta de aclimatación para *P. australis*. Algunos fotótrofos adaptados a frío consumen energía fotoquímica a través de diferentes rutas de fijación de carbono (Morgan-Kiss et al. 2006), por lo que la producción de AD posiblemente se presente como una respuesta al incremento de las tasas fotosintéticas, cumpliendo así alguna función en la regulación de la fotoprotección.

IV.4.2. Alternancia entre el crecimiento en luz y sobrevivencia en oscuridad

Algunas diatomeas son capaces de sobrevivir en total oscuridad desde algunas semanas hasta varios meses en estado vegetativo. Particularmente, especies antárticas pueden sobrevivir hasta 90 días en oscuridad a -1.8°C (Bunt y Lee, 1972; Peters y Thomas, 1996a; Peters y Thomas 1996b). Se ha observado que el periodo de sobrevivencia para especies de zonas templadas es de entre 21 y 126 días a 10 y 18°C (Ignatiades y Smayda, 1970; Smayda y Mitchell-Innes 1974; Antia, 1976; Anderson, 1976; Mengelt y Prezelin, 2002), respectivamente; mientras que el periodo de sobrevivencia a 20°C se encuentra entre 7 y 180 días (Antia y Cheng, 1970; Hargraves y French, 1975; Antia, 1976). Se ha especulado que después de periodos de oscuridad que van de meses a años, las diatomeas que sobreviven en estado vegetativo pueden requerir una fase de acondicionamiento de hasta 20 días ya que necesitan reconstruir y reorganizar el contenido celular antes de su división (Peters y Thomas, 1996a). Los resultados mostraron un crecimiento inmediato en las células de *P. australis* al re-exponerse a luz, mientras que para *T. pseudonana* el crecimiento declinó.

Las diferencias en el potencial de sobrevivencia en oscuridad entre especies se han asociado a su relativa capacidad de minimizar el daño celular, el cual finalmente resulta en pérdida de viabilidad (Smayda y Mitchell-Innes 1974). La viabilidad de las células, se ha asociado principalmente con su capacidad de preservación del aparato fotosintético, el cual es vital para el metabolismo en condiciones favorables de luz (Dehning y Tilzer, 1989; du Preez y Bate, 1992; Peters y Thomas, 1996a). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que durante el periodo de oscuridad (6 días), la capacidad fotosintética se redujo en un 20% para *P. australis* y en 53% para *T. pseudonana*. Al tercer día de ser reintroducidas a luz, la actividad fotosintética en *T. pseudonana*, fue cuatro veces mayor que el registrado previo a la incubación en oscuridad, sin embargo este valor fue 20 veces menor que el registrado para *P. australis*, para quien solo se observó el incremento en 1.4 veces. Considerando estos resultados, se tiene que *P. australis* es capaz de mantener una alta viabilidad en oscuridad, lo cual le permite responder de manera eficiente a cambios en las condiciones de irradiancia.

La tasa fotosintética mayor observada en *P. australis*, se puede atribuir a una eficiencia de utilización de luz absorbida más alta en comparación a *T. pseudonana* (valor de α^β , 55 veces mayor que el correspondiente a *T. pseudonana*). Al parecer *P. australis* está mejor adaptada a condiciones de baja irradiancia que *T. pseudonana*, ya que también mostró reducción en el punto de saturación por luz (E_k), y menor sensibilidad a la fotoinhibición (β). No se observó variación en el contenido de los pigmentos (clorofila *a*, diadinoxantina, diatoxantina, y β -caroteno) como respuesta a cambios en las condiciones de irradiancia para ninguna de las especies. Los resultados observados en este trabajo coinciden con los obtenidos para otras diatomeas (*Thalassiosira weissflogii*, *T. gravida*, *T. rotula*, *T. antarctica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis chuii*, *Skeletonema costatum*), quienes después de diferentes periodos de oscuridad (12 horas a 90 días), incrementan su capacidad fotosintética y el número celular, manteniendo estable la relación de pigmentos (Jørgensen, 1968; Griffiths, 1973; Smayda y Mitchell-Innes 1974; Peters y Thomas 1996a, 1996b; Berges y Falkowski, 1998).

Capítulo V

Evaluación *in vitro* de la absorción del ácido domoico en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) utilizando el modelo del intestino invertido

V.1. Introducción

El ácido domoico (AD) es un potente neurotóxico relacionado al grupo de aminoácidos excitatorios, producido por algunas macroalgas y diatomeas y es el responsable de la enfermedad neurotóxica conocida como envenenamiento amnésico por consumo de moluscos (ASP). La transferencia de la toxina en la red trófica, su acumulación y probable transformación en ciertos organismos causa intoxicación a consumidores de niveles superiores (Mariën, 1996; Lefebvre et al. 1999, 2001; Costa y Garrido, 2004; Vigilant y Silver, 2007; Bargu et al. 2008; Goldstein et al. 2008; Lefebvre y Robertson, 2010). El incremento en la frecuencia de florecimientos de diatomeas productoras de AD a nivel mundial representa una amenaza continua a la salud y seguridad alimentaria, ya sea por envenenamiento agudo o por una toxicosis crónica ocasionada por la exposición repetitiva durante largo plazo a niveles bajos de AD (Lefebvre y Robertson, 2010). Los síntomas neurotóxicos observados en humanos, aves y mamíferos marinos incluyen confusión, desorientación, vómito, diarrea, pérdida de memoria de corto plazo, convulsiones, en casos severos coma y la muerte. Efectos similares han sido observados en estudios de laboratorio con ratones, ratas y monos (Iverson et al. 1990; Tryphonas et al. 1990; Truelove e Iverson, 1994; Lefebvre y Robertson, 2010). En peces, se han observado síntomas clínicos como nado en espiral, ascenso-descenso y nado en círculos (Lefebvre et al. 2001).

Los efectos excitotóxicos del ácido domoico se ejercen debido a su similitud estructural con los ácidos glutámico, ácido aspártico y ácido kainico, lo que le permite interactuar en el sistema nervioso central con receptores ionotrópicos de glutamato (GLURs), con la participación y co-activación de receptores del subtipo 2-amino-3-hidroxi-5-meti-4-isoxazolepropionato (AMPA), kainato (KA) y N-metil-D-aspartato (NMDA). Además, la movilidad reducida de la molécula cuando se acopla al sitio de enlace del receptor ocasiona un incremento en la eficiencia de enlace (Lefebvre y

Robertson, 2010). Desde 1987, se han desarrollado estudios de exposición al AD en varias especies de vertebrados, en los que se han utilizado rutas de administración oral o por inyección (intraperitoneal, intravenosa, intra-arterial, intrauterina o directa al cerebro). La severidad en los efectos de la toxina está influenciada por la ruta de exposición; por ejemplo, los tratamientos intraperitoneales e intravenosos producen signos clásicos de envenenamiento a dosis significativamente bajas en comparación con la exposición a dosis orales (Grant et al. 2010). Lo anterior, posiblemente debido a la capacidad de adaptación del sistema de transporte intestinal a interferencias en la ingestión de un aminoácido específico debido a cambios en los niveles dietarios (Mayer y Westbrook, 1987; Maenz et al. 1993; Jean et al. 2001). La fuente de exposición al AD para humanos y fauna marina de vida libre es el consumo dietario por lo que la exposición oral es considerada la ruta ecológica más relevante (Lefebvre y Robertson, 2010).

El ácido domoico se relaciona al grupo de aminoácidos excitatorios, para los cuales existe un sistema de transportadores (EAAT) de alta afinidad integrado por cinco miembros; de estos, el transportador EAAT3 es el más ampliamente distribuido fuera del cerebro (duodeno, yeyuno, íleon, corazón, hígado y pulmón), por lo que se considera como la principal isoforma de EAAT responsable del abastecimiento de aminoácidos aniónicos para procesos metabólicos celulares generales (Seal y Amara, 1999).

Durante florecimientos tóxicos de *Pseudo-nitzschia*, no se han observado efectos de intoxicación en peces planctívoros expuestos de manera natural a niveles importantes de AD (Lefebvre et al. 2001). Asimismo, la susceptibilidad similar a la de aves y mamíferos solo se ha observado en peces cuando estos son expuestos al AD mediante inyección intracelómica (Lefebvre et al. 2001). Por lo tanto se ha considerado a los peces como tolerantes al consumo dietario de ácido domoico, desconociéndose su mecanismo de absorción.

En la región de Ensenada Baja California, el cultivo de atún aleta azul se ha convertido en una actividad de gran importancia económica, en la cual se utilizan grandes cantidades de sardina fresca como alimento. Considerando que la sardina es uno de los principales vectores implicados en eventos de mortalidad masiva de aves y mamíferos marinos, es probable que también lo pueda ser para el atún aleta azul. Sin embargo, no se

conoce si este organismo es capaz de incorporar esta toxina a través del intestino, asimismo no se conoce la susceptibilidad del atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) al ácido domoico. Debido a esto, el presente estudio evaluó la absorción *in vitro* del AD y su comportamiento en presencia de una mezcla compleja de aminoácidos (triptona), ácido glutámico, ácido aspártico o prolina. Se utilizó el método del intestino invertido para comprender los mecanismos de absorción de la toxina y su comportamiento en presencia de otros aminoácidos. Asimismo, se comparó la respuesta de absorción con la que tiene el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), un organismo en los cuales se han identificado transportadores EAAT3 en el intestino.

V.2. Materiales y métodos

V.2.1. Obtención de extractos de ácido domoico

Extracto de *Pseudo-nitzschia australis*: La cepa clonal no axénica de *P. australis*, se cultivó en medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993) modificado con silicato (250 μM) y nitratos (100 μM) a 14 °C, a una irradiancia de 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo un ciclo 12 h luz: 12 h oscuridad, en cultivo estático hasta alcanzar la fase exponencial. La biomasa se colectó por centrifugación (1500 x g, 5 min, 4 °C) y la toxina se extrajo por disrupción mecánica en solución fisiológica Ringer (pH 7.4; 117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄·7H₂O y 2.5 mM CaCl₂), adicionando 150 mM NaCl para compensar la fuerza iónica en su uso con intestino de atún. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (13,000 g, 5 min, 4 °C) y el sobrenadante se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Hidrolizado de vísceras de sardina (*Sardinops sagax*): Para simular el proceso de digestión en atún, se preparó un hidrolizado de vísceras de sardina contaminada con AD obtenidas de la región de la Bahía de Todos Santos. Para este propósito, se hidrolizó siguiendo las etapas de digestión ácida y básica (Alarcón et al. 2002; Navarrete-del-Toro y García-Carreño, 2002; Matus-de-la-Parra et al. 2007).

Para la realización del hidrolizado se obtuvieron previamente extractos enzimáticos del páncreas de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Se transportaron al laboratorio los páncreas de atún aleta azul (*T. orientalis*) obtenidos de la granja comercial Bajamachi S.A. de C.V., Ensenada, B.C., México, burbujeados con O₂ en solución fisiológica Ringer (pH 7.4; 117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄·7H₂O y 2.5 mM CaCl₂) con 150 mM NaCl adicionales para compensar la fuerza iónica. El extracto enzimático se obtuvo homogenizando en frío (4 °C) un volumen de tejido pancreático por dos volúmenes de solución salina (NaCl al 10%) y recuperando el sobrenadante por centrifugación (4400 rpm, 30 min, 4 °C) para ser almacenado a -80 °C hasta su uso (Viana y Raa, 1991).

Se preparó una solución proteica de vísceras de sardina (*Sardinops sagax*) homogeneizando una cantidad apropiada de vísceras en agua destilada para producir (8 mg proteína mL⁻¹). En la primera etapa (hidrólisis ácida), 480 mL de la solución proteica, fue ajustada a un pH de 2.0 con HCl 1 N a 37 °C. Para iniciar la reacción, se adicionaron 12000 unidades de pepsina de páncreas de porcino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), deteniendo la reacción tras una hora de incubación ajustando el pH a 8.0 con una solución de NaOH 1 M. La segunda etapa de hidrólisis alcalina fue iniciada agregando 15 mL de extracto enzimático del páncreas de atún y manteniéndola a 37 °C durante 2 h a pH de 8.0 por adición de NaOH al 5%. La solución proteica ya hidrolizada fue centrifugada (4400 rpm, 15 min, 4°C) y el sobrenadante se almacenó a 4 °C hasta su uso.

V.2.2. Obtención de la región intestinal

Se obtuvieron al momento del sacrificio las vísceras de atún de la granja comercial Bajamachi, S.A. de C.V. Las vísceras de conejo se obtuvieron del Rancho los Columpios (Ensenada, B.C.). En fresco, se separó un fragmento del intestino proximal (parte más cercana a la región de los ciegos pilóricos) en atún aleta azul y de íleon (fragmento intestinal posterior a la unión íleocecal) en conejo. La sección removida se transportó al laboratorio en solución fisiológica Ringer (pH 7.4; 117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄·7H₂O, and 2.5 mM CaCl₂) con 150 mM NaCl adicionales para

el caso de atún, burbujeados con O₂ para mantener la viabilidad del tejido hasta su arribo al laboratorio (Buddington et al. 1987; Berge et al. 2004).

V.2.3. Absorción intestinal del ácido domoico

Los estudios de absorción de la toxina fueron realizados empleando la técnica del intestino invertido descrito por Rosas et al. (2008). Un extremo del fragmento de intestino disectado fue cerrado con una sutura quirúrgica y con ayuda de hilo fue invertido hacia el otro extremo, quedando la pared mucosa expuesta y la capa sérica hacia el interior del intestino. Los intestinos ya invertidos fueron enjuagados, montados en tubos de vidrio parte del reactor diseñado por Rosas et al. (2008) y preincubados en solución Ringer a temperatura ambiente por 15 min, bajo burbujeo constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Previo al análisis de absorción intestinal, la solución Ringer fue cambiada por la solución experimental correspondiente, adicionando 300 µL de solución Ringer en el interior del intestino. Durante el experimento, los reactores se mantuvieron burbujeando las soluciones con la mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂, y muestras individuales (30 µL) de cada unidad experimental fueron colectadas a los 0, 15, 30, 45 y 60 min después de iniciado el experimento, y almacenadas a -80 °C hasta su análisis. Al finalizar el ensayo, se midió el área de absorción de los intestinos midiendo el largo y el diámetro de estos.

La absorción de AD en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), se evaluó utilizando como soluciones experimentales: Extracto de *P. australis* (30.60 nmol AD mL⁻¹), hidrolizado de vísceras de sardina (35.65 nmol AD mL⁻¹), extracto de *P. australis* conteniendo Triptona (Bacto Tryptone, Difco, 2 mg mL⁻¹), extracto de *P. australis* conteniendo ácido glutámico a tres concentraciones (0.05, 0.25 y 0.45 mg Glu mL⁻¹) e hidrolizado de vísceras de sardina conteniendo por separado ácido glutámico, ácido aspártico y prolina a concentraciones de 0.25, 0.08 0.10 mg mL⁻¹, respectivamente.

La absorción de la toxina en conejo (*Oryctolagus cuniculus*), se evaluó utilizando como solución experimental extracto de *P. australis* y extracto de *P. australis* conteniendo

por separado ácido glutámico, ácido aspártico y prolina a concentraciones de 0.25, 0.08 y 0.10 mg mL⁻¹, respectivamente.

V.2.4. Cuantificación de ácido domoico

Para la determinación de ácido domoico, las muestras se centrifugaron (5000 x g, 5 min, 4°C), el sobrenadante obtenido se diluyó con agua de mar y se analizó de acuerdo a lo descrito en la sección II.2.5 de Materiales y métodos del Capítulo II del presente trabajo.

V.2.5. Análisis estadístico

La significancia de las diferencias en la absorción del ácido domoico se determinó usando un análisis de varianza (ANOVA). La asociación entre los tratamientos fue analizada utilizando la prueba *a posteriori* de Tukey (Zar, 1999). Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el programa Statistica (StatSoft Inc.).

V.3. Resultados

La absorción específica máxima promedio de AD del extracto de *P. australis*, utilizando la región proximal del intestino invertido de atún aleta azul (*T. orientalis*) fue de 1.8 nmol AD cm⁻² a los 30 min (Fig. 28, Tabla VI). En presencia de triptona (mezcla compleja de aminoácidos) la absorción se redujo significativamente ($\rho < 0.05$) a 0.83 nmol AD cm⁻² (53 % del máximo). La absorción de AD utilizando el hidrolizado de sardina (1.9 nmol AD cm⁻²) en la región proximal del intestino de atún aleta azul (Fig. 28) no mostró diferencia significativa ($\rho > 0.05$) con el extracto de *P. australis* en los diferentes tiempos evaluados. La tasa de absorción más alta de la toxina se registró con el hidrolizado de sardina con mayor concentración inicial de AD (35.65 nmol AD mL⁻¹), valor que no mostró diferencia ($\rho > 0.05$) con el valor registrado para el extracto de *P. australis* con menor concentración inicial de AD (30.60 nmol AD mL⁻¹) (Tabla VI). Independientemente de la matriz en la que se presentó la toxina, la absorción de AD no mostró diferencia significativa en los diferentes tiempos evaluados (Fig. 28).

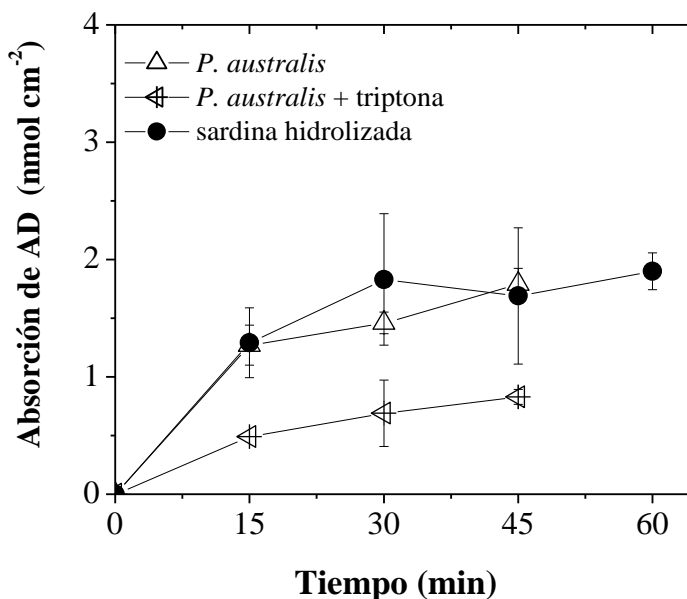


Figura 28. Absorción específica en diferentes extractos de ácido domoico, utilizando la región proximal del intestino invertido de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos representan la media \pm error estándar de tres réplicas.

Tabla VI. Absorción específica máxima y tasa media de absorción en diferentes extractos de ácido domoico, utilizando intestino proximal de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos representan la media \pm error estándar de tres réplicas.

Extracto	Absorción máx (nmol AD cm ²)	Tasa de absorción (pmol cm ⁻² min ⁻¹)
<i>P. australis</i> (30.60 nmol AD mL ⁻¹)	1.79 (0.13) ^a	48.6 (2.1) ^{a,b}
<i>P. australis</i> + Triptona (2 mg mL ⁻¹)	0.83 (0.063) ^b	23.0 (6.0) ^a
Sardina hidrolizada (35.65 nmol AD mL ⁻¹)	1.90 (0.15) ^a	61.0 (13.0) ^b

Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En la evaluación de la absorción de AD en presencia de diferentes concentraciones de ácido glutámico, para conocer si comparten el mismo sistema transportador de aminoácidos, no se encontró diferencia ($p > 0.05$) en la absorción de AD utilizando el extracto de *P. australis* con la absorción del extracto conteniendo la concentración más

baja de ácido glutámico (0.05 mg Glu mL⁻¹). Sin embargo, la presencia de concentraciones mayores del aminoácido (0.25 y 0.45 mg Glu mL⁻¹) resultó en mayor absorción ($\rho < 0.05$) en comparación al control (sin ácido glutámico). La máxima absorción de la toxina (1.92 nmol AD cm²) se detectó en presencia de 0.25 mg Glu mL⁻¹ (Tabla VII, Fig. 29). A su vez, las tasas de absorción máxima se incrementaron a diferentes tiempos en presencia del ácido glutámico, para las concentraciones de 0.05 y 0.25 mg Glu mL⁻¹ las tasas de absorción registradas a los 15 y 45 min respectivamente, fueron casi el doble del valor máximo registrado para el control a los 45 min, sin embargo no se observó diferencia significativa ($\rho > 0.05$) entre estas. La mayor tasa de absorción (90 pmol cm⁻² min⁻¹) registrada a los 15 minutos en presencia de 0.45 mg Glu mL⁻¹, fue superior ($\rho < 0.05$) a las anteriores (Tabla VII). A su vez, la presencia del ácido glutámico resultó en el incremento de las tasas de absorción máxima a diferentes tiempos, para las concentraciones de 0.05 y 0.25 mg Glu mL⁻¹ las tasas de absorción se registraron a los 15 y 45 min respectivamente, presentando casi el doble del valor máximo registrado para el control.

Tabla VII. Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico a diferentes concentraciones, en intestino proximal de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos son la media \pm error estándar de tres réplicas.

Extracto	Absorción máx (nmol AD cm ²)	Tasa de absorción (pmol cm ⁻² min ⁻¹)
<i>P. australis</i>	1.03 (0.20) ^a	22.8 (2.2) ^a
<i>P. australis</i> + ác. glutámico (0.05 mg mL ⁻¹)	0.71 (0.52) ^a	47.0 (17.4) ^a
<i>P. australis</i> + ác. glutámico (0.25 mg mL ⁻¹)	1.92 (0.08) ^b	42.0 (0.89) ^a
<i>P. australis</i> + ác. glutámico (0.45 mg mL ⁻¹)	1.35 (0.14) ^b	90.0 (4.6) ^b

Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($\rho < 0.05$).

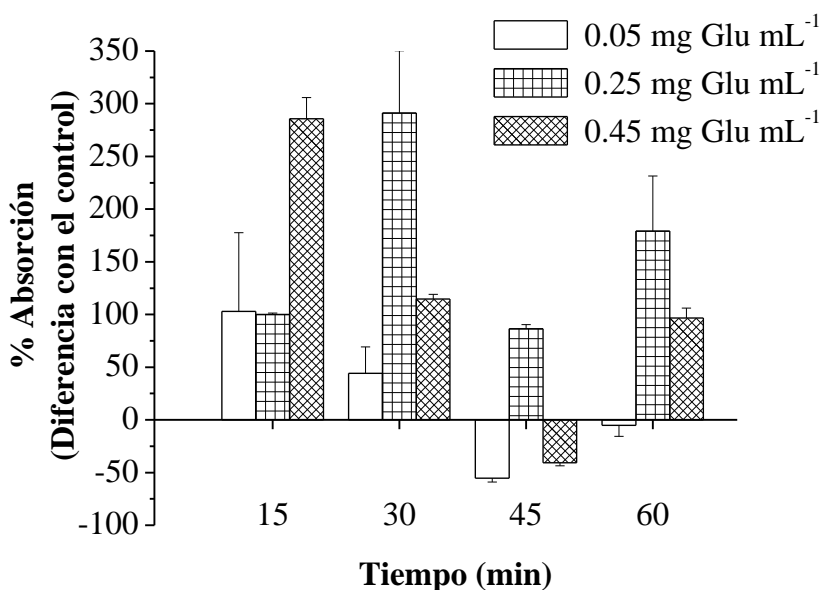


Figura 29. Absorción de ácido domoico en presencia de diferentes concentraciones de ácido glutámico, en la región proximal del intestino de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control. Se presenta la media \pm error estándar de tres réplicas.

En la evaluación de absorción de la toxina en presencia de diferentes aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico y prolina), realizada para conocer si existe interferencia en la absorción de la toxina por la presencia de otros aminoácidos, se encontró que la presencia de ácido glutámico ($0.25 \text{ mg Glu mL}^{-1}$) y prolina ($0.10 \text{ mg Pro mL}^{-1}$) en el hidrolizado de sardina, resultó en valores de absorción máxima entre 4.15 y $4.65 \text{ nmol AD cm}^2$, los cuales no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) del control (Tabla VIII, Fig. 30). Las tasas de absorción máxima registradas en presencia del ácido glutámico (30 min) y prolina (60 min), no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) de la observada a los 60 min para el control ($66.11 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$). La presencia del ácido aspártico en el extracto presentó un valor de absorción máxima semejante al control, con una tasa de absorción máxima a los 45 min (Tabla VIII).

Tabla VIII. Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico (0.25 mg mL^{-1}), ácido aspártico (0.08 mg mL^{-1}) y prolina (0.10 mg mL^{-1}), utilizando la región proximal del intestino de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos son la media \pm error estándar de tres réplicas, excepto para el ácido aspártico (*valor único).

Extracto	Absorción máx (nmol AD cm^2)	Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$)
Sardina hidrozizada (SH)	3.97 (2.33)	66.11 (39.7)
SH + ác. aspártico (0.08 mg mL^{-1})	3.96*	87.9*
SH + ác. glutámico (0.25 mg mL^{-1})	4.65 (2.95)	77.42 (49.1)
SH + prolina (0.10 mg mL^{-1})	4.15 (0.58)	69.19 (9.60)

Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

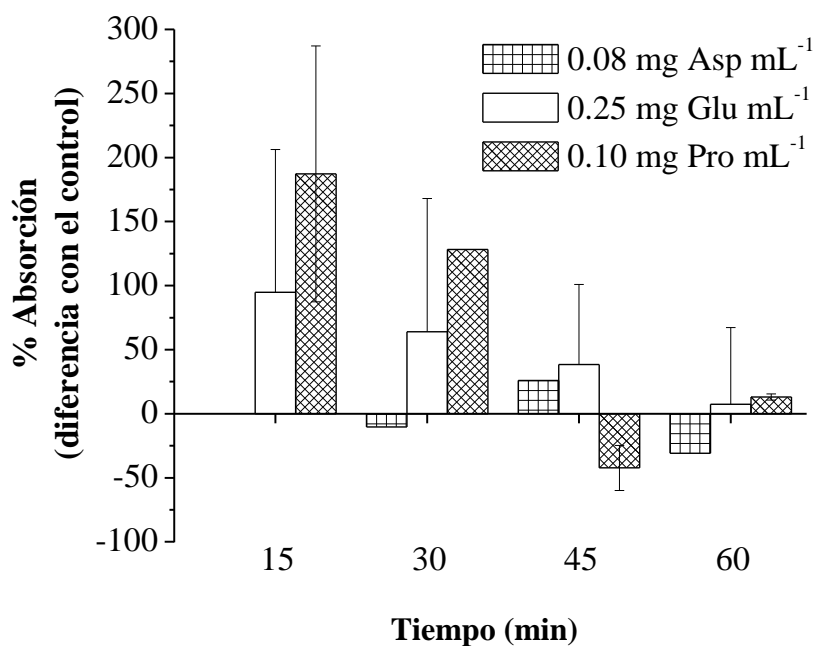


Figura 30. Absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico, ácido aspártico o prolina, en la región proximal del intestino de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control. Se presenta la media \pm error estándar de tres réplicas, excepto para el ácido aspártico (valor único).

La absorción del ácido domoico fue evaluada en íleon de conejo (*Oryctologus cuniculus*) en presencia de ácido glutámico, ácido aspártico y prolina. Los resultados mostraron una reducción del 57%; en la absorción máxima del ácido domoico ($1.39 \text{ nmol cm}^{-2}$) con respecto al control ($3.25 \text{ nmol cm}^{-2}$) en presencia de ácido aspártico (0.086 mg mL^{-1}). Se detectó asimismo una reducción de la absorción del AD en presencia del ácido glutámico (0.25 mg mL^{-1}) y prolina (0.10 mg mL^{-1}) de 22 y 29 % respectivamente, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con respecto a la absorción detectada en el control (Tabla IX, Fig. 31). La tasa de absorción máxima registrada en presencia del ácido aspártico ($92.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) a los 15 min, no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) de la observada a los 30 min para el control ($92.6 \text{ pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$). La presencia del ácido glutámico y prolina en el extracto resultaron en tasas de absorción máxima a los 45 min, presentando valores menores con respecto al control (Tabla IX).

Tabla IX. Absorción máxima específica y tasa media de absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico (0.25 mg mL^{-1}), ácido aspártico (0.08 mg mL^{-1}) y prolina (0.10 mg mL^{-1}), utilizando la región íleocecal del intestino de conejo. Los datos son la media \pm error estándar de tres réplicas.

Extracto	Absorción máx (nmol AD cm^{-2})	Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$)
<i>P. australis</i>	3.25 (0.55) ^a	108.3 (29.2) ^a
<i>P. australis</i> + ác. glutámico (0.25 mg mL^{-1})	2.54 (0.53) ^{a,b}	55.3 (7.10) ^b
<i>P. australis</i> + ác. aspártico (0.08 mg mL^{-1})	1.39 (0.40) ^c	92.6 (13.4) ^a
<i>P. australis</i> + prolina (0.10 mg mL^{-1})	2.31 (0.07) ^b	51.3 (0.78) ^b

Valores en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La absorción del ácido domoico en íleon de conejo ($3.25 \text{ nmol AD cm}^{-2}$) utilizando como fuente de la toxina a los extractos de *P. australis*, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la registrada en la región proximal de atún aleta azul (de 1.03 a $1.79 \text{ nmol cm}^{-2}$) (Tablas VI, VII, IX).

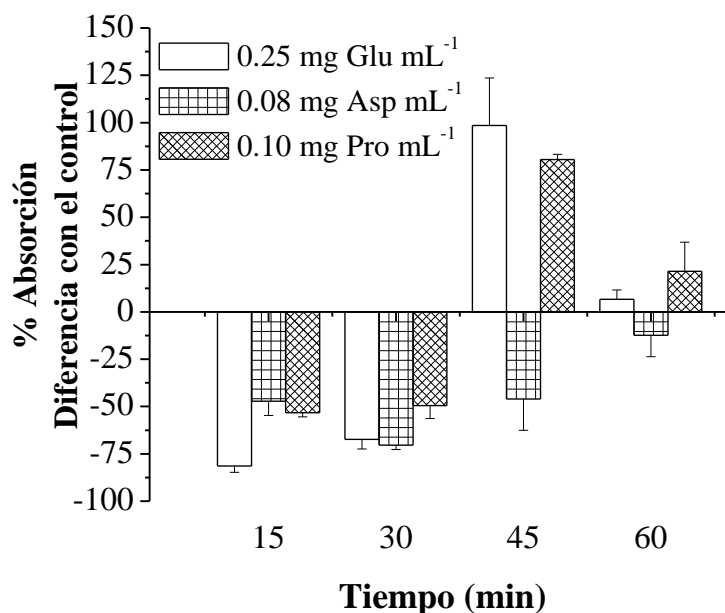


Figura 31. Absorción de ácido domoico en presencia de ácido glutámico, ácido aspártico o prolina, utilizando la región íleocecal del intestino de conejo. Los datos están expresados como la diferencia en porcentaje con respecto al control, y representan la media \pm error estándar de tres réplicas.

V.4. Discusión y conclusión

La absorción de sustancias y/o nutrientes se realiza por diferentes mecanismos, entre los que se incluyen la difusión independiente de transportadores, el transporte facilitado y el transporte activo (Mailliard et al. 1995). La absorción intestinal de aminoácidos, involucra un gran número de sistemas de transporte (sistema neutral (Z), básico (Y^+), ácido (X^-_{AG}), iminoglicina y β -aminoácido), los cuales aceptan grupos de aminoácidos más que aminoácidos individuales (Bröer, 2008). Debido a esto, se considera que entre los diversos sistemas transportadores de aminoácidos presentes se pueden presentar interacciones, ya sea por la especificidad del sustrato o por la posibilidad de que un aminoácido pueda ser transportado por más de un sistema transportador (Ferraris y Ahearn, 1984; Maenz et al. 1993; Mailliard et al. 1995; Jean et al. 2001).

Los aminoácidos excitatorios (EAA) presentan un sistema de transporte dependiente de sodio denominado sistema X_{AG}^- , que transporta L-glutamato, L-aspartato y D-aspartato con alta afinidad. En mamíferos se han identificado al menos cinco subtipos de transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs), de los cuáles los subtipos EAAT4 y EAAT5, se distribuyen en la retina y cerebelo del sistema nervioso central (SNC) respectivamente, mientras que los subtipos restantes se distribuyen además del sistema nervioso central (SNC), en el tejido periférico y retina (EAA1), en la placenta y retina (EAA2) y en el tejido periférico EAAT3 (Seal y Amara, 1999).

La presencia de síntomas en el sistema nervioso central e intestino, ocasionados por la ingestión de AD, se han relacionado con el papel transmisor del glutamato en el intestino. La habilidad de ingerir glutamato se presenta en la mayoría de las células y tejidos, y el transportador EAAT3 se ha expresado en neuronas entéricas del sistema digestivo (Danbolt, 2001). Por lo que considerando la similitud estructural del ácido domoico con el ácido glutámico, posiblemente la ingestión de la toxina es regulada por el sistema de transporte de aminoácidos excitatorios EAAT3 del sistema nervioso entérico.

El mecanismo de absorción del ácido domoico en peces es poco conocido. La absorción intestinal de AD en peces, ha sido evaluada solamente por Lefebvre y colaboradores (2007), quienes expusieron a juveniles de salmón (*Oncorhynchus kisutch*) a la toxina mediante alimentación por sonda. Los resultados mostraron una absorción rápida de la toxina en los primeros 15 min de exposición. En el presente estudio, utilizando una aproximación *in vitro* (sistema de intestino invertido), también se registró una rápida absorción de la toxina en atún aleta azul. La absorción máxima de AD se detectó en los primeros 15 min independientemente de la matriz en la que se presentó la toxina, extracto de *P. australis* o hidrolizado de vísceras de sardina con AD.

Por otra parte se detectó que durante los primeros minutos la presencia de triptona ($0.83 \text{ nmol cm}^{-2}$) causó una reducción en absorción del AD. Esto probablemente fue causado por el incremento en las concentraciones de otros aminoácidos, lo que sugiere una competencia del ácido domoico con otro(s) aminoácido(s) por los sitios de entrada de la toxina. Debido a esto se evaluó la absorción de la toxina en presencia de diferentes concentraciones del ácido glutámico, ácido aspártico y prolina. Los resultados mostraron

un aumento en la tasa de absorción del AD en presencia de ácido glutámico y prolina pero no en el caso del ácido aspártico. El incremento en la absorción de un aminoácido en presencia de otro aminoácido cuando ambos están inicialmente presentes extracelularmente se conoce como “estimulación competitiva” (Schafer y Jacquez, 1967). Si el ácido domoico y el ácido glutámico comparten el mismo sistema transportador de aminoácidos conocido como transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT), un incremento en la absorción del AD puede ser atribuída a la mayor afinidad de esta molécula por el transportador. Por lo tanto, en presencia de su competidor, se observa un incremento en su absorción. En el caso de la prolina, se conoce que este aminoácido es transportado por el sistema de iminoglicina (Matthews, 2000). Por lo tanto, el aumento en la absorción del AD en presencia de este aminoácido sugiere la posibilidad de que esta toxina pueda interactuar asimismo con el sistema transportador de iminoglicina. Lo respuesta observada coincide con diversos estudios que han reportado la interacción del ácido domoico con el sistema de transportadores que regula la ingestión del glutamato (Fonnum, 1984; Danbolt et al. 1992; Levy et al. 1993; Rothstein et al. 1994; Ross et al. 2000).

La eficiencia de utilización de aminoácidos dietarios en diferentes organismos depende de las características del alimento (digestibilidad, patrón y nivel de aminoácidos) y de su capacidad de regular la tasa de absorción de aminoácidos para prevenir la ocurrencia de niveles tóxicos en la sangre (Nolles et al. 2007). Algunos estudios han indicado que el transporte intestinal de solutos orgánicos en peces es menor que los reportados para mamíferos, sugiriendo la existencia de un mayor número de sitios de enlace para algunos aminoácidos para este último grupo de organismos (Ferraris y Ahearn, 1984; Bakke-McKellep et al. 2000). Coincidiendo con esto, en el presente estudio se observó que la absorción del ácido domoico en atún es 0.8 veces menor que en el íleon de conejo. Asimismo, las tasas de absorción en atún representaron entre el 21 y 44% del valor registrado para el conejo. Otra diferencia importante observada entre la absorción de AD en intestino de atún y conejo fue que el ácido glutámico y prolina aumentan la incorporación de la toxina en atún pero no en conejo, mientras que la adición de ácido aspártico, reduce para ambos organismos la absorción máxima de la toxina. Esta diferencia en la absorción

de la toxina, depende posiblemente de la capacidad de cada organismo para regular la absorción de un aminoácido en específico.

La diferenciación anatómica y fisiológica de la región absorptiva del tracto intestinal puede ser uno de los factores responsables de las diferencias observadas en la absorción del ácido domoico entre atún aleta azul y conejo. Asimismo, se tienen que considerar los requerimientos metabólicos específicos de estos organismos. Los peces, especialmente las especies migratorias y carnívoras, utilizan a los aminoácidos como el principal sustrato para la gluconeogénesis y como principal fuente de energía oxidativa, debido a que sus dietas son generalmente altas en proteínas y ácidos grasos, pero bajas en carbohidratos (Bequette, 2003). A su vez, los conejos poseen altas tasas metabólicas y su alimentación herbívora es baja en fibra y alta en carbohidratos y proteínas (Carabaño y Piquer, 1998; Irlbeck, 2001).

Estudios previos en peces carnívoros han registrado la remoción de casi todo el glutamato y aspartato dietario del tracto gastrointestinal durante el metabolismo absorptivo (Bequette, 2003). Específicamente para el atún aleta azul, utilizando la misma técnica que en el presente estudio se detectó que la mayor absorción de aminoácidos corresponde a aminoácidos no esenciales, dentro de estos el ácido glutámico (Martínez-Montaña et al. 2010; Peña-Marín, 2010). Los resultados sugieren la posibilidad de que los transportadores excitatorios del atún a diferencia de los existentes en conejo, presenten diferencias estructurales que le confieren menor afinidad por la toxina (AD).

En el presente estudio se comprobó que el atún aleta azul puede incorporar AD presente en su dieta, por lo que presenta en su intestino los transportadores involucrados en su absorción. La ausencia de reportes de síntomas de intoxicación en este organismo y en peces en general asociados a la incorporación de AD por vía dietaria indica que este grupo de organismos presentan un mecanismo eficiente de depuración de la toxina o las dosis incorporadas no han sido suficientes para causar efectos nocivos. Por tanto, se necesita caracterizar en detalle el proceso de absorción, la distribución en tejido y el mecanismo de depuración del AD, en peces expuestos al ácido domoico en su dieta.

Capítulo VI

Discusión General

VI.1. Especies del género *Pseudo-nitzschia* en la Bahía de Todos Santos

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* son considerados miembros comunes de la comunidad fitoplanctónica del Sistema de la Corriente de California (Trainer et al. 2010). A pesar de que en la costa Sur de California, se ha reportado la presencia de *P. australis*, *P. multiseriata*, *P. pungens* y *P. pseudodelicatissima* (Buck et al. 1992; Lange et al. 1994; Busse et al. 2006), en la costa Noroeste de Baja California solamente se ha confirmado la presencia de *P. australis* (Barocio-León et al. 2008; García-Mendoza et al. 2009; Cabrales-Talavera, 2010) y *P. pungens* (Hernandez-Becerril, 1998; Cabrales-Talavera, 2010), observándose también la presencia de especímenes de menor tamaño (Cabrales-Talavera, 2010). Durante el proceso de aislamiento del presente estudio, se evaluaron diferentes condiciones (medios de cultivo, irradiancia, agitación) y solamente se lograron aislar cepas de *P. australis* y *P. decipiens*, por lo que posiblemente el factor temperatura (14 °C) limitó el crecimiento de especies como *P. multiseriata*, *P. pungens* reportadas en zonas cercanas y posiblemente de especies clasificadas dentro de los complejos *P. delicatissima* y *P. pseudodelicatissima*.

VI.2. Factores relacionados al crecimiento de *Pseudo-nitzschia australis*

El crecimiento de especies del género *Pseudo-nitzschia* está asociado a una variedad de factores, destacando entre estos la temperatura y nutrientes (Trainer et al. 2008; Kudela et al. 2010). La temperatura es considerada un factor ambiental importante que puede interaccionar con la limitación de nutrientes y luz para el crecimiento fitoplanctónico (Eppely 1972, Rhee 1981, Raven y Geider, 1988). El intervalo de temperatura para el crecimiento óptimo de *P. australis* no se había caracterizado con anterioridad. Los florecimientos de *P. australis* en aguas del Pacífico se han presentado cuando la

temperatura superficial del mar está entre 12.5 y 15.5 °C en la parte central y sur de California (Walz et al. 1994; Kudela et al. 2004a; Busse et al. 2006; García-Mendoza et al. 2009; Montecino y Lange, 2009), y las cepas aisladas de estas áreas han sido cultivadas a 15 °C (Garrison et al. 1992; Maldonado et al. 2002; Kudela et al. 2004b; Wells et al. 2005; Armstrong-Howard et al. 2007; Cochlan et al. 2008). El intervalo reducido de temperatura (12 y 14 °C) para el crecimiento óptimo (alta acumulación de biomasa y fase exponencial larga) observado en este estudio, concuerda con la distribución y formación de florecimientos de *P. australis* en la parte Sur del Sistema de la Corriente de California, en donde las mayores abundancias de *P. australis* se presentan cuando la temperatura del agua se encuentra entre los 12 y 14 °C (Buck et al. 1992; Villac et al. 1993; Kudela et al. 2004a; Fehling et al. 2004b; Busse et al. 2006; Fawcett et al. 2007; García-Mendoza et al. 2009; Palma et al. 2010). Por otro lado, una baja acumulación de biomasa a los 15 °C y la inhabilidad para crecer por arriba de los 18 °C puede representar un factor limitante para la distribución de *P. australis* en la región central de California y parte norte de Baja California. En esta región, la temperatura superficial del agua de mar es mayor a los 15 °C de primavera a otoño (Lange et al. 1994), por lo que las condiciones óptimas para la acumulación de *P. australis* están asociadas a eventos de surgencias (Lange et al. 1994; Trainer et al. 2000; Trainer et al. 2008; Trainer et al. 2010), que traen agua subsuperficial fría (12-14 °C) a la superficie del mar y se presntan principalmente durante primavera y verano (Kudela et al. 2004a; Trainer et al. 2008; Checkley y Barth, 2009; Smayda y Trainer, 2010). Evidentemente, el rango de temperatura reportado aquí para *P. australis*, es un rasgo particular de las cepas aisladas en la región. Otras cepas pueden presentar diferentes preferencias de temperatura. Por ejemplo, *P. australis* aislada de las costas de Nueva Zelanda puede crecer a temperaturas superiores (17 y 19 °C) (Rhodes, 1998; Holland et al. 2005). Considerando que la temperatura es una variable ambiental importante para la acumulación de *P. australis* en la parte sur de la Corriente de California, temperaturas superficiales del mar entre los 12 y 14 °C puede ser un buen indicador de una posible acumulación de biomasa de esta especie.

La disponibilidad de macronutrientes, particularmente concentraciones adecuadas de $\text{Si}(\text{OH})_4$ y NO_3 , han sido consideradas importantes para el crecimiento de las agrupaciones naturales de especies del género *Pseudo-nitzschia* (Hutchins y Bruland, 1998; Bates, 1998; Bates et al. 1991; Trainer et al. 2000; Kudela et al. 2004a, Marchetti et al. 2004; Anderson et al. 2006; García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). Algunos estudios de campo han relacionado la acumulación de *P. australis* con una razón de silicatos:nitratos a nitratos baja (Anderson et al. 2006), mientras que otros trabajos sugieren que una alta concentración de silicatos a nitratos es un factor clave para su acumulación y hasta (García-Mendoza et al. 2009; Trainer et al. 2009). Sin embargo, los resultados observados el presente estudio durante la evaluación de dos condiciones de irradiancia (30 y 200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y dos relaciones Si: NO_3 (0.5- baja y 2.5-alta), sugieren que aunado a la disponibilidad de nitratos y silicatos la irradiancia es un factor importante para la acumulación de *P. australis*. En la parte sur del Sistema de la Corriente de California, los nitratos y silicatos no se presentan en concentraciones limitantes para el crecimiento fitoplanctónico entre los 12 y 14 °C. La concentración de estos nutrientes covaría con la temperatura, incrementándose a temperaturas menores de 15 °C (Zentara y Kamykoswki, 1977). Por lo tanto, las concentraciones de Si o NO_3 o sus relaciones molares por si solas, probablemente no son factores clave para el desarrollo de los florecimientos de esta especie.

VI.3. Factores relacionados a la producción de AD en *Pseudo-nitzschia australis*

Contrario a la evidencia de que en cultivo la limitación del crecimiento por estrés nutricional está asociada a un alto contenido de ácido domoico en *Pseudo-nitzschia* spp. (Bates et al. 1991; Pan et al. 1996a, 1996b; Fehling et al. 2004a). La evaluación del contenido de AD en diferentes fases de crecimiento de cultivos expuestos a diferentes temperaturas y relaciones silicatos:nitratos e irradiancias, mostraron la presencia de cantidades importantes de la toxina en condiciones fisiológicas específicas (fase de acondicionamiento, alta tasa fotosintética máxima y alta irradiancia). Por lo que la presencia de *P. australis* asociada a cambios en las condiciones de temperatura, nutrientes y

luz durante eventos de surgencia, representa un riesgo potencial de intoxicación por la posible inducción de una condición fisiológica en la que se produzcan cantidades importantes de AD.

Los resultados de la exposición de las células tanto a alta como a baja luz coinciden con la observación de que la biosíntesis de ácido domoico se asocia a la necesidad de energía fotosintética (Bates, 1998; Pan et al. 1998), al observar que concentraciones mayores de AD celular y disuelto coinciden con las mayores tasas fotosintéticas y tasas específicas de crecimiento más altas.

La principal respuesta de los organismos fotosintéticos a las condiciones ambientales es tratar de mantener la fotostasis, que es definida como el balance entre la energía absorbida a través de la fotoquímica y fotofísica (NADPH y ATP) y la energía utilizada a través del metabolismo y crecimiento (Huner et al. 2003; Öquist y Huner, 2003). Los valores de eficiencia fotosintética, regulación de la sección transversal de absorción y parámetro de saturación por luz observados para *P. australis* en condiciones de baja y alta irradiancia, y la ausencia de cambios en la concentración de pigmentos fotoprotectores registrado en éste estudio coinciden con la definición de Falkowski (1981) para organismos adaptados a sombra, los cuáles presentan una eficiente conversión de la irradiancia a energía fotosintética y generalmente sus mecanismos fotoprotectores son sacrificados en favor del aumento de la capacidad de cosecha de luz. Al parecer *P. australis* es un organismo adaptado a condiciones de baja irradiancia, el cual presenta una limitación en la respuesta de regulación de las tasas fotosintéticas y disipación de energía a través del incremento de los pigmentos fotoprotectores.

La asociación de concentraciones mayores de AD con las mayores tasas fotosintéticas observadas durante este estudio, coinciden con los reportes de que las diatomeas incorporan grandes cantidades de nitrato en condiciones de alta luz y baja temperatura (Dortch et al. 1979; Collos, 1980, 1982; Lomas y Glibert, 1999), y que una alta asimilación de NO_3 se presenta en condiciones de alta presión de excitación (Lomas y Gilbert, 1999).

Considerando que la asimilación de nitrógeno en exceso representa para algunas algas una vía para regular el balance entre el requerimiento de energía para procesos

metabólicos y la energía producida por fotoquímica (Lomas y Gilbert, 1999; Parker y Armbrust, 2005), la limitación de *P. australis* en la respuesta de regulación y disipación de energía y la coincidencia de concentraciones altas de AD con las mayores tasas fotosintéticas, se hipotetiza que la biosíntesis de ácido domoico actúa como un consumidor de electrones para reducir la presión de excitación en el aparato fotosintético.

En estudios previos se ha mostrado que algunas diátomeas son capaces de mantener su vitalidad después de prolongados periodos de oscuridad (Dehning y Tilzer, 1989; du Preez y Bate, 1992; Peters y Thomas, 1996a). Por lo que la respuesta favorable de crecimiento presentada por *P. australis* ante la alternancia entre oscuridad y luz, representa un riesgo potencial de desarrollo de florecimientos de esta especie a partir de poblaciones de células viables de *Pseudo-nitzschia* ubicadas en aguas profundas en condiciones de surgencia.

VI.4. Absorción del ácido domoico en peces

Se conoce poco del mecanismo de absorción del ácido domoico en peces, en estudios de laboratorio se ha confirmado la absorción de la toxina del tracto gastrointestinal y la consecuente presencia de síntomas de toxicidad (Lefebvre et al. 2001; Tiedeken et al. 2005; Schaffer et al. 2006; Lefebvre et al. 2007). Asimismo se ha sugerido que el AD dietario es confinado en el tracto gastrointestinal y eventualmente eliminado (Hardy et al. 1995).

La exposición dietaria ha sido considerada la ruta ecológica más relevante a utilizar durante la evaluación de riesgos potenciales a la salud (Lefebvre et al. 2010). La técnica denominada intestino invertido constituye una alternativa *in vitro* que permite la evaluación indirecta de la absorción de aminoácidos (Buddington et al. 1987). En este estudio, la utilización del sistema de intestino invertido, permitió confirmar la absorción de la toxina en atún aleta azul e identificar parcialmente su interacción con aminoácidos estructuralmente similares.

Considerando que en la acuicultura de atún aleta azul, durante el proceso de engorda se utilizan aproximadamente 100 kg sardina día⁻¹ para alimentar una jaula conteniendo de 1500 a 2000 peces (Zertuche-González et al. 2008), y que los peces planctívoros como la sardina concentran cantidades importantes de la toxina (~290 µg AD

g víscera⁻¹) (Cabrales-Talavera, 2010). De acuerdo a los resultados de absorción de la toxina en intestino de atún obtenidos en el presente estudio, existe la posibilidad de que la cantidad de toxina presente en el plasma sanguíneo después de la alimentación sea suficiente para causar síntomas de toxicidad como los observados por Lefebvre et al (2001) en la anchoveta (*Engraulis mordax*). Sin embargo, solo se conoce el proceso de excreción de ácido domoico en salmón (*Oncorhynchus kisutch*) después de su exposición oral (Lefebvre et al. 2007), por lo que la carencia de información acerca del proceso de depuración de la toxina en atún, limita la comprensión del posible efecto de su exposición a concentraciones de AD suministradas a través del alimento.

Referencias

Adams, N.G., Lesoing, M., Trainer, V.L., 2000. Environmental conditions associated with domoic acid in razor clams on the Washington coast. *J. Shellfish Res.* 19: 1007-1015.

Aifeng, L., Rencheng, Y., Yunfeng, W., Tian, Y., Mingjiang, Z., 2005. Morphological and toxicity characteristics of *Pseudo-nitzschia pungens* strain PP0201-01 isolated from the East China Sea. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 23(4): 418-426.

Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M., 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.* 82: 1–8.

Allen, J.F., 1998. Light, time and micro-organisms, In: Caddick, M.X., Baumberg, S., Hodgson, D.A., Phillips-Jones, M.K. (Ed.), *Microbial Responses to Light and Time*. Cambridge University, Cambridge, UK, pp. 1-31.

Álvarez, G., Uribe, E., Quijano-Scheggia, S., López-Rivera, A., Mariño, C., Blanco, J., 2009. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. *Harmful Algae* 8: 938-945.

Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D., Montresor, M., 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41: 542-556.

Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Levaldi Ghiron, J.H., Mann, D.G., Proschold, T., Montresor, M., 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.

Amato, A., Lüdeking, A., Kooistra, W.H.C.F., 2010. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea, Italy). *Toxicon* 55: 157-161.

Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L., Kudela, R., 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 327: 119–133.

Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4B): 704-726.

Anderson, J.M., Chow W.S., Park, Y.I., 1995. The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.* 46: 129-139.

Anderson, O.R., 1975. The ultrastructure and cytochemistry of resting cell formation in *Amphora coffeaeformis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 11: 272-281.

Anderson, O.R., 1976. Respiration and photosynthesis during resting cell formation in *Amphora coffeaeformis* (AG.) Kütz. *Limnol. Oceanogr.* 21: 452-456.

Antia, N., 1976. Effects of temperature on the darkness survival of marine microplanktonic algae. *Microb. Ecol.* 3: 41-54.

Antia, N.J., Cheng, J.Y., 1970. The survival of axenic cultures of marine planktonic algae from prolonged exposure to darkness at 20 °C. *Phycologia* 9(2): 179-183.

Armstrong-Howard, M.D., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N., Kudela, R.M. , 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6: 206–217.

Arsalane, W., Rousseau, B., Duval, J.C., 1994. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60: 237-243.

Assmy, P., Henjes, J., Klaas, C., Smetacek, V., 2007. Mechanisms determining species dominance in a phytoplankton bloom induced by the iron fertilization experiment EisenEx in the Southern Ocean. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 54: 340-362.

Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å., Buddington, R.K., 2000. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo arsal L.*). *Fish Physiol. Biochem.* 22: 33-44.

Bargu, S., Powell, C.L., Wang, Z.H., Doucette, G.J., Silver, M.W., 2008. Note on the occurrence of *Pseudo-nitzschia australis* and domoic acid in squid from Monterey Bay, CA (USA). *Harmful Algae* 7: 45-51.

Barocio-León, O.A., Millán-Nuñez, R. Santamaría del Ángel, E., Gonzalez-Silvera, A., Trees, C.C., Orellana-Cepeda, E., 2008. Bio-optical characteristics of a phytoplankton bloom event off Baja California Peninsula (30-311N). *Cont. Shelf Res.* 28: 672-681.

Bates, S.S., 1998. Ecophysiology and Metabolism of ASP Toxin Production, In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Ed.), *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 405-426.

Bates, S.S., Richard, J., 1996. Domoic acid production and cell division by *P. multiseriis* in relation to a light:dark cycle in silicate-limited chemostat culture, In: Penney, R. (Ed.), *Proceedings of the Fifth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., pp. 140-143.

Bates, S.S., Bird, C.J., Boyd, R.K., de-Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Hanic, L.A., Jamieson, W.D., McCulloch, A.W., Odense, P., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1988. Investigations on the source of domoic acid responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP) in eastern Prince Edward Island, In: Canada, N.R.C. (Ed.), Atlantic Research Laboratory Technical Report 57, p. 59.

Bates, S.S., Bird, C.J., Freitas, d., A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Rao, S., D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1203-1215.

Bates, S.S., Freitas, d., A.S.W., Milley, J.E., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Smith, J.C., Worms, J., 1991. Controls on Domoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* in Culture: Nutrients and Irradiance". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1136-1144.

Bates, S.S., Worms, J., Smith, J.C., 1993. Effects of ammonium and nitrate on growth and domoic acid production by *Nitzschia pungens* in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1248-1254.

Bates, S.S., Garrison, D.L., Horner, R.A., 1998. Bloom Dynamics and Physiology of Domoic-Acid-producing *Pseudo-nitzschia* Species, In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, a.G.M. (Ed.), Physiological ecology of harmful algal blooms. Springer-Verlag, Heidelberg.

Bates, S.S., Hiltz, M.F., Léger, C., 1999. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriis* resulting from sexual reproduction, In: Martin, J.L., Haya, K. (Ed.), Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences, St, Andrews, NB, Canada, pp. 21-26.

Bates, S.S., 2000. Domoic acid producing diatoms: another genus added! *J. Phycol.* 36(6): 978-983.

Bates, S.S., Léger, C., Satchwell, M., Boyer, G.L., 2000. The effects of iron on domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriis*, In: Hallegraeff, G.M. (Ed.), Proceedings of the Ninth Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmania.

Bates, S.S., Gaudet, J., Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., 2004. Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle; can bacteria produce domoic acid autonomously?. *Harmful Algae* 3: 11-20.

Bates, S.S., Trainer, V.L., 2006. The Ecology of Harmful Diatoms, In: Granéli, E., Turners, J.T. (Ed.), Ecology of Harmful Algae. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 81-93.

- Baugh, K.A., Bush, J.M., Bill, B.D., Lefebvre, K.A., Trainer, V.L., 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. *Afr. J. Mar. Sci.* 28: 403-407.
- Bell, A., 2003. Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2854-2865.
- Bequette, B.J., 2003. Amino Acid Metabolism in Animals: an Overview, In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino Acids in Animal Nutrition*. CABI Publishing, London, UK.
- Berge, G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, E., 2004. Intestinal absorption of amino acids in fish: kinetics and interaction of the in vitro uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 229: 265-273.
- Berges, J.A., Falkowski, P.G., 1998. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnol. Oceanogr.* 43(1): 129-135.
- Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V., Lee, R., 2008. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Møestrup et Hasle (bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae* 7: 438-442.
- Biswal, B., 2005. Photosynthetic response of green plants to environmental stress: Inhibition of photosynthesis and adaptational mechanism, In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of photosynthesis*. University of Arizona, Tucson, Arizona, pp. 731-741.
- Bröer, S., 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 88: 249-286.
- Buck, K.R., Chavez, F.P., 1994. Diatom aggregates from the open ocean. *J. Plankton Res.* 16(10): 1449-1457.
- Buck, K.R., Uttal-Cooke, L., Pilskaln, C.H., Roelke, D.L., Villac, M.C., Fryxell, G.A., Cifuentes, L., Chavez, F.P., 1992. Autecology of the diatom *Pseudonitzschia australis*, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84: 293-302.
- Buddington, R.K., Chen, J.W., Diamond, J., 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393: 261-281.
- Bunt, J.S., Lee, C.C., 1972. Data on the composition and dark survival of four sea-ice microalgae. *Limnol. Oceanogr.* 17: 458-461.
- Busse, L.B., Venrick, E.L., Antrobus, R., Miller, P.E., Vigilant, V., Silver, M.W., Mengelt, C., Mydlarz, L., Prezelin, B.B., 2006. Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA, USA. *Harmful Algae* 5: 91-101.

- Cabrales-Talavera, G., 2010. Distribución especial 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, CICESE, Ensenada B.C., México, p. 87.
- Campbell, A., D., Kelly, S., M., Busmann, M., Bolch, J., C., Wiggins, E., Moeller, R., P.D., Morton, L., S., Hess, P., Shumway, E., S., 2001. Amnesic shellfish poisoning in the king scallop, *Pecten maximus*, from the West Coast of Scotland. *J. Shellfish Res.* 20: 75-84.
- Carabaño, R., Piquer, J., 1998. The Digestive System of the Rabbit, In: de-Blas, C., Wiseman, J. (Ed.), *The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing, London.
- Caron, D.A., Garneau, M.È., Seubert, E., Howard, M.D.A., Darjany, L., Schnetzer, A., Cetinić, I., Filteau, G., Lauri, P., Jones, B., Trussell, S., 2010. Harmful algae and their potential impacts on desalination operations off southern California. *Water Res.* 44(2): 385-416.
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A., 2005. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4: 33-48.
- Checkley, D.M., Barth, J.A., 2009. Patterns and processes in the California Current System. *Prog. Oceanogr.* 83(1-4): 49-64.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vyverman, W., 2004. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *Int. Rev. Cytol.* 237: 91-154.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L., Vyverman, W., 2005. Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *Eur. J. Phycol.* 40(4): 379 - 395.
- Clarke, A., Leavey, R.J.G., 1996. The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients, and the microbial community in a nearshore Antarctic marine ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1281-1294.
- Cochlan, W.P., Price, N.M., Harrison, P.J., 1991. Effects of irradiance on nitrogen uptake by phytoplankton: comparison of frontal and stratified communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69: 103-116.
- Cochlan, W.P., Bronk, D.A., Coale, K.H., 2002. Trace metals and nitrogenous nutrition of Antarctic phytoplankton: experimental observations in the Ross Sea. *Deep-Sea Res. II* 49: 3365-3390.

- Cochlan, W.P., Herndon, J., Ladizinsky, N.C., Kudela, R.M., 2006. Nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis*, In: GEOHAB (Ed.), Open Science Meeting on HABs and Eutrophication. EOS Trans. Am. Geophys. Union, 87(36) suppl, Baltimore, MD, March 2005.
- Cochlan, W.P., Herndon, J., Kudela, R.M., 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). Harmful Algae 8(1): 111-118.
- Colombo-Pallotta, M.F., García-Mendoza, E., Ladah, L.B., 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis Pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. J. Phycol. 42: 1225-1234.
- Collos, Y., 1980. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 1. Changes in uptake parameters during nitrogen starvation. Limnol. Oceanogr. 25: 1075-1081.
- Collos, Y., 1982. Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. 2. Changes in nitrate and nitrite following a nitrate perturbation. Limnol. Oceanogr. 27(3): 528-535.
- Costa, P.R., Garrido, S., 2004. Domoic acid accumulation in the sardine *Sardina pilchardus* and its relationship to *Pseudo-nitzschia* diatom ingestion. Mar. Ecol. Prog. Ser. 284: 261-268.
- Cota, G.F., 1985. Photoadaptation of high Arctic ice algae. Nature 315: 219-222.
- Cusack, C.K., Bates, S.S., Quilliam, M.A., Patching J.W., Raine, R., 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish Waters. J. Phycol. 38: 1106-1112.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. 65(1): 1-105.
- Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., Kanner, B.I., 1992. An $[Na^+ - K^+]$ coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. Neuroscience 51: 295-310.
- Davidovich, N.A., Bates, S.S., 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 34: 126-137.
- Dehning, I., Tilzer, M.M., 1989. Survival of *Scenedesmus acuminatus* Chlorophyceae in darkness. J. Phycol. 25: 509-515.
- Demmig-Adams, B., 1990. Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochim. Biophys. Acta 1020: 1-24.

- Dortch, Q., 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61: 183-201.
- Dortch, Q., Ahmed, S.I., Packard, T.T., 1979. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in *Skeletonema costatum* as measures of nitrogen assimilation rates. *J. Plankton Res.* 1(2): 169-186.
- Dortch, Q., Clayton, J.R., Thronsen, S.S., Cleveland, J.S., Bressler S.L., Ahmed, S.I., 1985. Nitrogen storage and use of biochemical indices to assess nitrogen deficiency and growth rate in natural planktonic populations. *J. Mar. Res.* 43: 437-464.
- Douglas, D.J., Ramsey, U.P., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1992. Biosynthesis of the Neurotoxin Domoic Acid by the Marine Diatom *Nitzschia pungens* forma *multiseries*, determined with [¹³C]-Labelled Precursors and Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 714-716.
- Douglas, D.J., Bates, S.S., 1992. Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 85-90.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P.G., Post, A.F., Van-Hes, U.M., 1987. A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *J. Plankton Res.* 9: 607-612.
- du Preez, D.R., Bate, G.C., 1992. Dark survival of the surf diatom *Anaulis australis* Drebes et Schulz. *Bot. Mar.* 35(4): 315-319.
- Edlund, M.B., Stoermer, E.F., 1997. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *J. Phycol.* 33: 897-918.
- Eppley, R.W., 1972. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish B-NOAA* 70: 1063-1085.
- Eppley, R.W., 1977. The growth and culture of diatoms, In: Werner, D. (Ed.), *The Biology of Diatoms*. University of California Press, Berkeley.
- Evans, K.M., Bates, S.S., Medlin, L.K., Hayes, P.K., 2004. Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 40: 911-920.
- Evans, K.M., Kuhn, S.F., Hayes, P.K., 2005. High levels of genetic diversity and low levels of genetic differentiation in North Sea *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations. *J. Phycol.* 41: 506-514.

- Falkowski, P.G., 1980. Light-shade adaptation in marine phytoplankton, In: Falkowski, G., P. (Ed.), Primary productivity in the sea. Plenum, pp. 99-119.
- Falkowski, P.G., 1981. Light-shade adaptation and assimilation numbers. *J. Plankton Res.* 3(2): 203-216.
- Falkowski, P.G., 1992. Molecular ecology of phytoplankton photosynthesis., In: Falkowski, P.G., Woodhead, A.D. (Ed.), Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press, New York, pp. 47-68.
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. Aquatic Photosynthesis, Malden, Massachusetts.
- Fan, C., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2003. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* natural blooms and laboratory cultures. *Harmful Algae* 2: 283-299.
- FAO, 2004. Marine Biotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Food and Nutrition Paper 80.
- Fawcett, A., Pitcher, G.C., Bernard, S., Cembella, A.D., Kudela, R.M., 2007. Contrasting wind patterns and toxigenic phytoplankton in the southern Benguela upwelling system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 348: 19-31.
- Fehling, J., Davidson, K., 2004a. Growth and domoic acid production by *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. *J. Phycol.* 40: 674-683.
- Fehling, J., C., Smith, D., H., Green, Davidson, K., 2004b. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in scottish waters. *J. Phycol.* 40: 622-630.
- Fehling, J., Davidson, K., Bates, S.S., 2005. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4: 763-769.
- Ferraris, R.P., Ahearn, G.A., 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A(3): 397-413.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42: 1-11.
- French, F.W., Hargraves, P.E., 1980. Physiological characteristics of plankton diatom resting spores. *Mar. Biol. Lett.* 1: 185-195.
- Fritz, L., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., Beale, A.M., Work, T.M., 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *J. Phycol.* 28: 439-442.

- Fryxell, G.A., Garza, S.A., Roelke, D.L., 1991. Auxospore formation in an antarctic clone of *Nitzschia subcurvata* Hasle. *Diatom Res.* 6: 235-245.
- Fryxell, G.A., Villac, M.C., Shapiro, L.P., 1997. The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920-1996: a review. *Phycologia* 36(6): 419-437.
- Gallacher, S., Howard, G., Hess, P., MacDonald, E., Kelly, M.C., Bates, L.A., Brown, N., MacKenzie, M., Gillibrand, P., Turnell, W.L., 2001. The occurrence of amnesic shellfish poisons in shellfish from Scottish waters, In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S. I., Bolch, J. C., Lewis, R. J. (Ed.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 30-33.
- Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D., 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (June-July 2006). *Harmful Algae News, IOC-UNESCO* 32: 6-7.
- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C., Peña-Manjarrez, J.L., 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae* 8(3): 493-503.
- Garrison, D.L., Conrad, S.M., Eilers, P.P., Waldron, E.M., 1992. Confirmation of domoic acid production for *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28: 604-607.
- Geider, R.J., Osborne, B.A., 1982. *Algal Photosynthesis*. Chapman and Hall, New York.
- GEOHAB, 2005. *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*, GEOHAB Core Research Project: HABs in Upwelling Systems, In: Pitcher, P., Moita, T., Trainer, V.L., Kudela, R., Figueiras, P., Probyn, T. (Ed.). IOC and SCOR, Paris and Baltimore, p. 82.
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M., 1998. A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol. Oceanogr.* 43(4): 579-694.
- Glibert, P.M., Conley, D.J., Fisher, T.R., Harding, L.W., Malone, T.C., 1995. Dynamics of the 1990 winter/spring bloom in Chesapeake Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 27-43.
- Glibert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G., 2005a. The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18(2): 137-147.
- Glibert, P.M., Seitzinger, S., Heil, C.A., Burkholder, J.M., Parrow, M.W., Codispoti, L.A., Kelly, V., 2005b. The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms. *Oceanography* 18(2): 198-209.

Glibert, P.M., Seitzinger, S., Heil, C.A., Burkholder, J.M., Parrow, M.W., Codispoti, L.A., Kelly, V., 2006. Escalating worldwide use of urea - a global change contributing to coastal eutrophication. *Oceanography* 18: 198-208.

Glibert, P.M., Mayorga, E., Seitzinger, S., 2008. *Prorocentrum minimum* tracks anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs on a global basis: application of spatially explicit nutrient export models. *Harmful Algae* 8: 33-38.

Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Zabka, T.S., Langlois, G., Colegrove, K.M., Silver, M., 2008. Novel symptomatology and changing epidemiology of domoic acid toxicosis in California sea lions (*Zalophus californianus*): an increasing risk to marine mammal health. *Proc. R. Soc. B* 275: 267-276.

Granéli, E., Flynn, K., 2006. Chemical and physical factors influencing toxin content, In: Granéli, E., Turner, J.T. (Ed.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer, Berlin, pp. 229-241.

Grant, K.S., Burbacher, T.M., Faustman, E.M., Gratttan L., 2010. Domoic acid: Neurobehavioral consequences of exposure to a prevalent marine biotoxin. *Neurotoxicol. Teratol.* 32: 132-141.

Griffiths, D.J., 1973. Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory cultures of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.* 21: 91-97.

Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32: 234-236.

Hagström, J.A., Granéli, E., Maneiro, I., Barreiro, A., Petermann, A., Svensen, C., 2007. Release and degradation of amnesic shellfish poison from decaying *Pseudo-nitzschia multiseris* in presence of bacteria and organic matter. *Harmful Algae* 6: 175-188.

Halac, S.R., E., G.-M., Banaszak, A.T., 2009. Ultraviolet radiation reduces the photoprotective capacity of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae, Heterokontophyta). *Photochem. Photobiol.* 85(3): 807-815.

Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2): 79-99.

Hallegraeff, G.M., 1995. Harmful algal blooms: A global overview, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, p. 551.

Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO, Paris, pp. 25-49.

Hardy, R.W., T.M. Scott, C.L. Hatfield, H.J. Bamett, E.J. Gauglitz, J.C. Wekell, M.W. Eklund, 1995. Domoic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. *Aquaculture* 131: 253-260.

Hargraves, P.E., French, F.W., 1975. Observation on the survival of diatom resting spores. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 53: 229-238.

Hargraves, P.E., French, F.W., 1983. Diatom resting spores: significance and strategies, In: Fryxell, G. (Ed.), *Survival Strategies of the Algae*. Cambridge University Press, New York, pp. 49-68.

Hasle, G.R., 1964. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. I. Some marine species of the groups *Nitzschiella* and *Lanceolatae*. *Skrifter Utgitt av Det Norske Videnskap-Akademi i Oslo I. Mat.-Naturv. Klasse Ny Serie*.

Hasle, G.R., 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. *Skr. Nor. Vidensk. Akad. Oslo I. Mat. Naturv. Kl. Ny Ser.*

Hasle, G.R., 1972. The distribution of *Nitzschia seriata* Cleve and allied species. *Beih. Nova Hedwigia* 39: 171-190.

Hasle, G.R., 1994. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30, 1036-1039.

Hasle, G.R., Fryxell, G.A., 1995. Taxonomy of diatoms, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *IOC Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 341–366.

Hasle, G.R., Syvertsen E.E., 1997. Marine diatoms, In: Tomas, c. (Ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego, California, pp. 5-385.

Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae* 8(1): 3-13.

Hernández-Becerril, D.U., 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the Pacific coasts of Mexico. *Hydrobiologia* 379(1-3): 77-84.

Hernández-Becerril, D.U., Díaz-Almeyda, E.M., 2006. The *Nitzschia bicapitata* group, new records of the genus *Nitzschia*, and further studies on species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) from Mexican Pacific coasts. *Nova Hedwigia Beiheft.* 130: 293-306.

Hernández-Becerril, D.U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora Cynthia, Baron-Campis, S., 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. *J. Environ. Sci. Health, Part A* 42: 1349-1363.

Hillebrand, H., Sommer, U., 1966. Nitrogenous nutrition of the potentially toxic diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle. *J. Plankton Res.* 18(2): 295-301.

Hiltz, M., Bates, S.S., Kaczmarska, I., 2000. Effect of light:dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture. *Phycologia* 39: 59-66.

Holland, P.T., Selwood, A.I., Mountfort, D.O., Wilkins, A.L., McNabb, P., Rhodes, L.L., Doucette, G.J., Mikulski, C.M., King, K.L., 2005. Isodomoic Acid C, an Unusual Amnesic Shellfish Poisoning Toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chem. Res. Toxicol.* 18: 814-816.

Horner, R.A., Postel, J.R., 1993. Toxic diatoms in western Washington waters (U.S. west coast). *Hydrobiologia* 269/270: 197-205.

Horner, R.A., Garrison, D.L., Plumley, F.G., 1997. Harmful algal blooms and red tide problems on the U.S. west coast. *Limnol. Oceanogr.* 45(5 part 2): 1076-1088.

Howarth, R.W., 2008. Coastal nitrogen pollution: a review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae* 8(1): 14-20.

Huner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F., 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3(6): 224-230.

Huner, N.P.A., G., Ö., Melis, A., 2003. Photostasis in plants, green algae and cyanobacteria: the role of light harvesting antenna complexes, In: Green, B.R., Parson, W.W. (Ed.), *Advances in photosynthesis and respiration: light harvesting systems in photosynthesis*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 401-421.

Huppe, H.C., Turpin, D.H., 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 577-607.

Hutchins, D.A., Bruland, K.W., 1998. Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Nature* 393: 561-564.

Ignatiades, L., Smayda, T.J., 1970. Autoecological studies on the marine diatom *Rhizoddenia trafilissima* Bergon. 2. Enrichment and dark viability experiments. *J. Phycol.* 6(4): 357-364.

Irlbeck, N.A., 2001. How to feed the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* 79: E343-E346.

Iverson, F., Truelove, J., Tryphonas, L., Nera, E., 1990. The toxicology of domoic acid administered systematically to rodents and primates, In: Hynie, I., Todd, E.C.D., (Ed.), *Proceedings of Symposium on Domoic Acid Toxicity*, September 1990. *Can Dis Wkly Rep* 16 SIE 15-19.

Janson S., Hayes, P.K., 2006. Molecular Taxonomy of Harmful Algae. In: Granéli, E., Turners, J.T. (Ed.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 9-22.

Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C., 2004. Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.* 42: 545-557.

Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J.F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., Tome, D., 2001. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* 131: 91-98.

Johnson, R.L., Koerner, J.F., 1988. Excitatory amino acid neurotransmission. *J. Med. Chem.* 31(11): 2057-2066.

Jørgensen, E.G., 1968. The adaptation of plankton algae. IV. Light adaptation in different algal species. *Physiologia Pl.* 21: 423-427.

Kaczmarska, I., Fryxell, G.A., Watkins, T.P., 1986. Effect of the Gulf Stream Warm Core Rings on distributional patterns of the genus *Nitzschia*. *Deep-Sea Res.* 33(1-2): 1843-1868.

Kaczmarska, I., Bates, S.S., Ehrman, J.M., Leger, S., 2000. Fine structure of the gamete, auxospore and initial cell in the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyta). *Nova Hedwigia* 71: 337-357.

Kaczmarska, I., Ehrman, J.M., Bates, S.S., Green, D.H., Léger, C., Harris, J., 2005. Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudonitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4: 725-741.

Kaczmarska, I., Martin, J.L., Ehrman, J.M., LeGresley, M.M., 2007. *Pseudo-nitzschia* species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae* 6: 861-874.

Kalaitzis, J.A., Chau, R., Kohli, G.S., Murray S.A., Neilan B.A., 2010. Biosynthesis of toxic naturally-occurring seafood contaminants. *Toxicon* 56: 244-258.

- Kobayashi, K., Kobiyama, A., Kotaki, Y., Kodama, M., 2003. Possible occurrence of intracellular bacteria in *Pseudo-nitzschia multiseriis*, a causative diatom of amnesic shellfish poisoning. *Fish. Sci.* 69: 974-978.
- Kotaki, Y., Koike, K., Sato, S., Ogata, T., Fukuyo, Y., Kodama, M., 1999. Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseriis* isolated from Ofunato Bay, Japan. *Toxicon* 37: 677-682.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C.V., Huyen, N.T.M., Hoi, N.C., Fukuyo, Y., Kodama, M., 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *J. Phycol.* 36: 1057-1060.
- Kudela, R., Cochlan, W., Roberts, A., 2004a. Spatial and temporal patterns of *Pseudo-nitzschia* spp. in Central California related to regional oceanography, In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Ed.), *Harmful Algae 2002*. Florida and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO., pp. 347-349.
- Kudela, R., Roberts, A., Armstrong, M., 2004b. Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California, In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Ed.), *Harmful Algae 2002*. Florida and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 136-138.
- Kudela, R., W., Cochlan, W.P., Seeyave, S., 2010. The role of nutrients in regulation and promotion of harmful algal blooms in upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 85: 122-135.
- Kvitek, R.G., Goldberg, J.D., Smith, G.J., Doucette, G.J., Silver, M.W., 2008. Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 367: 35-47.
- Lange, C.B., Reid, F.M., Vernet, M., 1994. Temporal distribution of the potentially toxic diatom *Pseudonitzschia australis* at a coastal site in Southern California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104: 309-312.
- Laws, E.A., Bannister, T.T., 1980. Nutrient and light limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 25(3): 457-473.
- Laycock, M.V., de Freitas, A.S.W., Wright, J.L.C., 1989. Glutamate agonists from nlarlne algae. *J. Appl. Phycol.* 1: 113-122.

- Lefebvre, K.A., Powell, C.L., Busman, M., Doucette, G.J., Moeller, P.D.R., Silver, J.B., Miller, P.E., Hughes, M.P., Singaram, S., Silver, M.W., Tjeerdema, R.S., 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. toxins* 7: 85-92.
- Lefebvre, K.A., Robertson, A., 2010. Domoic Acid and Human Exposure Risks: A Review. *Toxicon* 56: 218-230.
- Lefebvre, K.A., Dovel, S.L., Silver, M.W., 2001. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Mar. Biol.* 138: 693-700.
- Lefebvre, K.A., Noren, D.P., Schultz, I.R., Bogard, S.M., Wilson, J., Eberhart, B.T., 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 81: 266-274.
- Levy, L.M., Lehre, K.P., Rolstad, B., Danbolt, N.C., 1993. A monoclonal antibody raised against an [Na⁺-K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett.* 317: 79-84.
- Lewis, N.I., Bates, S.S., McLachlan, J.L., Smith, J.C., 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens f. multiseriis*, In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Ed.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science, New York, pp. 601-606.
- Litaker R.W., Tester, P.A., 2006. Molecular Approaches to the Study of Phytoplankton Life Cycles: Implications for Harmful Algal Bloom Ecology. In: Granéli, E., Turners, J.T. (Ed.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 300-309.
- Lobban, C.S., Chapman, D.J., Kremer, B.P., 1998. *Experimental phycology: a laboratory manual*. Cambridge University, Cambridge.
- Lohr, M., Wilhelm, C., 1999. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 8784-8789.
- Lohr, M., Wilhelm, C., 2001. Xanthophylls synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212: 382-391.
- Lomas, M.W., Glibert, P.M., 1999. Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 44(3): 556-572.
- Lundholm, N., 2011. *Bacillariophyta, IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae*.

- Lundholm, N., Møestrup, Ø., 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis-varingica*, sp. nov. (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. *J. Phycol.* 36: 1162-1174.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Møestrup, Ø., 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia* 33: 475-478.
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Møestrup, Ø., 1997. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36(5): 381-388.
- Lundholm, N., Daugbjerg, N., Møestrup, Ø., 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) based on partial LSU rDNA. *Eur. J. Phycol.* 37: 115-134.
- Lundholm, N., Møestrup, Ø., Hasle, G.R., Hoef-Emden, K., 2003. A study of the *P. pseudodelicatissima/cuspidata*-complex (Bacillariophyceae). What is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39: 797-813.
- Lundholm, N., Hansen, P.J., Kotaki, Y., 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 273: 1-15.
- Lundholm, N., Møestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P., 2006. Inter and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *J. Phycol.* 42: 464-481.
- Mabry, T.J., 2001. Selected Topics from Forty Years of Natural Products Research: Betalains to Flavonoids, Antiviral Proteins, and Neurotoxic Nonprotein Amino Acids. *J. Nat. Prod.* 64: 1596-1604.
- MacIsaac, J.J., Dudgale, R.C., Barber, R.T., Blasco, D., Packard, T.T., 1985. Primary production cycles in an upwelling center. *Deep Sea Res.* 32: 503-529.
- Maenz, D.D., Chenu, C., Berteloot, A., 1993. Heterotropic effects of dipolar amino acids on the activity of the Anionic Amino acid Transport System X^-_{AG} in rabbit jejunal brush-border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 268(21): 15361-15367.
- Mailliard, E., Stevens, B.R., Mann, G.E., 1995. Amino acid transport by small intestinal, hepatic and pancreatic epithelia. *Gastroenterology* 108: 888-910.

- Maldonado, M.T., Hughes, M.P., Rue, E.L., Wells, M.L., 2002. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *Pseudo-nitzschia australis*. *Limnol. Oceanogr.* 47(2): 515–526.
- Mann, D.G., 1993. Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia* 269/270: 11-20.
- Marchetti, A., Trainer, V.L., Harrison, P.J., 2004. Environmental conditions and phytoplankton dynamics associated with *Pseudo-nitzschia* abundance and domoic acid in the Juan de Fuca eddy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 281: 1-12.
- Marchetti, A., Lundholm, N., Kotaki, Y., Hubbard, K., Harrison, P.J., Armbrust, V., 2008. Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) from Iron-limited waters in the Northeast Subarctic Pacific. *J. Phycol.* 44: 650-661.
- Mariën, K., 1996. Establishing tolerable dungeness crab (*Cancer magister*) and razor clam (*Siliqua patula*) domoic acid contaminant levels. *Environ. Health Perspect.* 104, 1230.
- Martin, J.L., Haya, K., Burridge, L.E., Wildish, D.J., 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima* - a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67: 177-182.
- Martínez-Montaña, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M.T., 2010. Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): In vitro uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* 299: 134-139.
- Matus-de-la-Parra, A., Rosas, A., Lazo, J.P., Viana, M.T., 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 223–231.
- Matthews, J.C., 2000. Amino acid and peptide transport systems, In: D’Mello, J.P.F. (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International Publishing, Kentucky, USA.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., 1987. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 28: 197-276.
- McCarthy, J.J., 1972. The uptake of urea by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 8(3): 216-222.
- McCarthy, J.J., Taylor, W.R., Taft, J.L., 1977. Nitrogenous nutrition of plankton in Chesapeake Bay 1. Nutrient availability and phytoplankton preferences. *Limnol. Oceanogr.* 22(6): 996-1011.

- McIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T., Geider, R.J., 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 38: 17-38.
- McMahon, T., Silke, J., 2000. Summary of phytoplankton monitoring and research in Ireland, In: Mulholland, O. (Ed.), *Proceedings of the Phytoplankton Monitoring Workshop*. Limerick, Marine Institute, Dublin, Ireland, pp. 12-16.
- Mengelt, C.P., Prézelin B.B., 2002a. Dark Survival and Subsequent Light Recovery for *Pseudonitzschia multiseriis*, 10th International Conference on Harmful Algae, St. Pete Beach, Florida.
- Mengelt, C., Prézelin, B.B., 2002b. A potential novel link between organic nitrogen loading and *Pseudo-nitzschia* spp. blooms, Proc California World Ocean Conf, Sta Barbara, California.
- Míguez, A., M. L. Fernández, Fraga, S., 1996. First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain), In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Ed.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC-UNESCO, Sendai, pp. 143-145.
- Miller, P.E., Scholin, C.A., 1996. Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-Target fluorescent probes. *J. Phycol.* 32(4): 646-655.
- Miller, P.E., Scholin, C.A., 1998. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes and filter-bases Whole Cell Hybridization. *J. Phycol.* 34: 371-382.
- Mock, T., Hoch, N., 2005. Long-term temperature acclimation of photosynthesis in steady-state cultures of the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Photosynth. Res.* 85: 307-317.
- Mock, T., Junge, K., 2007. Psychrophilic Diatoms: Mechanisms for Survival in Freezethaw cycles, In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, The Netherlands, pp. 345-366.
- Møestrup, Ø., Lundholm, N., 2007. IOC taxonomic reference list of toxic plankton algae diatoms. <http://www.bi.ku.dk/ioc/group1.asp>.
- Montecino, V., Lange, C.B., 2009. The Humboldt Current System: Ecosystem components and processes, fisheries, and sediment studies. *Prog. Oceanogr.* 83: 65-79.
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., Huner, N.P.A., 2006. Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70(1): 222-252.

Mos, L., 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environ. Toxicol. Phar.* 9, 79-85.
Öquist, G., Huner, N.P., 2003. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 329-355.

Navarrete-del-Toro, M.A., García-Carreño, F.L., 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. In: Wrolstad, R.E., Decker, E.A., Schwartz, S.J., Sporns, P. (Eds.), *Handbook of Food Analytical Chemistry. Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*, Vol. 1. John Wiley and Sons, pp. B2.2.1–B2.2.14.

Nijjar, M.S., Nijjar, S.S., 2000. Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca^{2+} overload and inhibition of Ca^{2+} calmodulin-stimulated adenylate cyclase in rat brain (review). *Int. J. Mol. Med.* 6(4): 377-466.

Nolles, J.A., Peeters, I.G.S., Bremer, B.I., Moorman, R., Koopmanschap, R.E., Verstegen, M.W.A., Schreurs, V.V.A.M., 2007. Dietary amino acids fed in free form or as protein do differently affect amino acid absorption in a rat everted sac model. *J. Anim. Physiol. An. N.* 90(7-8): 289-299.

Olaizola, M., La-Roche, J., Kolber, Z., Falkowski, P.G., 1994. Nonphotochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynthesis Res* 41: 357-370.

Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J., Montresor, M., 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudonitzschia* species. *Eur. J. Phycol.* 37: 247-257.

Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D., Montresor, M., 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 271: 87-98.

Osada, M., Stewart, J.E., 1997. Gluconic acid/gluconolactone: physiological influences on domoic acid production by bacteria associated with *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Aquat. Microb. Ecol.* 12: 203-209.

Palma, S., Mouriño, H., Silva, A., Barão, M.I., Moita, M.T., 2010. Can *Pseudo-nitzschia* blooms be modeled by coastal upwelling in Lisbon Bay? *Harmful Algae* 9: 294-303.

Pan, Y., Rao, S., D.V., Mann, K.H., Brown, R.G., Pocklington, R., 1996a. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis*. I. Batch culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 225-233.

Pan, Y., Rao, S., D.V., Mann, K.H., Li, W.K.W., Harrison, W.G., 1996b. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis*. II. Continuous culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131: 235-243.

- Pan, Y., Bates, S.S., Cembella, A.D., 1996c. Acclimation to low light intensity in photosynthesis and growth of *Pseudo-nitzschia multiseriata* Hasle, a neurotoxic diatom. J. Plankton Res. 18(8): 1427-1438.
- Pan, Y., Bates, S.S., Cembella, A.D., 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. Nat. toxins 6(3-4): 127-135.
- Pan, Y., Parsons, M.L., Busman, M., Moeller, P.D.R., Dortch, Powell, Q., C.L., Doucette, G.J., 2001. *Pseudo-nitzschia* sp. cf. *pseudodelicatissima* - a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. Mar. Ecol. Prog. Ser. 220: 83-92.
- Parker, M.S., Armbrust, V.E., 2005. Synergistic effects of light, temperature, and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 41: 1142-1153.
- Parsons, M.L., Dortch, Q., Turner, R.E., 2002. Sedimentological Evidence of an Increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) Abundance in Response to Coastal Eutrophication. Limnol. Oceanogr. 47(2): 551-558.
- Peña-Marin, E.S., 2010. Absorción intestinal de aminoácidos en el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), con el uso de la técnica intestino invertido, Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, B.C., México, p. 59.
- Petry, M., Sanz, M.A., Langlais, C., Bonnelye, V., Durand, J.P., Guevara, D., Nardes, W.M., Saemi, C.H., 2007. The El Coloso (Chile) reverse osmosis plant. Desalination 203(1-3): 141-152.
- Peters, E., 1996. Prolonged darkness and diatom mortality: II. Marine temperate species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 207: 43-58.
- Peters, E., Thomas, D.N., 1996a. Prolonged darkness and diatom mortality. I. Marine antarctic species. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 207: 25-41.
- Peters, E., Thomas, D.N., 1996b. Prolonged nitrate exhaustion and diatom mortality: A comparison of polar and temperate *Thalassiosira* species. J. Plankton Res. 18(6): 953-968.
- Platt, T., Denman, K.L., Jassby, A.D., 1977. Modeling the productivity of phytoplankton, In: Goldberg, E.D. (Ed.), The sea. John Wiley, New York, pp. 807-856.
- Platt, T., Gallegos, C.L., Harrison, W.G., 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J. Mar. Res. 38: 687-701.

Pocklington, R., Milley, J. E., Bates, S. S., Bird, C. J., de Freitas, A. S. W., Quilliam, M. A., 1990. Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by highperformance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 351-368.

Pulido, O.M., 2008. Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. *Mar. Drugs* 6: 180-219.

Qiu, S., Pak, C.W., Curras-Collazo, M.C., 2006. Sequential involvement of distinct glutamate receptors in domoic acid-induced neurotoxicity in rat mixed cortical cultures: effect of multiple dose/duration paradigms, chronological age, and repeated exposure. *Toxicol. Sci.* 89: 243-256.

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., Fortuño, J.M., Camp, J., 2008. Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Sci. Mar.* 72(2): 343-359.

Quilliam, M.A., 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin, In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp. 247-266.

Raven, J.A., 1990. Predictions of Mn and Fe use efficiencies of phototrophic growth as a function of light availability for growth and of C assimilation pathway. *New Phytol.* 116: 1-18.

Raven, J., Geider, R.J., 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110: 441-461.

Ravn, H., 1995. *Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)*. IOC Manuals and Guides. HAB Publication.

Reap, M.E., 1991. *Nitzschia pungens* Grunow f. multiseriata Hasle : growth phase and toxicity of clonal cultures isolated from Galveston, Texas. Texas A&M University p. 77.

Rhodes, L., Holland, P., Adamson, J., Selwood, A., McNab, P., 2004. Mass Culture of New Zealand Isolates of *Pseudo-nitzschia australis* for Production of a New Isomer of Domoic Acid, In: Steidinger, K.A., J. H. Landsberg, C. R. Tomas, and G. A. Vargo (Ed.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Rhee, G.Y., Gotham, I.J., 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26(4): 635-648.

Rhodes, L.L., White, D., Syhre, M., Atkinson, M., 1996. *Pseudonitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity, In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Ed.), Harmful and toxic algal blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 155-158.

Rhodes, L.L., 1998. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zeal. J. Mar. Fresh* 32: 537-544.

Rines, J.E.B., Donaghay, P.L., Deksheniaks, M.M., Sullivan, J.M., Twardowski, M.S., 2002. Thin layers and camouflage: hidden *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) populations in a fjord in the San Juan Islands, Washington, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225: 123-137.

Rosas, A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., Dabramo, L.R., Viana, M.T., 2008. Comparative intestinal absorption of amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquacult. Nutr.* 208: 1-9.

Ross, I.A., Johnson, W., Sapienza, P.P., Kim, C.S., 2000. Effects of the seafood toxin domoic acid on glutamate uptake by rat astrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 38: 1005-1011.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725.

Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. The diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge University, Cambridge.

Rue, E., Bruland, K., 2001. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. *Mar. Chem.* 76(1-2): 127-134.

Ryan, J.P., Chavez, F.P., Bellingham, J.G., 2005. Physical-biological coupling in Monterey Bay, California: topographic influences on phytoplankton ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 287: 23-32.

Sarno, D., Dahlman, J., 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean sea). *Harmful Algal News* 21(5).

Schafer, J.A., Jacques, J.A., 1967. Transport of amino acids in ehrlich ascites cells: Competitive stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 135(4): 741-750.

- Schaffer, P., C. Reeves, D.R. Casper, C.R. Davis, 2006. Absence of neurotoxic effects in leopard sharks, *Triakis semifasciata*, following domoic acid exposure. *Toxicon* 47: 747–752
- Schnetzer, A., Miller, P.E., Schaffner, R.A., Stauffer, B., Jones, B., Weisberg, S.B., DiGiacomo, P.M., Berelson, W., Caron, D.A., 2007. Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003-2004. *Harmful Algae* 6: 372-387.
- Scholin, C.A., Buck, K.R., Britschgi, T., Cangelosi, G., Chavez, F.P., 1996. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia* 35: 190-197.
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., Vogelaere, D., A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., III, M., R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van-Dolah, F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403(6): 80-84.
- Seal, R.P., Amara, S.G., 1999. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 431-456.
- Sierra-Beltrán, A., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, México: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35(3): 447-453.
- Sommer, U., 1998. Silicate and the functional geometry of marine phytoplankton. *J. Plankton Res.* 20(9): 1853-1859.
- Small, L.F., Menzies, D.W., 1981. Patterns of primary production and biomass in a coastal upwelling region. *Deep Sea Res.* 28: 123-149.
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, In: Granéli, E., Gundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M., (Ed.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 29-40.
- Smayda, T.J., Mitchell-Innes, B., 1974. Dark Survival of Autotrophic, Planktonic Marine Diatoms. *Mar. Biol.* 25: 195-202.
- Smayda, T.J., Trainer, V.L., 2010. Dinoflagellate blooms in upwelling systems: Seeding, variability, and contrasts with diatom bloom behaviour. *Prog. Oceanogr.* 85: 92-107.

Smith, J.C., Odense, P., Angus, R., Bates, S.S., Bird, C.J., Cormier, P., de Freitas, A.S.W., Léger, C., O'Neil, D., Pauley, K., Worms, J., 1990. Variation in Domoic Acid Levels in *Nitzschia* Species: Implications for Monitoring Programs. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 90(4): 27-31.

Smith, W.O., 1991. Nutrient distributions and new production in polar regions: Parallels and contrasts between the Arctic and Antarctic. Mar. Chem. 35: 245-257.

Stolte, W., McCollin, T., Noordeloos, A. M. A., Riegman, R., 1994. Effect of nitrogen source on the size distribution within marine phytoplankton populations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 184: 83-97.

Stewart, J.E., Marks, L.J., Wood, C.R., Risser, S.M., Gray, S. , 1997. Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation. Aquat. Microb. Ecol. 12: 211-221.

Subba-Rao, D.V., Wohlgeschaffen, G., 1990. Morphological variants of *Nitzschia pungens* Grunow F. multiseries Hasle. Botanica mar. 33: 545-550.

Stolte, W., Riegman, R., 1996. A model approach for size selective competition of marine phytoplankton for fluctuating nitrate and ammonium. J. Phycol. 32: 732-740.

Subba Rao, D.V., Partensky, F., Wohlgeschaffen, G., Li, W.K.W., 1991. Flow cytometry and microscopy of gametogenesis in *Nitzschia pungens*, a toxic, bloom-forming, marine diatom. J. Phycol. 27: 21-26.

Subba-Rao, D.V., Pan, Y., Mukhida, K., 1998. Production of Domoic Acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* H ASLE, Affected by Lithium. Mar. Ecol. 19(I): 31-36.

Syrett, P.J., 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 210: 182-210.

Talling, J.F., 1966. Photosynthetic behaviour in stratified and unstratified lake populations of a planktonic diatom. J. Ecol. 54(1): 99-127.

Tiedeken, J, A., J.S. Ramsdell, A.F. Ramsdell, 2005. Developmental toxicity of domoic acid in zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicol. Teratol. 27: 711-717.

Thessen, A.E., Bowers, H.A., Stoecker, D.K., 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. Harmful Algae 8: 792-810.

Todd, E.C.D., 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning-a review. J. Food Protect. 56: 69-83.

Tomas, C.R., 1997. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. Academic Press, London.

Trainer, V.L., Adams, N.G., Bill, B.D., Stehr, C.M., Wekell, J.C., Moeller, P., Busman, M., Woodruff, D., 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr.* 45(8): 1818-1833.

Trainer, V.L., Hickey, B.M., Horner, R.A., 2002. Biological and physical dynamics of domoic acid production off the Washington coast. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1438-1446.

Trainer, V.L., Hickey, B.M., Bates, S., 2008. Toxic Diatoms, In: Walsh, P.J., Smith, S.L., Fleming, L.E., Solo-Gabriele, H., Gerwick, W.H. (Ed.), *Oceans and human health: risks and remedies from the sea*. Elsevier Science, New York, pp. 219-237.

Trainer, V.L., Hickey, B.M., Lessard, E.J., Cochlan, W.P., Trick, C.G., Wells, M.L., MacFadyen, A., Moore, S.K., 2009. Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnol. Oceanogr.* 54(1): 289-308.

Trainer, V.L., Pitcher, G.C., Reguera, B., Smayda, T.J., 2010. The distribution and impacts of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 85: 33-52.

Truelove, J., Iverson, F., 1994. Serum domoic acid clearance and clinical observations in the Cynomolgus monkey and Sprague-Dawley rat following a single i.v. dose. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 52(4): 479-486.

Tryphonas, L., Truelove, J., Todd, E., Nera, E., Iverson, F., 1990. Experimental oral toxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) and rats. Preliminary investigations. *Food Chem. Toxicol.* 28: 707-715.

Van-Heukelem, L., Thomas, C.S., 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J. Chromatogr. A* 910: 31-49.

Viana, M.T., Raa, J., 1991. Lysozyme-like enzyme from the scallop *Chlamys islandica*. *Cienc. Mar.* 18(1): 93-107.

Vigilant, V.L., Silver, M.W., 2007. Domoic acid in benthic flat fish on the continental shelf of Monterey Bay, California, USA. *Mar. Biol.* 151: 2053-2062.

Villac, M.C., 1996. Synecology of the genus *Pseudonitzschia* H. Peragallo from Monterey Bay, California, USA, Department of Oceanography. Texas A & M University, p. 258.

Villac, M.C., Roelke, D.L., Villareal, T.A., Fryxell, G.A., 1993. Comparison of two domoic acid-producing diatoms - a review. *Hydrobiologia* 269: 213-224.

Vrieling, E.G., Koeman, R.P.T., Scholin, C.A., Scheerman, P., Peperzak, L., Veenhuis, M., Gieskes, W.W.C., 1996. Identification of a domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the Dutch Wadden Sea with electron microscopy and molecular probes. *Eur. J. Phycol.*31(4): 333 - 340.

Walz, P.M., Garrison, D.L., Graham, W.M., Cattey, M.A., Tjeerdema, R.S., Silver, M.W., 1994. Domoic acid-producing diatom blooms in the Monterey Bay, California: 1991-1993. *Nat. Toxins* 2: 271-279.

Wells, M.L., Trick, C.G., Cochlan, W.P., Hughes, M.P., Trainer, V.L., 2005. Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 50(6): 1908-1917.

Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C., 2000. Photorespiration metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. T. Roy. Soc. B* 355: 1517-1529.

Wright, J.L.C., Boyd, R.K., deFreitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V., Quilliam, M.A., Ragan, M., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D., 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern P. E. I. Canada. *Can. J. Chem.* 67: 481-490.

Wright, J.L.C., Quilliam, M.A., 1995. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.), *IOC manual on harmful marine algae, IOC manuals and guides*. UNESCO, Paris, pp. 113-133.

Zaccaroni, A., Scaravelli, D., 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals, In: NATO, S.-. (Ed.), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Gualtieri, P., Pisa, Italy, pp. 91-158.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*, 4 ed. Pearson, New Jersey.

Zentara, S.J., Kamykowski, D., 1977. Latitudinal relationships among temperature and selected plant nutrients along the west coast of North and South America. *J. Mar. Res.* 35: 321-337.

Zertuche-González, J.A., O. Sosa-Nishizaki, J.G. Vaca Rodriguez, R. del Moral Simanek, C. Yarish, B.A. Costa-Pierce, 2008. *Marine Science Assessment of Capture-Based Tuna (Thunnus orientalis) Aquaculture in the Ensenada Region of Northern Baja California, Mexico*. Final Report to The David & Lucile Packard Foundation, 300 Second Street, Los Altos, California, USA. 95p.

ANEXO

- I. Datos morfométricos de especies del género *Pseudo-nitzschia*
- II. Niveles de ácido domoico asociados a diferentes especies de *Pseudo-nitzschia*
(*in situ*)
- III. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp.

Tabla I.1. Datos morfo-métricos de especies del género *Pseudo-nitzschia*.

Especie	Longitud		Amplitud		Estrías en 10 µm		Fíbulas en 10 µm		Interespacio central	Traslape celular	Referencia
	min	máx	min	máx	min	máx	min	máx			
<i>P. americana</i>	17	37	2.5	3.7	26	31	19	22	ausente	10%	13,14,19,20,23,27
<i>P. australis</i>	73	120	6.0	7.8	13	17	13	18	ausente	1/3 – 1/4	6,8,10,14,15,18,19,30,32,33,37
<i>P. caciantha</i>	58	65	2.7	3.3	29	32	16	19			2,24
<i>P. calliantha</i>	61	80	1.5	1.8	35	38	17	21	presente		2,3,4,24
<i>P. cuspidata</i>	35	61	1.6	2.0	37	39	20	23	presente	1/6	10,18,24
<i>P. delicatissima</i>	35	75	1.5	2.1	36	40	20	25	presente	1/5- 1/10	1,2,4,6,9,14,15,17,20,24, 29,32,34,37
<i>P. dolorosa</i>	42	64	2.3	2.9	32	36	18	21	presente	1/10	25
<i>P. granii</i>	21	88	1.4	1.9	49	55	12	20	ausente	1/12	25
<i>P. fraudulenta</i>	68	110	4.6	6.7	19	23	17	22	presente	1/6 -1/9	6,9,10,13,14,17,19,20,30,32,34,37
<i>P. galaxie</i>	18	52	1.2	1.8	55	66	17	27	presente	5-10%	5,22
<i>P. multiseris</i>	75	124	3.5	4.8	11	15	11	14	ausente	1/3-1/4	6,7,9,12,13,14,15,17,20,21,30,33,10,34,35, 37
<i>P. multistriata</i>	45	62	2.7	3.6	36	42	23	29	ausente	1/11	28,30,36,
<i>P. pseudodelicatissima</i>	59	87	1.2	1.7	36	43	19	26	presente	10%	2,11,20,24,
<i>P. punges</i>	82	139	2.8	4.5	10	15	10	15	ausente	1/3-1/5	6,9,10,12,13,14,15,17,18,19,20,22,30,32,33, 34,35,
<i>P. seriata</i>	87	153	5.1	7.7	14	23	14	19	ausente	1/3-1/5	11,14,15,16,17,18,34,38
<i>P. subpacifica</i>	47	67	4.7	6.7	27	31	15	19	presente	1/5 – 1/6	13,18,20,
<i>P. heimii</i>	48	83	3.5	5.1	24	27	13	17	presente	1/5-1/6	25
<i>P. turgidula</i>	39	70	2.6	3.5	20	27	11	17	presente	1/5-1/8	10,11,13,18,25,

Tabla I.1. Datos morfo-métricos de especies del género *Pseudo-nitzschia* (continuación).

Especie	Poroides en 1 μm		Líneas de poroides	Himen de poroides		Referencia
	Min	Máx		Sectores	Tipo de poroide	
<i>P. americana</i>	7	9	2 (3)		Simple - diminuto	13,14,19,20,23,27
<i>P. australis</i>	4	5	2		Redondeado	6,8,10,14,15,18,19,30,32,33,37
<i>P. caciantha</i>	4	5	1-2	4	-	2,24
<i>P. calliantha</i>	5	5	1	7-10	Redondeado cuadrados	2,3,4,24
<i>P. cuspidata</i>	5	6	1-2	2	Ovalado cuadrado	10,18,24
<i>P. delicatissima</i>	9	11	2		Redondeado/ Hexagonal Triangular/Hexagonal	1,2,4,6,9,14,15,17,20,24,29,32,34,37
<i>P. dolorosa</i>	6	7	1-2		-	25
<i>P. granii</i>	6	7	1		-	25
<i>P. fraudulenta</i>	5	6	2-3		Redondeado/hexagon al cuadrado	6,9,10,13,14,17,19,20,30,32,34,37
<i>P. galaxie</i>	-	-	-		ninguno	5,22
<i>P. multiseriis</i>	4	6	3-7		redondeado	6,7,9,12,13,14,15,17,20,21,30,33,10,34,35,37
<i>P. multistriata</i>	9	11	2-3		Circular	28,30,36,
<i>P. pseudodelicatissima</i>	5	6	1	2	Ovalado cuadrado	2,11,20,24,
<i>P. pungen</i>	3	4	2-3		Redondeado simple	6,9,10,12,13,14,15,17,18,19,20,21,30,32,33,34,35
<i>P. seriata</i>	6	9	2.4-5		-	11,14,15,16,17,18,34,38
<i>P. subpacifici</i>	6	8	2		Diminuto simple	13,18,20,
<i>P. heimii</i>	6	8	2		-	25
<i>P. turgidula</i>	7	9	2		irregular	10,11,13,18,25

- 1) Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D., Montresor, M., 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41, 542-556.
- 2) Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Levialedi Ghiron, J.H., Mann, D.G., Pröschold, T., Montresor, M., 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158, 193-207.
- 3) Bargu, S., Koray, T., Lundholm, N., 2002. First report of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle 2003, a new potentially toxic species from Turkish coasts. *E.U. J. Fish. Aquat. Sci.* 19, 479-483.
- 4) Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L., Albertano, P., 2005. On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *J. Plank. Res.* 27, 763-774.
- 5) Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A., 2005. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4, 33-48.
- 6) Cusack, C., Raine, R., Patching, J.W., 2004. Occurrence of species from the genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Irish waters. *Proc. Royal Irish Acad.* 104B, 55-74.
- 7) Evans, K.M., Bates, S.S., Medlin, L.K., Hayes, P.K., 2004. Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 40, 911-920.
- 8) Frenguelli, J., 1939. Contribución al conocimiento de las diatomeas argentinas. Diatomeas del Golfo San Matías (Río Negro). *XV Revista del Museo de La Plata (n.s.)* 2, Botánica. 10, 201-226.
- 9) Ferrario, M.E., Sar, E.A., Castanos, C., Hinz, F., 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68, 131-147.

- 10) Ferrario, M.E., Sar, E.A., Sala, S.E., 2002. Diatomeas potencialmente toxígenas del Cono Sur Americano, p. 167-194. In: Sar E.A., M.E. Ferrario, y B. Reguera [eds.]. Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Madrid.
- 11) Ferrario, M., Licea, S., Balestrini, C.F., Ferreyra, G., 2004. Species of (*Pseudo-nitzschia*) in the Drake Passage (54°-61°S to 46°-64°W), p. 434-436. In: K.A. Steidinger, J.H. Landsberg, C.R. Tomas, y G.A. Vargo [eds.] Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- 12) Fryxell, G.A., Reap, M.E., Valencic, D.L., 1990 *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseries* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. Nova Hedwigia, Beih. 100, 171-188.
- 13) Hallegraeff, G.M., 1994. Species of the diatom genus *Pseudonitzschia* in Australian waters. Bot. Mar. 37: 397-411.
- 14) Hasle, G.A., 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. Skr. Norske Vidensk-Akad. I. Mat.-Nat. KI. Ny Serie 18, 1-45.
- 15) Hasle, G.R., Fryxell, G.A., 1995. Taxonomy of diatoms. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, and A.D. Cembella [eds.] IOC Manual on Harmful Marine Microalgae, p. 341-366. IOC manuals and Guides 33. Paris, France, UNESCO.
- 16) Hasle, G.R., Lundholm, N., 2005. *Pseudo-nitzschia seriata* f. *obtusum* (Bacillariophyceae) raised in rank based on morphological, phylogenetic and distributional data. Phycologia 44, 608-619.
- 17) Hasle, G.R., Lange, C.B., Syvertsen, E.E., 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrank, North Atlantic, and adjacent waters. Helgol. Meeresunters. 50, 131-175.
- 18) Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., 1996. Marine diatoms. In: C.R. Tomas [ed.] Identifying marine diatoms and dinoflagellates, p. 5-385. San Diego, Academic Press.

- 19) Hernández-Becerril, D.U., 1998. Species of the planktonic diatom genus *Pseudo-nitzschia* of the pacific coast of México. *Hydrobiologia* 379, 77-84.
- 20) Kaczmarek, I., LeGresley, M.M, Martin, J.L., Ehrman, J., 2005. Diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Quoddy Region of the Bay of Fundy, Canada. *Harmful Algae* 4, 1-19.
- 21) Lee, J.H., 1994. Neurotoxin-producing diatom, *Pseudonitzschia pungens* Grunow f. *multiseriis* Hasle, off the coastal waters of southern Korea. I Morphological features. *Korean J. Phycol.* 9, 125-134.
- 22) Lundholm, N. Moestrup, Ø., 2002. The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* sp. Nov. (Bacillariophyceae): morphology and phylogenetic relationships. *Phycologia* 41, 594-605.
- 23) Lundholm, N., Hasle, G.R., Fryxell. G.A., Hargraves, P.E., 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia lineata*. *Phycologia* 41, 594-605.
- 24) Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G.R., Hoef-Emden. K., 2003. A study of the *P. pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39, 797-813.
- 25) Marchetti, A., 2005. Ecophysiological aspects of iron nutrition and domoic acid production in oceanic and coastal diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia*. PhD thesis. University of British Columbia, Canada, 220 p.
- 26) Marchetti, A., Lundholm, N., Kotaki, Y., Hubbard, K.A., Harrison, P.J., Armbrust, E.V., 2008. Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from iron-limited waters in the NE Subarctic Pacific. *Journal of Phycology* 44, 650-661.
- 27) Orlova, T.Y., Stonick, I.V., Aizdaicher, N.A., Bates, S.S., Léger, C., 2007. Three bloom-forming *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) from the southeastern coast of Russia: toxicity, morphology and distribution. Unpublished manuscript.

- 28) Orsoni, L., Sarno, D., Procaccini, G., Poletti, R., Dahlmann, J., Montresor, M., 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *Eur. J. Phycol.* 37, 247-257.
- 29) Orsoni, L., Procaccini, G., Sarno, D., Montresor, M., 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 271, 87-98.
- 30) Rhodes, L.L., 1998. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.* 32, 537-544.
- 31) Rhodes, L., Adamson, J., Scholin, C., 2000. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.* 34, 463-467.
- 32) Rivera, P., 1985. Las especies del genero *Nitzschia* Hassall. Sección *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) en las aguas marinas chilenas. *Gayana Bot.* 42, 9-39.
- 33) Sastre, V., Santinelli, N.H., Esteves, J.L., Ferrario, M.E., 2001. Aspectos ecológicos de especies de *Pseudo-Nitzschia* en aguas costeras patagónicas (Argentina), p. 217-235. In: *Sustentabilidad de la Biodiversidad Algal*. Alveal k. & T. Antesana (Eds).
- 34) Skov, J., Lundholm, N., Moestrup, Ø., Larsen, J., 1999. Potentially toxic phytoplankton. 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae), p. 1-23. In: J.A. Lindley [ed.] *ICES identification leaflets for phytoplankton*, Leaflet No. 185. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen.
- 35) Stonick, I.V., Orlova, T.Y., Shevchenko, O.G., 2002. Morphology and ecology of the species of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian J. Mar. Biol.* 27, 362-366.

- 36) Takano, H., 1993. Marine diatom *Nitzschia multistriata* sp. Nov. common at inlets of southern Japan. Diatom, The Japanese J. Diatomol. 8, 39-41.
- 37) Vilac, M.C., 1996. Synecology of the genus *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo From Monterey Bay, California, U.S.A. Ph.D. Thesis, Texas A&M University, College Station, TX, 258 p.
- 38) Rűsz, H.L., Soylu, S., Kotaki, Y., Moestrup, O., Lundholm, N., 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. Harmful Algae in press.

Tabla II.1. Niveles de ácido domoico asociado a diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* (*in situ*)

<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	AD		Densidad celular	Referencia
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(pg cel^{-1})	$\text{cel L}^{-1} \times 10^6$	
<i>P. australis</i>	5.6 -12.7	0 - 117	0.053	Schnetzer et al. 2007
	1.3-3.8	37 - 78	0.049	Trainer et al. 2000
	n.d.	7.2 - 75	0.13	Scholin et al. 2000
	0 -2.3	5 - 43	0.077	Busse et al. 2006
	0.86	2.7 - 42	0.302	García-Mendoza et al. 2009
	0.1 - 6.7	3 - 31	0.6	Buck et al. 1992
	0.032 - 1.68	0.14 - 2.1	0.04-2	Anderson et al. 2006
<i>P. cuspidata</i>	24.17	80	2.3	Trainer et al. 2009
	13.38	63	6.1	Trainer et al. 2009b
<i>P. multiseriis</i>	0.29 - 12.3	0.4 - 32.6	0.1 - 1	Waltz et al. 1994
	0.1 - 0.7	0.3- 6.3	0.52	Trainer et al. 2000
<i>P. pseudodelicatissima</i>	1.0 - 2.7	1.0 - 4.6	0.6 - 0.9	Trainer et al. 2002
	0.01- 0.03	0.5 - 3.4	0.009 - 0.019	Marchetti et al. 2004

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp.

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. australis</i> Medio F/16 Temperatura 15 °C Irradiancia 22- 32 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	12 - 37 pg cel^{-1}	Garrison et al. 1992
Medio F/2 – 250 $\mu\text{M Si}$ Temperatura 15 °C Irradiancia 12-115 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 y 16:8 h	0.20 - 26 pg cel^{-1}	Cusack et al. 2002
Medio F/2 Temperatura 17 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	2.00 pg cel^{-1}	Rhodes 1998
Medio F/2 Temperatura 14°C Irradiancia 100-140 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.04 - 1.74 pg cel^{-1}	Álvarez et al. 2009
NR	0.15 - 1.68 pg cel^{-1} (26.5-217 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Fheling et al. 2004a
NR	1.20 - 1.32 pg cel^{-1}	Campbell et al. 2001
Medio F/2 - Si Temperatura 19 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	1.10 pg cel^{-1}	Rhodes et al. 2003
Medio F/2 (+ 50 $\mu\text{M Si}$) Temperatura 15 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.40 - 0.80 pg cel^{-1}	Kudela et al. 2004b
NR	0.40 pg cel^{-1}	Villac et al. 1993
Medio ESAW (50 $\mu\text{M NO}_3^-$, 50 μM , 25 $\mu\text{M urea}$) Temperatura: 15 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.00016 – 0.0018 pg cel^{-1} 0.00015 – 0.0094 ng L^{-1}	Armstrong-Howard et al. 2007
NR	30 $\mu\text{g L}^{-1}$	Fraga et al. 1998

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. (Continuación)

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. australis</i>		
Medio F/2 + Alquil (combinación) (100 μM NO_3^- , 10 μM PO_4^{3-} , 50 μM SiO_3^{2-}) Temperatura 12 °C Irradiancia 130 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:0 h	7.6 $\mu\text{g L}^{-1}$	Maldonado et al. 2002
<i>P. multiseriis</i>		
Medio F/2 Temperatura 20 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 10:14 h	0.1 – 67 pg cel^{-1}	Bates et al. 1999
Medio F/2 Temperatura 20 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 10:14 h	5 – 50 pg cel^{-1}	Bates et al. 2000
Medio F/2 + 214 μM Si Temperatura 15 °C Irradiancia 45, 100 y 145 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 10:14, 16 :0, 0:24 h Agitación 75-100 rpm	0.4 - 10 pg cel^{-1} (1.25 – 2.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bates et al. 1991
Medio L1 + 107 μM Si + 10^{-8} μM Se Temperatura 20°C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	0.5 - 9.31 pg cel^{-1}	Kaczmarek et al. 2005
Medio F/2 (440 μM NO_3^- , 440 μM NH_4^+) Temperatura 17 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 10:14 h	4.0 - 8.5 pg cel^{-1}	Bates et al. 1993
Medio F/2 (150 μM Si, 35 μM P) Temperatura Irradiancia Ciclo Luz:Oscuridad	7.0 pg cel^{-1}	Hillerbrand y Sommer 1996

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. (Continuación)

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. multiseriis</i>		
Medio H - Si Temperatura 15 °C Irradiancia 290 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:00 h Agitación 100 rpm	Particulado 0.02 -5.62 pg cel^{-1}	Pan et al. 1996a
Medio F/2 + 214 $\mu\text{M Si}$ Temperatura 15 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h Agitación 90 rpm	Disuelto 2.4 -399.20 $\mu\text{g L}^{-1}$	Douglas y Bates 1992
Medio F/2 (11 $\mu\text{M Si}$, 88 $\mu\text{M N}$ (NO_3^- , NH_4 , urea) Temperatura 15°C Irradiancia 100-140 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	2 pg cel^{-1} (290 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Douglas y Bates 1992
Medio F/2 (11 $\mu\text{M Si}$, 88 $\mu\text{M N}$ (NO_3^- , NH_4 , urea) Temperatura 15°C Irradiancia 100-140 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	Particulado 0.024 - 1.80 pg cel^{-1} (3.9 - 398 $\mu\text{g L}^{-1}$) Disuelto 0.001 - 2.13 pg cel^{-1} (0.16 - 103 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Thessen et al. 2009
Medio H (1765 $\mu\text{M N}$, 245 $\mu\text{M Si}$, 10.4 $\mu\text{M P}$) Temperatura 15 °C Irradiancia 290 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:00 h Agitación 100 rpm	0.26 -1.48 pg cel^{-1}	Pan et al. 1996c
Medio ESAW modificado Temperatura 20 °C Irradiancia 170 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:00 h	1.4 pg cel^{-1} (280 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Osada y Stewart, 1997
Medio L1 + 321 $\mu\text{M Si}$, Temperatura 15°C Irradiancia 15-25 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 16:8 h Agitación: 90 rpm	0.85 pg cel^{-1} (3 - 12 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Lundholm et al. 2005
Medio F (60.0 - 190.5 $\mu\text{M Si}$) Temperatura 15 °C Irradiancia 410 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:00 h	0.143 – 0.431 pg cel^{-1}	Pan et al. 1996b

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. (Continuación)

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. multiseriata</i>		
Medio F + 385.6 μMLi Temperatura 10-12 °C Irradiancia 330 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:0 h	0.23 pg cel^{-1}	Subba-Rao et al. 1988
NR	0.15 pg cel^{-1} (25 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Marchetti et al. 2008
Medio L1 + 321 $\mu\text{M Si}$ Temperatura 15°C Irradiancia 15-25 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 16:8 h pH: 7.0 - 10.0	0.07 pg cel^{-1}	Lundholm et al. 2004
Medio F/2 + 107 $\mu\text{M Si}$ Temperatura 20 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:0 h	100-2000 $\mu\text{g L}^{-1}$	Bates et al. 2004
Medio F/2 + Alquil (combinación) (100 $\mu\text{M NO}_3^-$, 10 $\mu\text{M PO}_4^{3-}$, 50 $\mu\text{M SiO}_3^{2-}$) Temperatura 12 °C Irradiancia 130 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 24:0 h	0.5 – 11.6 $\mu\text{g L}^{-1}$	Maldonado et al. 2002
Medio F/2 Temperatura 18 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.00025 -0.025 $\mu\text{g L}^{-1}$	Bates et al. 1995
<i>P. multistriata</i>		
Medio F/2 + Si Temperatura 20 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.001-0.69 pg cel^{-1}	Orsini et al. 2002
NR	0.645 pg cel^{-1}	Sarno y Dahlmann, 2000

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. (Continuación)

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. fraudulenta</i>		
Medio F/2 + 11 μM Si, 88 μM N (NO_3^- , NH_4^+ , urea) Temperatura	0.06-1.2 dAD $\mu\text{g L}^{-1}$ 2.7-53 dAD fg cel $^{-1}$	Thessen et al. 2009
Irradiancia 150-200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	0.009-0.57 pAD $\mu\text{g L}^{-1}$ 0.29-1.6 pAD fg cel $^{-1}$	
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>		
Medio F/2 (103 μM Si, 2.8-14.5 μM P, 760 -973 μM N) Temperatura 15 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 120 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	Celular 0.6-14.7 pg cel $^{-1}$ (2 - 280 $\mu\text{g L}^{-1}$) Disuelto 4 - 190 $\mu\text{g L}^{-1}$ excel	Fheling et al. 2004b
Medio Temperatura 15 $^\circ\text{C}$ Irradiancia Ciclo Luz:Oscuridad 16:8 h	13.7 pg cel $^{-1}$ 0.31 - 1.6 pg cel $^{-1}$	Lundholm et al. 1994
Medio F/2 + Si Temperatura 15 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 9:15 y 18:6 h	1.4 - 2.4 pg cel $^{-1}$ (5 - 21 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Fheling et al. 2005
Medio L1 Temperatura 4 y 15 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 16:8 h	1.46 - 1.93 pg cel $^{-1}$	Rüsz et al. 2011
Medio F/2 + 107 μM Si Temperatura 15 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.16-0.23 pg cel $^{-1}$ (28.9-41.5 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Fheling et al. 2004a
<i>P. calliantha</i>		
Medio F/2 Temperatura 19 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 65 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h Salinidad: 20	0.70 - 0.95 pg cel $^{-1}$	Besiktepe et al. 2008
Medio F/2 Temperatura 24 $^\circ\text{C}$ Irradiancia 100-140 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 12:12 h	0.01 pg cel $^{-1}$	Álvarez et al. 2009

Tabla III.1. Niveles de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp. (Continuación)

Condiciones de cultivo	AD	Referencia
<i>P. calliantha</i>		
Medio F/2 + 11 μM Si, 88 μM N (NO_3^- , NH_4^+ , urea) Temperatura Irradiancia 150-200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	Celular 0.0018-0.0057 pg cel^{-1} (0.10-6.3 $\mu\text{g L}^{-1}$) Disuelto 0.00086 – 0.0198 pg cel^{-1} (0.3-1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$)	Thessen et al. 2009
<i>P. pseudodelicatissima</i>		
Medio F/2 Temperatura 20 °C Irradiancia 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 16:8 h	0.0385 pg cel^{-1}	Pan et al. 2001
Medio F/2 – F/8 Temperatura 12-14 °C Irradiancia 45 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Ciclo Luz:Oscuridad 14:10 h	0.007 – 0.0098 pg cel^{-1}	Martin et al. 1990
NR	0.3 pg cel^{-1} (5 fg cel^{-1})	Adams et al. 2000
<i>P. turgidula</i>		
NR	0.03 pg cel^{-1}	Bates, 1998

NR= No Reportado