

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS



DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE FICOTOXINAS EN  
FITOPLANCTON Y MOLUSCOS BIVALVOS



T E S I S

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN  
OCEANOGRAFIA COSTERA

p r e s e n t a

OCEAN. PERLA EDITH LOPEZ RAMIREZ

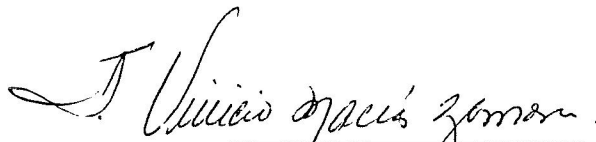
Ensenada, B. C. México, Marzo de 1998.

TESIS DEFENDIDA POR **PERLA EDITH LOPEZ RAMIREZ**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITE:



---

**DRA. ELIZABETH ORELLANA CEPEDA**  
DIRECTORA DE TESIS



---

**DR. JOSE VINICIO MACIAS ZAMORA**  
SINODAL



---

**M.C. ZAUL GARCIA ESQUIVEL**  
SINODAL

Marzo, 1998.

## RESUMEN

Con el propósito de cuantificar ficotoxinas características de las mareas rojas en la Bahía de Todos Santos, B.C. se realizaron análisis de ficotoxinas en fitoplancton y en mejillón (*Mytilus californianus*) recolectados durante períodos de florecimientos fitoplanctónicos ocurridos entre agosto de 1995 y agosto de 1996. Los lugares de muestreo fueron: el Rincón de Ballenas, dentro de la dársena portuaria, en la zona inmediata exterior al Puerto de Ensenada y en el área de cultivo comercial de mejillones, ubicado dentro de la Bahía. Para la determinación de las ficotoxinas se utilizaron métodos químicos (HPLC-RP) y biológicos (bioensayos en ratón) usando extractos de fitoplancton y mejillón de la Bahía Todos Santos. La especie mas abundante y frecuente dentro del fitoplancton fue *Lingulodinium polyedra*. Se identificaron las toxinas C1-C4, B2, GTX4, NEOSTX y STX en muestras de la Bahía. Los bioensayos en ratón con extractos de fitoplancton y mejillón mostraron piloerección, letargo y en algunos casos parálisis temporal en extremidades. Durante todo el ciclo anual en la Bahía la toxicidad no fue superior a 30 µg STX eq./100 grs de mejillón. Además, se detectó en la Bahía un evento extraordinario de *Gymnodinium flavum* y *Heterocapsa* sp durante agosto de 1996, reportándose por primera vez a *Heterocapsa* sp. como causante del florecimiento microalgal. Paralelo a este estudio también se analizaron extractos de ostión (*Crassostrea iridescens*) y almeja (*Donax* sp.) provenientes del suroeste mexicano. La especie que causó el evento de marea roja fue *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. La toxicidad reportada alcanzó valores superiores a 6,000 µg de STX equivalente a 100 gr. de tejido de molusco bivalvo. Los bioensayos en ratón con extractos de ostión y almeja causaron la muerte en todos los casos. Se concluye que las ficotoxinas se encuentran presentes en fitoplancton y mejillón de la Bahía Todos Santos, pero su toxicidad es inferior al límite permisible para consumo humano y no alcanzaron a afectar a la salud. La toxicidad reportada en los moluscos bivalvos del suroeste mexicano causó impacto negativo.

## DEDICATORIA

A **DIOS**, por estar siempre conmigo y permitirme llegar hasta aquí. Mil gracias.

CON ADMIRACIÓN, A MIS PADRES:

**BETUEL**, por ser el ejemplo y apoyo que siempre he tenido.  
Y

**SABINA**, por ser la fuente de alegría y fuerza en todos estos años y por ser más que mi madre.

A ambos gracias, por que además me han enseñado el camino de la LUZ VERDADERA. Los quiero mucho.

CON CARIÑO A MIS HERMANOS:

**VICTOR, BETUEL, DAVID, OSCAR y SARITA**, por que siempre sigamos estando unidos. Los quiero mucho.

A MIS CUÑADAS:

**PATTY G., MARIBEL y PATTY C.**, por estar siempre dispuestas a todo, gracias.

A MIS SOBRINOS:

**VICTOR, DAVID y BRIANNA**, por ser los peques que han traído más alegría a mi corazón. Los adoro.

## AGRADECIMIENTOS

A la **FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS** por todo el apoyo que me ha dado durante muchos años.

Al **POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA** que me ha permitido estudiar otra de las bellezas de nuestro gran océano.

A **CONACyT** por otorgarme la beca para realizar los estudios de Posgrado.

Al proyecto de Investigación **IMPACTO AMBIENTAL DE LAS MAREAS ROJAS** convenio CONACyT-UABC 431100-5-1984-PT, ya que sin su existencia no se hubiera realizado este trabajo.

A la **DRA. ELIZABETH ORELLANA C.**, mi gratitud y reconocimiento por aceptar desinteresadamente dirigir esta investigación. Agradezco sus enseñanzas que fueron la base primordial para que lograra lo que me propuse, las atenciones y esfuerzos de su persona para que todo saliera bien. Gracias por su amistad a través de estos años. **GRACIAS POR TODO.**

Al **DR. J. VINICIO MACIAS Z. y M. C. ZAUL GARCIA E.**, por el interés que mostraron en la revisión del trabajo, enriqueciéndolo con sus acertados comentarios. A ustedes muchas gracias.

Un especial agradecimiento al **M. C. EVARISTO MARTINEZ R.**, por sus atenciones, consejos y sugerencias brindadas en la realización del presente trabajo, y al **INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGIA DEL AGUA** por permitir usar sus instalaciones y equipos analíticos. Gracias.

Agradezco infinitamente al **DR. LUCIO MUÑOZ C., BIOL. ESTEBAN CABRERA** y al **QUIM. CASIMIRO RAMIREZ C.** por estar siempre dispuestos a la realización de los bioensayos en ratón. Al **INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA** por permitir utilizar sus instalaciones para la realización del método biológico.

Al **M. C. LUIS ALBERTO MORALES Z.** por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al **OCEAN. NORBERTO CASTRO** por su ayuda en la toma de muestras.

Al **SR. JESUS SALVADOR ALVAREZ A.** por su amabilidad y buena disposición para la toma de muestras.

A **MILI, EPI, ARTURO y NACHO** por las facilidades otorgadas en el préstamo de material y reactivos.

A todos los que forman parte física y mentalmente de la **COORDINACION DE MEDIO AMBIENTE, SEMARNAP.**

A todas las personas de quienes he recibido atenciones y buenos deseos.

## CONTENIDO

RESUMEN.	II
Dedicatoria.	III
Agradecimientos.	IV
Contenido.	V
Lista de Figuras.	VI
Lista de Tablas.	VII
Lista de Anexos.	VIII
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	5
HIPOTESIS	6
MATERIALES Y METODOS	7
Área de estudio en la Bahía de Todos Santos, B. C.	7
Área de estudio en el suroeste mexicano.	9
Recolecta de fitoplancton y mejillones.	11
Fitoplancton.	14
Extracción de ficotoxinas que producen p <acute>aral</acute> isis.	15
M <acute>e</acute> todo biol <acute>o</acute> gico para la determinaci <acute>o</acute> n de toxinas que provocan p <acute>aral</acute> isis.	16
An <acute>a</acute> lisis de toxinas que producen p <acute>aral</acute> isis por cromatograf <acute>i</acute> a l <acute>i</acute> quida de alta resoluci <acute>o</acute> n, con reactor poscolumna.	18
Procesamiento de la informaci <acute>o</acute> n.	19
RESULTADOS	21
Bahía de Todos Santos, B. C.	21
Suroeste Mexicano.	39
DISCUSIONES.	43
CONCLUSIONES.	58
RECOMENDACIONES.	59
LITERATURA CITADA.	60
ANEXO.	71

## LISTA DE FIGURAS

	página
No. 1.- Localización del área de muestreo en la Bahía de Todos Santos, B. C.	8
No.2.- Localización del área de estudio en el suroeste mexicano.	10
No. 3.- Composición porcentual de fitoplancton dentro de la dársena portuaria en la bahía de Todos Santos, B. C., durante la marea roja del 3 de agosto de 1995.	12
No. 4 a.- Perfil cromatográfico característico del florecimiento en la dársena portuaria, del 22 de septiembre de 1995.	26
No. 4 b.- Perfil cromatográfico del florecimiento de la zona exterior al muelle, del 22 de septiembre de 1995.	26
No. 5 a.- Perfil cromatográfico de <i>M. californianus</i> de Rincón de Ballenas, del 23 de agosto de 1995.	29
No. 5 b .- Perfil cromatográfico de <i>M. californianus</i> de Rincón de Ballenas, del 28 de agosto de 1995.	29
No. 6 .- Composición porcentual de fitoplancton de frente de la dársena portuaria, durante la marea roja del 15 de marzo de 1996, en Bahía de Todos Santos, B.C.	31
No. 7.- Composición porcentual de fitoplancton de dentro de la dársena portuaria, durante la marea roja del 15 de marzo de 1996, en Bahía de Todos Santos, B. C.	32
No. 8 a.- Perfil cromatográfico característico de <i>M. californianus</i> de Rincón de Ballenas, del 6 de febrero de 1996.	35
No. 8 b.- Perfil cromatográfico característico de <i>M. californianus</i> de Rincón de Ballenas, del 6 de marzo de 1996.	36
No. 9.- Composición porcentual de fitoplancton de 9 de agosto de 1996, en el área de cultivo de mejillones en Bahía de Todos Santos, B. C.	38
No. 10.- Cromatograma de extractos de ostión <i>C. iridiscens</i> , del suroeste mexicano.	41
No. 11.- Cromatograma de extractos de almeja <i>Donax</i> sp., del suroeste mexicano.	41

## LISTA DE TABLAS

	página
I.- Fecha de recolecta de fitoplancton y mejillones en la Bahía de Todos Santos, B. C.	12
II.- Fecha de recolecta de moluscos bivalvos en el suroeste mexicano.	13
III.- Síntomas de intoxicación observados en ratones inoculados con extractos de fitoplancton, de la dársena portuaria en Bahía de Todos Santos, B. C., en el primer período.	23
IV.- Porcentaje de las principales toxinas identificadas en fitoplancton de la Bahía de Todos Santos, B. C., en el primer período (agosto-septiembre de 1995).	24
V.- Síntomas de intoxicación observados en ratones inoculados con extractos de mejillón <i>M. californianus</i> , de Rincón de Ballenas, en la Bahía de Todos Santos, B. C. en el primer período (agosto-septiembre de 1995).	27
VI.- Porcentaje de las principales toxinas en mejillón <i>M. californianus</i> de Rincón de Ballenas, en la Bahía de Todos Santos, B. C. en el primer período primer período (agosto-septiembre de 1995).	28
VII.- Porcentaje de <i>Lingulodinium polyedra</i> en eventos de marea roja durante el segundo período (febrero a marzo de 1996), en Bahía de Todos Santos, B.C.	30
VIII.- Porcentaje de las principales toxinas identificadas en fitoplancton de la Bahía de Todos Santos, B. C., en el segundo período (febrero-marzo, 1996).	33
IX.- Síntomas de intoxicación observados en ratones inoculados con extractos de <i>M. californianus</i> del segundo período (febrero-marzo, 1996), en Bahía de Todos Santos, B. C.	34
X.- Porcentaje de las principales toxinas en mejillón <i>M. californianus</i> de la Bahía de Todos Santos, B. C. en el segundo período (febrero-marzo de 1996)	34
XI.- Toxicidad promedio determinada en moluscos bivalvos del suroeste mexicano durante el evento de marea roja de <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i> .	41
XII.- Concentracion de saxitoxina en moluscos del suroeste mexicano.	42

## ANEXOS

	página
I.- Tiempo de muerte en unidades ratón para la toxina que provoca parálisis. Tabla de Sommer's. (A.O.A.C., 1995)	71
II.- Corrección por peso en ratón (A.O.A.C., 1995)	72
III.- Curva de calibración de saxitoxina	73
IV.- Cromatograma usado como base para la obtención de porcentajes de toxinas. Oxidación poscolumna (Lawrence <i>et al.</i> , 1991).	74
V.- Composición fitoplanctónica del 3 de Agosto de 1995, dentro de la rada portuaria.	75
VI.- Índice de dominancia de Simpson para <i>L. polyedra</i> en los eventos de marea roja.	76
VII.- Índice de diversidad específicas de Shannon-Weaver ( $H'$ ), determinada para el primer y segundo período de muestreo de fitoplancton.	76
VIII.- Ejemplos de perfiles cromatográficos de fitoplancton y <i>M. californianus</i> , de la Bahía de Todos Santos, B. C.	77
IX.- Composición fitoplanctónica del florecimiento del 12 de septiembre de 1995, en la zona exterior al muelle.	79
X.- Composición fitoplanctónica del 15 de marzo de 1996, frente de la dársena portuaria.	79
XI.- Composición fitoplanctónica del 15 de marzo de 1996, dentro de la dársena portuaria.	80
XII.- Prueba de Wilcoxon para muestras independientes desequilibradas.	80
XIII.- Prueba de Contingencia.	81

## **I.- INTRODUCCION**

La taxocenosis fitoplanctónica incluye Dinoflagellatae, Bacillariophyceae, Rhaphidophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae, Prasinophyceae, Haptophyceae, Rhodophyceae y Xantophyceae (Sournia, 1981), las dos primeras clases en su mayoría son algas fotosintéticas unicelulares cuyo diámetro varía entre 10 y 200  $\mu\text{m}$ . Ciertas especies, bajo condiciones ambientales favorables, pueden reproducirse rápidamente hasta que la diversidad fitoplanctónica es reducida prácticamente a una especie dominante. Estos florecimientos se presentan generalmente en las zonas costeras y son frecuentemente visibles en áreas extensas de aguas que cambian de color y se les conoce comunmente como "marea roja" (Langlois *et al.*, 1991).

Algunos de los fitoplanctares que producen florecimientos pueden ser tóxicos o no tóxicos tanto para la fauna circundante, como para la salud del hombre, pudiendo ser excesivamente tóxicos cuando la especie causante genera toxina (Sournia, 1995).

Los florecimientos algales de fitoplancton tóxico tienen efectos negativos como: pérdidas económicas en la acuicultura, en la pesca y en operaciones turísticas, aunque su principal impacto es sobre la salud. En la mayoría de los casos, las proliferaciones del fitoplancton no tóxico son benéficas para la acuicultura y la pesquería (Hallegraeff, 1993).

La importancia de diversos estudios reside en identificar el impacto que ocasionan algunas especies fitoplanctónicas tóxicas que suelen presentarse temporalmente en zonas costeras con alta productividad pesquera (Hallegraeff, 1993).

Las toxinas marinas de origen algal, son llamadas colectivamente ficotoxinas, éstas son un grupo de compuestos químicos biológicamente activos cuya toxicidad se manifiesta de diferentes maneras en sus consumidores (Shumway y Cembella, 1993). Entre las ficotoxinas más conocidas se encuentran las que provocan:

parálisis, amnesia, neurosis, y diarrea en el hombre (Shumway y Cembella, 1993); otra toxina conocida como ciguatera puede causar la muerte a peces y a otros animales (Mercado *et al.*, 1995).

Los dinoflagelados marinos que generan la toxina que produce parálisis en aguas subtropicales son, entre otros: algunas especies de los géneros *Alexandrium*, y *Gymnodinium catenatum* (Shumway y Cembella, 1993); en aguas tropicales frecuentemente se ha reportado la especie *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Hallegraef, 1993). La toxina que produce amnesia en el medio marino es generada principalmente por distintas clases de algas, entre otras, la más común es la especie *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis*, una diatomea penada (Shumway y Cembella, 1993; Steidinger, 1993). La neurotoxina es producida por varias especies del género *Gymnodinium*, una de ellas es *G. breve* (Shumway y Cembella, 1993; Steidinger, 1993). Los dinoflagelados planctónicos usualmente implicados en la incidencia de diarrea incluyen especies del género *Dinophysis* spp., y algunas especies epifíticas/bénticas de dinoflagelados del género *Prorocentrum* (Shumway y Cembella, 1993).

La ciguatera es producida; entre otros, por *Gambierdiscus toxicus* y algunas especies de dinoflagelados bénticos del género *Amphidinium*, *Prorocentrum*, *Coolia* (Bagnis, 1993), *Ostreopsis lenticularis* (Mercado *et al.*, 1995).

Las toxinas que producen parálisis se dividen en tres grupos: **a)** Las toxinas carbamatos (saxitoxina, neosaxitoxina, gonyautoxina I, II, III, IV) son las más tóxicas, y las responsables de los síntomas de toxicidad, **b)** el grupo de las sulfocarbamoil (B1, B2, C1, C2, C3, C4), y **c)** las toxinas decarbamoil (dc-saxitoxina, dc-neosaxitoxina, dc-gonyautoxina I, II, III, IV) son producto de la conversión metabólica de los otros dos grupos de toxinas en los moluscos. La toxicidad de las toxinas del grupo decarbamoil es intermedia entre las carbamatos y sulfocarbamoil (Sullivan, 1993).

El ácido domoico es un aminoácido neurotóxico que provoca amnesia (Baden y Trainer, 1993). La neurotoxina en un poliéter conocido como brevetoxina

(Shimizu *et al.*, 1995). Las toxinas que provocan diarrea se dividen en tres grupos: el ácido okadaico y dinophysis-toxina; la pectenotoxina y la yessotoxina (Aune y Yndestad, 1993).

Las toxinas que provocan toxicidad en peces por ciguatera son: la ciguatotoxina (Park *et al.*, 1995; Yasumoto *et al.*, 1995), maitotoxina (Yasumoto *et al.*, 1995), scaritoxina, gambiertoxina, entre otras (Steidinger, 1993).

Estos compuestos tóxicos pueden ser ácidos grasos, cadenas peptídicas, polisacáridos, aminoácidos, entre otros; estas sustancias pueden ser emitidas como secreción, excreción o quedar en libertad después de la lisis de la célula (Sullivan, 1993), los que pueden ser acumulados en glándulas digestivas por moluscos bivalvos y otros filtroalimentadores (Shumway y Cembella, 1993). Los peces herbívoros son los principales vectores de intoxicación por ciguatera en el hombre (Davin y Kohler, 1988; Andersen, 1996).

Para la determinación de ficotoxinas existen métodos directos e indirectos, entre los directos se encuentran los analíticos y entre los indirectos se encuentran los bioensayos en ratón (Sullivan, 1993).

Con la aplicación de técnicas analíticas, la variabilidad entre los resultados se puede reducir hasta valores menores de 10 % en la concentración de saxitoxina, por ejemplo, determinándose resultados mucho más confiables en los cuales pudiesen basarse las decisiones de regulación (Sullivan, 1993).

El uso de la cromatografía líquida de alta resolución ha permitido realizar estudios cualitativos y cuantitativos en toxinas que provocan parálisis (Sullivan *et al.*, 1983), diarrea (Dickey *et al.*, 1993), amnesia (Mackenzie *et al.*, 1993), neurosis (Shimizu *et al.*, 1995) y ciguatera (Yasumoto *et al.*, 1995), donde las ficotoxinas se pueden analizar individualmente o en grupo (Sullivan, 1993).

El método indirecto de bioensayo en ratón resulta poco adecuado para detectar diferencias de toxicidad (Costas *et al.*, 1986), el error en los resultados que se obtiene con este método puede exceder del 20% del verdadero valor. La variabilidad excesiva que se obtiene a partir de los bioensayos con ratón, es

frecuentemente citada forzando de esta manera a la búsqueda de técnicas alternativas (Sullivan, 1993).

El bioensayo en ratón no proporciona información acerca de la identidad de las toxinas individuales que pueden estar presentes, este método indirecto está limitado a proveer solamente una aproximación de la toxicidad total de la muestra, que puede ser convertida en una cantidad con base en una toxina de referencia (Sullivan, 1993).

Entre las ventajas que proporcionan los bioensayos en ratón se pueden considerar: la obtención de resultados a un bajo costo en ausencia de infraestructura analítica, el bioensayo se realiza de manera sencilla y la respuesta se obtiene de manera casi inmediata (Andersen, 1996). El bioensayo en ratón fue la base para descubrir, estudiar y regular todas las toxinas marinas (Sullivan, 1993).

Al igual que en otras costas del mundo, la Bahía de Todos Santos, B. C. recibe aportes de nutrientes originados en los desechos de aguas residuales (López-Ramírez, 1993) y de tipo industrial en diversas zonas de la bahía (Cacho-López, 1993), permitiendo la eutroficación (Segovia-Zavala *et al.*, 1988). Con el enriquecimiento de nutrientes y de materia orgánica es posible la proliferación de especies susceptibles de generar mareas rojas (Mosqueda-Razo, 1995).

Además, de que los estudios de fitoplancton en la Bahía de Todos Santos, son pocos; éstos han sido enfocados a su distribución y abundancia (Rivas-Lozano y Millán-Nuñez, 1991), variabilidad temporal (Millán-Nuñez y Loya-Salinas, 1993) y biomasa fitoplanctónica (Aguirre-Buenfil, 1983).

En la parte norte de la bahía, Mosqueda-Razo, (1995) estudió la variabilidad anual de la diversidad fitoplanctónica, en el que hace un listado de géneros entre los que destacan: *Gonyaulax*, *Nitzschia*, *Gymnodinium* y *Prorocentrum* que incluyen especies susceptibles en generar florecimientos.

Entre las mareas rojas que han coloreado el agua en el área de estudio, se encuentran las siguientes especies: i) *Prorocentrum micans* con una densidad de  $2 \times 10^4$  células  $l^{-1}$  durante junio de 1985 y de  $2 \times 10^4$  células  $l^{-1}$  en el mismo mes pero en el año 1986; ii) *Lingulodinium polyedra* con una densidad de  $1 \times 10^6$  células  $l^{-1}$  (1991) y de  $5 \times 10^7$  células  $l^{-1}$  en mayo de 1992, y iii) *Gymnodinium splendens* (= *sanguineum*) con una densidad de  $1 \times 10^6$  células  $l^{-1}$  (Orellana *et al.*, 1996).

*Lingulodinium polyedra* es uno de los dinoflagelados que era considerado como no tóxico (Bates *et al.*, 1978, Patton *et al.*, 1967). En contraposición, los resultados positivos de la presencia de neurotoxina en extractos de *L. polyedra* en cultivo no axénico han sido reportados por algunos investigadores (Schradie y Bliss, 1962).

En la Bahía de Todos Santos se cultiva comercialmente mejillón, las investigaciones realizadas para la sanidad de moluscos bivalvos en los moluscos de la bahía corresponden a determinaciones microbiológicas (Orozco-Borbón y Sañudo-Wilheimy, 1988; Orozco-Borbón *et al.*, 1994) y en otros estudios a la contaminación por metales pesados (Reynoso-Nuño y Jorajuria, 1988). A la fecha, no se cuenta con trabajos de investigación que reporten la presencia de posibles ficotoxinas en mejillones de la Bahía de Todos Santos, B. C. (SEMARNAP, 1996, Departamento de Acuacultura, comunicación personal), lo que motivó el desarrollo del presente trabajo, cuyo objetivo general es la determinación de biotoxinas en moluscos bivalvos y su relación con el fitoplancton que las genera cuando son expuestos a los florecimientos fitoplanctónicos.

Los objetivos particulares son: a) la determinación de ficotoxinas en fitoplancton y en mejillón *Mytilus californianus* de la Bahía de Todos Santos, B. C. b) determinar la toxicidad en fitoplancton y moluscos bivalvos durante los eventos de marea roja, para conocer su aceptabilidad para el consumo humano. Las hipótesis son: a) las especies fitoplanctónicas de la Bahía de Todos Santos

producen toxinas; b) el mejillón *Mytilus californianus* de Bahía de todos Santos es aceptable para consumo humano.

Con respecto a las proliferaciones de microalgas tóxicas en el suroeste mexicano, se tiene que *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* fue reportado en 1942 en las costas del suroeste Mexicano (Steidinger *et al.*, 1980). En 1987 Rosales-Loessener *et al.*, (1989) reportaron una marea roja de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en las costas de Guatemala, resultando un total de 186 personas intoxicadas y 26 muertos por consumo de almejas (*Alphichaena kindermanni*) recolectadas durante ese evento.

Hacia el suroeste del Pacífico, las mareas rojas han sido poco frecuentes e incluso en algunas áreas no se tenía conocimiento de ellas, hasta hace veinte años. Del 7 al 21 de diciembre de 1989 se presentaron mareas rojas frente a las costas de Chiapas y Oaxaca, producidas por *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Cortés-Altamirano *et al.*, 1993)

Otra zona en la que recientemente se han presentado floraciones microalgales es la Bahía de Acapulco en Guerrero, donde se conocen 3 o 4 brotes muy fuertes, éstos se han detectado gracias a los informes técnicos del "Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos" (Cortés-Altamirano *et al.*, 1995). Los florecimientos repercuten distintamente a la salud, economía y pesquería a lo largo del litoral de la costa del Pacífico, por lo anterior el objetivo particular es la determinación de saxitoxina en moluscos bivalvos, procedentes de las costas de Guerrero y Michoacán, para certificar la aceptabilidad para consumo humano. La hipótesis de trabajo es: los moluscos bivalvos del suroeste mexicano son tóxicos superando el límite permisible (80 µg de saxitoxina/100 gr de tejido).

## **II.- MATERIALES Y METODOS**

### **II. 1 AREA DE ESTUDIO EN LA BAHIA DE TODOS SANTOS, B. C.**

La Bahía de Todos Santos se encuentra localizada entre los paralelos  $31^{\circ} 40'$  y  $31^{\circ} 50'$  de latitud Norte y de  $116^{\circ} 36'$  a  $116^{\circ} 50'$  de longitud Oeste. Está limitada al Sur por la península de Punta Banda que es rocosa y montañosa y por las Islas de Todos Santos al Oeste, por el Norte con Punta San Miguel; y al Sureste por el Estero de Punta Banda. La Bahía es un cuerpo de agua, que se considera somero, porque el 80% de su profundidad es menor que 50 metros (Secretaría de Marina, 1974).

En la Bahía de Todos Santos se encuentra el Puerto de Ensenada situado en el extremo nororiental a los  $116^{\circ} 38'$  y  $116^{\circ} 37'$  de longitud Oeste y, los  $31^{\circ} 51'$  y  $30^{\circ} 50'$  de latitud Norte (Fig. 1). El Puerto se encuentra protegido por un rompeolas, cuya longitud es de 1640 m. Cuenta también con un espigón localizado al Norte de la rada con una longitud de 855 m. Es clasificado como Puerto de Altura y cuenta con una superficie aproximada de  $1.95 \text{ km}^2$  (Macías-Carranza, 1996).

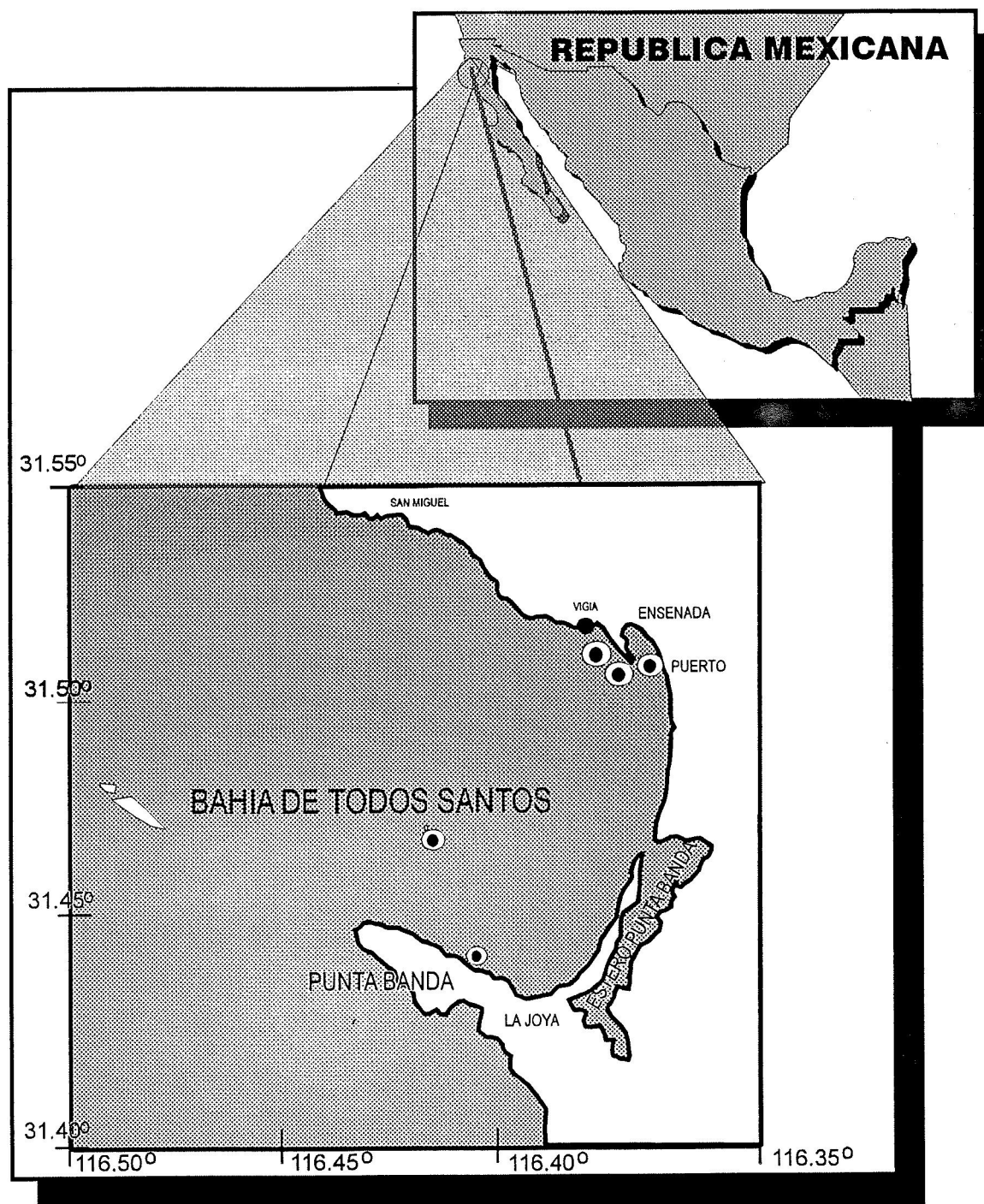


Fig. 1 Localización de las áreas de muestreo en la Bahía de Todos Santos, B.C.

## **II. 2 AREA DE ESTUDIO EN EL SUROESTE DE MEXICO**

El área de estudio en el suroeste de la república se localiza a lo largo de la costa del Pacífico Mexicano, entre los límites estatales de Michoacán y Guerrero. El estado de Michoacán se encuentra localizado a los 18° 36' de latitud Norte, en el límite con el estado de Colima y 102° 12' de longitud Oeste, al Sur con el estado de Guerrero (Morales-de la Garza *et al.*, 1988).

La zona costera del estado de Guerrero se extiende 420 km, desde la desembocadura del río Balsas, en el límite con el estado de Michoacán a los 17° 54' de latitud Norte y 102° 12' de longitud Oeste, hasta Punta Maldonado, al Sur con el estado de Oaxaca a los 16° 15' de latitud Norte y 98° 30' de longitud Oeste. La mayor parte de la costa se caracteriza por el litoral lagunar, aunque también presenta algunas zonas rocosas y llanuras de bajo relieve. La plataforma continental, tiene una profundidad máxima de 180 metros y una anchura pequeña y variable. El límite de la plataforma continental es irregular frente a las cercanías de Zihuatanejo y Acapulco. Toda el área costera de Guerrero presenta un clima tropical subhúmedo, con lluvias en verano y sequía en invierno. La precipitación más importante ocurre entre mayo y octubre, durante la presencia de los vientos marinos del suroeste (Coronado-Molina y Amezcua-Linares, 1988) (Fig. 2).

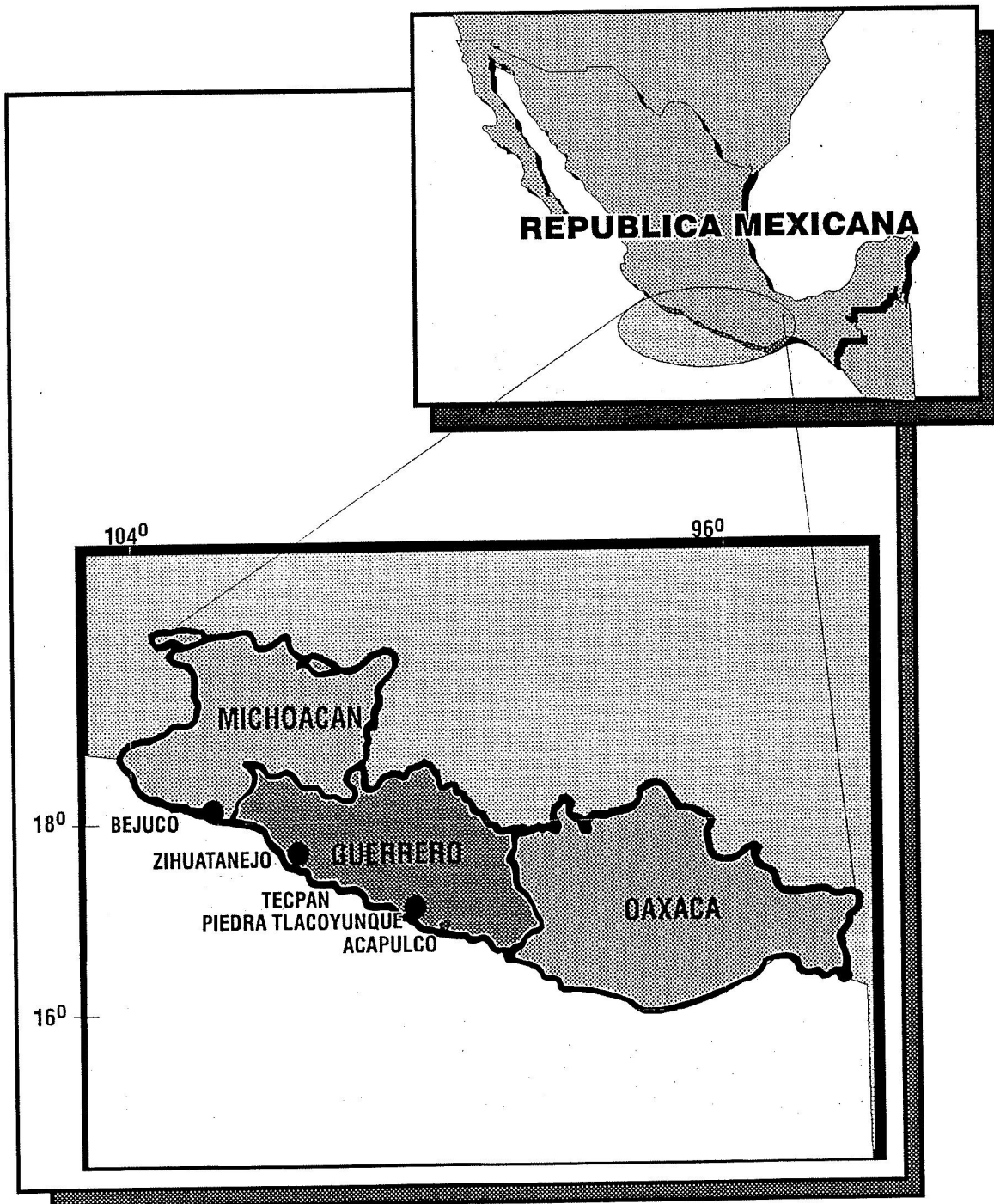


Fig. 2 Localización del área de estudio en el suroeste mexicano.

### **II.3 RECOLECTA DE FITOPLANCTON Y MOLUSCOS BIVALVOS**

Los muestreos de fitoplancton y de los moluscos se realizaron en Bahía de Todos Santos de agosto a septiembre de 1995 (primer período), de febrero a marzo de 1996 (segundo período) y en agosto de 1996 (tercer período) (Tabla I). En noviembre de 1995 se recolectaron moluscos bivalvos en el suroeste mexicano (Tabla II). La Tabla I y II muestra las replicas verdaderas.

Las muestras para el análisis cualitativo de fitoplancton se obtuvieron con la ayuda de una red para plancton #20, arrastrada dentro de la mancha durante 5 minutos a una velocidad de 3 nudos (Tangen, 1978); en una lancha con motor fuera de borda. Para los análisis cuantitativos de fitoplancton se recolectó agua (Venrick, 1978) de superficie dentro de la mancha de marea roja.

Se fijó una alicuota de fitoplancton de red con solución de formol al 4% y una alicuota de agua de superficie con lugol, para su determinación taxonómica (Thronsdén, 1978). La recolecta de los moluscos bivalvos se hizo manualmente en la zona intermareal en las áreas de muestreo. Las muestras de agua y de los moluscos se trasladaron al laboratorio para la extracción de ficotoxinas.

Tabla I.- Fecha de recolecta de fitoplancton (\*) y mejillones (\*\*)  
en la Bahía de Todos Santos, B. C.

PERIODO	FECHA	LOCALIDAD	No.de replicas	
P	3/08/95	*Dársena portuaria	3	
	21/08/95	*Dársena portuaria	3	
	21/08/95	**Rincón de Ballenas	5	
	23/08/95	**Rincón de Ballenas	5	
R	28/08/95	*Dársena portuaria	3	
	28/08/95	**Rincón de Ballenas	5	
	31/08/95	*Dársena portuaria	3	
I	31/08/95	**Rincón de Ballenas	5	
	4/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
	5/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
M	5/09/95	*Dársena portuaria	6	
	8/09/95	*Dársena portuaria	3	
	10/09/95	*Dársena portuaria	3	
	10/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
	12/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
E	12/09/95	*Dársena portuaria	3	
	12/09/95	**Zona exterior del muelle	2	
	19/09/95	**Dársena portuaria	3	
	19/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
R	22/09/95	*Zona exterior del muelle	2	
	22/09/95	*Dársena portuaria	3	
	24/09/95	*Dársena portuaria	3	
	24/09/95	**Rincón de Ballenas	3	
	26/09/95	*Dársena portuaria	3	
	26/09/95	**Rincón de Ballenas	2	
	O	28/09/95	*Dársena portuaria	3

Continuación de la Tabla I.

PERIODO	FECHA	LOCALIDAD	No.de replicas
S E G U N D O	6/02/96	*Dársena portuaria	3
	6/02/96	**Rincón de Ballenas	2
	6/02/96	**Zona exterior del muelle	2
	19/02/96	*Dársena portuaria	3
	19/02/96	**Rincón de Ballenas	2
	19/02/96	**Zona exterior del muelle	2
	6/03/96	**Rincón de Ballenas	2
	6/03/96	**Zona exterior del muelle	2
	6/03/96	*Dársena portuaria	2
	15/03/96	*Dársena portuaria	3
	15/03/96	*Frente dársena	3
	15/03/96	**Zona exterior del muelle	3
T E R C E R O	8/09/96	*Dársena portuaria	6
		*Dársena portuaria	6
		*Medio de la bahía	6
		*Area de cultivo de mejillones	6
		**Area de cultivo de mejillones	3

TABLA II.- Fecha de recolecta de moluscos bivalvos en el suroeste de México.

FECHA	LOCALIDAD	MUESTRA	REPLICAS
8/11/95	Zihuatanejo, Gro.	<i>Donax</i> sp.	2
11/11/95	El Reventón, Gro.	<i>Crassostrea iridescens</i>	2
11/11/95	Tecpan, Gro.	<i>Crassostrea iridescens</i>	2
11/11/95	Tlalcoyunque, Gro.	<i>Crassostrea iridescens</i>	2
18/11/95	Bejuco, Mich.	<i>Crassostrea iridescens</i>	2
21/11/95	Bejuco, Mich.	<i>Crassostrea iridescens</i>	2

#### II.4 Fitoplancton.

Para la identificación a nivel género y especie se consultaron los trabajos de: Allen (1941), Balech (1962) y (1963); Dodge (1985); Orellana-Cepeda (1971); Ricard (1987); Sournia (1967); Yamaji (1980), así como una lista de especies reportadas en la zona estudiada de muestreos realizados en las actividades del Proyecto "Ecofisiología del fitoplancton costero" (Orellana-Cepeda, 1994).

El conteo se realizó en un microscopio compuesto Wild Heerbrugg, utilizando los aumentos 100x y 400x. Los conteos se hicieron usando una cámara de conteo Sedwick-Rafter (Guillard, 1978), por transectos horizontales cubriendo la totalidad de la cámara. Con la ayuda de un contador de células DC Counter, el cual permite anotar 8 especies simultáneamente donde se registró el número de organismos de cada especie encontrada.

La diversidad de especies comunmente se puede estimar a través de varios índices (Siqueiros-Beltrones, 1990). Para conocer la estructura fitoplanctónica se utilizó el índice de diversidad de Shannon-Weaver (Patten, 1962). La diversidad de una comunidad comprende tanto el número total de especies en la muestra (S), como la abundancia relativa ( $p_i$ ) (Peet, 1974). El índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) se estima a partir de la siguiente expresión:

$$H' = -\sum_{i=1}^m p_i \text{Log}_2 p_i$$

donde:  $p_i$  = abundancia relativa de la especie  $i$  y dada por  $n_i/N$

$n_i$  = número de organismos de la especie  $y$

$N$  = número total de organismos contados en la muestra

(Margalef, 1977).

El índice de dominancia de Simpson se determinó con los datos cuantitativos obtenidos de los conteos con la cámara Sedwick-Rafter. El índice de dominancia

en una comunidad indica el efectivo total en la muestra (N), así como el valor de importancia relativa de la especie ( $n_j$ ).

El índice de dominancia de Simpson se obtiene a partir de la siguiente ecuación,

$$\lambda = \sum_{i=1}^S \frac{n_i^2}{N}$$

### ***II.5 Extracción de ficotoxinas que producen parálisis (Bricelj et al., 1990 y Boyer et al., 1987).***

El agua de mar superficial que contenía fitoplancton, se centrifugó 100 ml a 1650 gravedades (g) durante 10 minutos, para precipitar las células. Una vez formado el precipitado de células se decantó el sobrenadante, el precipitado se enjuagó con agua destilada para eliminar sales. Después de eliminar las sales, se agregó a cada muestra 5 ml de ácido acético 0.03 N (Bricelj et al., 1990). Para la extracción de las toxinas se sometió la muestra al ultrasonido durante 10 minutos, provocando la lisis de las células para liberar al medio acuoso el contenido celular con las toxinas. Posteriormente se centrifugó a 1650 (g) durante 10 minutos, para precipitar la pared celular de las microalgas. Para eliminar partículas que quedaron en el sobrenadante, éste se hizo pasar a través de un filtro de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ . Cada sobrenadante se almacenó en frascos de vidrio a temperatura de  $-20^\circ \text{C}$  hasta el bioensayo en ratón y análisis cromatográfico.

Los moluscos recolectados se dividieron en tres submuestras. Las submuestras se enjuagaron con agua dulce para eliminar impurezas, después se desconcharon y se pesaron. Por cada gramo de tejido total se añadió 1 ml de ácido

acético 0.03N, se homogenizó hasta obtener una pasta fina, posteriormente se centrifugó a 2400 g durante 30 minutos, para separar el tejido de la fase acuosa. El sobrenadante que contenía las toxinas se pasó en filtros GF/C, para eliminar partículas. Al igual que los extractos de fitoplancton, la fase acuosa se almacenó en frascos de vidrio y se conservó a temperatura de -20 °C, hasta su aplicación en bioensayos y en análisis químico.

### **II.6 Metodo biológico para la determinación de toxinas que provocan parálisis (A.O.A.C., 1995).**

Se usaron ratones albinos, machos, sanos con un peso entre 19 y 21 gramos. El peso de cada ratón se leyó todos los días en que se realizaron los bioensayos, hasta en el momento de la inyección. Los ratones que no alcanzaban el peso óptimo, se les alimentaba hasta que cada ratón obtenía el peso requerido para el bioensayo, se mantenían en ayunas durante 24 horas para comprobar la estabilidad de su peso.

Para la estandarización del bioensayo se utilizó una solución de referencia de saxitoxina (1 µg de saxitoxina/ml), la cual se preparó diluyendo 1 ml (medido con una pipeta Eppendorf de capacidad de 1000 µl del estándar de saxitoxina (100 µg/ml) en un matraz volumétrico de 100 ml y aforando con agua destilada acidificada con HCl (pH de 3).

Una vez obtenida la solución de referencia, se procedió a la estandarización del bioensayo se realizó diluyendo 10 ml de la solución de referencia (1 µg de saxitoxina/ml) con 10, 15, 20, 25 y 30 ml de agua acidificada con HCl (pH de 3), respectivamente. Las cinco diluciones se fueron emplearon en la estandarización del bioensayo.

Para la estandarización se utilizó un grupo de 10 ratones para cada dilución, Antes de la inoculación se pesaron individualmente y se registraron sus pesos para posteriores cálculos. A cada ratón se les inyectó intraperitonealmente 1 ml de la dilución preparada.

Se obtuvo la mediana del tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones utilizados con cada dilución. A partir de la mediana del tiempo de muerte se determinó las unidades ratón (U.R.) por mililitro (U.R./ml); aplicando la Tabla de Sommer's (Anexo I).

Con el peso de cada ratón, se determinó el factor de corrección por peso (Anexo II). Multiplicando las unidades ratón por el factor de corrección por peso se obtuvo el valor de las unidades ratón corregidas (U.R.C.) por mililitro de dilución (U.R.C/ ml). El factor de conversión (2.4) se obtuvo dividiendo los  $\mu\text{g}$  de saxitoxina/ml calculados en las diluciones por las unidades ratón corregidas. Este factor representa la cantidad de saxitoxina expresada en  $\mu\text{g}$  de saxitoxina equivalente a una unidad ratón (A.O.A.C. 1995).

Este factor de conversión se utilizó para obtener la toxicidad en los moluscos, a partir de los tiempos de muerte que se registraron al inocular intraperitonealmente 1 ml de extracto acuoso que contenía toxina (A.O.A.C. 1995). Las inoculaciones se realizaron por triplicado de cada extracto problema. Se registraron los pesos de los ratones utilizados en el bioensayo. Inmediatamente después de la inoculación se observaron signos de intoxicación como son: pérdida de movilidad, piloerección, parálisis en extremidades posteriores y anteriores, ansiedad, convulsiones, jadeo y muerte. Se anotó el tiempo de muerte de los ratones que fueron inoculados con muestras tóxicas.

Se determinó la mediana del tiempo de muerte, incluyendo sobrevivientes. De la Tabla de Sommer's (Anexo I) se obtuvieron las unidades ratón (U.R) correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón inoculado con extracto de moluscos contaminados por ficotoxinas que provocan parálisis. A cada peso de los ratones se les calculó el factor de corrección por peso (Anexo II). Multiplicando las unidades ratón por el factor de corrección por peso, se obtuvo el valor de las unidades ratón, corregidas por mililitro de dilución (U.R. / ml) (A.O.A.C., 1995).

Los animales que sobrevivieron al inocular los extractos ácidos de tejido de moluscos y fitoplancton, fueron observados durante las 48 horas después de la inyección.

**La toxicidad se calculó a partir de la siguiente ecuación:**

$$\mu\text{g STX eq./100 grs de tejido de molusco} = (\mu\text{g saxitoxina/ml}) \times \text{factor de dilución}$$

**II.7 *Análisis de toxinas que producen parálisis por cromatografía líquida de alta resolución con reactor post-columna* (Oshima et al., 1987, Oshima, Y. 1995., Martínez et al., 1996).**

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) Modelo 1050 con una columna ODS de velosil C18 fase inversa de 4.6 x 250 mm y un reactor post-columna Pickering Modelo PCX 5100.

Las condiciones de análisis utilizadas consistieron en una fase móvil de ácido hexanosulfónico y ácido heptanosulfónico 1.5 mM, ácido acético 20 mM y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM ajustado con NH<sub>4</sub>OH a pH de 7.5, con un flujo de 0.6 ml/min. La fase oxidante fue preparada con ácido peryódico 7 mM y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM ajustado con NaOH a pH de 9 y un flujo de 0.6 ml/min. La temperatura de reacción fue de 75 ° C.

Como fase ácida se ocupó el ácido acético 0.5 M. La longitud de onda de excitación fue de 340 nm y de emisión a 410 nm.

El límite de detección (LD) fue calculado en base a la técnica de la dilución la cual consiste en la resolución cromatográfica de la concentración mínima detectable.

En la curva de calibración se utilizaron cinco soluciones de 0.1, 0.50, 1.50, 2.50 µg de saxitoxina/ml, acidificadas con ácido acético 0.03 N a pH de 3. (En

el Anexo III se muestra la curva de calibración obtenida de las diluciones empleadas).

Antes de iniciar el análisis, se prelimpió cada extracto de fitoplancton y moluscos, centrifugando a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C y posteriormente se ultrafiltró, para eliminar los sólidos en la muestra. La fase acuosa fue inyectada en el cromatógrafo líquido, donde era transportada por la fase móvil y al entrar en contacto con la fase oxidante formaba un derivado fluorescente. Finalmente, los derivados fueron detectados a 410 nm.

### **II.8 Procesamiento de la información.**

Para describir la estructura de la comunidad fitoplanctónica se usó el índice de diversidad de Shannon-Weaver (Margalef, 1977).

Los perfiles cromatográficos obtenidos de los extractos de fitoplancton de las mareas rojas provocadas por *Lingulodinium polyedra* y los de *M. californianus* fueron comparados con el perfil que obtuvieron Lawrence *et al.*, (1991) (Anexo IV) de un estándar con derivados de la toxina que provoca parálisis. Obtenido con el método de post-columna, al igual que el utilizado en este estudio.

Sólo se trabajó con el estándar de saxitoxina, aprobado y proporcionado por la Administración de Drogas y Alimento (por sus siglas en inglés Food Drugs Administration, FDA) de Estados Unidos de Norteamérica.

La identificación de toxinas se basa en que existe una clara regularidad en la aparición de cada toxina en el cromatograma, lo que hace sencillo identificarlas. La cualificación de tales toxinas se considera válida debido que el tiempo de retención son similares, cuándo se utilizan las mismas condiciones de análisis.

El porcentaje de la toxinas presentes en los perfiles cromatográficos de extractos ácidos de fitoplancton y moluscos fue aplicado para mostrar variaciones en las proporciones de los componentes tóxicos (Sousa *et al.*, 1995).

La prueba de Wilcoxon se utilizó para investigar si existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos en cromatografía líquida de los extractos ácidos de mejillones, de cada uno de los días de muestreo en los diferentes períodos.

La estadística no paramétrica de Wilcoxon para dos muestras independientes, se aplicó para probar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos períodos de muestreo. El uso de esta prueba también permitirá determinar si los porcentajes de toxinas son similares en el primer y segundo período de muestreo. Así mismo, se determinó si existen diferencias significativas entre la abundancia fitoplanctónica entre un sitio y otro.

Para demostrar el grado de asociación entre grupos de toxinas que se obtuvieron de los extractos de fitoplancton y mejillones, se utilizó la prueba de contingencia (Zar, 1984).

### III.- RESULTADOS

#### ***Evento de marea roja en la Bahía de Todos Santos, B. C., en verano y otoño de 1995 (primer período).***

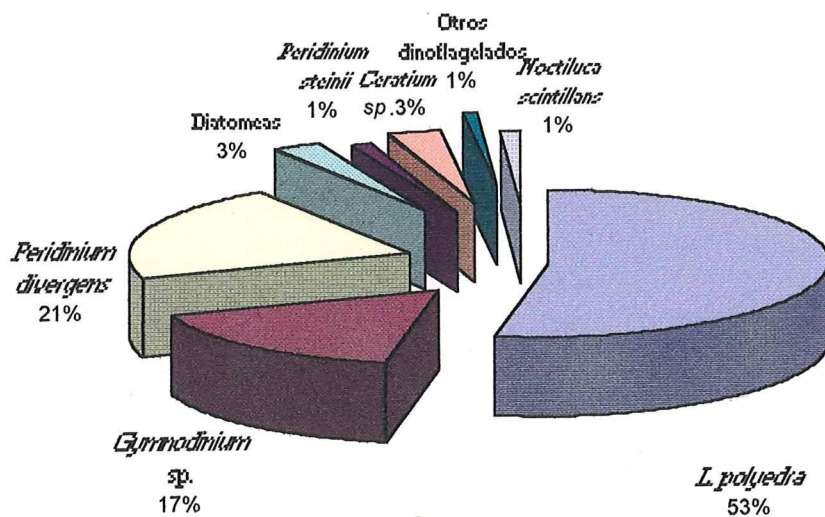
##### ***Fitoplancton.***

En este período de muestreo de fitoplancton se presentaron florecimientos del dinoflagelado *Lingulodinium polyedra* en la dársena portuaria y en la zona exterior del muelle, observándose un color rojo ladrillo en el agua.

Las condiciones atmosféricas en que se presentaron las mareas rojas durante este período; fueron días soleados y templados. Por ejemplo, el día 3 de agosto de 1995 (Fig. 3) se observó una densidad específica de  $793 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> para *L. polyedra* y de  $254 \times 10^3$  células l<sup>-1</sup> para *Gymnodinium* sp. correspondiendo entre ambos a 70 % del total. (La composición fitoplanctónica se presenta en el Anexo V).

El índice de dominancia de Simpson para esta fecha correspondió a 0.53 (Anexo VI). El índice de diversidad específica de Shannon-Weaver (H') para el día 3 de agosto fue de 2.3. El dinoflagelado *L. polyedra* ocupó un 53 % y *Gymnodinium* sp. el 17 % .

Durante el primer período se determinó una diversidad mínima (Anexo VII) de 0.85 el 12 de septiembre de 1995 en la zona exterior del muelle. La composición fitoplanctónica de la marea roja en esa fecha, se presenta en el Anexo VIII, donde se puede observar que *L. polyedra* ocupó el 91 % del total.



**Fig. 3.-** Composición porcentual de fitoplancton dentro de dársena portuaria en la Bahía de Todos Santos, B. C., durante la marea roja del 3 de Agosto de 1995.

El índice de dominancia de Simpson en la dársena portuaria fue de 0.91 durante el evento de marea roja del día 22 de septiembre. El dinoflagelado *L. polyedra* fue la especie dominante y se mantuvo en el plancton disminuyendo el índice de dominancia a 0.6 el 26 de septiembre de 1995, en el mismo lugar (Anexo VI).

### Bioensayos

Los ratones usados como testigos y blancos de reactivos no mostraron signos de intoxicación. Estos permanecieron activos durante todo el bioensayo.

Los signos observados en los ratones inoculados con los extractos ácidos de fitoplancton durante el primer período de marea roja de *L. polyedra* fueron piloerección y letargo. No se observó parálisis en las extremidades anteriores ni posteriores de los ratones. Estos signos fueron notorios inmediatamente después del inóculo intraperitoneal (Tabla III).

Tabla III.- Síntomas de intoxicación observados en ratones inoculados con extractos de fitoplancton de la dársena portuaria en Bahía de Todos Santos, B. C. en el primer período.

Fechas	Piloerección	Letargo
3/08/95	SI	SI
21/08/95	SI	SI
28 y 31/08/95	SI	SI
5, 8,10 ,12 y 19 /09/95	SI	SI
22 , 24, 26 y 28 /09/95	SI	SI

### Cromatografía

La Tabla IV muestra las composiciones porcentuales del contenido de toxinas en extractos ácidos de fitoplancton determinados en los perfiles cromatográficos, durante el primer período de muestreo. Dentro de la dársena portuaria, los días 3 de agosto y 22 de septiembre de 1995 apareció sólo la neosaxitoxina (NEOSTX). El 28 de agosto la NEOSTX fue remplazada por la gonyautoxina 2 (GTX2), con porcentaje superior al 50% de *L. polyedra*.

Los extractos ácidos de fitoplancton correspondientes al día 31 de agosto, presentan cinco derivados de toxinas que pueden causar parálisis; la toxina de

mayor porcentaje (34.4) corresponde a saxitoxina (STX), seguida por las toxinas sulfocarbamoil C1-C4 y B2 que ocupan el 32.6 % y 18.2 %, respectivamente. La NEOSTX presentó un porcentaje de 12.3, y el mínimo de 2.5 % correspondió a la toxina GTX2 (Tabla IV).

En la Tabla IV se puede observar que para el 22 de septiembre sólo se detectó en el fitoplancton a la NEOSTX con el 100% mientras que para el día 26 del mismo mes se presentaron las toxinas C1-C4, B2, GTX2 y NEOSTX, de las cuales la predominante fue la NEOSTX con 81.6% (Tabla IV).

TABLA IV.- Porcentaje de las principales toxinas identificadas en fitoplancton, de la Bahía de Todos Santos, B. C., en el primer período (agosto-septiembre de 1995).

Fecha	3/08/95	28/8/95	31/08/95	22/09/95	22/09/95	26/09/95	
LUGAR	Dentro de la dársena					Zona exterior al muelle	Dentro de la dársena
TOXINA							
C1-C4			32.6	24.7		8	
B2			18.2	19		6.7	
GTX2		100	2.5			2.2	
NEOSTX	100		12.3	56.3	100	81.6	
STX			34.4				

Para el mes de septiembre se observó una predominancia porcentual de la NEOSTX en extractos de fitoplancton, de los florecimientos ocurridos en la dársena portuaria (por ejemplo: para el día 3 de agosto, *L. polyedra* ocupó el 53% de la composición fitoplanctónica) y en la zona exterior del muelle (para el día 22 de octubre, el mismo dinoflagelado ocupó un 75% de la composición fitoplanctónica). Los de la dársena portuaria contienen además toxinas C1-C4 y B2 (por ejemplo Fig. 4a). La toxina que se presentó en un 100% en el perfil cromatográfico de las muestras de la zona exterior del muelle fue la NEOSTX (por ejemplo Fig. 4b). En el Anexo VIII se presentan ejemplos de cromatogramas de fitoplancton de la dársena portuaria del 3/08/95 (a) y de fitoplancton del mismo lugar del 31/8/95.

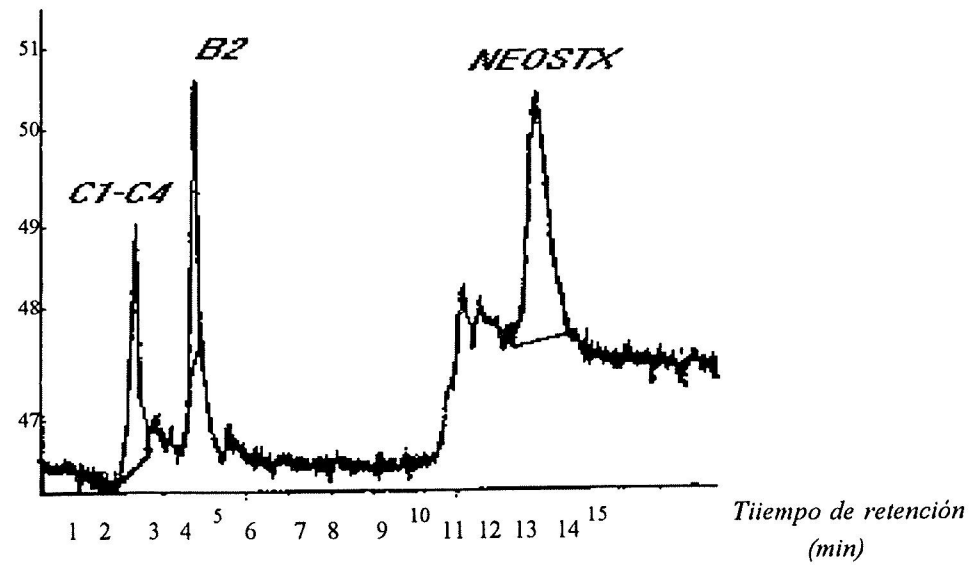


Fig. 4a.- Perfil cromatográfico característico del florecimiento en la dársena portuaria, del 22 de septiembre de 1995.

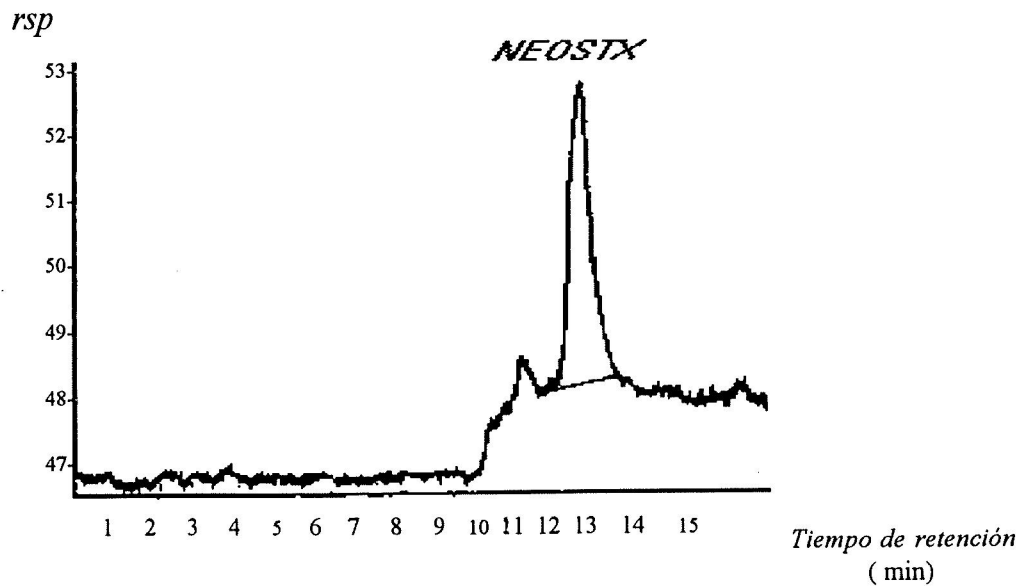


Fig. 4 b.- Perfil cromatográfico característico del florecimiento en la zona exterior del muelle, del 22 de septiembre de 1995.

Las respuestas de los ratones inyectados con extractos de mejillones recolectados en los meses de agosto y septiembre (1995) en Rincón de Ballenas (Tabla V), corresponden a signos de intoxicación como son; piloerección y letargo posterior a la inoculación del extracto ácido. Estos signos permanecieron aproximadamente por 24 horas. Los extractos de mejillones del día 23 de agosto de 1995 causaron piloerección, letargo y parálisis en las extremidades posteriores en los ratones inoculados; éstos signos de intoxicación fueron observados por 26 horas. Los ratones fueron recuperándose lentamente; a las 48 horas su actividad se restableció.

Tabla V.- Síntomas de intoxicación observados en los ratones inoculados, con extractos de *M. californianus* de Rincón de Ballenas, en la Bahía de Todos Santos, B. C. en el primer período (agosto-septiembre de 1995).

Fechas	Parálisis	Piloerección	Letargo
21/08/95	No	Si	Si
23/08/95	Extremidades anteriores	Si	Si
28 y 31/08/95	No	Si	Si
4, 5, 10 y 12 /09/95	No	Si	Si
15, 19, 24 y 26 /09/95	No	Si	Si

En el primer período se obtuvieron perfiles de toxinas presentes en los extractos de *Mytilus californianus* cuya composición porcentual para el mes de agosto y septiembre mostraron, que las toxinas C1-C4 ocuparon el mayor porcentaje (Tabla VI). La toxina B2 fue la segunda en importancia en la recolecta del día 28 de agosto y 10 de septiembre.

TABLA VI.- Porcentaje de las principales toxinas en mejillón *M. californianus* de Rincón de Ballenas, en la Bahía de Todos Santos, B. C. en el primer período (agosto-septiembre de 1995).

FECHA	23/08/95	28/08/95	31/08/95	10/09/95	19/09/95	24/09/95
TOXINA						
C1-C4	54.6	58.4	95	66.3	96.4	93
B2	5.2	47.6	4.4	29		6.3
GTX2						
NEOSTX	26.2		1.5	0.5	1.6	0.8
STX			0.3		0.7	

La neosaxitoxina (NEOSTX) constituyó la segunda toxina en importancia en los mejillones recolectados en Rincón de Ballenas el día 23 de agosto (Fig. 5a), mientras que para el 28 de agosto la toxina B2 fue la segunda en importancia (Fig. 5b). En fechas posteriores a ese período, la NEOSTX se presentó en porcentaje menor a 2 (TABLA VI). En el Anexo VIII de muestran ejemplos de perfiles cromatográficos de *M. californianus* de Rincón de Ballenas, de fechas 31/8/95 (c), 10/9/95 (d), 19/9/95 (e) y 24/9/95 (f).

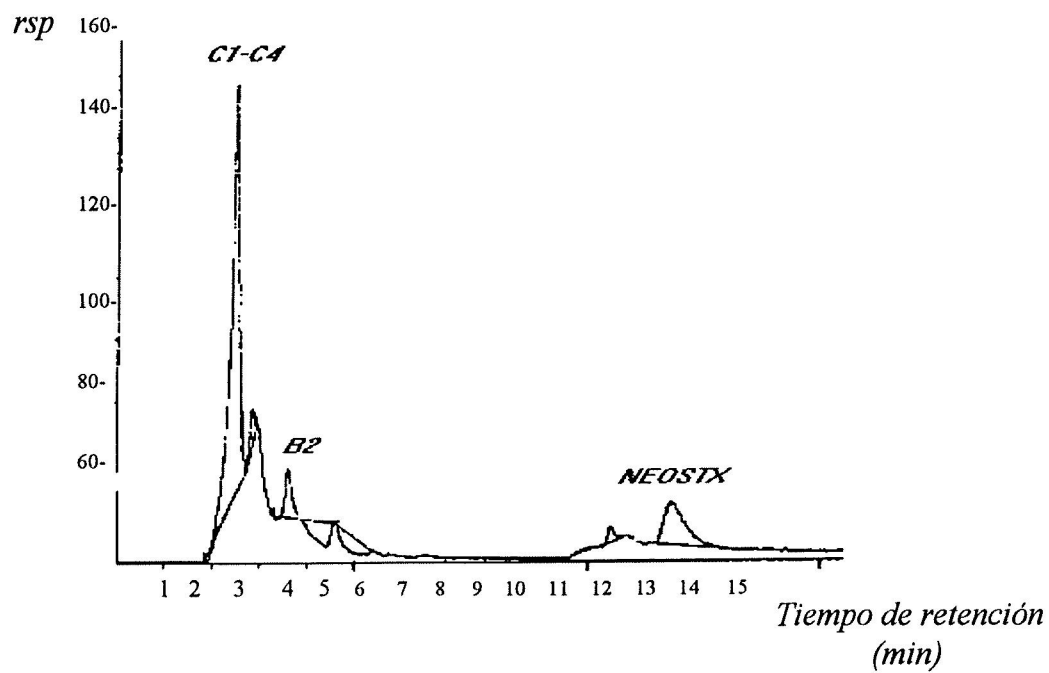


Fig. 5a.- Perfil cromatográfico característico de *M. californianus* de Rincón de Ballenas, del 23 de agosto de 1995.

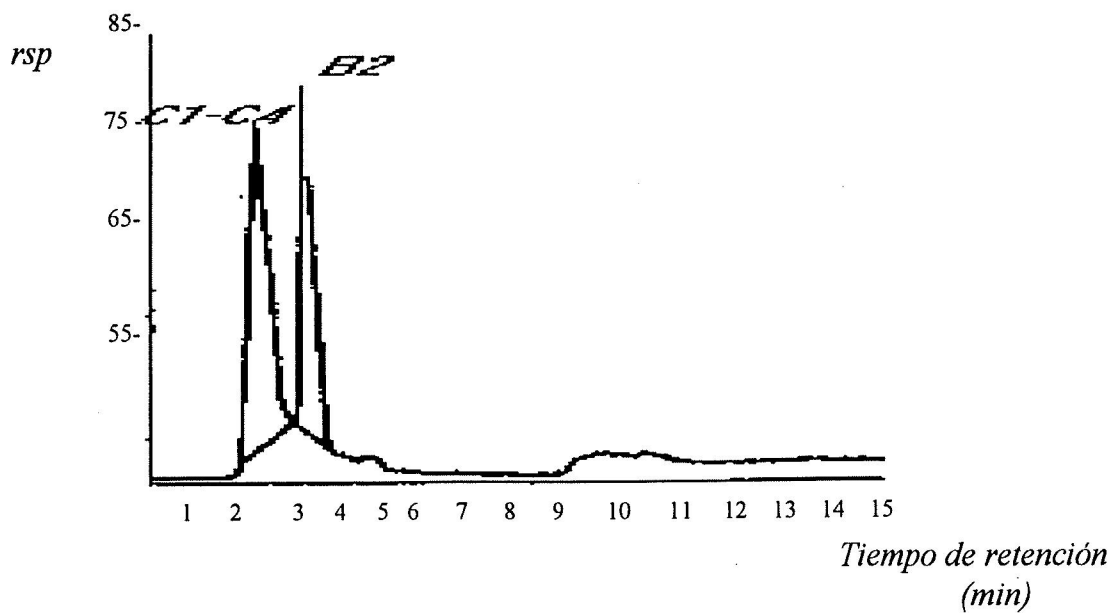


Fig. 5 b.- Perfil cromatográfico característico de *M. californianus* de Rincón de Ballenas, del 28 de agosto de 1995.

**III.2 Evento de marea roja en la Bahía de Todos Santos, B. C., en invierno (segundo período), durante los meses de febrero y marzo de 1996.**

**Fitoplancton.**

Durante el segundo período de muestreo (febrero a marzo de 1996) realizado, se presentó un florecimiento de color rojo ladrillo; las áreas visibles del cambio de color en el agua de mar fueron la dársena portuaria, dentro y frente de la misma y en la zona exterior del muelle. La composición porcentual determinada para el dinoflagelado *L. polyedra* fue superior a 68 % , en el fitoplancton (Tabla VII).

Tabla VII.- Porcentaje de *L. polyedra* en eventos de marea roja durante el segundo período (febrero a marzo de 1996), en Bahía de Todos Santos, B. C.

Fecha	Lugar	Porcentaje
19 febrero de 1996	Dentro de la dársena	85
6 marzo de 1996	Frente de la dársena	68.5
15 marzo de 1996	Dentro de la dársena	85.3
15 marzo de 1996	Frente de la dársena	96

El índice de dominancia de Simpson (Anexo VI) más alto (0.96) que se determinó para *L. polyedra* se encontró el 15 de marzo en frente de la dársena portuaria (aproximadamente a 300 metros al oeste del espigón principal), en el Anexo IX se muestra la composición fitoplanctónica para esa fecha.

*L. polyedra* ocupó un 96% del fitoplancton total del brote del 15 de marzo de 1996 frente de la dársena portuaria (Figura 6), siendo el porcentaje más alto de este dinoflagelado que se determinó para el segundo período.

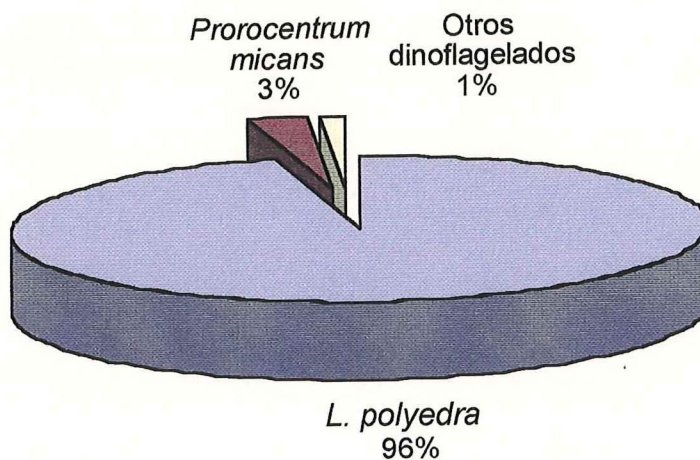


Fig. 6.- Composición porcentual de fitoplancton frente de la dársena portuaria, durante la marea roja del 15 de marzo de 1996, en Bahía de Todos Santos, B. C.

La abundancia fitoplanctónica determinada para la misma fecha, correspondió a  $1.15 \times 10^3 \text{ cél l}^{-1}$  durante el florecimiento. La marea roja del 15 de marzo dentro de la rada presentó una composición porcentual del 85% de *Lingulodinium polyedra* (Fig. 7), cuya abundancia fitoplanctónica fue de  $1.26 \times 10^3 \text{ cél l}^{-1}$ . El índice de Simpson determinado para el mismo dinoflagelado y la misma fecha fue de 0.85 (Anexo VI), su composición fitoplanctónica se muestra en el Anexo X.

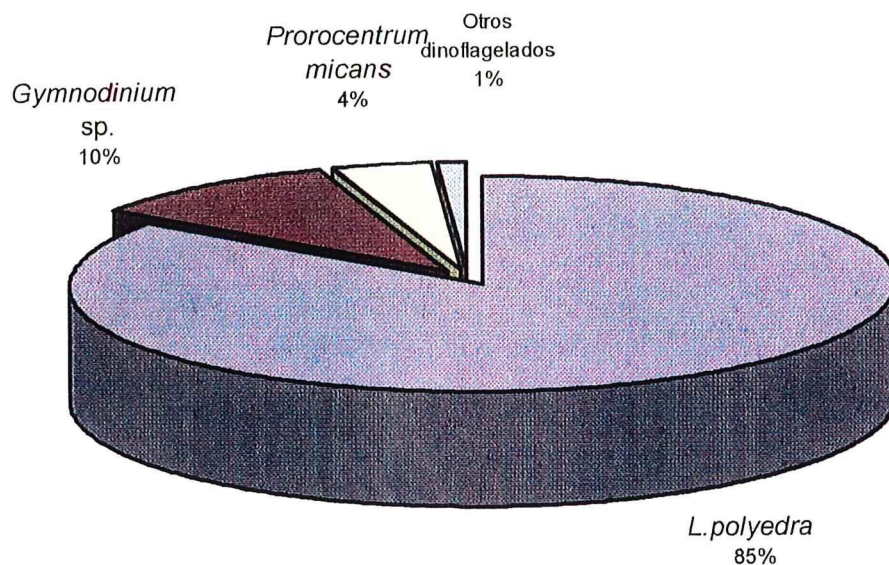


Fig. 7.- Composición porcentual de fitoplancton dentro de la dársena portuaria, durante la marea roja del 15 de marzo de 1996, en Bahía de Todos Santos, B. C.

El índice de diversidad específica de Shannon-Weaver para el fitoplancton del 6 de febrero de 1996 dentro de la dársena portuaria fue de 0.9 y de 1.7 para el 3 de marzo de 1996 frente de la dársena portuaria (aproximadamente a 300 metros al oeste del espigón principal) (Anexo VII).

A los resultados antes descritos de ambos períodos, se les aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes desequilibradas, con  $\alpha = 0.05$ . Esta prueba mostró que no existen diferencias significativas en la dominancia del dinoflagelado *L. polyedra* entre los resultados obtenidos durante los eventos de marea roja en el primer período (Anexo XI).

Con esta misma prueba se demostró que no existen diferencias significativas en la abundancia fitoplanctónica entre las microalgas del evento de marea roja del

19 de febrero de 1996 (dentro de la rada) y el del 6 de marzo del mismo año (frente de la rada, a aproximadamente a 300 metros al oeste del espigón principal).

### Bioensayos.

La respuesta que se observó en los ratones inoculados con extractos ácidos de fitoplancton recolectado en el segundo período fueron, piloerección y letargo; ninguno de los ratones inoculados con extractos de fitoplancton de ese período presentaron parálisis.

### Cromatografía.

Los perfiles cromatográficos del fitoplancton del 6 de febrero de 1996 de la dársena portuaria, estuvieron constituidas por las toxinas B2, gonyautoxina 3 (GTX3) y neosaxitoxina (NEOSTX) y para el 6 de marzo del mismo año sólo se determinó gonyautoxina 1 (GTX1) y B1 (Tabla VIII). Los ejemplos de perfiles cromatográficos de fitoplancton de dentro de la dársena del 6/2/96 (g) y 6/0/96 (h), se presentan en el Anexo VIII.

Tabla VIII.- Porcentaje de las principales toxinas identificadas en fitoplancton de la Bahía de Todos Santos, B. C. en el segundo período (febrero- marzo, 1996).

Lugar	Dentro de la dársena	
	6/02/96	6/03/96
FECHA		
TOXINA		
B2	28.1	
GTX1		48.2
B1		51.8
GTX3	29	
NEOSTX	32.5	

Los signos de intoxicación observados en los ratones inoculados con extractos ácidos de *M. californianus* recolectados en los meses de febrero y marzo de 1996 (segundo período) se muestran en la Tabla IX. Los bioensayos realizados con extractos de *Mytilus californianus* del día 2 de febrero (1996), provocaron parálisis en las extremidades anteriores y posteriores, la parálisis

permaneció aproximadamente por 6.30 hrs, después de este tiempo los ratones siguieron presentando letargo hasta 27 hrs. después de la inoculación. A las 48 hrs de haber realizado el bioensayo, los ratones recuperaron su actividad. Sólo para esta fecha se observó parálisis en las extremidades anteriores de los ratones ensayados.

Tabla IX.- Síntomas de intoxicación observados en los ratones inoculados con extractos de *M. californianus* del segundo segundo período (febrero-marzo, 1996), en Bahía de Todos Santos, B. C.

Fecha	Localidad	Páralisis	Piloerección	Letargo
6/02/96	Zona exterior al muelle	extremidades anteriores y posteriores	Si	Si
19/02/96	Zona exterior al muelle	No	Si	Si
6/03/96	Rincón de Ballenas	No	Si	Si
15/03/96	Rincón de Ballenas	No	Si	Si

En la Tabla X se muestra la composición porcentual de las toxinas presentes en los extractos de los mejillones (*Mytilus californianus*) del segundo período (febrero a marzo de 1996). Las toxinas C1-C4, B2 y GTX4 estuvieron presentes en los perfiles cromatográficos de los extractos de los mejillones del mes de febrero. La composición porcentual de estas toxinas fue de mayor a menor, en el orden que se mencionan.

TABLA X.- Porcentaje de las principales toxinas en mejillón *M. californianus* de Bahía de Todos Santos, B. C., en el segundo período (febrero - marzo de 1996).

Lugar	Rincón de Ballenas	Zona exterior del muelle	Rincón de Ballenas		Zona exterior del muelle
FECHA TOXINA	6/02/96	19/02/96	6/03/96	15/03/96	15/03/96
C1-C4	47.3	48	6	48.5	45
B2	35.2	25	40	20	27
GTX4	20	7.2	6	10	8.5

En éste período, la toxina B2 es la segunda en importancia porcentual (ejemplo en la Fig. 8 a y b). Los extractos de *M. californianus* de Rincón de Ballenas el día 6 de febrero mostraron un porcentaje mayor de GTX4, por ejemplo Fig. 8a. En el Anexo VIII se muestran ejemplos de los perfiles cromatográficos de *M. californianus* de la zona exterior al muelle del 19/02/96 (l), de Rincón de Ballenas del 15/3/96 (j) y de la zona exterior al muelle del 15/3/96 (k).

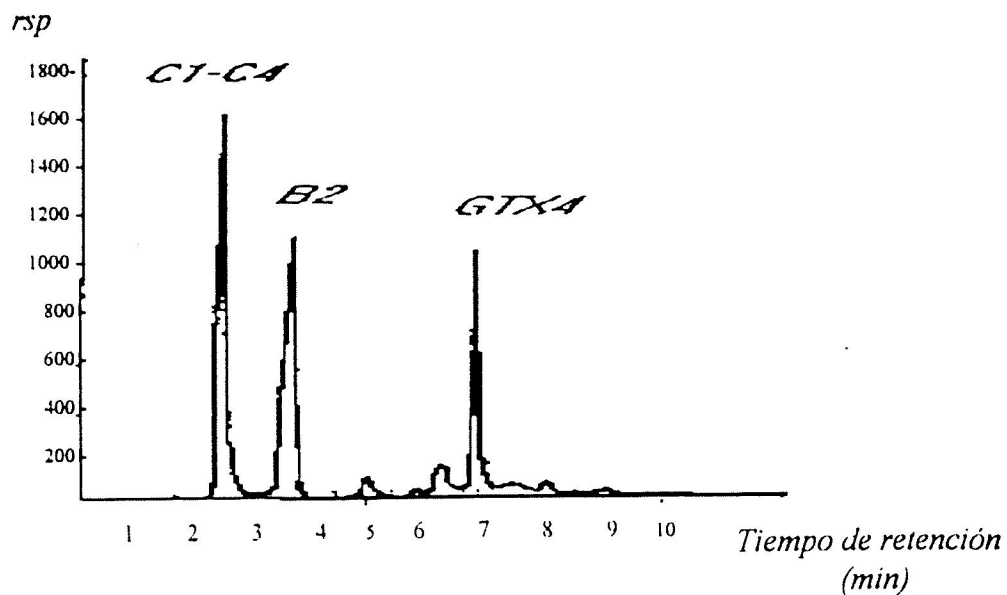


Fig. 8a. Perfil cromatográfico característico *M. californianus* de Rincón de Ballenas, del 6 de febrero 1996.

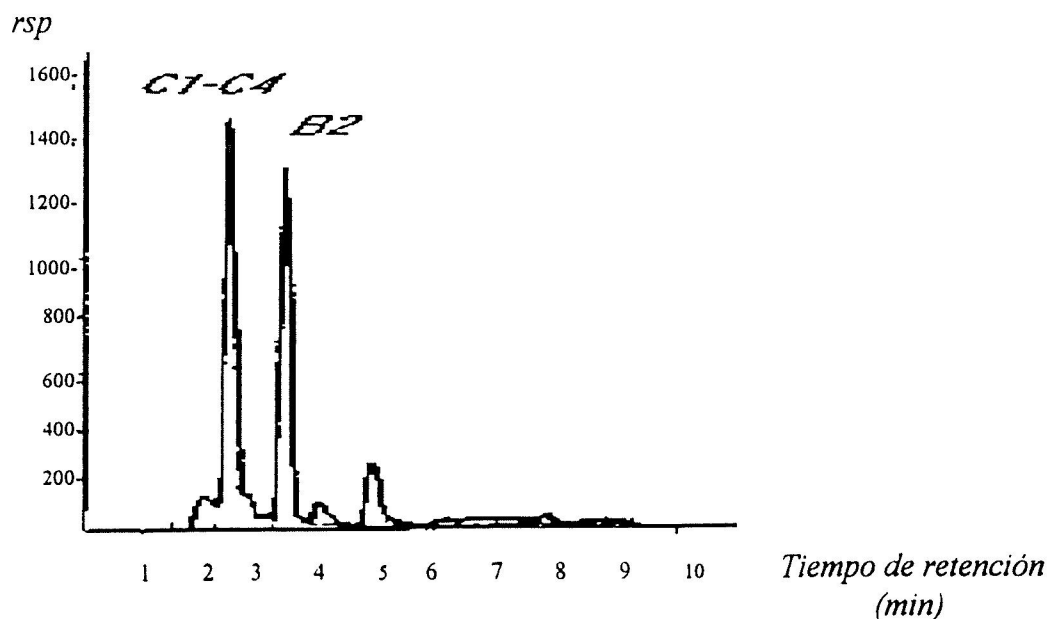


Fig. 8b. Perfil cromatográfico característico *M. californianus* de Rincón de Ballenas, del 6 de marzo de 1996.

En referencia a los resultados obtenidos por el método químico se determinó que la toxina C1-C4 fue la que obtuvo mayor porcentaje en los extractos ácidos de mejillones (*M. californianus*) para ambos períodos. Usando la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon para muestras independientes, se demostró que los porcentajes de la toxina C1-C4 para ambos períodos no son significativamente distintos al  $\alpha = 0.05$ .

Usando la prueba de contingencia (Anexo XII) se determinó el grado de asociación de dos conjuntos de datos a fin de probar su significancia. Es decir en el primer período, los perfiles cromatográficos que se obtuvieron de los extractos ácidos de fitoplancton y de mejillones de la misma fecha (31 de agosto/95), demostraron que estadísticamente ambos grupos de datos están relacionados. En ambos perfiles se presentaron las toxinas C1-C4, B2, NEOSTX y STX (Tabla VI) excepto para los perfiles de fitoplancton donde también apareció la GTX2 (Tabla IV).

En el segundo período, con la misma prueba se demostró que las toxinas presentes en los extractos de fitoplancton del 6 de febrero de 1996 de dentro de la dársena portuaria y las toxinas de los extractos de mejillones de Rincón de Ballenas en la misma fecha, no tienen relación significativa, en cuanto a las toxinas presentes en cada grupo de datos, esto se debe a que son de diferentes lugares. Cabe mencionar que los perfiles cromatográficos de los extractos de fitoplancton contenían las toxinas B2, GTX3 y NEOSTX (Tabla VIII); y los perfiles de los extractos de mejillones C1-C4, B2 y GTX4 (Tabla X).

La prueba de contingencia (Anexo XII) indicó que en el conjunto de datos de las toxinas de los extractos de fitoplancton del 6 de febrero de 1996 de dentro de la dársena y de las toxinas de los mejillones de Rincón de Ballenas el 6 de marzo del mismo año, existe relación entre los derivados de toxinas del fitoplancton y mejillones.

La misma prueba se utilizó para comparar el conjunto de datos de las toxinas de fitoplancton del 6 de febrero de 1996 de dentro de la dársena portuaria, y el grupo de datos de las toxinas de mejillones de la zona exterior del muelle el 19 de febrero del mismo año, también se determinó que existe relación en ambos conjuntos de datos.

### **III.3 Evento de marea roja en Bahía de Todos Santos, B. C. en agosto de 1996 (tercer período).**

El 9 de agosto de 1996 en la Bahía de Todos Santos, B. C., se presentó un florecimiento donde las especies más importantes fueron *Gymnodinium flavum* y *Heterocapsa* sp. El color que se observó durante el evento fue amarillo paja. Los tres sitios estudiados fueron el área de cultivo de mejillones, al medio de la bahía y dentro de la dársena portuaria.

La concentración del fitoplancton en el área de cultivo de los mejillones alcanzó una densidad de  $5.5 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup>, correspondiendo a *G. flavum*  $2.9 \times 10^3$

cél l<sup>-1</sup> (53%) y a *Heterocapsa* sp. una densidad de  $2.5 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> (45%), ambas especies formaron parte del 98% del total.

Al medio de la bahía se determinó una densidad de  $3.1 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> correspondiendo a *G. flavum*  $1.6 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> (54%) y a *Heterocapsa* sp. una densidad de  $1.3 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> (45%); ambas especies representaron el 99% del total.

Dentro de la dársena portuaria la densidad fue de  $7.9 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup>, a *G. flavum* se le determinó una densidad de  $4.5 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> (56.4 %) y a *Heterocapsa* sp. una densidad de  $3 \times 10^3$  cél l<sup>-1</sup> (39.4%), ambas especies alcanzaron el 95.8% de la densidad total. La codominancia se produjo en los tres lugares de muestreo.

En la Figura 9 se observa la composición porcentual del fitoplancton en el área de cultivo de mejillones en la Bahía de Todos Santos, B. C.

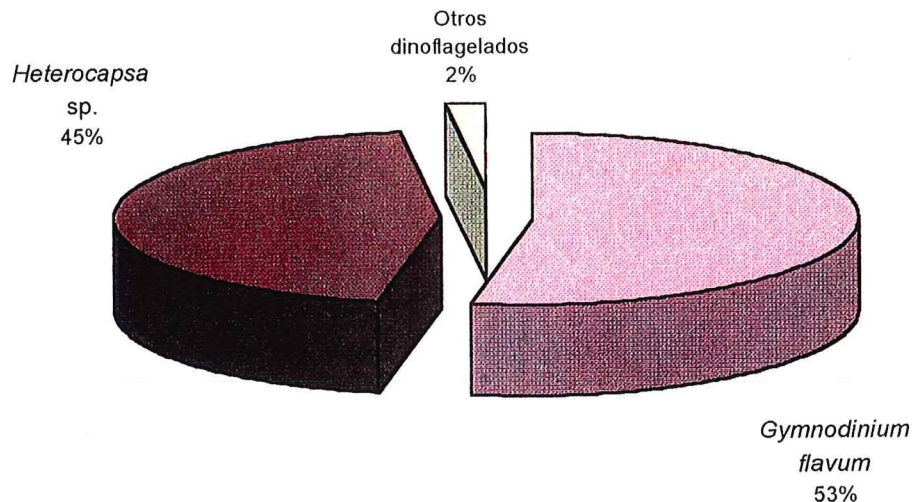


Fig. 9.- Composición porcentual del fitoplancton de 9 de agosto de 1996, en el área de cultivo de mejillones en Bahía de Todos Santos, B. C.

Mediante la prueba de Wilcoxon (Anexo XI) se determinó que existen diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre la abundancia del fitoplancton en las tres áreas, así como en el fitoplancton del área de cultivo de mejillones y la

dársena portuaria. Estadísticamente no existen diferencias significativas entre la abundancia del fitoplancton de medio de la bahía y el área de cultivo de mejillones.

Los síntomas observados en los ratones que fueron inoculados con extractos ácidos de mejillones y de fitoplancton durante el florecimiento de *Gymnodinium flavum* y *Heterocapsa* sp. fueron: piloerección y el letargo; estos signos permanecieron por espacio de cuatro horas.

#### **IV.4. EVENTO DE MAREA ROJA EN EL SUROESTE MEXICANO, DURANTE OTOÑO DE 1995.**

El dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* fue la especie dominante del florecimiento ocurrido el mes de noviembre y parte de diciembre en los estados de Michoacán y Guerrero.

##### **Bioensayos.**

Las toxicidades determinadas por el bioensayo en ratón con extractos de ostiones del género *Crassostrea iridescens* y almejas del género *Donax* sp., presentaron valores superiores al límite permisible (80 µg de STX/100 grs. de tejido de molusco) (Tabla XI). Los moluscos bivalvos estudiados estuvieron expuestos de manera natural al florecimiento.

El florecimiento de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* fue detectado por el color rojizo del agua de mar. Su toxicidad fue suficiente para afectar la fauna como peces, tortugas y langostas. Al ostión *Crassostrea iridescens* se le practicaron pruebas de toxicidad por bioensayo en ratón encontrando 298 µg de STX / 100 grs. de tejido, en el Bejuco, Michoacán (Tabla XI).

El molusco bivalvo *Crassostrea iridescens* de Tecpan, Gro., alcanzó toxicidades de 6,300 µg de STX /100 grs. de tejido. La almeja *Donax* sp. había bioconcentrado 520 µg de STX /100 grs. de tejido (Tabla XI).

Tabla. XI.- Toxicidad promedio determinada en dos especies de moluscos bivalvos del suroeste mexicano durante el evento de marea roja de *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*.

Localidad	Fecha	µg STX/100 grs de tejido total	Tipo de muestra
Zihuatanejo, Gro.	8/Nov1995	520	<i>Donax</i> sp.
El Reventón, Gro.	11/Nov/1995	1,300	<i>C.iridescens</i>
Tecpan, Gro.	11/Nov/1995	6,300	<i>C.iridescens</i>
Piedra Tlalcoyunque, Gro.	11/Nov/1995	1,850	<i>C.iridescens</i>
Bejuco, Mich.	18/Nov/1995	600	<i>C.iridescens</i>
Bejuco, Mich.	21/Nov/1995	300	<i>C.iridescens</i>

### **Cromatografía.**

Los análisis cuantitativos realizados por cromatografía en extractos ácidos de los mismos moluscos, también mostraron respuesta de la presencia de saxitoxina y otras toxinas. Los extractos del ostión *C. iridescens* mostraron la presencia de saxitoxina y otros compuestos (Fig. 10). La almeja *Donax* sp. también presentó saxitoxina y otros compuestos (Fig. 11).

Las concentraciones de saxitoxina que se determinaron por el método químico en los moluscos del suroeste mexicano se muestran en la Tabla XII. Estos valores fueron superiores al límite permisible para consumo humano (80 µg STX /100 grs. de tejido).

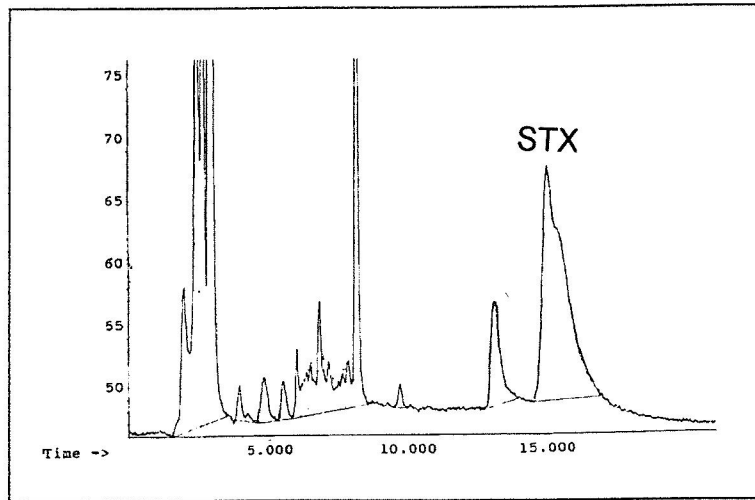


Fig. 10.- Perfil cromatográfico característico del ostión *C. iridescens*, del suroeste mexicano.

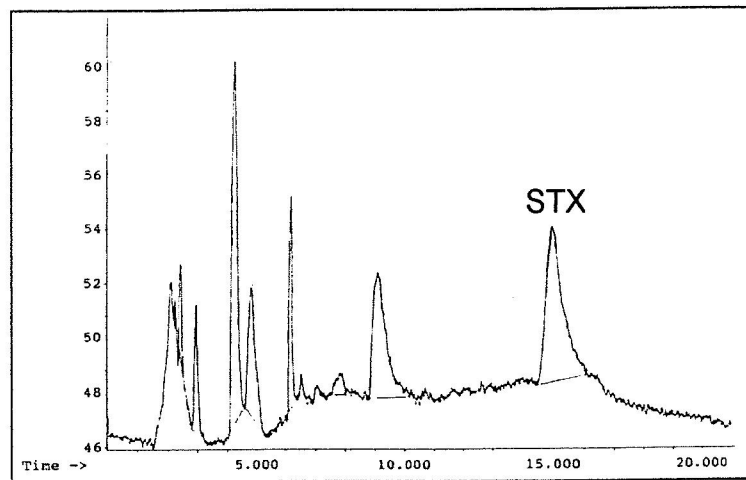


Fig. 11.- Perfil cromatográfico característico de la almeja *Donax* sp. del suroeste mexicano.

La máxima concentración (1,900 µg STX/100 grs. de tejido de ostión) se determinó en Tecpan Gro. y la mínima en el Bejuco, Mich. (100 µg STX/100 grs. de tejido de ostión) (Tabla XII).

Tabla XII. Concentraciones de saxitoxina en dos especies de moluscos bivalvos del suroeste mexicano.

LOCALIDAD	µg STX eq. x100 g <sup>-1</sup> de tejido de molusco	Especie
Bejuco, Mich.	100-224	<i>C. iridescens</i>
Piedra Tlalcoyunque, Gro.	118-1,660	<i>C. iridescens</i>
Tecpan, Gro.	566-1,930	<i>C. iridescens</i>
Reventón, Gro.	113-1,660	<i>C. iridescens</i>
Zihuatanejo, Gro.	125-440	<i>Donax sp.</i>

#### **IV. DISCUSIONES.**

##### **BAHIA DE TODOS SANTOS, B.C.**

En la Bahía de Todos Santos, B. C. son comunes las mareas rojas, al igual que en otras zonas costeras (Segovia *et al.*, 1988). Se ha estudiado mucho en diversas especies de microalgas, sin embargo los estudios relacionados al dinoflagelado *L. polyedra*, en la producción o no; de sustancias químicamente nocivas, han sido contradictorios.

En este estudio se utilizaron extractos ácidos de fitoplancton (>53% de *L. polyedra*) para determinar la posible toxicidad de ellos. Los extractos ácidos de *L. polyedra* han sido utilizados para probar la posible toxicidad de este dinoflagelado, pues Schradie y Bliss, (1962) reportan la muerte de ratones inoculados con extractos de *L. polyedra*, en una hora. Los síntomas que presentaron los ratones fueron similares a los primeros signos observables en ratones inoculados con extractos de moluscos contaminados por ficotoxinas que producen parálisis.

En la Bahía de Todos Santos, B. C., la mayoría de los eventos de marea roja estudiados en este trabajo estuvieron asociados a la presencia del dinoflagelado *L. polyedra* principalmente. Esta especie ha estado presente desde las costas de California (Patton *et al.*, 1967), hasta las costas de Baja California Sur (Orellana *et al.*, 1996), en diferentes épocas del año.

Durante el estudio de variabilidad anual de la estructura fitoplanctónica realizado por Mosqueda-Razo (1995) en la Bahía de Todos Santos., encontró que *L. polyedra* formó parte de la composición fitoplanctónica durante todo el año de muestreo. En este estudio la misma especie fue la más importante en cuanto a porcentaje (> 53%) durante los eventos de marea roja, por lo que se le considera la causa principal del color rojo ladrillo en la Bahía de Todos Santos, B. C.

La abundancia fitoplanctónica máxima que se determinó durante este estudio fue de  $1.3 \times 10^3$  cel l<sup>-1</sup>. La composición porcentual de *L. polyedra* fue del 85% (Fig. 7) en el florecimiento del día 15 de marzo de 1996 (Anexo X) en Bahía de Todos Santos, B. C, causado por el dinoflagelado *L. polyedra*. Esta concentración es menor en comparación al evento de marea roja de 1992 en la misma área donde esta especie alcanzó dentro de la manchas, concentraciones de  $9 \times 10^5$  cel l<sup>-1</sup> Orellana *et al.*, (1996).

La densidad fitoplanctónica máxima se señaló en el texto anterior, se determinó en un evento de marea roja que se desarrolló a finales de invierno, sin embargo el que reportan Orellana *et al.*, (1996) ocurrió durante la primavera, existiendo condiciones climáticas diferentes en ambas estaciones del año.

Los valores de diversidad encontrados con el índice de Shannon-Weaver variaron entre 0.85 bits cel<sup>-1</sup> a 2.3 bits cel<sup>-1</sup>, para los florecimientos del primer y segundo período. El máximo valor de 2.3 bits cel<sup>-1</sup> fue debido a que ese fitoplancton se recolectó fuera de la mancha de marea roja. De acuerdo a los valores de diversidad que señala Margalef, (1977) (1 a 2 bits cel<sup>-1</sup>) el resto de los valores (Anexo VII) quedaron dentro de los establecidos para la zona costera. Excepto el valor de 2.3 bits cel<sup>-1</sup>.

Sin embargo, los índices de diversidad encontrados por Mosqueda-Razo (1995) en la Bahía de Todos Santos son mayores que los reportados en este estudio. La diferencia entre ellos es atribuida a que durante esta investigación se trabajo con mareas rojas.

La presencia de florecimientos de *L. polyedra* en el primer (agosto-septiembre/1995) y segundo período (febrero-marzo de 1996) de muestreo, estuvieron relacionados a días con sol y templados. Legovic *et al.*, (1991) han reportado que *L. polyedra* es muy abundante en las aguas costeras del sur de California durante calma, condiciones cálidas, flujo de materia orgánica y nutrientes inorgánicos en épocas de surgencia.

A diferencia del tercer período, el color del agua fue amarillo y estuvo relacionado con las especies *Gymnodinium flavum* y *Heterocapsa* sp. La densidad fue de  $9.9 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ , dentro de la dársena; en este brote *G. flavum* tuvo una densidad de  $4.5 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$  y *Heterocapsa* sp. de  $3.1 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ , sumando ambas especies alcanzaron el 96 %. En otros sitios como en el área de cultivo de mejillones se determinó una densidad de  $2.9 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$  para *G. flavum* y de  $2.5 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$  para *Heterocapsa* sp. éstas especies ocuparon el 98% del total, la densidad fitoplanctónica registrada fue  $5.5 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ . La densidad mínima ( $3 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ ) se determinó en medio de la bahía, durante dicho florecimiento. *G. flavum* tuvo una densidad de  $1.6 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ , y a *Heterocapsa* sp.  $1.3 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ , ocupando el 99 % del total.

En la dársena portuaria se determinó la densidad más alta para *Heterocapsa* sp., lo que llevaría a una nueva hipótesis sobre la relación que puede existir entre esta especie y el aporte de materia orgánica proveniente del desarrollo urbano. Cabe mencionar que hasta la fecha no se había reportado a esta especie como causante de florecimiento en la Bahía de Todos Santos, B. C.

*Heterocapsa* sp. ha sido reportada por Uchida *et al.* 1995, como la especie causante de brotes en las bahías de Japón, durante verano y otoño, reportando densidades de  $80 \times 10^6 \text{ cel l}^{-1}$ . Esta densidad es superior a la que se determinó durante este estudio en la bahía. Tanto este florecimiento como el reportado por Uchida *et al.*, (1995) coinciden en verano, por lo que también puede estar relacionado con la temperatura. Uchida *et al.*, (1995) han reportado que *Heterocapsa* sp. es la responsable de la pérdida de movilidad y lisis de *Gyrodinium instriatum*, esta situación se presentó cuando *Heterocapsa* sp. estaba en contacto con *Gyrodinium instriatum*, la razón de esta respuesta es la excreción de compuestos químicos. Sin embargo, durante el florecimiento de *Gymnodinium flavum* y *Heterocapsa* sp. no se reportó ningún tipo de daño a la

fauna de la Bahía de Todos Santos. En tanto que en las bahías de Japón esta microalga ha causado daños a los bivalvos (Uchida *et al.*, 1995).

Las densidades determinadas en la bahía fueron menores en comparación a las reportadas durante el brote del mismo dinoflagelado, en el mismo mes y año en Eréndira, B. C., donde el florecimiento alcanzó una densidad de  $14.5 \times 10^3 \text{ cel}^{-1}$  (Flores *et al.*, 1996).

*G. flavum* ha sido considerado como una de las especies tóxicas para los peces (Taylor, 1989), sin embargo para otros autores (Sullivan, 1993) la producción de alguna biotoxia es dudosa. En la Bahía de Todos Santos no se observó, ni reportó la muerte de fauna en la zona costera ni durante ni después del florecimiento, sin embargo la empresa Abulones Cultivados en Eréndira, B. C. a 100 km. al sur de la Bahía de Todos Santos tuvo pérdidas económicas considerables, por la mortalidad de larvas de abulón, la causa de la mortalidad no fue atribuida directamente con la especie que produjo el brote (Flores *et al.*, 1996), sino al cambio de la calidad del agua durante el evento.

Holmes *et al.* (1967) reportaron un florecimiento de color amarillo de *G. flavum* en Mission Bay en el estado de California en 1961 (pero no se especifican densidades ni porcentajes), el color que se observó durante el florecimiento *G. flavum* y *Heterocapsa* sp. en la Bahía de Todos Santos fue también amarillo.

En este estudio, la composición porcentual de *G. flavum* osciló entre 53-56% de la composición del fitoplancton cuantitativo. Cullen *et al.*, (1987) reportan un florecimiento en la zona costera de La Jolla, California de este mismo dinoflagelado con una densidad de  $6 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$ , la composición porcentual que ocupó *G. flavum* fue de 80-99%, este florecimiento ocurrió desde a finales de julio y hasta principios de agosto de 1982, época que coincide con el florecimiento del tercer período.

Los florecimientos de *G. flavum* se refieren, parecen ser favorecidos por el transporte de microalgas de aguas subtropicales e incluso aguas tropicales,

hacia las áreas donde se han reportado los brotes (Peláez, 1987), como en la zona costera de Baja California, Méx. y California, EUA.

Durante el primer y segundo período, las toxinas que se determinaron en los perfiles de fitoplancton fueron las de la familia de los carbamoil y en moluscos se observaron las toxinas de la familia N-sulfocarbamoil. Las toxinas de la primera familia son frecuentemente detectadas en extractos de dinoflagelados tóxicos (Sullivan, 1993), éstas fueron predominantes en los extractos de microalgas (Tabla IV y VIII), son consideradas como las que ocasionan los síntomas observables de intoxicación en ratones (Sullivan, 1993).

Las toxinas N-sulfocarbamoil (C1, C2, C3, C4, B1 y B2) también se han encontrado en moluscos (Boyer *et al.*, 1987), en este trabajo éstas toxinas fueron las que ocuparon mayor porcentaje en los mejillones, lo que explica los resultados obtenidos en los bioensayos debido a su baja actividad biológica en el bioensayo en ratón (Boyer *et al.*, 1987).

Los síntomas que se observaron en los ratones inoculados con extractos ácidos de fitoplancton de Bahía de Todos Santos, B. C., cuyas densidades aproximadas fueron de  $1 \times 10^3 \text{ cel l}^{-1}$  en el primer período y segundo período, pudieran ser producto de la alteración de los órganos nerviosos terminales, que al ponerse de manifiesto toxinas en baja concentración mantienen los transmisores de impulsos nerviosos alterados (com. personal. Dr. Lucio Muñoz Cabrera).

En la práctica, sin embargo, los límites muy bajos de toxicidad no se pueden detectar (Bates y Rapoport, 1975). Durante los bioensayos realizados con extractos de fitoplancton y mejillones de la bahía no se observó muerte en los ratones inoculados, lo que posiblemente se atribuye a concentraciones muy bajas de las toxinas durante los períodos de estudios.

Bates *et al.*, (1978) utilizó extractos ácidos de *L. polyedra* en cultivo y de fitoplancton en muestras recolectadas durante un florecimiento de *L. polyedra*

en la costa de La Jolla, California en febrero de 1969, septiembre y noviembre de 1974, de los cuales realizó bioensayos en ratón y peces obteniendo resultados negativos, descartando la posibilidad de la presencia de saxitoxina en los extractos. En este estudio al igual que el anterior los bioensayos no fueron positivos, es decir; después de 24 horas posterior al inoculo los ratones sobrevivían.

Por otra parte, Bruno *et al.*, (1990) en los bioensayos en ratón con extractos ácidos de fitoplancton, donde *L. polyedra* ocupó el 82 % de la comunidad fitoplanctónica, determinaron tiempos de muerte entre 3 y 5 minutos. Otros autores (Belin *et al.* 1995) identifican a *L. polyedra* como productora de ictiotoxinas solubles en agua, estos compuestos químicos pueden ser los responsables de la mortalidad de moluscos en el Mediterráneo en 1977. En contra parte, durante este estudio no se reportó daño a la fauna.

Durante los períodos de estudio se observó que *L. polyedra* ocupó el mayor porcentaje en la composición fitoplanctónica, entre otras especies se encontraron a *Peridinium divergens*, *Gymnodinium* sp. Otros autores (Bruno *et al.*, 1990) reportan los géneros *Peridinium*, *Scrippsiella* y *Gyrodinium* como especies que formaron parte de la composición fitoplanctónica en una marea roja donde *L. polyedra* ocupó el 82% del total de la muestra. Ellos atribuyen a *L. polyedra* la presencia de saxitoxina en su extracto, pero no especifican la densidad de cada especie en dicho evento. En este trabajo se demostró que la presencia de saxitoxina no se relaciona a esta especie, debido a que *L. polyedra* produce una ictiotoxina conocida como yesotoxina (Tubaro *et al.*, 1997).

Los géneros que se reportan como los más frecuentes en la composición fitoplanctónica de los florecimientos, en los períodos estudiados, no se encuentran en las listas de las especies que son tóxicas (Steidinger, 1993). Sin embargo *L. polyedra* está clasificado como productor de sustancias tóxicas.

Esta especie esta considerada como una de las 11 especies tóxicas que causan florecimientos en las costas de China (Tseng *et al.*, 1993)

Las variaciones observadas en la composición de toxinas en los extractos de fitoplancton durante el evento de marea roja en la zona exterior del muelle y la dársena portuaria son notorias, en los extractos ácidos de fitoplancton del 31 de agosto de 1996, se identificaron cinco tipos de toxinas (Tabla IV), las de mayor porcentaje correspondieron a la saxitoxina (STX). La evidencia de la presencia de STX también se puede observar en el fitoplancton (Tabla IV) y en mejillones (Tabla VI). Bruno *et al.*, (1990) reportó concentraciones de 0.022 µg/ml en las muestras recolectadas durante el florecimiento donde *L. polyedra* ocupó el 82% de la composición fitoplanctónica.

Los dinoflagelados tóxicos producen solamente una pequeña cantidad de STX en relación hacia las otras toxinas (Sullivan *et al.*, 1983), la evidencia de la saxitoxina encontrada en este trabajo en el fitoplancton puede ser el efecto sinérgico entre otras especies. En mejillones, puede atribuirse a la biotransformación de las toxinas (Shumway *et al.*, 1993). Las toxinas que se presentaron en menor porcentaje fueron C1-C4, B1 y B2, éstas son consideradas dentro del grupo de las toxinas N-sulfocarbamoil (Cembella *et al.*, 1993).

En los perfiles cromatográficos del fitoplancton del 22 de septiembre dentro de la dársena se reconocieron las toxinas C1-C4, B2 y NEOSTX, la composición del fitoplancton correspondió al 72 % de *L. polyedra* y 5% de *P. divergens*, entre otras especies. La composición microalgal del día 22 del mismo mes en la zona exterior del muelle fue representada por *L. polyedra* (71%) y *P. divergens* (16%), entre otras especies. Los perfiles cromatográficos solo se reconoció la NEOSTX, la diferencias en contenido de toxinas en ambos lugares puede ser debida a las especies que se encontraron en menor porcentaje, como un efecto sinérgico.

La comparación entre los índices de dominancia no demostró diferencias significativas debido a que *L. polyedra* siempre presentó una densidad superior al 50 %. Tampoco existen diferencias ( $\alpha=0.05$ ) en la abundancia fitoplanctónica de las mareas rojas analizadas, debido a las densidades se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud ( $1 \times 10^3$  cel  $l^{-1}$ ).

La neosaxitoxina predominó (Tabla IV) en ambas localidades, con porcentajes no menores del 70 % de *L. polyedra*. En relación a la presencia de diferentes derivados químicos en las diferentes muestras, los investigadores indican que la misma especie puede presentar o no toxinas, ésto depende de la localización geográfica (Boyer *et al.*, 1986), aunque las áreas de estudio estén muy cercanas, se puede observar diferencias en los perfiles cromatográficos. Esta diferencia determinada a través de los perfiles cromatográficos de fitoplancton de la misma fecha, pero de diferente área la podemos atribuir, entre otras; a la genética y fisiología del fitoplancton, a las condiciones ambientales en que se desarrolla la misma especie, que posiblemente le puedan favorecer la producción ciertos de ciertos tipos de toxinas.

La presencia o ausencia de la saxitoxina en extractos de *L. polyedra* ha sido discutida por varios autores (Bates *et al.*, 1978), los resultados obtenidos en este trabajo pueden mostrar la presencia de un grupo representativo de las toxinas que provocan parálisis (Tabla IV), estos resultados pueden ser confirmados por los obtenidos por Bruno *et al.*, 1990 con la misma especie (*L. polyedra*) durante un evento de marea roja (con una dominancia del 82 %).

No se descarta la posibilidad de que *L. polyedra* sea capaz de generar sustancias tóxicas (Steidinger, 1993). Se le ha asociado en la mortandad de peces y fauna circundante posterior a los florecimientos de *L. polyedra* (Schradie and Bliss, 1962). Durante y después de la marea roja estudiada en el primer y segundo período en Bahía de Todos Santos, no se reportó mortalidad de peces o fauna circundante. Como lo asocian otros autores, en la zona costera costera de San Diego (Schradie and Bliss, 1962). Sin embargo,

Tolomio y Moschin, (1995) atribuyen a los brotes de este dinoflagelado, la mortalidad de peces en la Laguna Venecia (Mar Adriático) por efectos tóxicos de esta especie, donde su toxicidad ha sido demostrada.

Los perfiles cromatográficos de fitoplancton (6/2/96), presentaron las toxinas B2, GTX3 Y NEOSTX (Tabla VIII). La composición del fitoplancton para esta fecha correspondió al 85% de *L. polyedra* y el 8.4% de *P. micans*, entre otras especies; la abundancia fitoplanctónica para ese evento fue de  $5.8 \times 10^5$  cel l<sup>-1</sup>. La presencia de las toxinas en los extractos fitoplanctónicos no presentaron una relación directa con la abundancia de *L. polyedra*, ni tampoco a *P. micans*. Esta especie se considera como no tóxica, incluso se ha usado como control en la tasa de filtración de mejillones, los cuales no mostraron ninguna respuesta de acumulación de toxinas (Pillet y Houvenaghel, 1995). Por otra parte, en el fitoplancton del 6 de marzo de la dársena se identificaron las toxinas GTX1 y B1 (Tabla VIII) y la composición fitoplanctónica estuvo compuesto por el 68.5% de *L. polyedra*, el 16 de *Gymnodinium sp.* y el 11.4% de *P. divergens*, entre otras especies, con una densidad de  $1.1 \times 10^3$  cel l<sup>-1</sup>.

Los resultados estadísticos que se obtuvieron cuando se comparó la abundancia fitoplanctónica de la marea roja del 19 de febrero de 1996 de la dársena y del 6 de marzo del mismo año frente de la dársena portuaria, se deben a que las especies que florecieron en el mes de febrero, hayan sido las mismas y que las condiciones ambientales no sufrieron cambios, permitiendo que éstas se mantuvieran.

De la misma manera se determinó que no existen diferencias significativas en la abundancia de las especies encontradas en la marea roja del 15 de marzo de 1996 de la dársena portuaria y del mismo día enfrente de la dársena.

Las toxinas que se mostraron en los perfiles cromatográficos del fitoplancton en el presente trabajo tuvieron en común las toxinas C1-C4, B1,

B2 GTX1-3 y NEOSTX (Tabla IV y VIII), otros estudios han mostrado que las toxinas C1-C4, B1 y B2 fueron las de mayor abundancia en *Alexandrium tamarensis*, y los porcentajes mínimos correspondieron para las toxinas NEOSTX y STX (Anderson *et al.*, 1996).

Otros dinoflagelados tóxicos muestran en su perfil tóxico B1, C2, GTX3 y STX (Sullivan *et al.*, 1983). Bruno *et al.* (1990) considera que la presencia de la saxitoxina es la evidencia clara experimental de la producción de saxitoxina por un clono de *L. polyedra*. El presente trabajo permitió identificar por cromatografía líquida (Fig. 4a y b), la presencia de toxinas paralizantes en el fitoplancton durante eventos de marea roja donde *L. polyedra* alcanzó más del 50% del total de la muestra, con densidades que oscilaron entre  $1.3 \times 10^3 \text{cél l}^{-1}$  hasta de  $7.9 \times 10^5 \text{cél l}^{-1}$ .

Sullivan *et al.*, (1983) encontraron B2, C2 GTX3 y STX en perfiles de dinoflagelados (*Gonyaulax* sp.) y C1 y GTX2 en mejillones que fueron expuestos a florecimientos, esto posiblemente debido a la epimerización de C2 y GTX3

Las toxinas que producen parálisis, son un problema epidemiológico en muchas de las áreas costeras del mundo, esto involucra la acumulación de neurotoxinas potentes de origen microalgal, en los moluscos (Sullivan *et al.*, 1983). Los moluscos que se estudiaron estuvieron de manera natural expuestos a florecimientos de *L. polyedra* (55-60%) en los que se determinó la presencia de toxinas N-sulfocarbamoil (C1, C2, C3, C4, B1 y B2). Esta diferencia en los perfiles de origen fitoplanctónico, están reportados por Sullivan *et al.*, 1983, haciendo notar diferencias en los niveles relativos de varias toxinas entre dinoflagelados y moluscos y entre diferentes especies de moluscos colectados en la misma área.

La variación observada de porciones de toxinas en extractos de *M. californianus* caracterizada por las toxinas N-sulfocarbamoil C1-C4 y B2, durante el primer (Tabla VI) y segundo período (Tabla X), estadísticamente no

difirieron. Aunque también se mostraron la NEOSTX y la STX en el verano (Tabla VI), en el invierno (segundo período) se presentó la GTX4. Porcentualmente las toxinas N-sulfocarbamoil fueron predominantes en los mejillones analizados para ambos períodos (Tabla VI y X). El porcentaje de la neosaxitoxina para algunos extractos fué muy bajo, excepto para el primero (23 de agosto, 1995) que se presentó un 26.2 %. Esto puede deberse al tiempo de exposición al florecimiento, a la retención de toxinas, entre otros factores (Cembella *et al.*, 1993).

Las señales observadas en los cromatogramas de los extractos de mejillones, son mayores que los de fitoplancton (Fig. 4 a y b y Fig. 5 a y b). Esto es debido a que los moluscos concentran en sus glándulas digestivas ficotoxinas (Boyer *et al.*, 1986).

El volumen que pueden llegar a filtrar estos organismos varía de especie a especie (Bricelj *et al.*, 1990), en promedio pueden llegar a filtrar de 6.4 lts d<sup>-1</sup> gr de peso húmedo de molusco (Silvert y Cembella, 1995).

La predominancia de los componentes tóxicos en moluscos bivalvos indican la ingestión reciente de dinoflagelados ricos en esos compuestos químicos (Shumway y Cembella, 1993). Sin embargo las diferencias encontradas en la composición de toxinas entre bivalvos y la composición del fitoplancton del primer período pueden deberse a dos mecanismos: 1) retención selectiva y eliminación de toxinas específicas, y 2) biotransformación entre componentes tóxicos entre los tejidos del molusco (Shumway y Cembella 1993, Cembella *et al.*, 1993).

Con respecto a las N-sulfocarbamoil, Kotaki *et al.* (1985) señala que las altas concentraciones de esta toxina pueden indicar que recientemente los moluscos fueron expuestos a un florecimiento tóxico. Podemos asumir una interconversión metabólica de las tóxicas en los tejidos de los moluscos que fueron analizados, pudiendo ser la razón de la desimilitud en los perfiles de las toxinas (Sullivan *et al.*, 1983).

La prueba de contingencia mostró el grado de asociación del conjunto de datos de las toxinas de fitoplancton y mejillones del 31 de agosto de 1995, determinando que existe relación significativa entre ambos grupos de datos de toxinas, aunque las áreas de muestreo de fitoplancton (dentro rada) y mejillones (Rincón de Ballenas) estén distantes, esto puede ser debido a la interconversión metabólica de las toxinas en los moluscos (Shumway y Cembella, 1993). En contra parte, en el fitoplancton de dentro de la dársena del 6 de febrero de 1996 y los mejillones de Rincón de Ballenas de la misma fecha, no se encontró relación significativa entre ambos grupos de toxinas. Las diferencias estadísticas encontradas pueden ser atribuidas a procesos biológicos de los filtroalimentadores, así como a la retención selectiva y eliminación de tóxicas (Cembella *et al.*, 1993), la similitud puede atribuirse a que el florecimiento alcanzó ambos lugares.

Con la prueba de Wilcoxon se demostró relación significativa entre las toxinas de fitoplancton (dentro de la dársena) del 6 de febrero de 1996 y las toxinas en mejillones (Rincon de Ballenas) del 6 de marzo del mismo año, y para el grupo de datos de toxinas de fitoplancton del día 6 de febrero y de mejillones del 19 de febrero del mismo año, también se determinó relación significativa entre los datos. Lo que significa que los moluscos pueden acumular y en su caso biotransformar toxinas las cuales pueden mantenerse por varias semanas en los tejidos de los bivalvos (Sullivan *et al.*, 1993).

La variación en toxinas en fitoplancton y mejillones pueden debido a la combinación de factores, incluyendo la sincronización, persistencia, y magnitud de los florecimientos tóxicos, la toxicidad específica por célula y la composición de la toxina del organismo contaminante; efectos ambientales sobre el metabolismo de los moluscos bivalvos, y tal vez a las diferentes genóticas entre las poblaciones de los moluscos (Shumway y Cembella, 1993).

Los componentes tóxicos obtenidos de fitoplancton y de mejillones recolectados durante eventos de marea roja, pueden ser la base del

seguimiento del monitoreo de especies fitoplanctónicas productoras de florecimientos en la Bahía de Todos Santos, considerando que la producción anual de mejillones en la bahía es de aproximadamente de 100 ton/año (para 1996) (SEMARNAP, Delegación B. C., 1996, comun. personal).

Los mejillones se detoxifican más rápidamente que otras especies como: *S. giganteus* y *Spisula solidissima*, las cuales muestran retenciones prolongadas de biotoxinas posteriores a la desaparición de los florecimientos (Bricelj *et al.*, 1990). Con estas características de los mejillones y el desarrollo de materiales de referencia para la determinación de toxinas que provocan parálisis, con el uso de los mejillones se puede obtener el 95% de límites de confianza en la determinación de esta familia de toxinas (Van Egmond, 1996).

Los bioensayos para el monitoreo y certificación de la Bahía de Todos Santos, B. C. que han realizado en el Laboratorio de Salubridad en la ciudad de México con mejillones de la Bahía de Todos Santos, desde 1992 hasta diciembre de 1997 no han obtenido resultados positivos de la presencia de biotoxinas en mejillones recolectados durante florecimientos de en la Bahía de Todos Santos (J. C. Garduño. Subdelegación de la SEMARNAP en Ensenada, B. C. 1996, comun. Personal), sus resultados coinciden con los que obtuvimos en los bioensayos en ratón.

#### **IV.II.- SUROESTE MEXICANO**

Las toxicidades reportadas para los ostiones del suroeste mexicano fueron de hasta 6,300  $\mu\text{g}$  STX /100 grs. de tejido, en Tecpan, Gro. (11 de Nov. 1995).

Los ostiones estuvieron de manera natural expuestos al florecimiento del dinoflagelado tóxico. Las toxicidades sobrepasaron el límites máximo para consumo humano (80  $\mu\text{g}$  STX / 100 grs. de tejido, A.O.A.C, 1995).

Sin embargo en esa misma fecha pero en El Reventón se determinó una toxicidad de 1,300  $\mu\text{g}$  STX/100 grs. de tejido de ostión y en Piedra Tlalcoyunque, Gro. de 1,850  $\mu\text{g}$  STX/100 grs. de tejido. Las diferencias en las toxicidades pueden deberse a las densidades del florecimiento en las diferentes áreas, y al tiempo de exposición de los moluscos al brote (Cembella *et al.* 1993).

Con respecto al Bejuco Mich. el 18 de noviembre de 1995 se determinó una toxicidad de 600  $\mu\text{g}$  STX/100 grs. de tejido de ostión, tres días después se reportaron 300  $\mu\text{g}$  STX/100 grs. de tejido de ostión. El decremento de la toxicidad puede atribuirse a la etapa de dispersión del fitoplancton (Cortés-Altamirano *et al.* 1993), o a las consideraciones que asumen Shumway y Cembella (1993) que son; la retención selectiva y eliminación de toxinas específica y a la biotransformación entre componentes tóxicos entre los tejidos del molusco.

En diferencia con nuestros datos de toxicidades, Cortés-Altamirano *et al.* (1993), reportaron valores máximos de 629  $\mu\text{g}$ STX/100 grs de tejido de ostión *C. iridescens* de Huatulco Oax. y de 811  $\mu\text{g}$ STX /100 grs de tejido de ostión en la Ventosa, Oax. La época de ambos florecimientos coincidió en el mes de noviembre, pero en su caso en 1995 y 1989, respectivamente.

Durante el evento de marea roja de noviembre de 1995, se reportaron 196 intoxicados y siete muertos (Orellana-Cepeda, 1996), por la ingestión de moluscos que estuvieron expuestos al brote. Cortés-Altamirano *et al.* (1993), durante su estudio reporta 99 intoxicados y tres decesos. En el evento de

noviembre de 1995, al igual que el evento anterior se implementó la cuarentena por las autoridades de la SEMARNAP, para evitar que más personas fueran intoxicadas.

Este mismo dinoflagelado causó marea roja en las costas de Guatemala donde reportaron toxicidades de 6,000  $\mu\text{g}$  STX/100 gr de tejido de la almeja *Amphichaena kindermanni*, en el verano de 1987, ocasionando 26 muertes y decenas de personas intoxicadas (Rosales-Loessener *et al.*, 1989), la toxicidad reportada es similar a la que se determinó en Tecpan, Gro. (6,300  $\mu\text{g}$  STX/100 gr de tejido de ostión), en noviembre de 1995. En la almeja *Donax* sp. de reportó una toxicidad de 520  $\mu\text{g}$  STX/100 gr de tejido, en Zihuatanejo, Gro. el 8 de noviembre de 1995.

El evento de marea roja causó serios problemas de salud pública, impactos socio-económicos en las regiones turísticas. Debido a lo anterior, se hace aún más importante e imprescindible el estudio de las especies fitoplanctónicas productoras de toxinas, y su efecto en la salud del hombre.

Los análisis químicos cuantitativos mostraron la presencia de otras toxinas en los extractos de ostiones y almejas que fueron contaminados por *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, los valores determinados por cromatografía son menores a los obtenidos en bioensayo en ratón, ésto es debido a que los métodos biológicos dan una respuesta de la toxicidad total de las muestras estudiadas (Sullivan, 1993), y en los resultados cuantitativos del suroeste solo se indicó la concentración de la saxitoxina.

## V.- CONCLUSIONES.

- 1.- Se determinó por primera vez en la Bahía de Todos Santos, B. C., la presencia de toxinas similares a las que producen parálisis en extractos ácidos de fitoplancton con abundancia superior del 50% de dinoflagelado *L. polyedra.*, en muestras de la Bahía de Todos Santos, B. C.
- 2.- Se reporta por primera vez en la Bahía de Todos Santos, B. C. la microalga *Heterocapsa* sp. como causante de marea roja.
- 3.- Se identificó la presencia de saxitoxina tanto en fitoplancton como en mejillones de Bahía de Todos Santos en el evento de marea roja de verano.
- 4.- Las toxinas que se identificaron no tuvieron impacto negativo observable a la fauna circundante en la Bahía de Todos Santos, B. C.
- 5.- Los niveles de toxicidad alcanzados en la Bahía de Todos Santos, B. C. no sobrepasaron el límite permisible (80 µg SXT eq./100 grs de tejido de molusco) para consumo humano.
- 6.- Los niveles de toxicidad alcanzados en el suroeste mexicano con la almeja *Donax* sp. sobre pasaron en un orden de magnitud y en dos ordenes de magnitud al límite permisible para consumo humano en ostión *C. iridescens*
- 7.- Considerando el uso de organismos centinelas certificados para la determinación del contenido de ficotoxinas y para mejorar la calidad de la metodología analítica, con esta investigación se pueden iniciar gestiones para trabajar en un monitoreo a nivel nacional, donde se valoren las toxinas tanto en fitoplancton como en moluscos bivalvos.

## **VI. RECOMENDACIONES.**

- 1).- Se propone realizar un programa nacional de monitoreo.
- 2).- En caso de contingencia ambiental se recomienda:
  - a) identificar la especie o especies causantes del florecimiento,
  - b) aplicar el método biológico,
  - c) identificar las toxinas por método químico
- 3).- Se recomienda el uso del método químico para la identificación de ficotoxinas.

## VII. LITERATURA CITADA.

- Aguirre-Buenfil, L. A. (1983). Biomasa e índice pigmentario (D430/D665) del fitoplancton en zonas afectadas por descargas orgánicas en la Bahía de Todos Santos, B. C. (FEB-DIC). Tesis de Licenciatura. UABC. Ensenada, B. C. 64 pp.
- Allen, W. E. (1941). Twenty years statistical studies of marine plankton dinoflagellates of southern California. *Amer. Modl. Nat.*, Vol. 26: 603-635.
- A.O.A.C. (1995). Paralytic shellfish poison, biological method. In: Official methods of analysis. 15th ed. Williams (Ed.) Arlington, Virginia. 46-48 pp.
- Andersen, P. (1996). Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. I.O.C. Tech. Ser. No. 44, UNESCO Press. 1: 102 pp.
- Anderson, D. M., Kulis, D. M., Qi, Y-Z., Zheng, L., Lu, S. and Lin, Y-T. (1996). Paralytic Shellfish poisoning in southern China. *Toxicon*. Vol. 34: 579- 590.
- Aune, T. and Yndestad, M. (1993). Diarrhetic shellfish poisoning. In: Falconer, I. R.(Ed.) *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 87-104 pp.
- Baden, D. G. and Trainer, V. L. ( 1993). Mode of action of toxins of seafood poisoning. In: Falconer, I. R. (De.) *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 49-74 pp.
- Balech, E. (1962). Tintinnoidea y Dinoflagellata del Pacífico. Según material de las expediciones Norpac y Downwind de las Instituciones SCRIPPS, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia y el Instituto Nacional de Investigaciones de las Ciencias Naturales y Ciencias Zoológicas. Tomo. VII No. 1 Ed. CONI. Buenos Aires. 253 pp.
- Balech, E. (1963). La familia Podolamacea (Dinoflagellata). Instituto de Biología Marina. Bolletin No. 2 Febrero. Universidad Nacional. Buenos Aires. 33 pp.

- Bagnis, R. (1993) . Ciguatera fish poisoning. In: Falconer, I. R. (Ed.) Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 105-115 pp.
- Bates, H. A., and Rapoport, H. (1975) . A chemical Assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. J. Agr. Food Chem. Vol. 23: 237-239.
- Bates, H. A., Kostriken, R., and Rapoport, H. (1978) . The occurrence of saxitoxin and other toxins in various dinoflagellates. Toxicon. Vol. 16: 595-601.
- Belin, C., Beliaeff, B., Raffin, B., Rabia, M. and Ibanez, F. (1995). Phytoplankton time series data of the french phytoplankton monitoring network toxic and dominant species. In: P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien, P. and Marcaillou-Le, C. (Ed.). Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes. 771-776 pp.
- Boyer, G. L., Sullivan, J. J., Andersen, R. J., Taylor, F. J. R., Harrison, O. J. and Cembella, A. D. (1986) . Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture. Mar. Biol. Vol. 93: 361-369.
- Boyer, G. L., Sullivan, J.J., Andersen, R. J., Taylor F. J. R., Harrison, O. J. and F. J. R. Taylor. (1987). Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* in culture. Mar. Biol. Vol. 96: 123- 128.
- Bricelj, V. M., Lee, J. H., Cembella, A. D. and Anderson, D. M. (1990) . Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 63: 177-188.
- Bruno, M., Gucci, P. M. B., Pierdominici, E., Ioppolo, A. and Volterra, L. (1990) . Presence of saxitoxin in toxic extracts from *Gonyaulax polyedra*. Toxicon. Vol. 28: 1113-1116.

- Cacho-López, L. (1992). Variación estacional de nutrientes al noroeste de Bahía de Todos Santos (1989-1990). Tesis de Licenciatura. UABC. 46 pp.
- Cancino-Franklin, J. L. (1985). Experimentos sobre el cultivo del mejillón *Mytilus californianus* en la Bahía de Todos Santos, B. C., Tesis de Licenciatura. UABC. 146 pp.
- Cembella, A. D., Shumway, S. E., and Lewis, N. (1993). Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. J. of Shellfish Research. Vol. 12:389-403.
- Chi-Barragán, G., y García-Pámanes, F. A. (1983). Estudios preliminares sobre la biología, ecología y explotación comercial de *Mytilus californianus* en Baja California. Tesis de Licenciatura. UABC. 180 pp.
- Coronado-Molina, C. y Amezcua-Linares, F. (1988). Distribución y abundancia de los peces demersales de la costa de Guerrero y en el Pacífico de México. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México. Vol.15: 67-94.
- Cortés-Altamirano, R., Hernández-Becerril, D. U. y Luna-Soria, R. (1995). Mareas rojas en México: una revisión. Rev. Lat-Amer. Microbiol. Vol. 37: 343-352.
- Cortés-Altamirano, A., Muñoz-Cabrera, L. and Sotomayor-Navarro, O. (1993). Envenenamiento paralítico por mariscos (PSP), causado por el dinoflagelado *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* en la costa suroeste de México. An. Ins. Cien. del Mar y Limnol. UNAM, Vol. 20: 43-54.
- Costas, E., Fernández, J. L. y Delgado, A. (1986). Variabilidad interclonal para la toxicidad PSP en el dinoflagelado *Gonyaulax excavata*, un nuevo sistema de bioensayo. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. Vol. 3: 55-60.
- Cullen, J. J., Horrigan, S. G. (1982). Yellow water in La Jolla Bay, California, July 1980. A bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium flavum* Kofoid and Swezy. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 63: 67-80.

- Davin, W. T. and Kohler, C. C. (1988). Ciguatera toxins adversely affect piscivorous fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* . Vol.117: 374-384 .
- Dickey, R. W., Granade, W. H. and Bencsath, F. A. (1993). Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC-Fluorometric Determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish. In: T. J. Smayda and Shimizu, Y. (Ed.) *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier. New York. 495-500 pp.
- Dodge, J. D. (1985). *Atlas of Dinoflagellates*. Farrant Press., London. 119 pp.
- Egmond, V. (1996). Development of reference materials for paralytic shellfish poisons . In: *Industrial technologies. Standards, measurements and testing*. Synopses of projects. European Commission. 93 pp.
- Flores, A. R., Vázquez, M. E., Arroyo, O.E. and Badillo, S.L. (1996). Efectos nocivos de mareas rojas en el cultivo comercial de abulón en la empresa Abulones Cultivados. Resumen. Taller sobre Biología, Pesquería y Cultivo de Abulón en México. 12 pp.
- Gonzalez, C. L., Ordoñez, J. A. and Maala, A. M. (1989). Red tide: The Philippine Experience. In: Okaichi T., D. M. Anderson and Nemoto, T. (Ed.). *Red Tides. Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier. New York. 45-48 pp.
- Guillard, R. (1978). Counting slides. In: Sournia A. *Phytoplankton manual*. UNESCO. 182-189 pp.
- Hallegraeff, G.M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*. Vol. 32: 79-99.
- Holmes, R. W., Williams, P. M. and Eppley, R. W. (1967). Red water in La Jolla Bay, 1964-1966. *Limnol. Oceanogr.* Vol. 12:503-512.
- Langlois, G. W., Danielson, R. E., Perera, S. K. and Pickering, M. V. (1991). Toxins on the Half Shell: Shellfish Monitoring along the California Coast. *LC-GC*. Vol. 9: 838-844.

- Lawrence, J. F., Menard, C., Charbonneau, C. F. and Hall, S. (1991). A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poisoning using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol.74: 404-409.
- Legovic, T., Vilivic, D., Petricoli, D. and Zutic, V. (1991). Subsurface *Gonyaulax polyedra* bloom in a stratified estuary. *Mar. Chem.* Vol. 32: 361-374.
- López-Ramírez, P. E. (1993). Variaciones diurnas de algunos efectos producidos por la descarga del material orgánico introducido por la U.A.B.C. Unidad Ensenada, en la línea de costa cercana al efluente, durante Noviembre de 1992. Tesis de Licenciatura. UABC. 92 pp.
- Macías-Carranza, V. A. (1996). Análisis de organoestañados por el método de generación de hidruros y detección por espectrofotometría de absorción atómica (HG-AAS) en el Puerto de Ensenada, B. C. Tesis de Licenciatura. UABC. 56 pp.
- Mackenzie, A.L., White, D. A., Sim, P. G. and Holland, A. J. (1993). Domoic Acid and the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*). In: T. J. Smayda and Shimizu, Y. (Ed.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, New York. 607-612 pp.
- Margalef, R. (Ed.)(1977). *Ecología*. Omega. Barcelona. 951 pp.
- Matsuoka, K. and Fukuyo, Y. (1995). Taxonomy of cysts. In: G. M. Hallegraeff, Anderson, D. M., Cembella, A. D. and Enevoldsen, H. O. (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. Intergovernmental Oceanographic Commission (of UNESCO). Francia. 381-401 pp.
- Martinez-Martinez, E., Orellana-Cepeda, E. y Tomasini-Ortiz, C. (1996). Desarrollo de un sistema de análisis por cromatografía de líquidos y reactor poscolumna para la determinación cuantitativa de ficotoxinas. V Cong. Lat. de Geog. Org. Acapulco. 367-368

- Mee, L.D., Espinosa, M. and Diaz, G. (1986). Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific Coast of México. *Mar. Environ. Res.* Vol. 19:17-92.
- Mercado, J. A., Viera, M., Tosteson, T. R., González, Y., Silva, W., and Escalona de Motta, G. (1995). Differences in the toxicity and biological activity of *Ostreopsis lenticularis* observed using different extraction procedures. In: P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien, P. and Marcaillou-Le, C. (Ed.). *Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton.* Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes. 321-326 pp.
- Millán-Nuñez, E., and Loya-Salinas, D. H. (1993). Variabilidad temporal del fitoplancton en una zona costera del noroeste de Baja California. *Ciencias Marinas* Vol.19: 61-74.
- Morales- de la Garza, E. A., Carranza-Edwards, A. y Márquez-García, A. Z. (1988). Distribución y evolución de sedimentos superficiales del delta del río Balsas, Michoacán, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.* Vol. 5: 95-104.
- Mosqueda-Razo, C. A. (1995). Variabilidad anual de la estructura del fitoplancton de red en el área norte de Bahía de Todos Santos, Baja California. Tesis de Licenciatura. UABC. 80 pp.
- Orellana-Cepeda, E. (1971). Sistemática (Dinoflagellatae) y distribución del fitoplancton marino en una área del Pacífico sud-oriental (Operación Oceanográfica "Marchile VII" Marzo 1968). U. C. V. 78 pp.
- Orellana-Cepeda, E. (1994). Ecofisiología del fitoplancton costero. Reporte Técnico. UABC-FCM. Ensenada, B. C.
- Orellana-Cepeda, E. (1996). *Pyrodinium* toxicity reappears near Acapulco. *Harmful Algae News, I.O.C. UNESCO.* (14): 1
- Orellana-Cepeda, E., Morales-Zamorano, L. A. (1994). Impacto de la eutroficación sobre el fitoplancton marino. *Serie Científica.* Vol. 2:17-34.

- Orellana-Cepeda, E., Morales-Zamorano, L. A. y Castro-Castro, N. (1996).  
A conceptual model of coastal red tides off Baja California (en prensa).
- Orozco-Borbón, M. V. y Sañudo-Wilhelmy, S. A. (1988). Estudio de coliformes,  
estreptococos y bacterias patógenas a lo largo de la costa de Baja California.  
Ciencias Marinas. Vol. 14: 1-8.
- Orozco-Borbón, M. V. ; Segovia-Zavala, J. A., Delgadillo-Hinojosa, F. D. y Muñoz-  
Barbosa, A. (1994). Estudio bacteriológico de agua de mar para el cultivo  
de moluscos bivalvos en Baja California. Ciencias Marinas. Vol. 20: 183-198.
- Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraef, G., and Blackburn S.  
(1987). Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic  
shellfish toxins in Tasmanian Shellfish. Toxicon. Vol. 25:1105-1111.
- Oshima, Y. (1995). Post-column derivatization HPLC methods for paralytic  
shellfish poisons. In: G. M. Hallegraef, Anderson, D. M. and Cembella, A.  
D. (Eds.). Manual on harmful marine microalgae. Manual and guides. I.O.C.  
UNESCO. 81- 94 pp.
- Park, D.L., Fremy, J. M., Marcaillou-Le Baut, C., Gleizes, E., Masselin, P.  
and Goldsmith C.H. (1995). Utilization of solid-phase immunobead assay to  
monitor fish and shellfish harvesting areas for ciguatera fish, and  
diarrheic shellfish poisoning toxins. In: P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le,  
E., Gentien, P. and Marcaillou-Le, C. (Ed.). Harmful Marine Algal Blooms.  
Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine  
Phytoplankton. Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes. 327-332 pp.
- Patten, B. (1962). Species diversity in net phytoplankton of Raritan Bay. In:  
Nybakken, J. (1971). Readings in Marine Ecology. Pub. Harper & Row.  
N.Y. 30-47 pp.
- Patton, S., Chandler, P. T. and Kalon, E. B. (1967). Food value of red tide  
(*Gonyaulax polyedra*). Science. Vol. 158: 789-790.

- Peet, P. K. (1974). The measurement of species diversity. Annual review of ecology and systematics. Vol. 15: 285-307.
- Peláez, J. (1987). Satellite images of a "red tide" episode off southern California. Oceanologica Acta. Vol. 10: 403-410.
- Pillet, S. and Houvenaghel, G. (1995). Influence of experimental toxification by DSP producing microalgae, *Prorocentrum lima*, on clearance rate in blue mussels *Mytilus edulis*. In: P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien, P. and, Marcaillou-Le, C. (Ed.). Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes. 481-486 pp.
- Reynoso-Nuño, H. E. y Jorajuria, A. (1988). Distribución de metales pesados en la costa occidental de la Península de Baja California, usando *Mytilus californianus* como organismo centinelas. Ciencias Marinas. Vol. 14: 101-116.
- Richard, M. (1987). Atlas du phytoplancton Marin. Diatomophycées. CNRS (Ed.). Paris. Vol 2.
- Rivas-Lozano, A. M. y Millán-Nuñez, R. (1983). Distribución y abundancia del fitoplancton en la Bahía de Todos Santos. Ciencias Marinas. Vol. 17 : 13-24.
- Rosales-Loessener, F., De Porras, E. and Dix, M. W. (1989). Toxic shellfish poisoning in Guatemala. In: T. Okaichi, Anderson, D.M. and Nemoto, T. (Ed.), Red tides. Biology, Environmental Science, and Toxicology. Elsevier. N. Y. 113-116 pp.
- Santamaria-del- Angel, E. y Orellana-Cepeda, E. (1992). Tintinidos de la Bahía de Todos Santos B. C. México (1980-1985) Y. Taxonomía. Ciencias Marinas. Vol. 18: 171-197.
- Schradie, J., and Bliss, C. A. (1962). The cultivation and toxicity of *Gonyaulax polyedra*. Lloydia. Vol. 25: 214-221.
- Secretaria de Marina. (1974). Estudio Oceanográfico de la región de Ensenada, B. C. Dirección general de oceanografía y señalamiento marítimo. México. 70 pp.

- Segovia-Zavala, J. A., Rivera-Duarte, Y. and Del Valle-Villorin, F.J. (1988).  
Efectos de desechos orgánicos en las zonas adyacentes a los efluentes  
en Bahía de Todos Santos. C. M. Vol. 14: 81-94.
- Shimizu, Y., Watanabe, N. and Wrensford, G. (1995). Biosynthesis of  
brevetoxins and heterotrophic metabolism in *Gymnodinium breve*. In: P.  
Lassus, Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien, P. and Marcaillou-Le, C. (Ed.).  
Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International  
Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes.  
351-357 pp.
- Shumway, S. E., and Cembella, A. D. (1993). The impact of toxic algae on scallop  
culture and fisheries. Reviews in the Fisheries Science. Vol.1 : 121-150.
- Silvert, W. L. and Cembella, A.D. (1995). Dynamic modelling of phycotoxin  
kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine  
invertebrates. Can. J. Fish. Aquat. Sci. Vol. 52: 521-531.
- Siqueiros-Beltrones, D. A. (1990). Una nota sobre los índices usados para valorar  
la diversidad de especies en asociaciones de diatomeas bentónicas.  
Ciencias Marinas, Vol. 16 : 91-99.
- Sournia, A. (1967). Le genre *Ceratium* (Peridinien planctonique) Dans le canal  
de Mozambique contribution a une révision mondiale Extrait 'Vie et Milieu'  
Série A : Biologie Marine. Tomo XVIII. Fascicules 2-3-A. 375-500 pp.
- Sournia, A. (1995). Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean:  
an inquiry into biodiversity. In: P. Lassus, Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien,  
P. and, Marcaillou-Le, C. (Ed.). Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings  
of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton.  
Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes, 103-112 pp.
- Sousa, Y., Alvito, P., Franca, S., Sampayo, M. A. de M., Martinez, A. G. and  
Rodriguez, V. J. A. (1995). Data on paralytic shellfish toxins related to recent  
*Gymnodinium catenatum* blooms in Portugal Coastal waters. In: P. Lassus,  
Arzul, G., Erard-Le, E., Gentien, P. and, Marcaillou-Le, C. (Ed.). Harmful

- Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes. 825-829 pp.
- Steidinger, K. A., Tester, L. S., and Taylor, F. J. R. (1980). A redescription of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Bohm) stat. nov. from Pacific red tides. *Phycologia*. Vol. 19: 329-337.
- Steidinger, K. A. (1993). Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates In: I. R. Falconer (Ed.). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 1-28 pp.
- Sullivan, J. J., Iwaoka, W. T., and Liston, J. (1983). Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* Vol. 114: 465-472.
- Sullivan, J.J. (). *Methods of Analysis for Algal Toxins: Dinoflagellate and Diatom Toxins*. In: I. R. Falconer (Ed.), *Algal Toxins en Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 29-48 pp.
- Tangen, K. (1978). Nets. In Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. UNESCO. 50-58 pp.
- Taylor, F. J. R. (1989). The taxonomy and relationships of red tide flagellates. In: Anderson, D.M., A.W. White., and D. G. Baden (Eds.) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier. N.Y. 1-26 pp.
- Thronsdon, J. (1978). Preservation and storage. In Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton Manual*. UNESCO. 69-74 pp.
- Tseng, C. K., Zhuo, M. J. and Zuo, J. Z. (1993). Toxic phytoplankton studies in china. In: T. J. Smayda and Y. Shimizu (Ed.). *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier. N.Y. 347-352 pp.
- Tolomio, C. and Moschin, E. (1985). Y a-t-il des microalgues nuisibles dans la lagune de Venise? (Période d'observation : 1988-1993). *Mar. Life*. Vol. 5: 3-9.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., and Yasumoto, T. (1977). Occurrence of yessotoxin in phytoplankton and mussels from Northern Adriatic Sea. VIII International Conference on Harmful Algae. Abstracts. Vigo. 205 pp.

- Uchida, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, Y. and Honjo, T. (1995). The red-tide dinoflagellate *Heterocapsa* sp. kills *Gyrodinium instriatum* by cell contact. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 118: 301-303.
- Usup, G., Kulis, D. and Anserdon, M. (1995). Toxic production in a Malaysian isolate of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*. In: P.Lassus, Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. and Marcaillou, C. (Ed.). *Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton.* Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes, 519-524 pp.
- Van Egmond, H. P. (1996). Development of reference materials for paralytic shellfish poisons. In: European Commission (ed). *Standards, measurements and testing.* Industrial Technologies. pag. 13.
- Venrick, E. L. (1978). The implications of subsampling. In: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton Manual.* UNESCO. 75-87 pp.
- Yamaji, Y. (1980). *Illustrations of the Marine Plankton of Japan.* Pub. Hoikusha Comp. Osaka. 360 pp.
- Yasumoto, T., Satake, M., Sugiyama, K., Ishida, S., Murata, M. and Naoki, H. (1995). Maitotoxin, other ciguatera toxins: from structures to determination. In: P.Lassus, Arzul, G., Erard, E., Gentien, P. and Marcaillou, C. (Ed.). *Harmful Marine Algal Blooms. Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton* Lavoisier, Intercept Ltd. Nantes, 377-382 pp.
- Zar, J. H. (1984). *Biostatistical Analysis.* Second Edition. By Prentice-Hall. New Jersey. 718 pp.

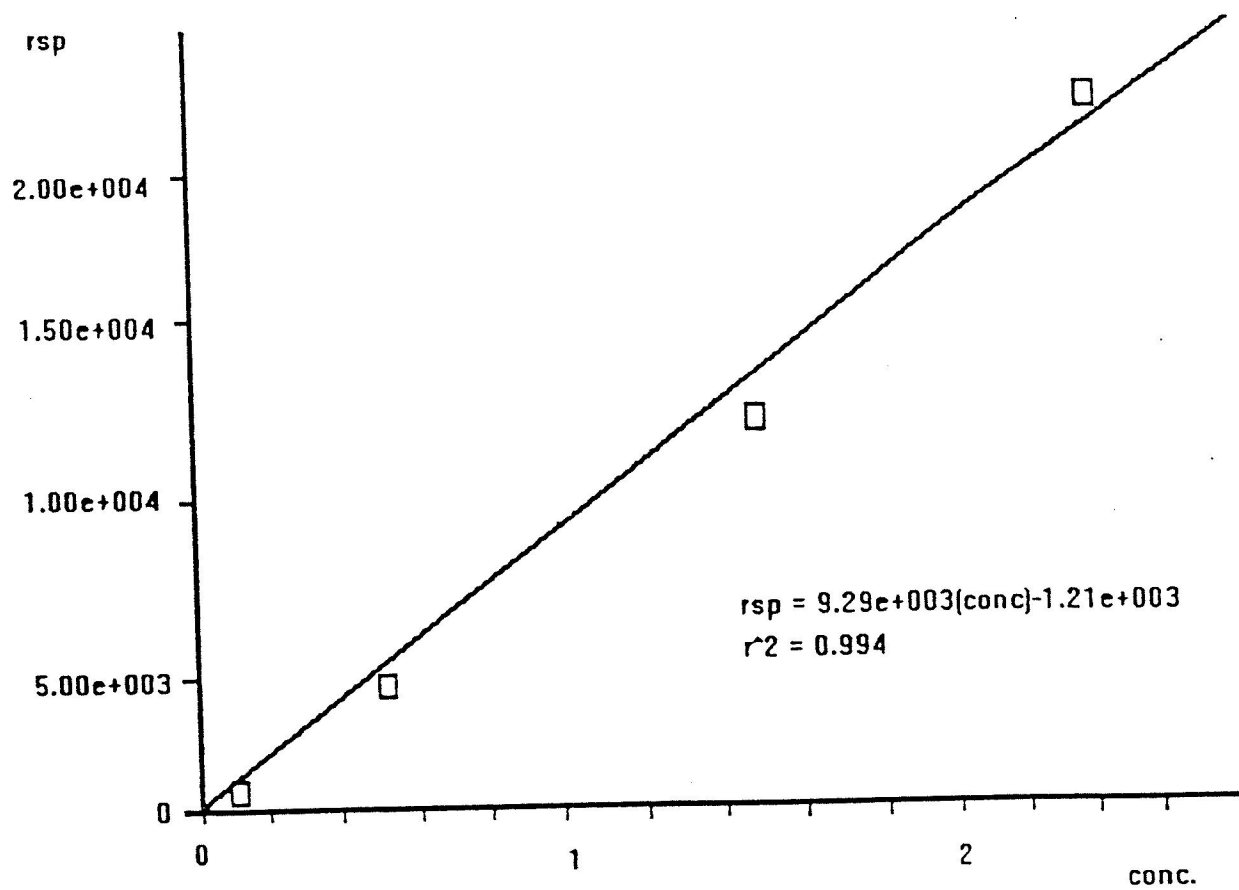
**ANEXO I. Tiempo de muerte en unidades ratón para la toxina que provoca parálisis. Tabla de Sommer's (A.O.A.C. 1995).**

TIEMPO DE MUERTE	UNIDADES RATON	TIEMPO DE MUERTE	UNIDADES RATON	TIEMPO DE MUERTE	UNIDADES RATON	TIEMPO DE MUERTE	UNIDADES RATON
1:00	100.0	3:00	3.70	55	1.96	30	1.13
10	66.2	5	3.57	5:00	1.92	10:00	1.11
15	38.2	10	3.43	5	1.89	30	1.09
20	26.4	15	3.31	10	1.86	11:00	1,075
25	20.7	20	3.19	15	1.83	30	1.06
30	16.5	25	3.08	20	1.80	12:00	1.05
35	13.9	30	2.98	30	1.74	13	1.03
40	11.9	35	2.88	40	1.69	14	1,015
45	10.4	40	2.79	45	1.67	15	1,000
50	9.33	45	2.71	50	1.64	16	0.999
55	8.42	50	2.63	6:00	1.60	17	0.98
2:00	7.67	55	2.56	15	1.54	18	0.972
5	7.04	4:00	2.50	30	1.48	19	0.965
10	6.52	5	2.44	45	1.43	20	0.96
15	6.06	10	2.38	7:00	1.39	21	0.954
20	5.66	15	2.32	15	1.35	22	0.948
25	5.32	20	2.26	30	1.31	23	0.942
30	5.00	25	2.21	45	1.28	24	0.937
35	4.73	30	2.16	8:00	1.25	25	0.934
40	4.48	35	2.12	15	1.22	30	0.917
45	4.26	40	2.08	30	1.20	40	0.898
50	4.06	45	2.04	45	1.18	60	0.875
55	3.88	50	2.00	9:00	1.16		

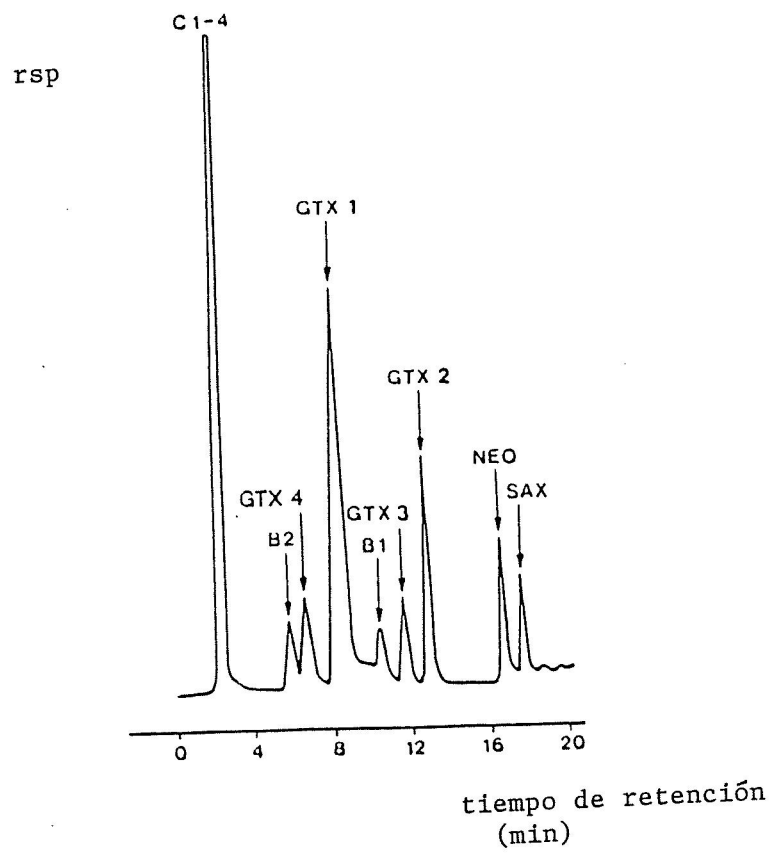
## ANEXO II .- Corrección por peso de ratón ( A.O.A.C. 1995).

Peso del ratón (grs)	Unidades ratón	peso del ratón (grs)	Unidades ratón
10.0	0.500	16.5	0.860
10.5	0.530	17.0	0.880
11.0	0.560	17.5	0.905
11.5	0.590	18.0	0.930
12.0	0.620	18.5	0.950
12.5	0.650	19.0	0.970
13.0	0.675	19.5	0.985
13.5	0.700	20.0	1.000
14.0	0.730	20.5	1.015
14.5	0.760	21.0	1.030
15.0	0.785	21.5	1.040
15.5	0.810	22.0	1.050
16.0	0.840	22.5	1.060

## ANEXO III. Curva de calibración del estándar de la saxitoxina.



ANEXO IV.- Perfil cromatográfico usado como base para la determinación de porcentajes de toxinas. Tomado de Lawrence *et al.*, 1991



ANEXO V.- Composición fitoplanctónica del día 3 de Agosto de 1995, dentro de la rada portuaria.

ESPECIE	DENSIDAD $\times 10^3$ cel l <sup>-1</sup>
<i>Lingulodinium polyedra</i>	793
<i>Gymnodinium</i> sp.	254
<i>Peridinium divergens</i>	312
<i>Ceratium falcatum</i>	18
<i>C. cf. divaricum</i>	13
<i>C. furca</i>	10
<i>C. minimum</i>	3
<i>Peridinium globulus</i>	1
<i>Peridinium steinii</i>	19
<i>Prorocentrum micans</i>	5
<i>Dinophysis ovum</i>	4
<i>Pyrophacus horologicum</i>	4
<i>Oxytoxum scolopax</i>	2
<i>Heterocapsa</i> sp.	1
<i>Bidulphia mobiliensis</i>	1
<i>Bacillaria paradoxa</i>	35
<i>Noctiluca scintillans</i>	8

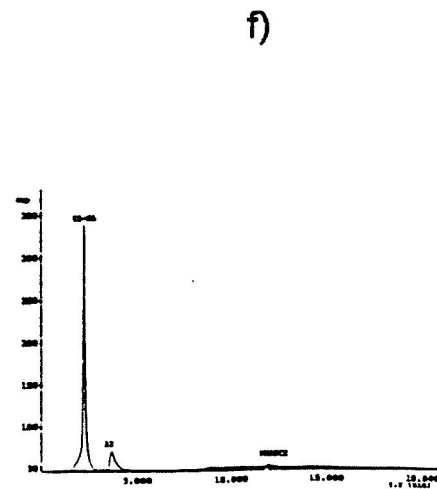
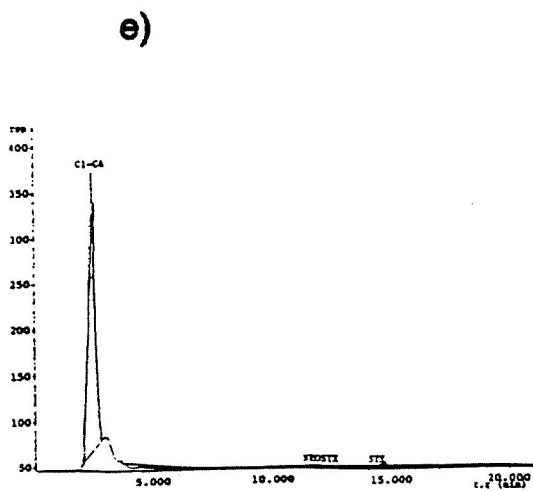
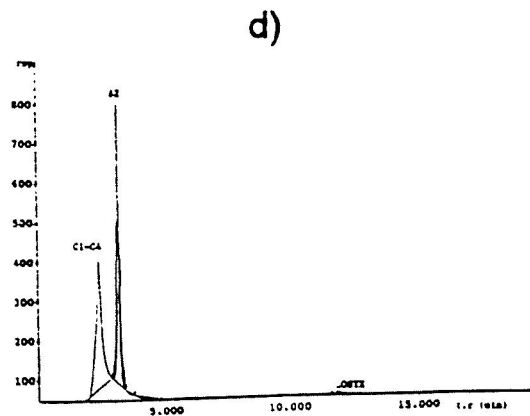
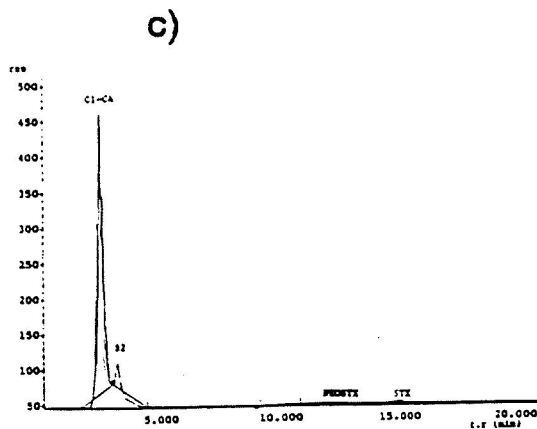
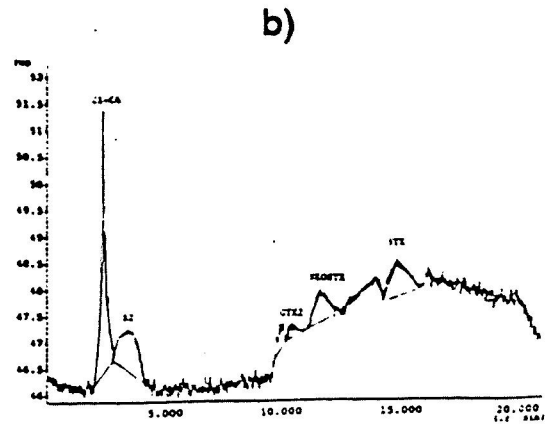
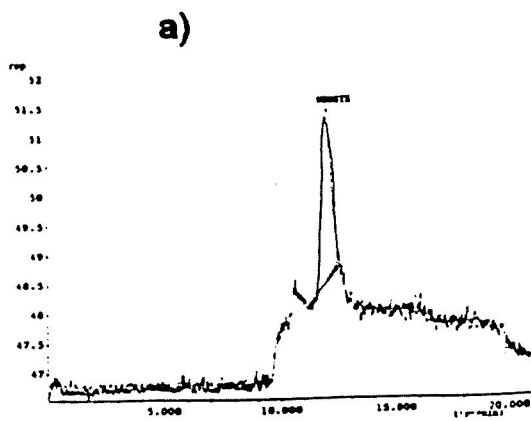
ANEXO VI.- Índice de dominancia de Simpson para  
*L. polyedra* en los eventos de marea roja.

Lugar	Fecha	Índice
Dentro de la dársena	3/agosto/1995	0.53
Zona exterior al muelle	12/agosto/1995	0.91
Dentro de la dársena	22/septiembre/1995	0.91
Dentro de la dársena	26/septiembre/1995	0.60
Frente de la dársena	15/marzo/1995	0.96
Dentro de la dársena	15/marzo/1996	0.85

ANEXO VII.- Índice de diversidad específica de Shannon-Weaver ( $H'$ ),  
determinada para el primer y segundo período de muestreo de fitoplancton.

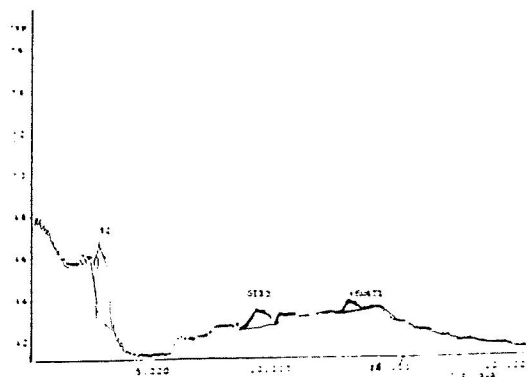
FECHA	$H'$	LUGAR
9/SEPTIEMBRE/1995	1.25	Dentro de la rada
12/SEPTIEMBRE/1995	0.85	Zona exterior al muelle
12/SEPTIEMBRE/1995	1.3	Dentro de la rada
19/SEPTIEMBRE/1995	1.7	Dentro de la rada
22/SEPTIEMBRE/1995	1.3	Dentro de la rada
24/SEPTIEMBRE/1995	1.9	Dentro de la rada
26/SEPTIEMBRE/1995	1.5	Dentro de la rada
6/FEBRERO/1996	0.9	Dentro de la rada
6/MARZO/1996	1.7	Frente de la rada

ANEXO VIII.- Ejemplos de perfiles cromatográficos de fitoplancton y *M. californianus*, de la Bahía de Todos Santos, B. C.

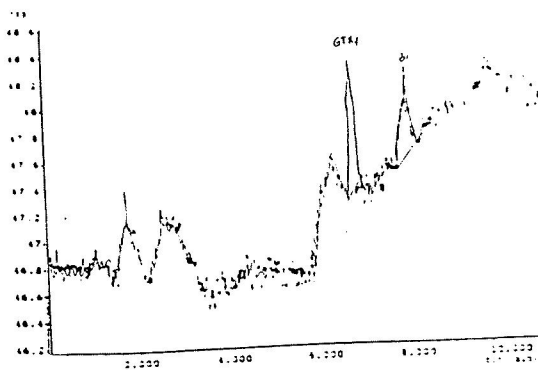


continuación del Anexo VIII.

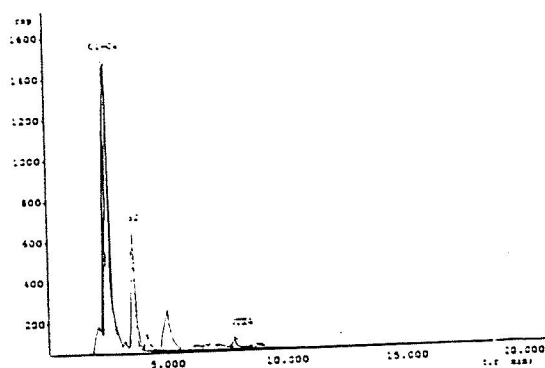
g)



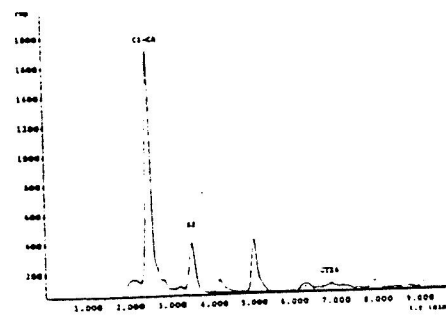
h)



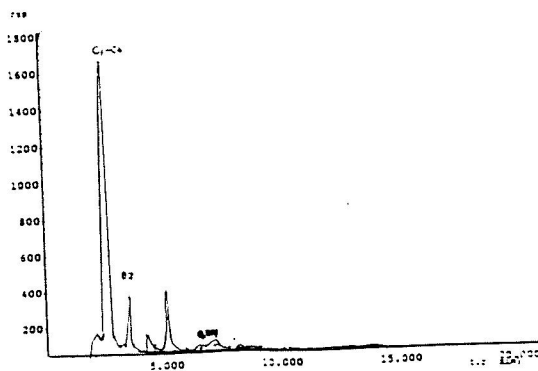
i)



j)



k)



ANEXO IX.-Composición fitoplanctónica del florecimiento del 12 de septiembre de 1995, en la zona exterior al muelle.

ESPECIE	PORCENTAJE
<i>Lingulodinium polyedra</i>	91
<i>Gymnodinium</i> sp.	1.4
<i>G. flavum</i>	1.3
<i>Peridinium divergens</i>	3.35
<i>P.steinni</i>	0.5
<i>Oxytoxum scolopax</i>	0.08
<i>Prorocentrum micans</i>	0.85
<i>P. gracile</i>	0.17
<i>Pyrophacus horologicum</i>	0.08
<i>Biddulphia mobiliensis</i>	0.08

ANEXO X.- Composición fitoplanctónica del 15 de marzo de 1996, frente de la dársena portuaria.

ESPECIE	DENSIDAD (X10 <sup>3</sup> cel l <sup>-1</sup> )
<i>L. polyedra</i>	983
<i>Prorocentrum micans</i>	32
<i>P. gracile</i>	5
<i>Peridinium steinni</i>	1
<i>Ceratium fusus</i>	1
<i>C. minimum</i>	2

ANEXO XI.- Composición fitoplanctónica del 15 de marzo de 1996, dentro de la dársena portuaria.

ESPECIE	DENSIDAD (X10 <sup>3</sup> cel l <sup>-1</sup> )
<i>L. polyedra</i>	1,077
<i>Gymnodinium sp.</i>	120
<i>Prorocentrum micans</i>	45
<i>P. gracile</i>	6
<i>Ceratium furca</i>	4
<i>C. fusus</i>	1
<i>C. cf. divaricum</i>	1
<i>Dinophysis ovum</i>	1
<i>Peridinium steinii</i>	5
<i>Oxytoxum scolopax</i>	1

ANEXO XII.- Prueba de Wilcoxon para muestras independientes desequilibradas.  $\alpha=0.05$ .

Ho= son iguales las abundancias fitoplanctónicas en ambas áreas.

Ha= son diferentes las abundancias fitoplanctónicas en ambas áreas.

Fitoplancton de:	TL <sub>crit</sub>	TU <sub>crit</sub>	TL <sub>cal</sub>	TU <sub>cal</sub>	Ho	Ha
Dentro de la dársena 3/8/95 Dentro de la dársena 22/9/95	57	95	35	46		se rechaza
Dentro dársena 22/9/95 Zona exterior al muelle 22/9/95	83	127	49	57		se rechaza
Dentro dársena 19/02/96 Frente dársena 6/3/96	12	28	20	25		se rechaza
Dentro dársena 15/3/96 Frente dársena 15/3/96	6	18	10	18		se rechaza
Medio bahía 9/08/96 Area cultivo mejillones 9/08/96	33	63	60	60		se rechaza
Medio bahía 9/8/96 Dentro dársena 9/8/96	63	108	66	114		se rechaza
Area cultivo mejillones 9/08/96 Dentro dársena 9/8/96	48.5	87.5	35	67	se rechaza	

ANEXO XIII. Prueba de Contingencia  $\alpha=0.05$ 

Ho= Las dos clasificaciones de toxinas son independientes.

Ha= Las dos clasificaciones de toxinas son dependientes.

Lugar	Muestra	$x^2_{crit} = X_{\alpha}(r-1)(c-1)$	$x^2_{calc}$	Ho	Ha
Dentro dársena Rincón de Ballenas	Fitoplancton 31/8/95 Mejillón 31/08/95	2.13	0.002		se rechaza
Dentro dársena Rincón de ballenas	Fitoplancton 6/02/96 Mejillones 6/03/96	9.49	13.94	se rechaza	
Dentro dársena Zona exterior al muelle	Fitoplancton 6/02/96 Mejillones 19/02/96	9.49	7.57		se rechaza