

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

OCEANOLOGÍA



TESIS PARA OBTENER TÍTULO DE OCEANÓLOGO

**“Cuantificación de ácido domoico disuelto en agregados de
materia orgánica asociado a *Pseudo-nitzschia* sp. aislada del
Alto Golfo de California”**

Yessica Soledad Loya Madero

Ensenada, B. C. a 24 de noviembre de 2023

Resumen de la tesis que presenta **Yessica Soledad Loya Madero** como requisito parcial para la obtención del grado de Oceanólogo.

“Cuantificación de ácido domoico disuelto en agregados de materia orgánica asociado a *Pseudo-nitzschia* sp. aislada del Alto Golfo de California”

Resumen

El ácido domoico (AD) es la neurotoxina responsable de la intoxicación amnésica por consumo de Mariscos (ASP) en humanos, y también ha sido responsable con la muerte de mamíferos marinos y aves. Es producida principalmente por algunas especies del género *Pseudo-nitzschia*. La toxina puede ser excretada por estas especies disolviéndose en el medio marino, convirtiéndose en ácido domoico disuelto (ADd). Recientemente, se ha sugerido que el ADd se asocia con agregados de materia orgánica, lo que actúa como un medio de transmisión y estabilidad de la molécula. Este estudio se centra en evaluar la proporción de ADd retenido en la fracción asociada a (TEP) (considerados como agregados de materia orgánica de tamaño superior a los 0.45 μm), como un factor determinante para la permanencia del AD en el medio ambiente. Para esto, se analiza la cantidad del AD retenido en la fracción asociada a los TEP (AD_{TEP}) en un cultivo celular de *Pseudo-nitzschia* sp. Se analiza la relación del AD_{TEP} con el carbono orgánico disuelto (COD) y el carbono orgánico particulado (COP). Se observó que la proporción de AD_{TEP} es de 0.56% respecto al AD total producido por de *Pseudo-nitzschia* sp. Además, se observa que el ADd y el COD presentan un aumento hacia el inicio de la fase de decaimiento de *Pseudo-nitzschia* sp. (Día 20), mientras que el COP muestra un patrón inverso. La baja concentración de AD_{TEP} detectada se debió probablemente a la asociación de los TEP con células retenidas en un filtro de de 3.0 μm , por lo que la concentración de ADd fue mucho mayor que la fracción de AD_{TEP} . Asimismo, la fracción de ADd fue mayor durante el inicio de la fase de decaimiento del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.

Palabras clave: Ácido domoico, *Pseudo-nitzschia* sp, agregados de materia orgánica, partículas exoplíméricas transparentes, carbono orgánico disuelto, carbono orgánico particulado

Summary of the thesis presented by **Yessica Soledad Loya Madero** as a partial requirement to obtain the degree of Oceanologist.

“Quantification of dissolved domoic acid in organic matter aggregates associated with a strain of *Pseudo-nitzschia* sp. isolated from the Upper Gulf of California”

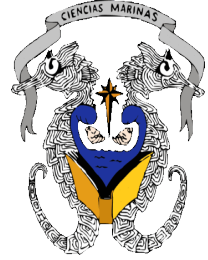
Summary

Domoic acid (DA) is the neurotoxin responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP) in humans, and has also been responsible for the death of marine mammals and birds. It is produced mainly by some species of the genus *Pseudo-nitzschia*. The toxin can be excreted by these species and dissolves in the marine environment, becoming dissolved domoic acid (dDA). Recently, it has been suggested that dDA is associated with aggregates of organic matter, which acts as a means of transmission and stability of the molecule. This study focuses on evaluating the proportion of dDA retained in the fraction associated with (TEP) (considered as aggregates of organic matter larger than 0.45 μm), as a determining factor for the permanence of dDA in the environment. For this purpose, the amount of DA retained in the TEP-associated fraction (DA_{TEP}) in a cell culture of *Pseudo-nitzschia* sp. The relationship of DA_{TEP} with dissolved organic carbon (DOC) and particulate organic carbon (POC) is analyzed. It was observed that the proportion of DA_{TEP} is 0.56% with respect to the total AD produced by *Pseudo-nitzschia* sp. In addition, it is observed that dDA and DOC show an increase towards the beginning of the decay phase of *Pseudo-nitzschia* sp. (Day 20), while POC shows a reverse pattern. The low DA_{TEP} concentration detected was probably due to the association of TEPs with cells retained on a 3.0 μm filter, so that the dDA concentration was much higher than the DA_{TEP} fraction. Likewise, the dDA fraction was higher during the beginning the decay phase of the *Pseudo-nitzschia* sp. culture.

Keywords: Domoic acid, *Pseudo-nitzschia* sp, organic matter aggregates, transparent exopolymeric particles, dissolved organic carbon, particulate organic carb



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA**



“Cuantificación de ácido domoico disuelto en agregados de materia orgánica asociado a *Pseudo-nitzschia* sp. aislada del Alto Golfo de California”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANOLOGO

PRESENTA:

**Yessica Soledad Loya Madero
364818**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

**Dr. Ernesto García Mendoza
DIRECTOR**

**Dr. Aramis Olivos Ortiz
SINODAL**

**Dra. Mary Carmen Ruíz de la Torre
SECRETARIO**

**Dr. José Rigel Castañeda Quezada
SINODAL**

“Por la Realización Plena del Ser”

Dedicatorias

A mis padres y hermanos que han estado presente en cada paso de mi vida.

Para mi compañero de vida, que sin ti nada de esto hubiera sido posible.

A los maravillosos amigos que me han acompañado en este camino.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por haberme permitido concluir mis estudios dentro del programa de estudios en ocenaología.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por brindarme la beca como ayudante de investigación.

Al Proyecto PRONAI 319104 “Atención de la Problemática Asociada a Florecimientos Algales Nocivos en Baja California: Integración del Conocimiento a Necesidades Socio-ambientales y Económicas” por el apoyo para la compra de material que permitió el desarrollo del proyecto.

Al proyecto “Respuestas biológicas de la comunidad fitoplanctónica a la presencia de hierro y vitamina b12 y sus implicaciones para la formación y persistencia de florecimientos algales nocivos en aguas costeras mexicanas” por la beca recibida.

Dr. Ernesto García Mendoza gracias por recibirme y guiarme en el camino del ácido domoico. Su guía y observaciones han impulsado mi trabajo, espero seguir aprendiendo de usted.

A cada uno de los integrantes de mi comité, al Dr. Aramis Olivos porque gracias a sus consejos he mejorado como estudiante y persona, a la Dra. Mary Carmen Ruíz que me apoyó pasito por pasito y finalmente pero no por ello menos importante, al Dr. Rigel Castañeda ya que sin él estaba perdida en el proceso de elaboración de los experimentos de la tesis, fue de muchísima ayuda.

A la Dra. Sonia Quijano por impulsarme en el conocimiento del fitoplancton, las tortugas y muchos otros temas. Es un ejemplo a seguir para mí, siempre será parte de mi motivación para seguirme preparando y tratar de hacer un cambio positivo en lo que me rodea.

A los integrantes del laboratorio de biología algal y Ficotox, especialmente a la futura doctora Kassandra Beltrán, ya que eres un ejemplo a seguir y un apoyo muy importante. Además de hacer divertido mi tiempo en el laboratorio.

A los integrantes del laboratorio de microbiología marina, especialmente al Dr. Helmut Maske Rubach, el Dr. Cesar Octavio Alameda Jáuregui y el Mtro. José Ernesto Sampedro Avila, por su disposición para apoyar con el análisis de algunas variables que involucra mi proyecto.

Tabla de contenido

Resumen	I
Summary	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Tabla de contenido	VI
Lista de figuras	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1 Diatomeas	5
2.2 Características del ácido domoico	6
2.3 Efectos y transferencia del ácido domoico	8
2.4 Ácido domoico disuelto (ADd) y su degradación	9
2.5 Materia orgánica disuelta (MOD) y las partículas exoplíméricas transparentes (TEP).....	10
3. Justificación	13
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5. Hipótesis	15
6. Metodología	16
6.1 Condiciones del cultivo.....	16
6.2 Crecimiento Poblacional.....	17

6.3 Obtención de muestras para determinación de diferentes variables	18
6.4 Almacenamiento de muestras	21
6.5 Determinación de concentración de AD	21
6.6 Determinación de concentración de TEP	23
6.7 Determinación de concentración de COP y COD	25
6.8 Análisis estadístico	26
7. Resultados	27
7.1 Crecimiento poblacional de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	27
7.2 Producción de ácido domoico disuelto en <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	29
7.3 Producción de materia orgánica en forma de TEP en <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	30
7.4 Evaluación de COD y COP en muestras de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	33
7.5 Comparación de variables.....	35
7.6 Relación de diferentes fracciones de AD en el día 20 de la curva de crecimiento de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.....	39
8. Discusión	41
8.1 Producción de AD.....	41
8.2 Producción de TEP	43
8.3 Producción de AD respecto a la producción de TEP	46
8.4 Producción de COD y COP.....	48
8.5 Relación de variables	49
9. Conclusiones	52
10. Recomendaciones	53
11. Referencias	54

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. Tomado de He y colaboradores (2010).....	8
Figura 2. Esquema que describe la definición teórica de rango de tamaño del carbono orgánico particulado, carbono orgánico disuelto, partículas exoplíméricas transparentes, así como compuestos particulados, coloidales y disueltos (Flecha roja indica la posible incorporación del AD a fracción de TEP) (Modificado de Villacorte (2014), con elementos del esquema elaborado por Verdugo y colaboradores (2004)).....	12
Figura 3. Células en cadenas y solitarias presentes en el cultivo original de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.....	16
Figura 4. Esquema de muestreo durante el crecimiento poblacional de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. para la determinación de AD, TEP, COD, COP.....	20
Figura 5. Recolección y filtrado de muestras para análisis de AD, TEP, COP y COP...21	
Figura 6. Proceso de extracción del AD.	22
Figura 7. Procedimiento para la cuantificación de TEP a partir del filtrado de 50 ml del cultivo de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.....	24
Figura 8. Curva de calibración para cuantificación de TEP, elaborada a partir del método de Bittar y colaboradores (2018).....	25
Figura 9. Crecimiento poblacional del aislado SFy (Línea) de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. obtenido de la región de San Felipe, B.C. En condiciones de luz-oscuridad 12:12 h, con	

medio de cultivo L1 enriquecido con silicatos. Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.28

Figura 10. Concentración de AD_{TEP} (barras) medida como la fracción de AD retenido en filtros de 0.45 μm . Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.29

Figura 11. Concentración de ADd (barras) que pasa a través del filtro de 0.45 μm . Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.....30

Figura 12. Concentración de TEP (barras) evaluada los días 6, 14 y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.....31

Figura 13. Detección de geles asociados a la presencia de TEP (agregados de materia orgánica de color azul en la fotografía) en muestra del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. teñida con azul de alciano.33

Figura 14. Concentración de COD (barras) medida como la fracción de COD retenido en filtros de GF/F calcinados. Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada).....34

Figura 15 Concentración de COP (barras) que pasa a través de filtro GF/F calcinado. Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.	35
Figura 16. Variables analizadas el día 6, 14 y 20 de la curva de crecimiento de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. Concentración de AD(TEP) y TEP [A], ADd y COD [B], COD, COP, TEP [C]. La concentración de COD y POC se expresa en $\mu\text{M L}^{-1}$, TEP en $\mu\text{g EqXG L}^{-1}$ y AD en pgAD ml^{-1}	39
Figura 17. Fracciones de AD _{TEP} (azul), ADd (amarillo) y ADc (pistache) analizadas en muestras colectadas el día 20 del cultivo de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	40
Figura 18. Concentración de AD _{TEP} (barra azul) y ADd (Barra amarilla). Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	42
Figura 19. Concentración de TEPc (con células) y TEP (sin células) (Barras). Se evaluó el día 20 del cultivo celular de un aislado de <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	46

1. Introducción

Las diatomeas son organismos unicelulares pertenecientes al grupo de las Ochrophytas o también denominadas algas pardas. Se encuentran dentro de los grupos más importantes dentro del fitoplancton marino, presentan un tamaño entre 2 y 200 μm y se caracterizan por sus dos valvas de sílice (Brock, 2003). La mayoría de las diatomeas viven libres en la columna del agua, pero otras pueden estar unidas a superficies de rocas, plantas y animales marinos. Algunas se desplazan en superficies con apoyo de la producción de mucosa, aunque, la mayoría no son móviles, por lo cual al encontrarse en la columna del agua son desplazadas por las corrientes marinas lo cual favorece su hundimiento. Sin embargo, algunas especies presentan estructuras, como espinas u otras que se unen con otras células que forman grandes cadenas, lo cual favorece su flotabilidad y disminuye su hundimiento (Smol, 2010).

Se estima que las diatomeas contribuyen con alrededor del 40% de la productividad primaria en el medio marino. Son importantes para la productividad estacional durante enriquecimiento de nutrientes en aguas costeras de latitudes altas, además, son responsables de algunos florecimientos algales en la plataforma continental de aguas templadas y de zonas de surgencias. Entre los florecimientos algales producidos por las diatomeas, destacan especies del género *Pseudo-nitzschia* como productoras de ácido domoico (AD), una toxina de tipo neurotóxico (Brock, 2003).

El AD es un aminoácido tricarboxílico no proteico, no esencial, polar, soluble en agua y en menor medida en otros solventes como el metanol. Su fórmula molecular es

$C_{15}H_{21}NO_6$ con peso de 311 g mol^{-1} (Quilliam y Wright, 1989; Falk *et al.*, 1991; Mafra *et al.*, 2009). Fue aislado y descrito por primera vez como un metabolito secundario en *Chondria armata* (Takemoto y Daigo, 1958). Posteriormente, en 1987 se identificó como una toxina producida por algunas especies del género *Pseudo-nitzschia* después de una afectación en humanos asociada al consumo de moluscos. El síndrome causado por el AD se le denomina intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP; por sus siglas en inglés) (Bates *et al.*, 1998). Asimismo, se le asocia con la mortandad de aves y mamíferos marinos (Lefebvre *et al.*, 2002a; Van *et al.*, 2020).

El AD está presente en el medio ambiente durante florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia*, productoras de esta toxina. Es acumulado y transferido en la trama trófica por organismos planctívoros y organismos filtradores, y puede acumularse en niveles tróficos superiores incluso después de un florecimiento (Lefebvre *et al.*, 2002a). Este compuesto se puede encontrar en el medio marino de dos formas: la concentración intracelular (ADp) y la fracción disuelta de la toxina (ADd). Esta última fracción puede ser liberada de las células debido a estrés ambiental y/o por lisis celular (Wang *et al.*, 2007).

El ADd se caracteriza por ser moderadamente termoestable a temperatura ambiente, sin embargo, se degrada a partir de los 50°C y a un pH entre 2 y 12 (Quilliam, 2003). También se degrada por exposición de luz UV (Bates *et al.*, 2003), por lo que los primeros metros la columna de agua se consideran un sumidero de ADd debido al alcance de radiación UV a esta profundidad (Bates *et al.*, 2003; Bouillon *et al.*, 2006).

Biológicamente el AD es degradado por bacterias presentes en organismos como el mejillón *Mytilus edulis* (Stewart *et al.*, 1998). Sin embargo, Umhau y colaboradores (2018), Geuer y colaboradores (2019) y Horta-García (2020) reportan que el ADd es ubicuo y persistente en el medio marino, lo que indica una mayor estabilidad de la molécula en contraste con sus características de degradación.

La fracción disuelta de la materia orgánica (MOD) está integrada por mezclas heterogéneas de moléculas como sustancias húmicas, aminoácidos y carbohidratos (Volk *et al.*, 1997; Perdue y Ritchie, 2003). Uno de los componentes principales de la MOD son las partículas exopoliméricas transparentes (TEP, por sus siglas en inglés). Los TEP son polisacáridos ácidos en forma de microgeles ($>0.4 \mu\text{m}$) que pueden ser teñidos con el colorante azul de alciano (Passow y Alldredge, 1995). Forman parte de la MOD y la materia orgánica particulada, la cual se asocia principalmente a exudados producidos por fitoplancton y bacterioplanctón (Bar-Zeev *et al.* 2012). Los TEP se caracterizan por ser centros de actividad microbiana, además de atraer diferentes compuestos orgánicos, como los producidos por fitoplancton y bacterias, aunado a otros compuestos como los metales. Dada la agregación de dichos compuestos, la densidad de la matriz se incrementa y con ello incrementa su hundimiento, lo cual facilita su participación en los ciclos del carbono debido a su exportación al fondo oceánico y procesos de remineralización (Hakspiel-Segura *et al.*, 2017; Passow, 2002).

El ADd se incorpora a la (MOD) una vez que es liberado al medio marino (Guer *et al.*, 2019). El ADd y la MOD se mantienen unidos a partir de la formación de ligandos

con metales traza como el cobre y el hierro (Fisher *et al.*, 2006; Lelong *et al.*, 2012). Por otro lado, Márquez y colaboradores (2020) sugieren que el ADd se puede transferir hacia otros organismos a partir de la incorporación de esta fracción en agregados de TEP que precipitan y están a disposición de organismos presentes en el bentos, también la incorporación puede ser directa por consumo de los agregados TEP-ADd por parte de organismos como los copépodos. Sin embargo, poco se sabe acerca del papel que tienen los agregados de TEP en la permanencia del ADd en el medio marino.

La asociación del ADd con TEP presentes en la MOD, podría ser un factor clave para su permanencia en la columna del agua, por lo que es importante caracterizar la concentración presente en estos agregados para conocer y comprender cuáles son las condiciones que permiten la prevalencia de la molécula en el medio. Por lo tanto, en el presente trabajo se evalúa la cantidad de ADd presente en TEP y se contrasta con el AD celular y no complejado a algún compuesto orgánico en condiciones de cultivo de una especie de *Pseudo-nitzschia* sp. aislada del Alto Golfo de California.

2. Antecedentes

2.1 Diatomeas

Las diatomeas pertenecen a una clase taxonómica que cuenta con alrededor de 200 géneros y más de 105 especies. Tienen una pared celular formada por sílice (frústula) y se clasifican como diatomeas céntricas que presentan una simetría radial o penadas con simetría bilateral respectivamente. La frústula está compuesta por dos valvas, una más grande que se sobrepone por encima de la otra (Brock, 2003).

Tienen un ciclo reproductivo único. Cuando su reproducción es asexual, la formación de nuevas células se produce mediante la construcción de nuevas frústulas con el uso de una frústula antigua, lo cual da como resultado la reducción progresiva del tamaño de las células nuevas a partir de la célula original, las cuales llegan a tener un tamaño de 75% de la célula inicial. Por otro lado, la reproducción sexual implica la formación de gametos a través de la meiosis (Brock, 2003). La clorofila a y c, carotenos y fucoxantina son los pigmentos principales de las diatomeas (Battarbee, 2001).

Las diatomeas son consideradas parte importante de la productividad primaria de la zona costera en latitudes templadas y polares, y contribuyen en gran medida a la exportación de carbono, donde hay surgencias y aguas ricas en nutrientes, por lo que son abundantes en primavera. Algunas especies son responsables de los florecimientos algales nocivos o no nocivos, especialmente en la plataforma continental de ambientes templados. Al igual que otras microalgas, la presencia de nutrientes inorgánicos es fundamental para su crecimiento, sin embargo, para las diatomeas el sílice es un nutriente esencial que puede

limitar su crecimiento. Una vez que las diatomeas han utilizado los nutrientes del ambiente siguen un proceso de agregación y muerte, lo cual favorece el hundimiento de células senescentes (Smol, 2010).

2.2 Características del ácido domoico

El AD se aisló e identificó por primera vez en la macroalga rodófito *Chondria armata*, de la cual deriva su nombre “Domoï” que significa alga roja en japonés (Takemoto y Daigo, 1958). Posteriormente, se detectó y aisló a partir de *Chondria baileyana* y *Alsidium corallinum* (Alvarez-Falconí, 2009). En 1987 se identificó a diatomeas como *Nitzschia pungens*, ahora *Pseudo-nitzschia multiseriis* como especie que produce AD (Todd, 1993).

Actualmente se conoce que el AD es producido por 27 de las 52 especies del género *Pseudo-nitzschia*, (Bates *et al.*, 2018). *P. australis* es una de las especies que más AD produce en un intervalo de 0.014 a 0.25 pmol cel⁻¹ (Geuer, 2020). En contraste *P. galaxiae* es la que menos produce con concentraciones entre 1.12 a 10⁻⁷ pmol cel⁻¹ (Cerino *et al.*, 2005).

El AD es un aminoácido no proteico del grupo de los kanoides, como el ácido kainico y el glutamato. El AD interviene en procesos de transmisión sináptica en el cerebro por lo que se clasifica como una molécula neuroexcitatoria. Su toxicidad se debe a la activación de los receptores del glutamato presentes en el sistema nervioso de vertebrados (Larm *et al.*, 1997; Berman *et al.*, 2002). Debido al parecido estructural del AD con el glutamato o ácido glutámico, el AD se une de forma permanente a los receptores del

glutamato lo que provoca que haya una estimulación continua de las neuronas, dando como resultado un daño neuronal (Quilliam y Right, 1989). Existen ocho estructuras análogas (Figura 1) (ácido isodomoico A-H) (Wright *et al.*, 1990; Zaman *et al.*, 1997), las cuales son isómeros del AD y se generan cuando este es fotodegradado (Bouillon *et al.*, 2006).

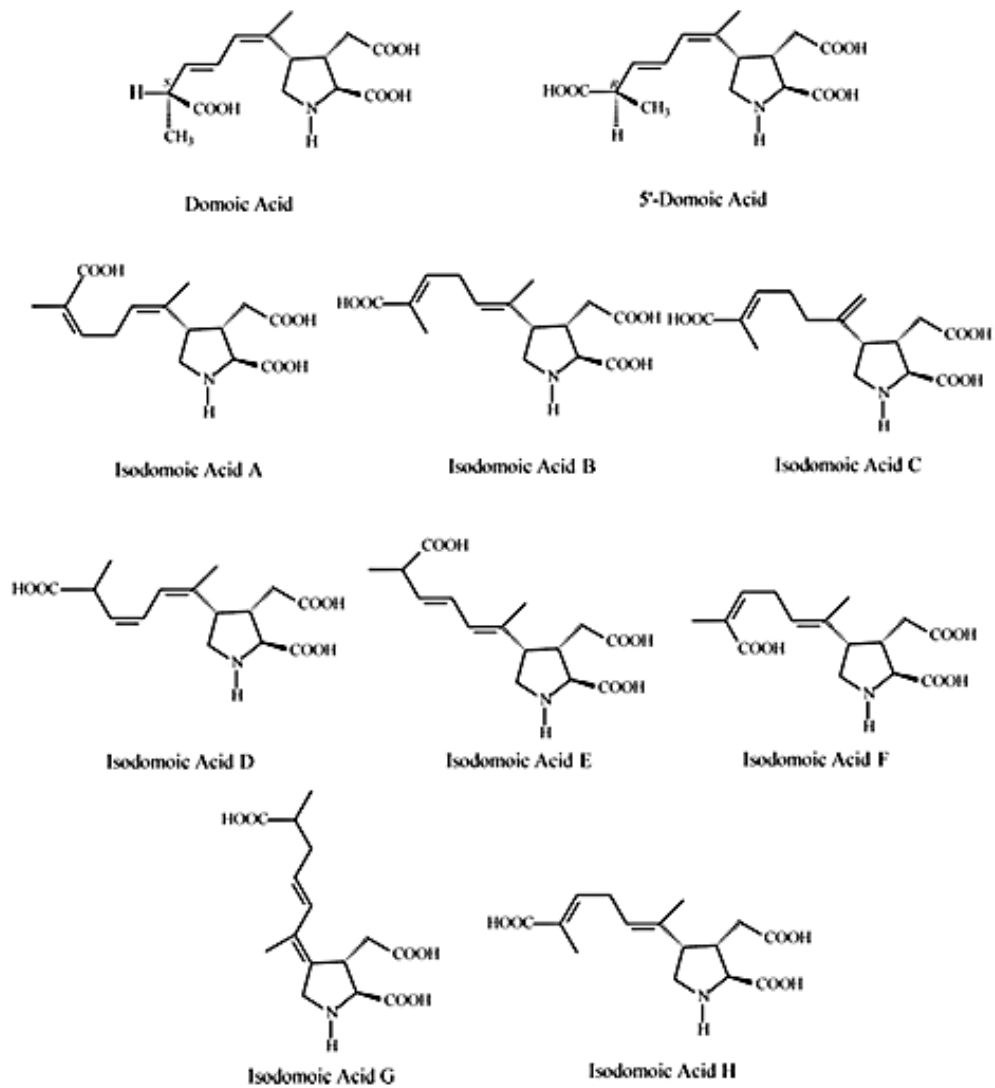


Figura 1. Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. Tomado de He y colaboradores (2010).

2.3 Efectos y transferencia del ácido domoico

El AD se utilizó en Japón como una sustancia antihelmíntica (Daigo, 1959), hasta que en 1987 se identificó como una neurotoxina producida por especies del género *Pseudo-nitzschia* (Bates *et al.*, 1998). En Canadá en el año 1987 se registró la intoxicación de personas por el consumo mejillones *Mytilus edulis* contaminados con AD. Se intoxicaron más de 100 personas con tres decesos, sufriendo síntomas como: vómitos, diarrea, pérdida de memoria de corto y largo plazo y en casos graves hasta coma (Quilliam y Wright, 1989). A partir de este incidente no se han reportado muertes de personas (Bates *et al.*, 2018), pero se han documentado muertes masivas de mamíferos marinos y aves marinas por intoxicación por AD (Lefebvre y Robertson, 2010; Nogueira *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2015). Las mortandades de aves y lobos marinos han sido causadas por el consumo de peces planctívoros que habían ingerido células de *Pseudo-nitzschia* (Lefebvre *et al.*, 1999).

Durante los florecimientos algales nocivos (FAN) con altas abundancias celulares de *Pseudo-nitzschia* y altas concentraciones de AD, este se acumula en diferentes organismos fitoplanctófagos y detritívoros y la toxina es transferida a niveles superiores de la trama trófica (Lefebvre *et al.*, 2001; 2002a). Por ejemplo, peces pelágicos menores fitoplanctófagos acumulan AD al alimentarse de fitoplancton y zooplancton y estos peces son los vectores de la toxina para otros organismos como mamíferos marinos y aves al ser

su fuente de alimento (Lefebvre *et al.*, 2002b; Van *et al.*, 2020). Por otra parte, los moluscos bivalvos también acumulan el AD tras la ingesta de células de *Pseudo-nitzschia* sin verse afectados, y representan un riesgo para la salud humana tras el consumo de estos organismos (Alvarez-Falconí, 2009).

2.4 Ácido domoico disuelto (ADd) y su degradación

La excreción, muerte celular y las heces fecales de organismos que se han alimentado de células de *Pseudo-nitzschia* son las principales fuentes de ADd en el medio marino (Hagström *et al.*, 2007). En el caso de la excreción, está se presenta principalmente como consecuencia del estrés celular cuando ocurren cambios ambientales como concentración de nutrientes, temperatura, pH, salinidad e irradiancia (Ladizinsky, 2003; Lundholm *et al.*, 2004; Hagström *et al.*, 2007; Silver *et al.*, 2010).

La degradación del ADd depende diferentes factores y se ha reportado como una molécula fotosensible con una degradación a longitudes de onda mayores a 370 nm (Bates *et al.*, 2003). También se ha detectado que algunas bacterias presentes en el molusco *Mytilus edulis* son capaces de degradar la toxina (Stewart *et al.*, 1998). La degradación bacteriana del AD es mayor durante un FAN (Hagström *et al.*, 2007) por la cantidad de células fitoplanctónicas presentes y los procesos densodependientes como el aumento en la abundancia de bacterias (Bates *et al.*, 2004). La presencia de hierro en forma iónica es otra de las condiciones en las cuales se ha evaluado la degradación del AD por procesos de fotooxidación de la molécula (Bates *et al.*, 2003), proceso que ocurre en la superficie del océano (Fisher *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha identificado que la MOD reduce la

degradación del AD, ya que cuando está asociado a esta fracción es transportado a regiones más profundas donde las condiciones de degradación de las moléculas son menos intensas que en superficie (Geuer *et al.*, 2019).

2.5 Materia orgánica disuelta (MOD) y las partículas exoplíméricas transparentes (TEP)

Se reconoce que la MOD es aquella que pasa a través de un filtro de membrana GF/F que presenta un tamaño nominal de poro de aproximadamente 0.7 μm (Fisher *et al.*, 2006; Denis *et al.*, 2017; Geuer *et al.*, 2019). Está formada principalmente por azúcares, aminoácidos, lípidos, vitaminas y pigmentos, entre otras moléculas. El origen de estas moléculas es la liberación y lisis celular de organismos como el fitoplancton (Benner, 2002). La MOD se clasifica de acuerdo a su peso molecular (alto y bajo peso molecular), está compuesta en un 80% de carbono orgánico disuelto (COD) de bajo peso molecular. Por lo tanto, la MOD es uno de los principales reservorios de carbono, participando así en ciclos biogeoquímicos globales por lo que cumple un rol importante en el océano (Amon y Benner, 1996).

Además del COD dentro de la MOD se encuentra el carbono orgánico particulado (COP) y carbono orgánico coloidal (COC), los cuales al igual que el COD participan en los ciclos del carbono (Amon y Benner, 1996). El COC se forma en gran medida por los organismos que liberan sustancias coloidales (bacterias y fitoplancton) (Passow 2000) y esta fracción tiende a aglomerarse y formar agregados que favorecen su precipitación (Kepkay, 1994). El COC se agrega en forma de geles de diferentes tamaños, los cuales

pueden ir de nanogeles coloidales a microgeles, incluso se ha estimado que cerca del 10% del carbono orgánico está formado por este tipo de agregados (Heckman *et al.*, 1967). Algunos de los agregados contienen partículas orgánicas poliméricas generados por microorganismos a partir de la excreción de mucilago (Figura 2) (Myklestad 1995). Un tipo de mucilago son las partículas exoplíméricas transparentes (TEP), los cuales son microgeles compuestos principalmente por agregados de polisacáridos ácidos y proteínas. Los TEP son definidos como partículas de tamaño superior a los 0.45 μm que al ser filtrados son retenidos en dicho tamaño de poro, por ello su extensión puede comprender desde pocos nm hasta 100 μm de longitud. Su formación está asociada con la liberación de sustancias coloidales como parte de procesos biológicos o por muerte celular de bacterias y fitoplancton principalmente (Passow, 2000).

La formación de TEP está mediada por enlaces iónicos, cuya unión está determinada por factores físicos y químicos. La formación de estos compuestos está asociada con la agregación entre ellos mismos y con otras partículas formándose TEP de distintos tamaños (Alldredge *et al.*, 1993), además, contienen diferentes cantidades de carbono en sus estructuras, lo cual representa un reservorio y transporte de este compuesto en el océano (Chin *et al.*, 1998). Con relación al AD, además de asociado con la MOD, se ha reportado que esta toxina se une a TEP lo que propicia la permanencia del ADD en el medio ambiente por precipitación de estas partículas al fondo marino (Márquez *et al.*, 2020).

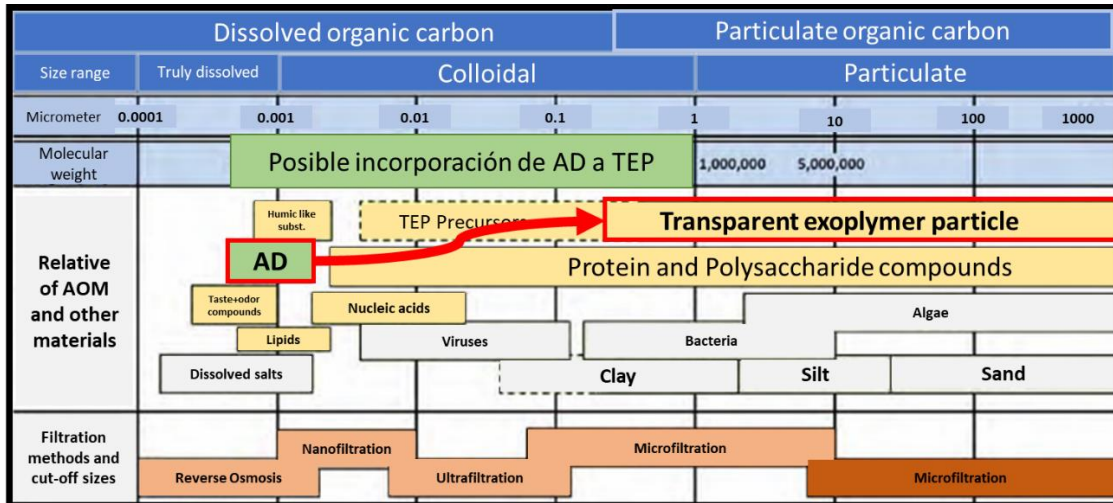


Figura 2. Esquema que describe la definición teórica de rango de tamaño del carbono orgánico particulado, carbono orgánico disuelto, partículas exoplíméricas transparentes, así como compuestos particulados, coloidales y disueltos (Flecha roja indica la posible incorporación del AD a fracción de TEP) (Modificado de Villacorte (2014), con elementos del esquema elaborado por Verdugo y colaboradores (2004).

3. Justificación

El AD se consume y transfiere en la trama trófica a través de diferentes organismos fitoplanctófagos, lo cual afecta a aves, mamíferos marinos y humanos, por ello existe un interés en conocer su acumulación y permanencia en el medio por el sector de sanidad e inocuidad en diversos países (Lefebvre *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2010; Van Hemert *et al.*, 2020). Por otro lado, el AD puede ser degradado por diversos factores como la presencia de luz y bacterias heterotróficas (Bates *et al.*, 1995; Bates *et al.*, 2003; Bouillon *et al.*, 2006). Existen investigaciones que indican la permanencia de la molécula en el medio marino a pesar de sus características de degradación (Umhau *et al.*, 2018; Garcia, 2019). Sin embargo, aún no se conocen del todo los mecanismos o condiciones que favorezcan la prevalencia y ubicuidad del ADd en el medio marino. Se ha planteado que existe una asociación entre el ADd y componentes de la MOD (Geuer *et al.*, 2019) como los agregados de materia orgánica en forma de TEP (Marquez *et al.*, 2020). Sin embargo, existe poca información del papel que juega la MOD en la permanencia del ADd y su transferencia a niveles tróficos superiores. Por tanto, se plantea que una proporción significativa del AD producido por células de *Pseudo-nitzschia* sp. puede incorporarse a los TEP. Por esto, en este trabajo bajo condiciones estándar de crecimiento se caracterizó el ADd durante diferentes fases de crecimiento de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp, ya que la acumulación de ADd en TEP puede influir en la prevalencia del AD en el medio marino. Esto es importante ya que aportará conocimiento sobre una posible relación entre el ADd y componentes formados a partir de MOD.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar la asociación entre el ácido domoico disuelto producido por *Pseudo-nitzschia* sp. aislada del Alto Golfo de California y los agregados de materia orgánica en forma de partículas exoplíméricas transparentes.

4.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la concentración de ácido domoico en los TEP (AD_{TEP}) (Fracción retenida en filtros de $0.45\ \mu\text{m}$) y ADD ($< 0.45\ \mu\text{m}$) en tres fases del crecimiento poblacional de un cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.
2. Determinar la concentración de agregados de materia orgánica en forma de TEP en tres etapas de crecimiento poblacional del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.
3. Caracterizar la relación entre la concentración de carbono orgánico disuelto y carbono orgánico particulado y su relación con la producción de TEP y ADD en tres etapas de crecimiento poblacional del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.
4. Evaluar la relación entre el ácido domoico particulado (AD_p), AD_{TEP} y ADD en la fase estacionaria del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.

5. Hipótesis

La concentración de ácido domoico disuelto asociada a la fracción de agregados de materia orgánica es mayor durante una condición de estrés para el crecimiento poblacional (fase estacionaria de crecimiento o decaimiento del cultivo) de *Pseudo-nitzschia* sp.

6. Metodología

6.1 Condiciones del cultivo

Se trabajó con una aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. productora de ácido domoico aislada en junio de 2021 a partir de la recolección de muestra superficial en zonas aledañas a San Felipe, B. C. en el Alto Golfo de California. El asilamiento consistió en la recolección de células con el uso de capilares y un “lavado” con tres gotas de agua de mar estéril, para luego transferir las células a placas de 96 pocillos con medio de cultivo estéril (Figura 3).



Figura 3. Células en cadenas y solitarias presentes en el cultivo original de *Pseudo-nitzschia* sp.

Una vez acondicionado el aislado se mantuvieron en matraces de vidrio de 200 ml a 16 °C, con un ciclo de luz:oscuridad 12:12, a una irradiancia de $\sim 160 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un medio de cultivo L1 (Guillard y Hargraves, 1993) enriquecido con 250 μM de silicatos. Antes de comenzar los experimentos fue necesario escalar los cultivos a matraces de 1 l y se les hizo recambio de medio de cultivo durante tres generaciones, para asegurar la aclimatación bajo las mismas condiciones ambientales. Una vez aclimatadas se establecieron 3 réplicas (SFy 1, SFy 2 y SFy 3) en matraces con 720 ml de medio y 80 ml del cultivo.

6.2 Crecimiento Poblacional

Se caracterizó el crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp. mediante el análisis del cambio de abundancia celular en tiempo. Para esto se colectaron muestras cada dos días, desde el día de inoculación (Día 0) hasta el día 24. La toma de muestras consistió en la obtención de alícuotas 1.5 ml que se fijaron con 1 ml de Lugol ácido para su posterior conteo, el cual se hizo con cámara de conteo Sedgwick-Rafter y un microscopio de luz invertido marca LEICA DM13000B.

La tasa de crecimiento fue calculada durante tres periodos de muestreo (Día 4-6, 12-14 y 18-20), mediante la ecuación propuesta por Gilliard (1973):

$$\mu = (\text{Ln}X_2 - \text{Ln}X_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde :

μ = Tasa de crecimiento

$t_2 =$ Tiempo 2

$t_1 =$ Tiempo 1

$X_2 =$ Abundancia celular en t_2

$X_1 =$ Abundancia celular en t_1

6.3 Obtención de muestras para determinación de diferentes variables

Se colectaron muestras en 3 diferentes días durante el desarrollo del cultivo que representa diferentes fases de crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp. Se muestreo al inicio de fase exponencial, inicio de la fase estacionaria y final de la fase estacionaria que corresponden al día 6, 14 y 20, respectivamente. En cada una de las fases se recolectaron 5 muestras, dos fueron usadas para determinación de concentración de AD, otra para evaluar la concentración de TEP (Figura 4), finalmente se recolectaron muestras para obtención de COD y COP (Tabla I).

Tabla I. Muestras recolectadas durante el experimento

Replica	Fase de crecimiento	Parámetro analizado
SFy 1, SFy 2	Exponencial	[AD]TEP en filtro 0.45 μm
		[AD] pasado por filtro 0.45 μm
		[TEP] en filtro 0.45 μm
		[COP] en filtro GF/F
		[COD] pasado por filtro GF/F
SFy 1, SFy 2	Inicio estacionaria	[AD]TEP en filtro 0.45 μm
		[AD] pasado por filtro 0.45 μm
		[TEP] en filtro 0.45 μm
		[COP] en filtro GF/F
		[COD] pasado por filtro GF/F
SFy 1, SFy 2	Inicio estacionaria	[AD]TEP en filtro 0.45 μm
		[AD] pasado por filtro 0.45 μm
		[ADc] en filtro 0.45 μm on células
		[TEP] en filtro 0.45 μm
		[TEPc] en filtro 0.45 μm con células
		[COP] en filtro GF/F
		[COD] pasado por filtro GF/F

Durante la obtención de muestras de cada fase de crecimiento se obtuvieron 150 ml del matraz de cultivo y se pasaron a través de un filtro de tamaño de poro de $3.0\ \mu\text{m}$ para eliminar las células de *Pseudo-nitzschia*. La concentración de AD en esta fracción representa la fracción particulada o celular de la toxina. Posteriormente, se subdividieron los 150 ml filtrados en submuestras, 50 ml para el análisis de AD, 50 ml para análisis de TEP y 50 ml para COD/COP (Figura 4). Para el análisis de estas variables se utilizaron filtros de 25 mm con tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$ de policarbonato (Nuclepore, Whatman) y filtros GF/F (Whatman) de acuerdo a el esquema presentado en la Tabla I. El ADc solo se midió durante el día 20 del cultivo.

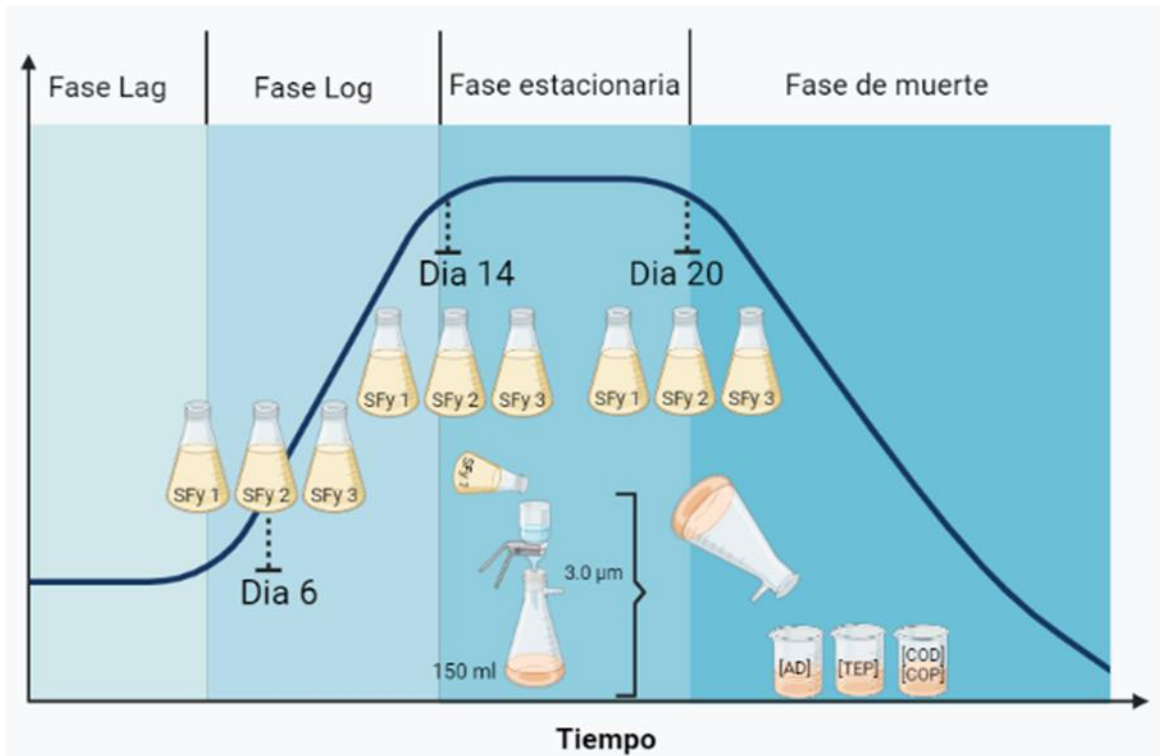


Figura 4. Esquema de muestreo durante el crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp. para la determinación de AD, TEP, COD, COP.

6.4 Almacenamiento de muestras

El material colectado en los filtros de 0.45 μm se utilizó para la determinación de AD_{TEP} . El filtro se cubrió con papel aluminio y se congeló a -20°C . Para la cuantificación de ADd se colectaron 15 ml del filtrado en un vial y se congeló a -20°C . Para el análisis de TEP se pasaron 50 ml a través de un filtro de 0.45 μm , posteriormente se colocó el filtro en un vial y fue procesado inmediatamente. Finalmente, se filtraron 50 ml a través de un filtro GF/F previamente calcinado, el filtro se almacenó en papel aluminio y 10 ml del filtrado en un vial (Figura 5).



Figura 5. Recolección y filtrado de muestras para análisis de AD, TEP, COP y COP.

6.5 Determinación de concentración de AD

Para determinar la concentración de AD, cada filtro de 0.45 μm y la fracción que pasó a través del filtro se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml con perlas de zirconia y 1 ml de metanol al 50 %, se procedió a homogenizar mediante disruptión mecánica (10 segundos a 500 rpm, con tres repeticiones y un periodo de enfriamiento entre cada una). Posteriormente, se centrifugó (13,000 rpm, 4°C). Finalmente se recuperó el sobrenadante

y se filtró con filtros de polipropileno (GE Healthcare Whatman™) de 0.2 µm de tamaño de poro, colectando la muestra filtrada en tubos ámbar (Figura 6).

La cuantificación de AD se realizó con el uso del protocolo descrito por Mafra y colaboradores (2009) con la técnica de cromatografía de líquidos y detección espectrometría de masas (LC-MS/MS). Se utilizó una columna Agilent Poroshell 120 SB-C8 (3.0 X 50 mm de diámetro interno, tamaño de poro 2.7 µm) para la separación de analitos. Los resultados son expresados en pg de AD por ml.

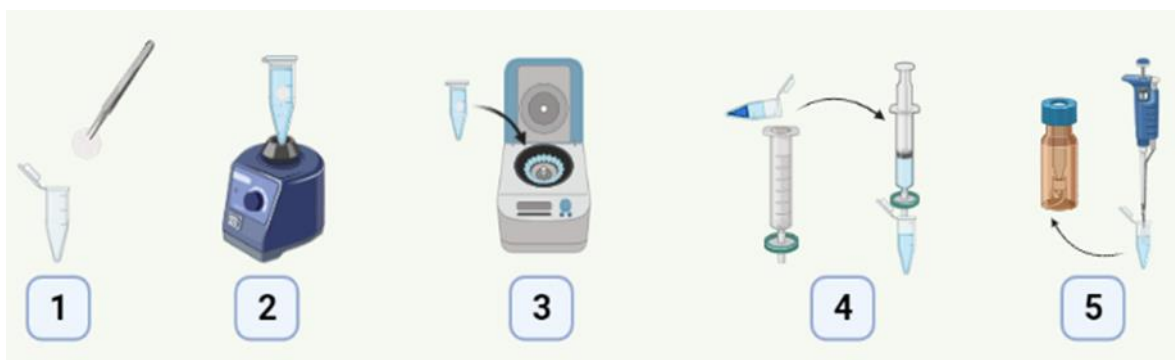


Figura 6. Proceso de extracción del AD.

De forma convencional se define al ácido domoico particulado (ADp) como la fracción retenida en un filtro GF/F (7.0 µm de tamaño nominal de poro) y el ADd es la fracción no retenida por este filtro. En el presente estudio se analizó el ADd como la fracción no retenida en el filtro de 3.0 µm (no asociado a las células), y esta, a su vez, se separó en la fracción asociada a los TEP (AD_{TEP}; lo retenido en filtro de 0.45 µm) y propiamente disuelta, considerada como la que no es retenida en el filtro de 0.45 µm.

6.6 Determinación de concentración de TEP

Previo al análisis de muestras para determinación de TEP se realizó una curva de calibración de acuerdo con Bittar y colaboradores (2018). De una solución stock con 75 mg de XG l⁻¹ se obtuvieron muestras de 0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.00 ml de Goma Xantana (XG) y se almacenaron en tubos Eppendorf que fueron aforados a 1 ml con agua ultrapura Milli-Q. Posteriormente, se adicionaron 0.5 ml del colorante azul de alciano a cada dilución y se filtraron a una presión de 175 mmHg en filtros de 0.45 µm. Los filtros se transfirieron a un vial al cual se le añadieron 6 ml de ácido sulfúrico y se dejaron en agitación durante 2 h. Para cuantificar los TEP, se midió la absorbancia a 787 nm en espectrofotómetro.

La determinación de TEP consistió en la filtración de 50 ml de muestra y su posterior fijación con el uso del colorante alcian blue 0.02% en ácido acético glacial al 0.06% (pH 2.5). Una vez teñidos los TEP se retiró el exceso del colorante con 1 ml de agua Milli-Q y se colocó el filtro en un vial de centelleo. Posteriormente, se añadieron 6 ml de ácido sulfúrico al 80% y la muestra se dejó en agitación constante durante dos horas y finalmente se midió la absorbancia a 717 nm en celda de 1 cm (Figura 7). La concentración de TEP en las muestras se determinó mediante la curva de calibración elaborado con las diluciones de XG de acuerdo protocolo de Passow y colaboradores (1995). La concentración de TEP es expresada como microgramos de equivalente goma xantana por litro (µg EqXG L⁻¹), se utilizó la fórmula de (Passow y Alldredge (1995). El coeficiente de determinación de dicha curva fue de 0.9935 (Figura 8)

Además, se corroboró la presencia de TEP mediante visualización en microscopio invertido con un objetivo de 20x durante las 3 etapas de crecimiento en una de las réplicas.

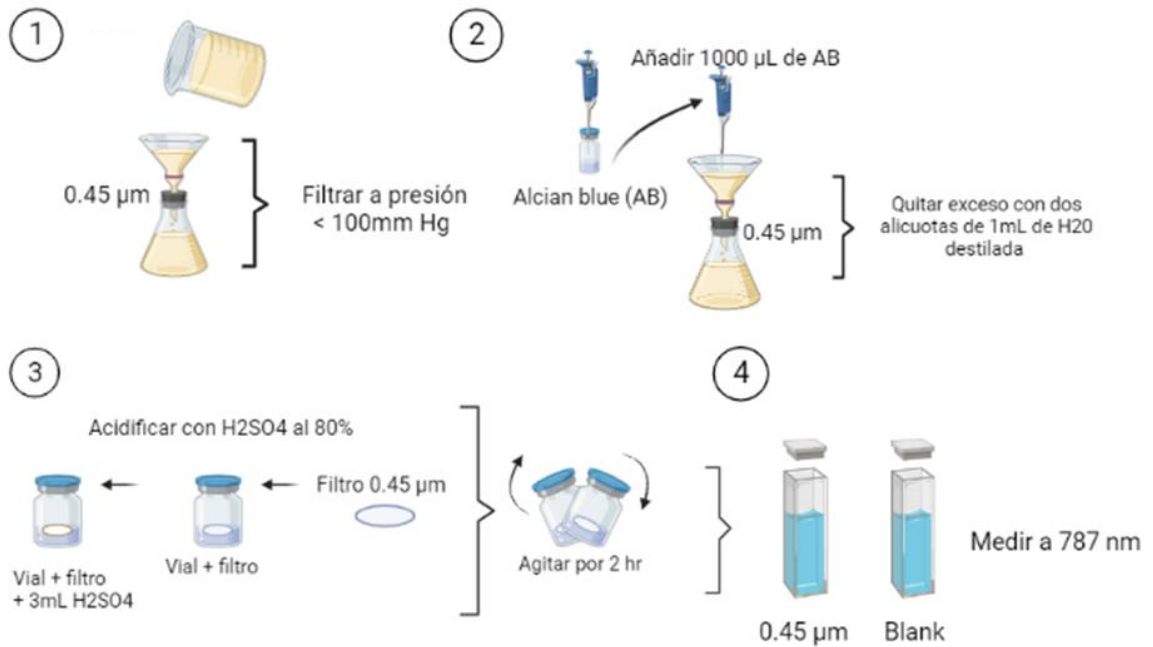


Figura 7. Procedimiento para la cuantificación de TEP a partir del filtrado de 50 ml del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.

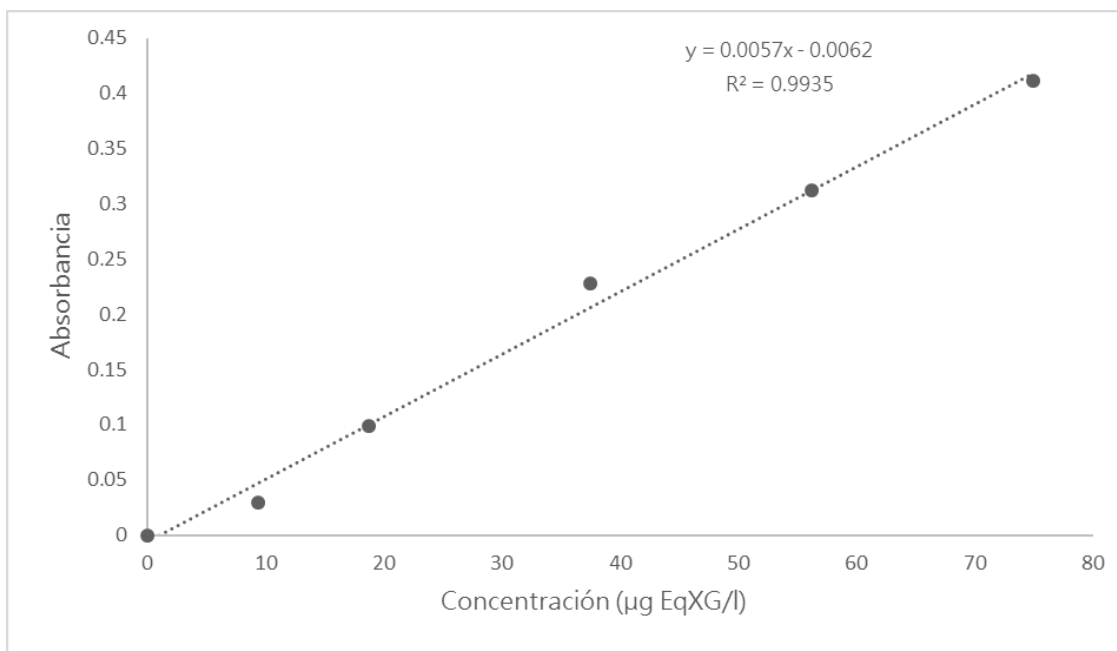


Figura 8. Curva de calibración para cuantificación de TEP, elaborada a partir del método de Bittar y colaboradores (2018).

6.7 Determinación de concentración de COP y COD

Las muestras recolectadas para medición de COD se almacenaron a -20°C hasta el día de su análisis. Justo antes de ser analizadas se descongelaron y acidificaron añadiendo $20\ \mu\text{l}$ de HCl al 50%. En paralelo se prepararon estándares de oftalato con concentración de $100.07\ \mu\text{M}$, $498.93\ \mu\text{M}$, $994.33\ \mu\text{M}$ y $2517.62\ \mu\text{M}$.

La determinación de COD se obtuvo mediante el método de combustión a alta temperatura con el uso de un analizador COT (vario TOC cube, Elementar Americas), las muestras se posicionaron en el aparato intercalando viales con agua destilada y los estándares, además se utilizaron como referencia agua de mar certificada con bajo

contenido de carbono y agua de mar profunda (laboratorio Hansell, RSMAS/MAC de la Universidad de Miami).

El COP se midió en el material colectado en un filtro GF/F previamente calcinado. Los filtros se almacenaron a -20°C , luego se sometieron a varios procesos de secado en desecador tras la adición de HCl para la eliminación de vapores de este mismo. El análisis del COP consistió en la pirolisis y cuantificación por medio de un detector de conductividad térmica mediante un Analizador Simultáneo de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno (Vario Micro Cube, Elementar), los resultados son expresados en micromoles por litro ($\mu\text{M L}^{-1}$).

6.8 Análisis estadístico

Para determinar la relación entre las variables analizadas se utilizaron dos pruebas estadísticas (Wilcoxon y Spearman) ya que las variables no presentaron una distribución normal de acuerdo con el análisis a priori de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Los softwares empleados fueron Statistica y SigmaPlot 12.0 para la realización de pruebas estadísticas (a 95% de intervalo de confianza) y gráficas de resultados respectivamente.

7. Resultados

7.1 Crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp.

Como se describe en la sección de materiales y métodos se utilizaron tres réplicas para evaluar el crecimiento de *Pseudo-nitzschia* sp. Sin embargo, para determinar la abundancia poblacional, así como cada uno de los parámetros evaluados solo fueron calculados con solo el resultado (promedio) de dos de las tres repicas, dado que la curva de crecimiento de la tercer replica presentó un crecimiento anómalo en comparación a las otras dos replicas.

El cambio de abundancia celular en tiempo indica que la fase de acondicionamiento duró 5 días. A partir del sexto día hasta el día 14 se observa un crecimiento acelerado o fase exponencial. Después del día 14 no se observó un incremento en la abundancia celular y se asocia al inicio de la fase estacionaria que se mantuvo hasta el día 20. Después de este día se presentó una disminución notoria en la abundancia celular (Figura 9). Los días de muestreo fueron el día 6, 14 y 20, donde se presentó una abundancia celular de 55×10^2 cel ml⁻¹, 75×10^2 cel ml⁻¹ y 74×10^2 cel ml⁻¹, respectivamente, mientras que la tasa de crecimiento específica se determinó a partir del día 4-6, 12-14 y 18-20 y fue de 0.45 d⁻¹, 0.18 d⁻¹ y -0.12 d⁻¹, respectivamente.

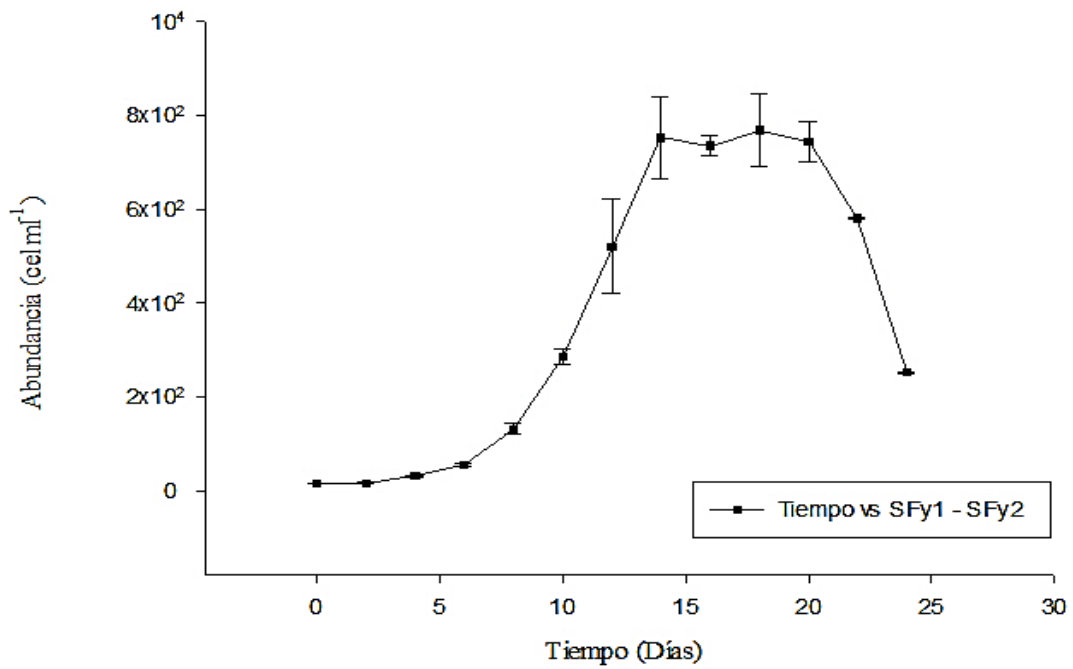


Figura 9. Crecimiento poblacional del aislado SFy (Línea) de *Pseudo-nitzschia* sp. obtenido de la región de San Felipe, B.C. En condiciones de luz-oscuridad 12:12 h, con medio de cultivo L1 enriquecido con silicatos. Las cajas y bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

7.2 Producción de ácido domoico disuelto en *Pseudo-nitzschia* sp.

Se observó un patrón de disminución de AD_{TEP} respecto al tiempo de cultivo. La concentración más alta de 27.45 pgAD ml⁻¹ se detectó al inicio de la fase exponencial y fue disminuyendo para el día 14 y 20, 23.01 pgAD ml⁻¹ y 9 pgAD ml⁻¹, respectivamente. Esto representó una disminución de 15.85% del día 6 al día 20 (Figura 10).

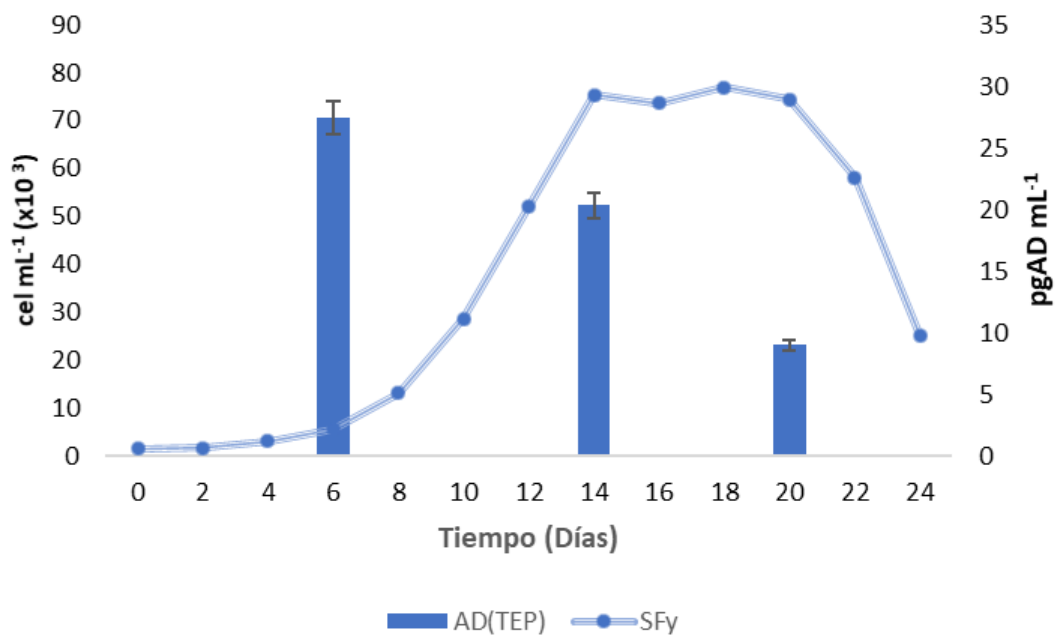


Figura 10. Concentración de AD_{TEP} (barras) medida como la fracción de AD retenido en filtros de 0.45 μ m. Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

Contrario a lo observado para el AD_{TEP} el ADd fue menor al día 6 y aumentó para el día 14 y 20. Las concentraciones detectadas en los tres días de muestreo fueron aproximadamente 20 veces mayores en comparación con AD_{TEP}. La concentración más alta se presentó al final de la fase estacionaria (Día 20) con 245 pgAD ml⁻¹, seguida de 133.49 pgAD ml⁻¹ para el día 14 y 37.25 pgAD ml⁻¹ para el día 6 (Figura 11).

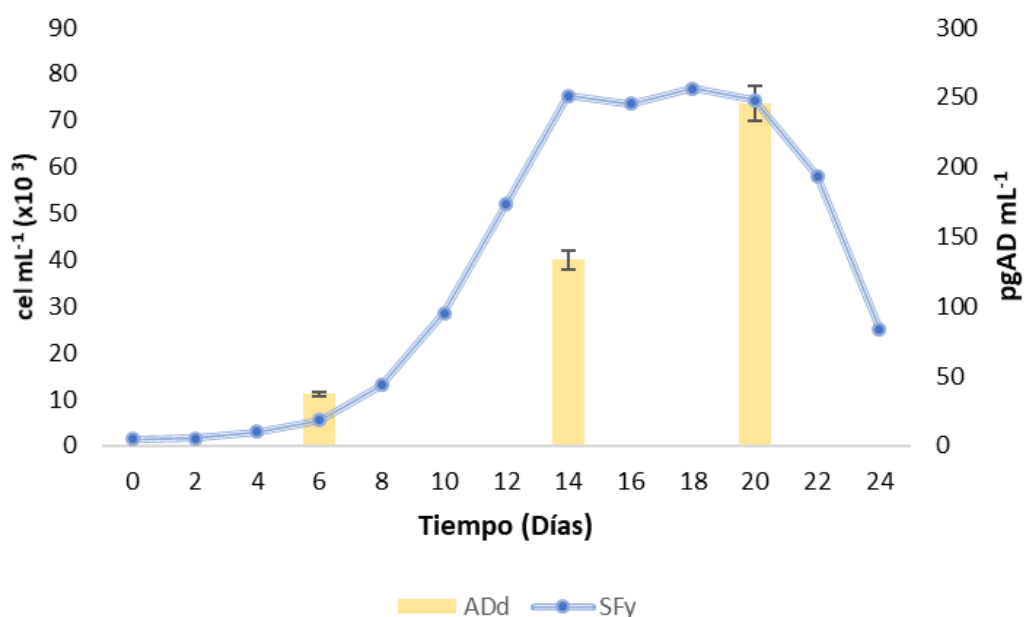


Figura 11. Concentración de ADd (barras) que pasa a través del filtro de 0.45 μm . Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

7.3 Producción de materia orgánica en forma de TEP en *Pseudo-nitzschia* sp.

La concentración de TEP durante diferentes fases de crecimiento poblacional no varió significativamente. La concentración más alta se detectó al día 6 del cultivo con

12.64 $\mu\text{g EqXG l}^{-1}$. El día 14 se detectaron 12.39 $\mu\text{g EqXG l}^{-1}$ y 8.44 $\mu\text{g EqXG l}^{-1}$ el día 20 (Figura 12).

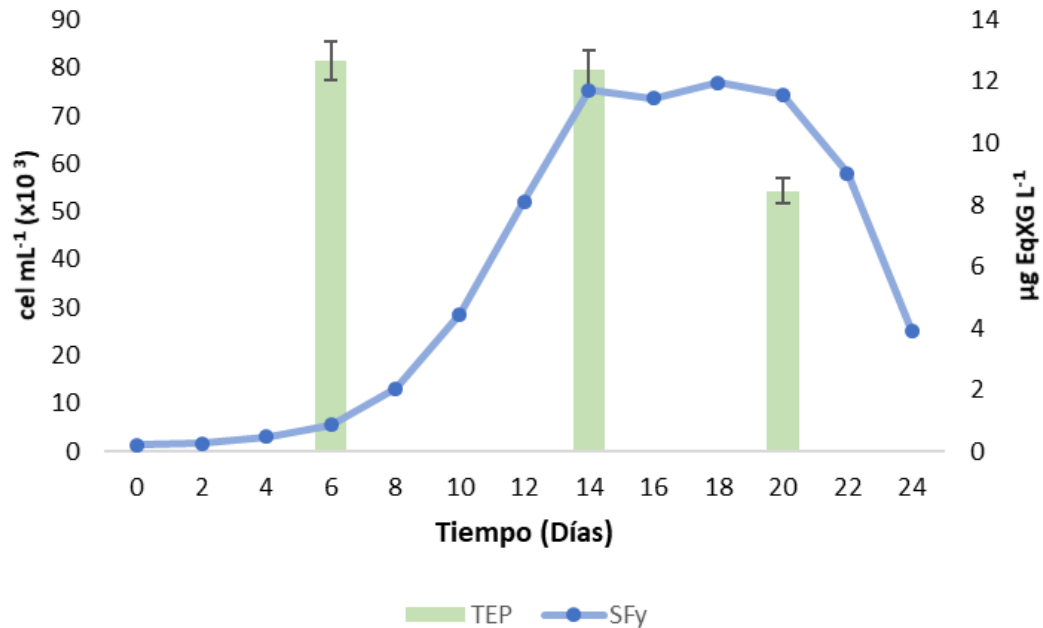


Figura 12. Concentración de TEP (barras) evaluada los días 6, 14 y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

La concentración de TEP en la fracción celular (TEPc) analizada el día 20 de la curva de crecimiento de *Pseudo-nitzschia* sp. fue en promedio de 23.88 µg EqXG l⁻¹.

Por otra parte, se analizó la presencia de TEP mediante microscopio en una muestra antes de ser pasada por el filtro de 3.0 µm para verificar visualmente la presencia de estos geles. Se observó la presencia de TEP tras teñirse con azul de alciano (Figura 13). Además, se observaron los geles principalmente en la periferia celular de *Pseudo-nitzschia* sp.



Figura 13. Detección de geles asociados a la presencia de TEP (agregados de materia orgánica de color azul en la fotografía) en muestra del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. teñida con azul de alciano.

7.4 Evaluación de COD y COP en muestras de *Pseudo-nitzschia* sp.

Una de las variables analizadas fue el carbono orgánico disuelto, cuyas concentraciones variaron en los tres puntos de muestreo (Día 6, 14 y 20). La concentración el día 6 fue de $9 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$, $5 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$ el día 14 y $12 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$ el día 20 (Figura 14).

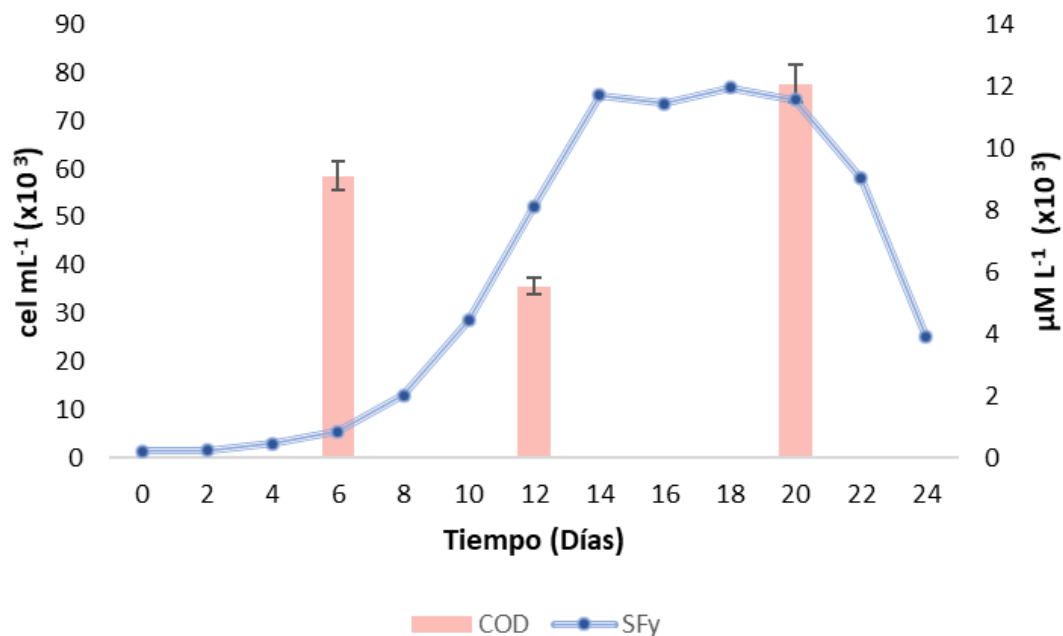


Figura 14. Concentración de COD (barras) medida como la fracción de COD retenido en filtros de GF/F calcinados. Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

Las concentraciones de COP evaluado durante diferentes fases de crecimiento poblacional fueron de $1 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$ el día $1 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$ el día 14 y $2 \times 10^3 \mu\text{M l}^{-1}$ para el día 20 (Figura 15). La concentración aumentó de la fase de acondicionamiento hacía el final de la fase estacionaria durante el crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp.

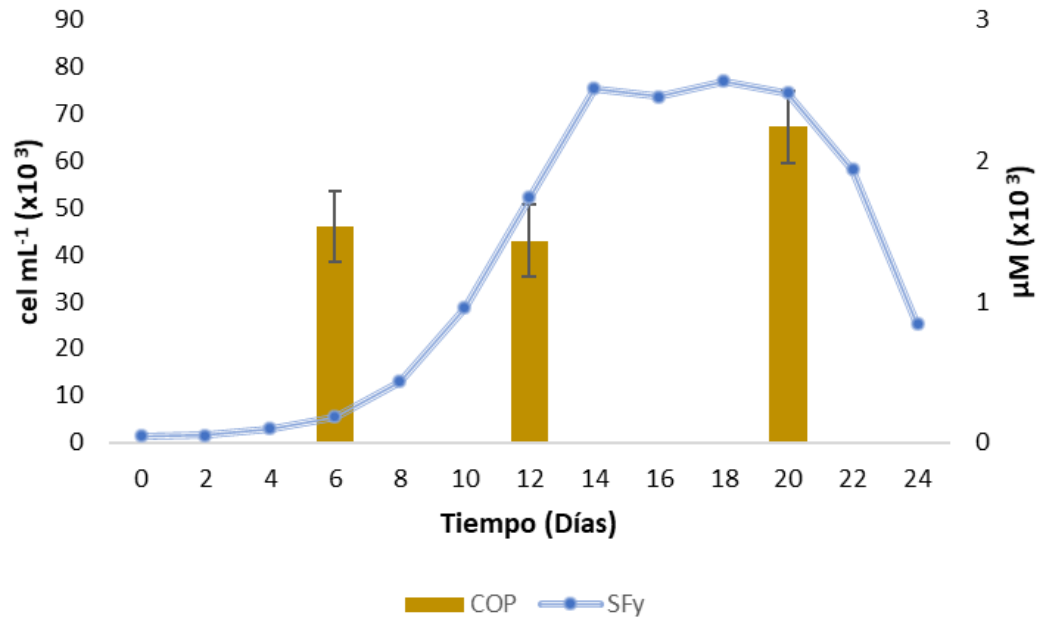


Figura 15. Concentración de COP (barras) que pasa a través de filtro GF/F calcinado. Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudonitzschia* sp. (SFy; línea punteada). Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

7.5 Comparación de variables

Se evaluó la correlación entre las variables analizadas mediante las pruebas estadísticas Wilcoxon y Sperman. El uso de esas pruebas estadísticas estuvo delimitado por la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, de la cual se obtuvo que solamente las variables ADD y TEP muestran un comportamiento normal con valores de $P=0.322$ y $P=0.394$ correspondiente para cada una de ellas, mientras que la abundancia celular y el AD contenido en TEP no siguieron una distribución normal. Por lo tanto, y relacionando

asimismo con tamaño de muestra y la relación de normalidad de las variables se aplicaron pruebas como Wilcoxon y Serman para evaluar correlación entre variables (Tabla II).

Se probaron las hipótesis Ho: no hay correlación positiva/negativa entre variables, y H1: Existe una correlación positiva/negativa entre variables en el análisis de Serman. El resultado indica que no existe una correlación positiva/negativa entre todas las variables analizadas. Sin embargo, al realizar el análisis de correlación entre variables es posible determinar que existe una correlación positiva débil entre AD_{TEP} y el resto de las variables, así como de ADd con TEP. Por otro lado, la abundancia celular presentó una correlación negativa débil con el resto de las variables.

Tabla II. Pruebas estadísticas utilizadas para el análisis de correlación entre variables.

Prueba estadística	Variable	p-valor/coeficiente de correlación	Interpretación
Wilcoxon	ADTEP/ADd	0.0175	No existe correlación significativa entre variables
	ADTEP/TEP	0.0296	No existe correlación significativa entre variables
	ADd/TEP	0.0175	No existe correlación significativa entre variables
Serman	ADTEP/ADd	0.658/0.257	Correlación positiva débil
	ADTEP/TEP	0.356/0.464	Correlación positiva débil
	ADd/TEP	0.803/0.116	Correlación positiva débil

La concentración de AD_{TEP} y TEP tienden a disminuir respecto al tiempo del cultivo celular (Figura 16), mientras que para la fracción disuelta. En contraste el ADd y COD se

incrementa respecto al tiempo de cultivo y se detectaron las mayores concentraciones el día 20. Sin embargo, a diferencia del ADd el COD presentó la concentración más baja durante el día 14 (Figura 16).

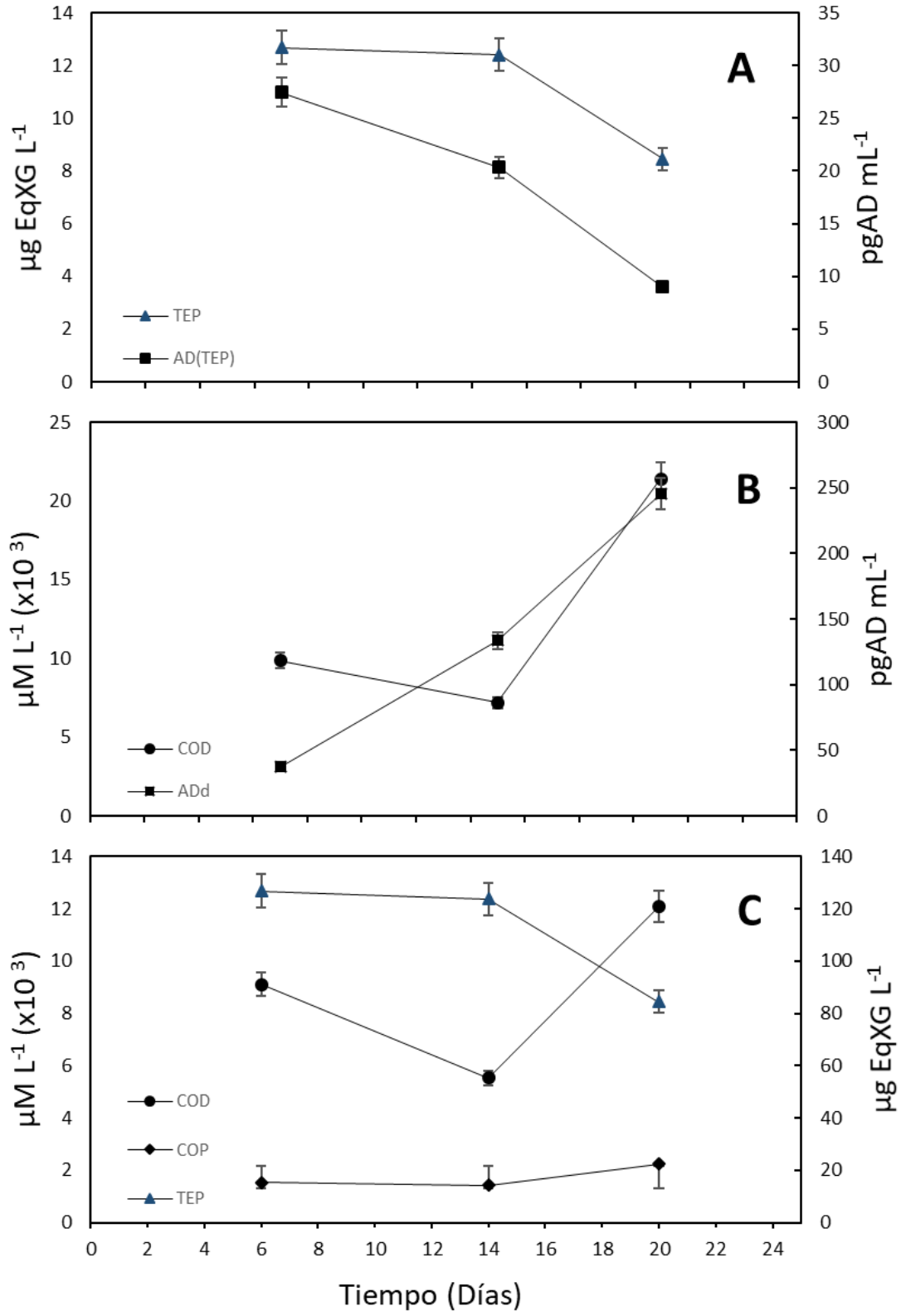


Figura 16. Variables analizadas el día 6, 14 y 20 de la curva de crecimiento de *Pseudo-nitzschia* sp. Concentración de AD(TEP) y TEP [A], ADd y COD [B], COD, COP, TEP [C]. La concentración de COD y POC se expresa en $\mu\text{M L}^{-1}$, TEP en $\mu\text{g EqXG L}^{-1}$ y AD en pgAD ml^{-1} . Los bigotes representan el error porcentual de los datos obtenidos.

7.6 Relación de diferentes fracciones de AD en el día 20 de la curva de crecimiento de *Pseudo-nitzschia* sp.

Se determinó la concentración de AD en diferentes fracciones. Se cuantificó el AD_{TEP} , AD_{c} y AD_{d} . La concentración de AD_{c} fue mayor seguida del AD_{d} y en menor medida en AD_{TEP} (Figura 17). El promedio de producción AD total fue de 1600 pg ml^{-1} , del cual el 84.09% de AD pertenece a la fracción de AD_{c} , 0.56 % a AD_{TEP} y el 15.34% a AD_{d} .

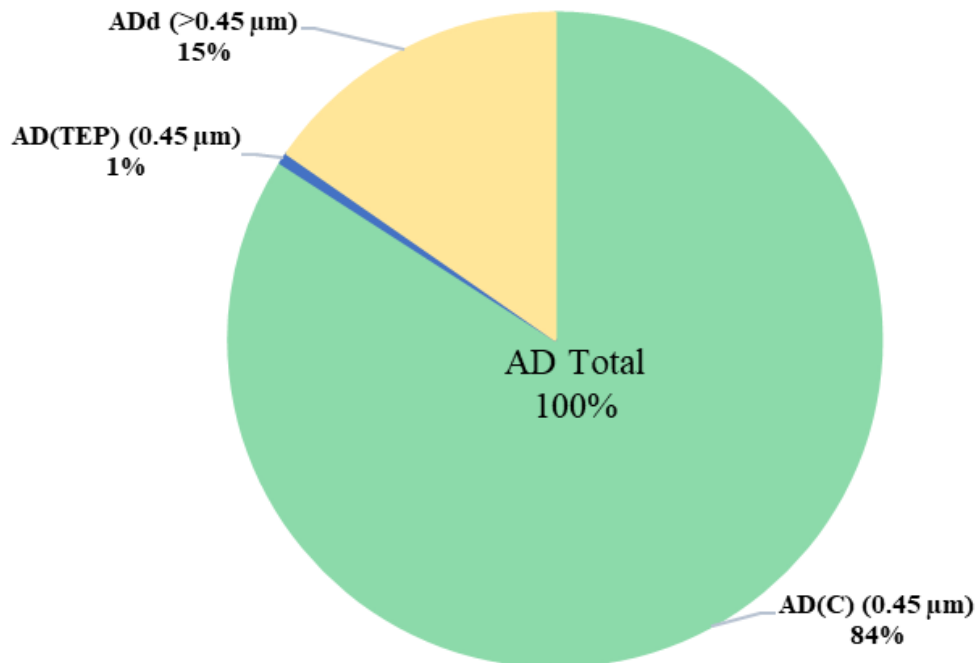


Figura 17. Fracciones de AD_{TEP} (azul), ADd (amarillo) y ADc (pistache) analizadas en muestras colectadas el día 20 del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.

8. Discusión

8.1 Producción de AD

Existe preocupación por la presencia de AD en el medio marino y los factores que involucran su permanencia, por ello se han tratado de comprender los factores involucrados en su permanencia. Caracterizar la producción de AD de especies productoras es el primer paso para comprender la presencia de AD en el medio y posteriormente entender los factores de su degradación y permanencia.

En este trabajo planteamos como hipótesis que la concentración de AD_{TEP} sería mayor durante una condición de estrés para el crecimiento poblacional (fase estacionaria de crecimiento o decaimiento del cultivo). Asimismo, se esperaba que una fracción importante de esta toxina estuviera presente en los TEP. Sin embargo, se encontró que la concentración de AD_{TEP} disminuyó con el tiempo de cultivo y fue menor al final de la fase estacionaria, cuando existe una limitación para el crecimiento poblacional al estar las células fisiológicamente estresadas. Por otro lado, la concentración de AD_{TEP} fue menor que la concentración de ADd. En contraste con la concentración de AD_{TEP} , la mayor concentración de ADd (245 pgAD ml^{-1}) se presentó durante la fase estacionaria (Día 20). Por lo tanto, estas dos fracciones presentaron un comportamiento inverso y la mayor concentración de AD_{TEP} se detectó en la etapa de acondicionamiento con $27.45 \text{ pgAD ml}^{-1}$ (Figura 18). Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico estas variables muestran una correlación débil.

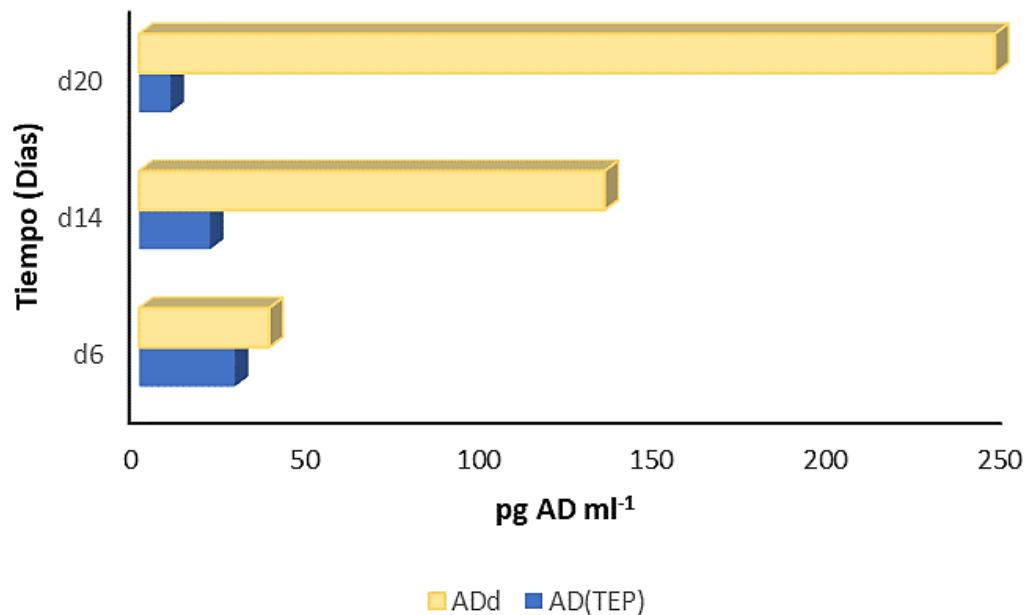


Figura 18. Concentración de AD_{TEP} (barra azul) y ADd (Barra amarilla). Se evaluó la concentración los días 6, 14, y 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp.

Santiago (2018) describe la producción de AD en cepas de *Pseudo-nitzschia* bajo condiciones controladas de crecimiento e identifica la mayor producción de ADd (36.77 a 70.83 pg AD cel⁻¹) durante la fase de acondicionamiento, lo cual difiere con los resultados obtenidos, ya que las concentraciones evaluadas por el cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. fueron la mayor parte del AD disuelto total se produjo durante el inicio de la fase de decaimiento del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. y pudo estar relacionado con las condiciones experimentales de la presente investigación en las cuales no hubo aportes de nutrientes a lo largo del cultivo. Se ha descrito que la producción de AD está condicionada por diferentes factores, como el estrés producido por la limitación de nutrientes como N,

P, Si, Fe y Cu, o por el exceso de estos últimos, etc. (Bates *et al.*, 2001). En relación a esto, durante la etapa de senescencia incrementa el estrés por limitación de nutrientes y por lisis celular, por ello se ha reportado la mayor concentración de ADd durante la etapa de senescencia en condiciones de florecimientos algales (Bates y Trainer, 2006), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente experimento.

8.2 Producción de TEP

Al igual que la concentración de ADd en el medio marino, el incremento de materia orgánica se ha relacionado con el decaimiento de un florecimiento algal, es decir con la etapa de senescencia de las células presentes en el florecimiento (Passow, 2002). Gran parte de la formación de TEP está influenciado por la liberación de exudados por parte de organismos fitoplanctónicos y ya que la concentración de estos se incrementa durante la etapa de decaimiento de un florecimiento algal se ha detectado un incremento en TEP y formación de agregados durante esta etapa (Verdugo *et al.*, 2004).

El método utilizado en el presente trabajo para la detección de TEP fue el mismo que el propuesto inicialmente por Passow y Alldredge en 1995. Este protocolo fue probado con muestras ambientales del canal de Santa Barbara en el Pacífico sur de California (EEUU), un mesocosmos compuesto por diatomeas y flagelados, además de muestras de monocultivos. En muestras ambientales cuantificaron concentraciones de hasta $310 \mu\text{gXG L}^{-1}$ en superficie y concentraciones inferiores a los $50 \mu\text{gXG L}^{-1}$ en profundidades menores a los 10 m. Por otro lado, en el mesocosmos se cuantificaron TEPs dentro de un intervalo de 21 a $363 \mu\text{gXG L}^{-1}$, mientras que en muestras de monocultivo se detectaron

concentraciones promedio de 1000 $\mu\text{gXG L}^{-1}$ para *Chaetoceros gracilis*, 706 $\mu\text{gXG L}^{-1}$ para *Thalassiosira rotula* y 920 $\mu\text{gXG L}^{-1}$ para *Emiliania huxleyi*. Dichas concentraciones superan las concentraciones detectadas para el aislado de *Pseudo-nitzschia* sp. evaluado en el presente trabajo.

En muestras ambientales colectadas durante un florecimiento algal en el Mar Báltico, se observó que la concentración de TEP aumentaba conforme decaía el florecimiento. Se detectaron concentraciones de hasta 5600 $\mu\text{gXG L}^{-1}$, además de incrementarse la agregación de los carbohidratos exopoliméricos (Engel, 2000). Aunado a esto, Villacorte y colaboradores (2015) monitorearon el crecimiento (abundancia) de un dinoflagelado, una macroalga y una diatomea respecto a la producción de TEP. La concentración de TEP fue diferente con cada uno de los organismos, siendo la diatomea (*Chaetoceros affinis*) el organismo en el cual se detectó la mayor concentración de TEP con 10 mgXG l^{-1} . Además, la concentración de TEP en todos los organismos fue mayor durante la etapa de senescencia en comparación a las otras fases de crecimiento.

En contraste con los resultados observados por Engel (2000) y Villacorte y colaboradores (2015), detectamos una disminución en la concentración de TEP del inicio hacia la etapa final del cultivo. Aunado a esto, se observó que el tiempo de filtración (separación de células y muestra, filtro 3.0 μm) de la muestra aumentó del día 6, 14 y 20. Dicho cambio se asocia tanto al incremento en la abundancia de células en el cultivo y como a un posible incremento de TEP en el cultivo. Esto último probablemente ocasionó la colmatación más rápida en los filtros de 3.0 μm por la retención de TEP. Esto ya ha

sido observado y discutido por Hakspiel-Segura y colaboradores (2017), y Discart y colaboradores (2015) quienes hacen énfasis en que la filtración es un paso crucial en el análisis de TEP, dado que el proceso de filtración podría influir en la agregación o disgregación de agregados en forma de TEP.

Debido al proceso de colmatación observado en el día 6 y 14, el último día (Día 20) se determinó la concentración de TEP con células (TEPc) y sin células, es decir omitiendo el paso de filtrado con 3 μm . Se observó que la concentración de TEPc fue aproximadamente 2 veces mayor a la evaluada en el filtro sin células (Figura 19), esto indica que la presencia de TEP asociada a las células representa una proporción importante de esta fracción de la MOD y no está colectándose en el filtro de 0.45 μm . Por lo tanto, existe una subestimación ya que se están cuantificando principalmente los TEP “libres” o no asociados a las células. Particularmente, la baja concentración de TEP evaluada en la etapa estacionaria tardía (Día 20) pudo estar asociada con la retención de esta fracción de agregados en el filtro de 3 μm usado para la remoción de células.

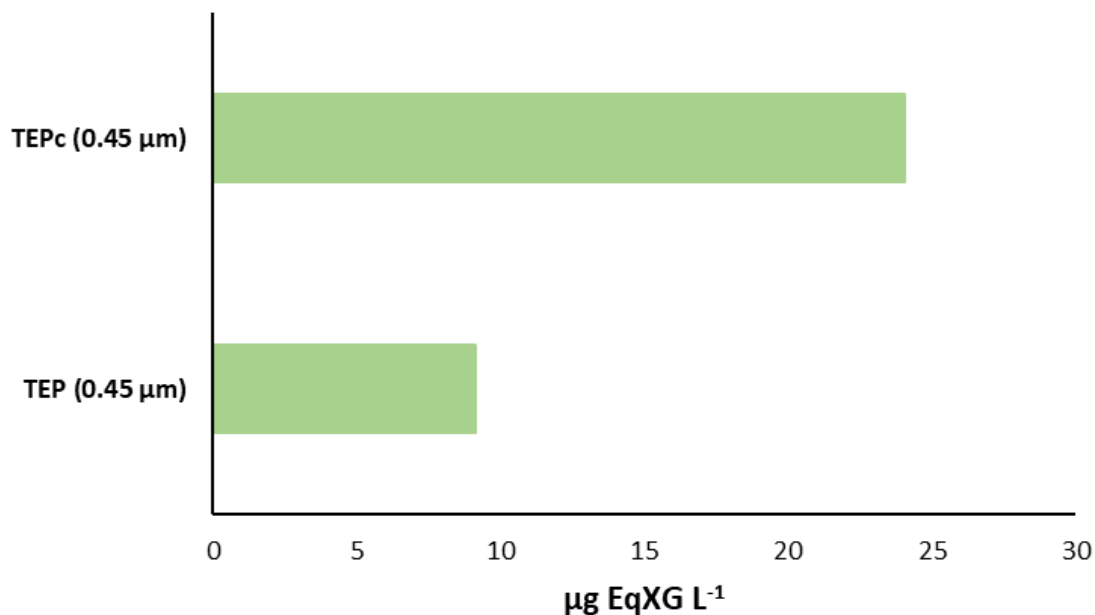


Figura 19. Concentración de TEPc (con células) y TEP (sin células) (Barras). Se evaluó el día 20 del cultivo celular de un aislado de *Pseudo-nitzschia* sp.µ

Por otra parte, Valdés (2019) evalúa la concentración de TEP en muestras ambientales en la materia retenida en filtros de 0.45 µm, así como los precursores de TEP en filtros de 0.45 µm y reporta que la concentración de precursores de TEP analizados mediante la misma técnica de cuantificación de TEP fue significativamente mayor por lo que, los agregados (geles) precursores de TEP podrían encontrarse en una mayor concentración que los TEP contribuyendo a su retención al momento del filtrado. Los precursores no fueron considerados en el análisis del presente trabajo.

8.3 Producción de AD respecto a la producción de TEP

Los TEP se caracterizan por su matriz pegajosa rica en polisacáridos compuestos con grupos carboxilo y éster, cuyos grupos funcionales promueven la formación de

complejos, especialmente con metales traza (Passow, 2002). Esta propiedad de agregación favorece la integración de otros compuestos disueltos con agregados de mayor tamaño presentes en el medio acuoso (Alldredge *et al.*, 1993).

Ya que el AD forma parte de los compuestos disueltos en el medio, este se incorpora a la matriz de materia orgánica disuelta (Hansell *et al.*, 2009). Geuer y colaboradores (2018) reportaron que el ADd forma parte de la MOD presente en muestras, lo cual fue analizado a partir la relación del ADd respecto al COD.

Por otro lado, se ha descrito que la vía de transferencia convencional de AD hacía niveles tróficos superiores es a través del consumo de los organismos productores por otros organismos filtradores y zooplancton (Incorporación de ADp o ADc). Sin embargo, Márquez y colaboradores (2020) proponen que otra de las vías de transferencia puede ser a través del AD disuelto retenido en agregados de materia orgánica (TEP, nieve marina). Realizaron un experimento en el cual se indujo la formación del complejo AD-agregados mediante agitación. Posteriormente, se expuso a esos complejos a copépodos y reportaron que estos pueden acumular concentraciones de alrededor de $24.8 \text{ pgDA copepodo}^{-1}$ bajo condiciones de agitación (Márquez *et al.*, 2020)

De acuerdo a la importancia ecológica que tienen los TEP es fundamental conocer qué proporción del AD total pueden secuestrar (complejar) estos compuestos. La proporción de AD_{TEP} que documentamos fue relativamente baja de menos del 1% del AD total. Una proporción mucho más baja que el ADd. Sin embargo, factores metodológicos como la eficiencia de filtración probablemente afectó la cuantificación de AD_{TEP} . Por otra

parte, las condiciones del cultivo afectan tanto la producción de TEP como la de AD. Por lo que la proporción de AD_{TEP} respecto al AD total puede ser diferente bajo otras condiciones del cultivo. Por último, la comunidad bacteriana presente en el cultivo también puede afectar esta proporción, y no necesariamente representa las características del medio ambiente, sin que su presencia/actividad fue parte de esta investigación.

8.4 Producción de COD y COP

Parte de la MOD está compuesta por COD formada por compuestos coloidales que tienden a juntarse y formar agregados por lo que parte de estos agregados pudieron ser cuantificados como TEP en material retenido en filtros de $0.45\ \mu\text{m}$. Wetz y Wheeler (2007) reportan el COP como el carbono contenido en células. En el presente trabajo no se consideró el carbono presente en el material celular del cultivo ya que las células de *Pseudo-nitzschia* sp. fueron previamente retenidas mediante un filtro de $3.0\ \mu\text{m}$. Por consiguiente, el carbono asociado al material retenido en filtros de alrededor de $0.5\ \mu\text{m}$ puede ser asociado con los TEP. Es decir, el carbono en esta fracción es realmente MOD. Esta fracción de carbono con TEP y COD puede ser comparable aun cuando existen diferencias de material retenido en ambos filtros por diferencia del tamaño de poro ($0.5\ \mu\text{m}$ y $0.45\ \mu\text{m}$).

Las concentraciones de COD y COP evaluadas durante el presente trabajo tienden a incrementar del inicio al día 20 de muestreo. Sin embargo, al día 6 la concentración de ambas variables fue menor respecto al día 14. A medida que la cepa se acercó al inicio de la fase de decaimiento existió mayor probabilidad de lisis celular y con ello la liberación

de compuestos orgánicos presentes en el interior de organismos, lo cual pudo influir en el incremento de carbono en muestras obtenidas.

Wetz y Wheeler (2007) reportan que existe una variabilidad importante en la producción de COP y COD en diferentes especies de diatomeas evaluadas. No obstante, independientemente de la especie, el COP siempre superó la concentración de COD en la etapa final de crecimiento poblacional de los cultivos. En contraste con el presente trabajo donde la concentración de COD fue mayor en los tres días de muestreo en comparación con la concentración de COP lo que pudo estar dado por la lisis celular.

Además, Wetz y Wheeler (2007) identificaron que la producción de COD fue mayor durante los primeros días del experimento para dos cepas (*Cylindrotheca closterium* y *Ballerochea* sp.) y menor durante los primeros días del experimento en *Chaetoceros decipiens*.

8.5 Relación de variables

El día 20 del experimento se analizó la concentración de AD total a partir de cada una de las fracciones utilizadas para diferentes procesos del experimento y se encontró que el 0.56% del AD total se retuvo en la fracción de TEP, lo cual confirma la asociación de compuestos formados por agregados de materia orgánica en forma de TEP y AD.

El COD y ADd representaron la mayor concentración de carbono y del total de la toxina. La fracción que pasa por un filtro de 0.45 μm comúnmente se asocia a la presencia de diversos compuestos, incluyendo precursores de TEP (Moon, 2019).

Hakspiel-Segura y colaboradores (2021) reportaron que en muestras ambientales la concentración de TEP fue significativamente mayor (de 1.7 a 64 veces) en material retenido en filtros de 0.22 μm en comparación con filtros de 0.45 μm . En nuestro trabajo se detectaron altas concentraciones de COD. Sin embargo, no es posible afirmar que la proporción de precursores de TEP en la fracción que paso por filtro de 0.45 μm está relacionada con las altas concentraciones de COD. El COD incluye todos los compuestos orgánicos presentes en la muestra, además de precursores de TEP.

Wetz y Wheeler (2007) evaluaron la producción de COD, COP y TEP durante la curva de crecimiento de tres tipos de diatomeas (*Chaetoceros decipiens*, *Cylindrotheca closterium* y *Ballerochea* sp.). Encontraron que las concentraciones más bajas de COD se presentaron durante la etapa de senescencia de *Cylindrotheca closterium* y *Ballerochea* sp., con abundancias celulares alrededor de 10×10^8 células L^{-1} . Por otro lado, las concentraciones máximas se observaron durante los primeros días, con concentraciones alrededor de 100 y 200 $\mu\text{M L}^{-1}$ y abundancias de alrededor de 10×10^3 células L^{-1} a 10×10^4 células L^{-1} . En comparación, las muestras de este estudio mostraron concentraciones máximas de alrededor de 2×10^3 $\mu\text{M L}^{-1}$ durante el inicio de la fase de decaimiento del cultivo (Día 20), con abundancias de aproximadamente 70×10^3 células L^{-1} .

Además, Wetz y Wheeler (2007) evaluaron la concentración de COP y observaron que las concentraciones más altas se presentaron durante la etapa de senescencia, alcanzando entre 400 y 900 $\mu\text{M L}^{-1}$, en contraposición a lo identificado con el COD. En la prueba actual, las concentraciones fueron superiores a los 1400 $\mu\text{M L}^{-1}$ en los tres puntos

de muestreo. Esta diferencia en las concentraciones y crecimiento puede estar asociada con diferencias fisiológicas y de acondicionamiento entre especies.

En cuanto a la producción de TEP evaluada por Wetz y Wheeler (2007) *Cylindrotheca closterium*, mostró un incremento progresivo de producción de esta fracción desde el día 0 hasta el día 12 de cultivo presentando una concentración máxima de 1400 $\mu\text{g EqXG L}^{-1}$. En comparación, en nuestro trabajo, la máxima concentración fue de alrededor de 14 $\mu\text{g EqXG L}^{-1}$ detectados el día 6 del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. La diferencia en las concentraciones medidas están asociadas probablemente a que usamos un filtro de 3.0 μm que retuvo las células. Por lo tanto, no se determinó la concentración de TEP que podría estar asociada a las células que se demostró puede representar el doble de lo que se colectó en el filtro de 0.45 μm .

Adicionalmente, Norrman y Ulloa (1995) durante un experimento de florecimiento de diatomeas en un mesocosmos con el uso de filtros GF/F de 47 mm identificaron que la concentración más alta de COD y COP se presentó en el día 7, coincidiendo con el pico de máxima concentración de clorofila y biomasa, mientras que la concentración más baja se registró al inicio del experimento, lo cual contrasta con lo observado en el presente estudio. No obstante, es importante considerar que las condiciones de colecta de las muestras obtenidas difieren del experimento realizado por Norrman y Ulloa, ya que en este trabajo se utilizó un filtro de 3.0 μm previo a la recolección de muestras de COP y COD.

9. Conclusiones

- La concentración de ADd fue mayor que la fracción de AD_{TEP} . La fracción de ADd fue mayor durante el inicio de la fase de decaimiento del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp.
- La concentración de TEP se mantuvo relativamente constante durante el crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp. (Día 6, 14 y 29).
- El AD_{TEP} constituye menos del 1% del AD total en el inicio de la fase de decaimiento del cultivo (Día 20).
- El ADd y el COD se relacionaron durante el crecimiento poblacional del cultivo de *Pseudo-nitzschia* sp. La concentración máxima de estas variables se detectó en el inicio de la fase de decaimiento.
- La relación entre la producción de AD, TEP, COP y COD es compleja y está relacionada con el crecimiento poblacional de *Pseudo-nitzschia* sp.

10. Recomendaciones

- En el presente trabajo se empleo un filtro de 3.0 μm para la separación de células con respecto al respecto de las muestras. Sin embargo, se plantea que el uso de este filtro alteró los resultados debido a la colmatación del filtro, reteniendo agregados de materia orgánica en forma de TEP. Se sugiere que en futuras investigaciones se considere el uso de diferentes tamaños de filtro para la separación de células con respecto al resto de las muestras. Además, de evaluar mediante microscopia la diferencia de concentración de TEP retenida en los diferentes filtros empleados.
- Considerar el análisis de todas las variables de interés con remoción y sin remoción de células, ya que con ello se podrá tener un panorama más completo de los resultados obtenidos.

11. Referencias

- Allredge, A. L., Passow, U., y Logan, B. E. (1993). The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 40(6), 1131-1140.
- Alvarez-Falconí, P. (2009). Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 26(4), 505–516.
- Amon, R. M., y Benner, R. (1996). Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41(1), 41-51.
- Benner, R. (2002): Chemical composition and reactivity. In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, ed. by D. A. Hansell and C. A. Carlson, Academic Press, San Diego. 59– 90.
- Berman, F.W., LePage, K.T., y Murray, T.F., (2002). Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is controlled preferentially by the NMDA receptor Ca(2^b) influx pathway. *Brain Research*, 924, 20–29.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hal.
- Bates, S. S., Douglas, D. J., Doucette, G. J., y Leger, C. (1995). Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Natural toxins*, 3(6), 428-435.

- Bates, S. S., Garrison, D. L., y Horner, R. A. (1998). Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. *NATO ASI series G ecological sciences*, 41, 267-29.
- Bates SS, Léger C, Satchwell M, Boyer GL (2001) The effects of iron on domoic acid production by *Pseudo-nitzschia* multiseries. In: Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ, Lewis RJ (eds) *Harmful algal blooms 2000*. IOC-UNESCO, Paris, 320–323.
- Bates, S. S., Léger, C., Wells, M. L., y Hardy, K. (2003). Photodegradation of Domoic Acid. *Proceedings of the Eight Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*, 30–35.
- Bates, S. S., Gaudet, J., Kaczmarska, I., y Ehrman, J. M. (2004). Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia* multiseries (Hasle) Hasle; Can bacteria produce domoic acid autonomously? *Harmful Algae*, 3(1), 11–20
- Bates, S. S., y Trainer, V. L. (2006). The ecology of harmful diatoms. In *Ecology of harmful algae*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 81-93.
- Bates, S. S., Hubbard, K. A., Lundholm, N., Montresor, M., y Leaw, C. P. (2018). *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae*, 79, 3-43.
- Battarbee, R. W., Jones, V. J., Flower, R. J., Cameron, N. G., Bennion, H., Carvalho, L., y Juggins, S. (2001). *Diatoms*. Springer Netherlands. 155-202.

- Bouillon, R. C., Knierim, T. L., Kieber, R. J., Skrabal, S. A., y Wright, J. L. (2006). Photodegradation of the algal toxin domoic acid in natural water matrices. *Limnology and oceanography*, 51(1), 321-330.
- Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., y Zingone, A. (2005). The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae*, 4(1), 33-48.
- Chin, W.C., Orellana, M.V., y Verdugo, P., (1998). Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Lett. Nat.* 391, 568-572.
- Daigo, K. (1959). Studies on the constituents of *Chondria armata*. III. Constitution of domoic acid. *J Pharm.*
- Denis, M., Jeanneau, L., Pierson-Wickman, A. C., Humbert, G., Petitjean, P., Jaffr ezic, A., y Gruau, G. (2017). A comparative study on the pore-size and filter type effect on the molecular composition of soil and stream dissolved organic matter. *Organic Geochemistry*, 110, 36-44.
- Discart, V., Bilad, M. R., y Vankelecom, I. F. (2015). Critical evaluation of the determination methods for transparent exopolymer particles, agents of membran fouling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(2), 167-192.
- Engel, A. (2000). The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particle stickiness (α) during the decline of a diatom bloom. *Journal of Plankton Research*, 22(3), 485-497.

- Falk, M., Seto, P. F., y Walter, J. A. (1991). Solubility of domoic Munn, C. B. 2019. Marine microbiology: ecology & applications. CRC Press. 181-183.
- Fisher, J. M., Reese, J. G., Pellechia, P. J., Moeller, P. L., y Ferry, J. L. (2006). Role of Fe (III), phosphate, dissolved organic matter, and nitrate during the photodegradation of domoic acid in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2200–2205.
- Geuer, J. K., Krock, B., Leefmann, T., y Koch, B. P. (2019). Quantification, extractability and stability of dissolved domoic acid within marine dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 215, 103669.
- Geuer, J. (2020). Biogeochemistry of dissolved domoic acid in the ocean: Sources , distribution and function. 149.
- Hagström, J. A., Granéli, E., Maneiro, I., Barreiro, A., Petermann, A., y Svensen, C. (2007). Release and degradation of amnesic shellfish poison from decaying *Pseudo-nitzschia* multiseres in presence of bacteria and organic matter. *Harmful Algae*, 6, 175–188.
- Hakspiel-Segura, C., Cajal-Medrano, R., Maske-Rubach, H., y Villegas-Mendoza, J. (2017). Temporal and spatial distribution of transparent exopolymer particles off the northern coast of Baja California, Mexico. *Ciencias marinas*, 43(4), 249-267.
- Horta-García, M. A. (2020). Variación espacio-temporal del ácido domoico disuelto (ADd) en la región de la Bahía de Todos Santos, Baja California. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

- Kepkay, P. E. (1994). Particle aggregation and the biological reactivity of colloids. *Marine Ecology-Progress Series*, 109, 293-293.
- Ladizinsky, N. C. (2003). The influences of dissolved copper on the production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia* species in Monterey Bay, California: laboratory experiments and field observations. 1–68.
- Larm, J.A., Beart, P.M., y Cheung, N.S., (1997). Neurotoxin domoic acid produces cytotoxicity via kainate- and AMPA-sensitive receptors in cultured cortical neurones. *Neurochemistry International*, 31, 677–682
- Lefebvre, K. A., Powell, C. L., Busman, M., Doucette, G. J., Moeller, P. D., Silver, J. B., ... y Tjeerdema, R. S. (1999). Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Natural toxins*, 7(3), 85-92.
- Lefebvre, K. A., Dovel, S. L., y Silver, M. W. (2001). Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology*, 138, 693-700.
- Lefebvre, K. A., Bargu, S., Kieckhefer, T., y Silver, M. W. (2002a). From sanddabs to blue whales: The pervasiveness of domoic acid. *Toxicon*, 40(7), 971–977.
- Lefebvre, K. A. M. W., Silver, M., Coale, S., y Tjeerdema, R. (2002b). Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. *Marine biology*, 140, 625-631.

- Lefebvre, K. A., y Robertson, A. (2010). Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon*, 56(2), 218-230.
- Lelong, A., Jolley, D. F., Soudant, P., y Hégaret, H. (2012). Impact of copper exposure on *Pseudo-nitzschia* spp. physiology and domoic acid production. *Aquatic toxicology*, 118, 37-47.
- Lundholm, N., Hansen, P. J., y Kotaki, Y. (2004). Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Marine Ecology Progress Series*, 273, 1–15.
- Lundholm, N., Krock, B., John, U., Skov, J., Cheng, J., Pančić, M., y Harðardóttir, S. (2018). Induction of domoic acid production in diatoms—Types of grazers and diatoms are important. *Harmful Algae*, 79, 64-73.
- Mafra, L. L., Léger, C., Bates, S. S., y Quilliam, M. A. (2009). Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization , using UV or mass spectrometry detection. 1216, 6003–6011.
- Marquez, I. A., Abraham, A., y Krause, J. W. (2020). Organic polymer consumption facilitates domoic acid entry into the marine food web without direct ingestion of *Pseudo-nitzschia*. *Harmful Algae*, 98, 101891.
- Munn, C. B. (2019). *Marine microbiology: ecology & applications*. CRC Press.
- Nogueira, I., Lobo-da-Cunha, A., Afonso, A., Rivera, S., Azevedo, J., Monteiro, R., y Vasconcelos, V. (2010). Toxic effects of domoic acid in the seabream *Sparus aurata*. *Marine Drugs*, 8(10), 2721-2732.

- Norrman, B., Zwiefel, U. L., Hopkinson Jr, C. S., y Brian, F. (1995). Production and utilization of dissolved organic carbon during an experimental diatom bloom. *Limnology and Oceanography*, 40(5), 898-907.
- Passow, U. (2000). Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 1-11.
- Passow, U., y Alldredge, A. L. (1995). A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography*, 40(7), 1326-1335.
- Passow, U. (2002). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in oceanography*, 55(3-4), 287-333.
- Perdue, E. M., y Ritchie, J. D. (2003). Dissolved organic matter in freshwaters. *Treatise on geochemistry*, 5, 605.
- Quilliam, M. A., y Wright, J. L. (1989). The amnesic shellfish poisoning mystery. *Analytical chemistry*, 61(18), 1053A-1060A.
- Quilliam, M. A. (2003). Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. *Manual on harmful marine microalgae, monographs on oceanographic methodology*, 11, 247-266.
- Santiago, I. (2011). Potencial tóxico de cepas de pseudo-nitzschia aisladas de la costa occidental de Baja California. Tesis de doctorado. CICESE.

- Smol, J. P., y Stoermer, E. F. (Eds.). (2010). *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. Cambridge University Press.
- Silver, M. W., Bargu, S., Coale, S. L., Benitez-Nelson, C. R., Garcia, A. C., Roberts, K. J., Sekula-Wood, E., Bruland, K. W., y Coale, K. H. (2010). Toxic diatoms and domoic acid in natural and iron enriched waters of the oceanic Pacific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48), 20762–20767.
- Stewart, J.E., Marks, L.J., Gilgan, M.W., Pfeiffer, E., Zwicker, B.M., (1998). Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 44, 456–464.
- Takemoto, T., y Daigo, K. (1958). Constituents of *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 6(5), 578b-580.
- Todd, E. C. (1993). Domoic acid and amnesic shellfish poisoning-a review. *Journal of food protection*, 56(1), 69-83.
- Umhau, B. P., Benitez-Nelson, C. R., Anderson, C. R., McCabe, K., y Burrell, C. (2018). A time series of water column distributions and sinking particle flux of pseudo-nitzschia and domoic acid in the Santa Barbara Basin, California. *Toxins*, 10(11).
- Valdés, P. (2019). Exploración metodológica del potencial de formación de geles marinos. Tesis de maestria, CICESE.
- Van Meerssche, E., y Pinckney, J. L. (2017). The influence of salinity in the domoic acid effect on estuarine phytoplankton communities. *Harmful Algae*, 69, 65-74.

- Van Hemert, C., Schoen, S. K., Litaker, R. W., Smith, M. M., Arimitsu, M. L., Piatt, J. F., Holland, W. C., Ransom Hardison, D., y Pearce, J. M. (2020). Algal toxins in Alaskan seabirds: Evaluating the role of saxitoxin and domoic acid in a large-scale die-off of Common Murres. *Harmful Algae*, 92, 101730.
- Vieira, A. C., Martínez, J. M. C., Pose, R. B., Queijo, Á. A., Posadas, N. A., y López, L. M. B. (2015). Dose-response and histopathological study, with special attention to the hypophysis, of the differential effects of domoic acid on rats and mice. *Microscopy Research and Technique*, 78(5), 396–403.
- Villacorte, L. O., Ekowati, Y., Calix-Ponce, H. N., Schippers, J. C., Amy, G. L., y Kennedy, M. D. (2015). Improved method for measuring transparent exopolymer particles (TEP) and their precursors in fresh and saline water. *Water research*, 70, 300-312.
- Volk, C. J., Volk, C. B., y Kaplan, L. A. (1997). Chemical composition of biodegradable dissolved organic matter in streamwater. *Limnology and Oceanography*, 42(1), 39-44.
- Wang, Z., King, L., Ramsdell, S. y Doucette, J. (2007). Determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 1163, 1–2, 169-176.
- Wetz, M. S., y Wheeler, P. A. (2007). Release of dissolved organic matter by coastal diatoms. *Limnology and Oceanography*, 52(2), 798-807.

Wright, J. L. C., Falk, M., McInnes, A. G., y Walter, J. A. (1990). Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Can. J. Chem.* 68, 22–25.

Zaman, L., Arakawa, O., Shimosu, A., Onoue, Y., Nishio, S., Shida, Y., et al. (1997). Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon.* 35, 205–211.