



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



Concentración de toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) asociadas a la presencia de dinoflagelados del género *Dinophysis* durante enero a diciembre del 2012, en la Bahía de Todos Santos, B. C., México

T E S I S

Que para obtener el Título de

O C E A N Ó L O G O

presenta:

Y A I R E B A L E J A N D R A S Á N C H E Z B R A V O

Ensenada, Baja California, México, Mayo 2013

RESUMEN

La presencia de toxinas de tipo diarreico en moluscos bivalvos es uno de los problemas más importantes relacionados con intoxicaciones y pérdidas económicas asociadas a florecimientos algales nocivos (FAN) en muchos países. Las toxinas de tipo diarreico son el ácido okadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (DTX1, DTX2, DTX3). El AO se puede coextraer con otro tipo de toxinas como las pectenotoxinas (PTXs), las yesotoxinas (YTXs) y los azaspirácidos (AZAs), entre otras, por lo que, al conjunto de toxinas que se extraen por medio de solventes orgánicos se les conoce como toxinas lipofílicas. En México, la información sobre este tipo de toxinas es prácticamente nula. Una de las actividades económicas costeras más importantes en Baja California es la acuicultura. Baja California es el principal exportador de moluscos bivalvos cultivados del país. Esta actividad se vio afectada en el 2010 ya que se implementaron dos vedas sanitarias debido a resultados positivos para toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón (BER), pero la presencia de estas toxinas no se confirmó por métodos analíticos. En el presente trabajo se evaluó la presencia de toxinas de tipo lipofílico en mejillones cultivados en el área de Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos mediante dos protocolos de bioensayo en ratón y por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se caracterizó la variación de la concentración de estas toxinas en muestras recolectadas durante 2012. Asimismo, se caracterizó la composición y abundancia de la comunidad fitoplanctónica en muestras de agua colectadas en la misma área. Se confirma por primera vez en México la presencia de toxinas de tipo lipofílico en moluscos bivalvos. Mediante el BER a partir de hepatopáncreas y cuerpo completo se obtuvieron resultados positivos para la presencia de toxinas lipofílicas durante tres períodos (febrero, mayo a julio y septiembre a octubre). Los resultados por LC-MS/MS confirmaron la presencia de este tipo de toxinas para los períodos de mayo a julio, y septiembre a octubre. Se detectaron 5 grupos de toxinas: AO en forma libre y esterificada y dinophysistoxina 2 (DTX2); se detectaron cuatro análogos del grupo de la YTX; así como a la pectenotoxina 2 (PTX2); espirólido 1 (SPX1) y a la gimnodimina (GYM). La suma de la concentración del AO, DTX2 y PTX2 fue mayor a los 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en muestras recolectadas durante julio y fue mayor a 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de septiembre a noviembre, rebasando el nivel máximo permitido de 160 $\mu\text{g AO-eg kg}^{-1}$. La concentración de estas toxinas en los moluscos estuvo relacionada con la presencia de *Dinophysis fortii* y *D. acuminata*. Estas especies se registraron cuando existió una fuerte estratificación vertical en la columna de agua. La YTX, otra toxina también considerada en la regulación, presentó concentraciones (la suma de YTX y de sus análogos; homoyesotoxinas, 45-Hidroxi-yesotoxina y 45-Hidroxi-1a-homoyesotoxina) de 0.03 a 1.08 mg kg^{-1} durante los meses de mayo a julio. No se logró identificar a especies reportadas como productoras de este grupo de toxinas en las muestras de agua. Como toxinas no reguladas, se detectaron al SPX1 y a la GYM (iminas cíclicas) en concentraciones menores a los 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. En el 2012 se implementaron 3 vedas sanitarias en Rincón de Ballenas con base a resultados de BER. Este bioensayo con extracción en hepatopáncreas presentó un 57 % de error al compararse con los resultados por LC-MS/MS. El porcentaje de error disminuyó a un 39 % con el bioensayo con cuerpo entero. Las medidas sanitarias implementadas mediante resultados del BER con cuerpo entero fueron efectivas para reducir los riesgos sanitarios asociados a la presencia de toxinas de tipo lipofílico presentes en moluscos bivalvos de la región.

Palabras clave: Dinophysis, toxinas, DSP.

Concentración de toxinas lipofílicas en el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) asociadas a la presencia de dinoflagelados del género *Dinophysis* durante enero a diciembre del 2012, en la Bahía de Todos Santos, B. C., México

T E S I S
QUE PRESENTA:

YAIRES ALEJANDRA SÁNCHEZ BRAVO

APROBADA POR:



Dr. Ernesto Garcia Mendoza
Presidente del Jurado



Dra. Graciela Guerra Rivas
Sinodal Propietario



Dr. José Luis Peña Manjarrez
Sinodal Propietario

T E S I S

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedicó a las tres personas más importantes en mi vida. En primer lugar a mi madre Rebeca que me apoyó en todo momento, dándome consejos, motivándome constantemente y levantándome en cada caída. Gracias por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a aprender de mis errores, y sobre todo por enseñarme que con dedicación, esfuerzo y tenacidad se puede alcanzar cualquier meta.

A mi hermano Avith que en muchas ocasiones tomó el rol de padre encargándose de protegerme de todo peligro (o mejor dicho todo ser viviente masculino, jaja) y que al igual que mi mamá me apoyo en todo momento, incluso cuando no estaba de acuerdo con mis ideas locas. Pero sobre todo porque fueron mi sostén más grande cuando lo necesité.

A mi pequeño Angel que a pesar del corto tiempo que compartimos, hizo de la maternidad la experiencia más gratificante y hermosa de mi vida. Aunque no lo tenga conmigo en cuerpo, lo llevaré en mi corazón y mi pensamiento cada día de mi vida, ya que al recordar cada una de sus sonrisas logró salir adelante a pesar de lo difícil que se vea el camino.

AGRADECIMIENTOS

Han contribuido muchas personas durante la elaboración de esta tesis, pero tengo que agradecer principalmente al Dr. Ernesto García Mendoza que desde el primer día mostró mucho entusiasmo en este trabajo y que con su experiencia y paciencia me dejó muchas enseñanzas y que me además me dio la oportunidad de entrar en el mundo de las biotoxinas permitiéndome pertenecer al equipo FICOTOX.

A todos los integrantes del Laboratorio FICOTOX por sus comentarios, críticas y sugerencias durante esta tesis que por un momento pareció infinita. Gracias Jennifer, Jairo, Axel, Leslie, Pavel, Ramón y Michelle por su paciencia, amistad y apoyo, pero sobre todo gracias por compartir un poco de su experiencia y conocimientos conmigo, todos ustedes hicieron más placentera esta experiencia.

Al Dr. José Luis Peña, al Dr. Antonio Almazán y a la Dra. Graciela Guerra por su apoyo tanto en la cuestión taxonómica como en la bioquímica, por sus críticas y sugerencias siempre con el objetivo de mejorar este trabajo.

A las empresas Acuicultura Oceánica y Aqualap por apoyarme con los moluscos necesarios para esta investigación y en especial a Roger Frías por sus atenciones.

A Baja acuafarm y a la Dra. Paula Pérez Brunius, por proporcionarme los datos de temperatura de la región así como al Dr. David Rivas por el apoyo en el procesamiento de los mismos.

Al Dr. Andrew Turner y Dr. Juan Blanco por su gran apoyo en el análisis de biotoxinas a partir de LC-MS/MS. Gracias a ambos por tener siempre la mejor disponibilidad para trabajar a pesar de radicar en diferentes países.

Y por último pero no por eso menos importante gracias a mi familia ensenadense Ixetl, Liz, Ivonne, Yama, Chiapas, Rod, Toño, y Monty que siempre estuvieron apoyandome y metiendo presión para que terminara esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	i
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCION GENERAL	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	4
II.I. INTOXICACIÓN DIARREICA POR MOLUSCOS (DSP).....	4
II.II. TOXINAS LIPOFILICAS.....	5
II.II.I. ACIDO OKADAICO Y DINOPHYSISTOXINAS (AO, DTXs).....	6
II.II.II. YESOTOXINAS (YTXs).....	7
II.II.III. PECTENOTOXINAS (PTXs).....	7
II.II.IV. AZASPIRACIDOS (AZAs).....	8
II.II.V. OTRAS TOXINAS LIPOFÍLICAS (IMINAS CÍCLICAS).....	9
II.III. TÉCNICAS DE DETECCIÓN.....	10
II.IV. DSP EN MÉXICO.....	12
III. OBJETIVO GENERAL	15
III.II. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
IV. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO	16
V. METODOLOGÍA	18
V.I. COLECTA DE MUESTRAS.....	18
V.II. VARIABLES AMBIENTALES.....	18
V.III. CARACTERIZACION DE LA COMUNIDAD FITOPLANCTONICA.....	19
V.IV. DETERMINACION DE TOXINAS.....	19
V.IV.I. CUANTIFICACION DE TOXINAS LIPOFILICAS EN MOLUSCOS BIVALVOS POR BIOENSAYO EN RATON A PARTIR DE HEPATOPANCREAS.....	20
V.IV.II. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR ARMONIZADO DE LA UNION EUROPEA PARA LA DETECCION DE TOXINAS LIPOFILICAS EN BIOENSAYO EN RATON A PARTIR DE CUERPO COMPLETO.....	21
V.IV.III. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR ARMONIZADO PARA LA DETECCION DE BIOTOXINAS MARINAS DE TIPO LIPOFILICO EN MOLUSCOS POR LC-MS/MS.....	22
VI. RESULTADOS	24
VI.I. COMUNIDAD FITOPLANCTONICA Y VARIABLES AMBIENTALES.....	24
VI.I.I. ABUNDANCIA DE ESPECIES CON POTENCIAL TOXICO.....	26
VI.I.II. ESPECIES ASOCIADAS A TOXINAS LIPOFILICAS.....	29
VI.I.III. TEMPERATURA.....	36
VI.II. DETECCION DE TOXINAS LIPOFILICAS.....	38
VI.II.I. BIOENSAYO EN RATON.....	38
VI.II.II. CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	41
VI.III. VARIACION TEMPORAL DE TOXINAS DE TIPO LIPOFILICO Y SU RELACION CON LA COMUNIDAD FITOPLANCTONICA.....	45
VI.III.I. TOXINAS TIPO DST _x (AO, DTX Y PTX).....	45
VI.III.II. YESOTOXINAS (YTX).....	50

	VI.III.III. IMINAS CICLICAS.....	53
	VI.III.IV. REGULACION.....	55
VII.	DISCUSION.....	65
	VII.I. COMUNIDAD FITOPLANCTONICA Y VARIABLES AMBIENTALES.....	65
	VII.II. ESPECIES CON POTENCIAL TOXICO Y NOCIVO.....	67
	VII.II.I. DIATOMEAS.....	67
	VII.II.II. DINOFLAGELADOS.....	68
	VII.III. TOXINAS LIPOFILICAS EN MUESTRAS DE MEJILLON.....	73
	VII.III.I. TOXINAS TIPO DIARREICO (DST _x): AO, DTX Y PTX.....	74
	VII.III.II. YESOTOXINAS (YTX).....	78
	VII.III.III. IMINAS CICLICAS.....	81
	VII.III.IV. REGULACION.....	84
VIII.	CONCLUSIONES.....	92
IX.	REFERENCIAS.....	95
X.	ANEXO.....	109

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
<i>I.</i> Resultados y tiempos de supervivencia de bioensayos en ratón por cuerpo completo, y hepatopáncreas en muestras de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.....	40
<i>II.</i> Concentración de toxinas lipofílicas detectadas en el cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos de enero a diciembre del 2012. Las toxinas fueron detectadas por LC-MS/MS mediante un sistema Aquity Xevo TQ MS/MS.	44
<i>III.</i> Concentración de toxinas lipofílicas medidas en muestras del cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las toxinas fueron detectadas por LC-MS/MS mediante un sistema Aquity Xevo TQS MS/MS.	45
<i>IV.</i> Comparación de los resultados de la presencia de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón utilizando el protocolo de extracción en hepatopáncreas (HP) y en cuerpo completo (CC) con los resultados de toxinas de tipo diarreico detectadas por LC-MS/MS (Xevo- TQ)	57
<i>V.</i> Comparación de los resultados de la presencia de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón utilizando el protocolo de extracción en hepatopáncreas (HP) y en cuerpo completo (CC) con los resultados de toxinas tipo diarreico detectadas por LC-MS/MS (Xevo- TQS).....	59
<i>VI.</i> Concentrado de los resultados de la comparación de la detección de toxinas de tipo diarreico (DSTx) por medio de bioensayo en ratón con extracción en hepatopáncreas (HP) y cuerpo entero (CC) con respecto a resultados obtenidos por LC-MS/MS en dos sistemas cromatográficos (XEVO–TQ y XEVO–TQS)....	61

- VII.* Concentración de toxinas lipofílicas excepto tipo DSTx en muestras de mejillón donde se detectaron muertes en tiempos menores a 1 hora después de la administración del extracto durante el bioensayo en ratón por hepatopáncreas... 84
- VIII.* Concentración de toxinas lipofílicas en muestras de mejillón donde se detectaron signos atípicos a las DSTx durante el bioensayo en ratón por cuerpo completo.. 85
- IX.* Concentración de toxinas tipo DSTx en muestras en que el bioensayo en ratón dio como resultado un falso negativo en comparación con la concentración detectada por LC-MS/MS..... 91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

PÁGINA

1. Ubicación del área certificada para cultivo de moluscos en el área de Rincón de Ballenas dentro de la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California. Se presentan, los polígonos concesionados para cultivo de moluscos (Azul: Acuacultura Oceánica, S.A. de C.V.; Rojo: Aqualap S.A. de C.V.). Asimismo, se presenta la ubicación de los sensores (Hobos) utilizados para la medición de temperatura en la zona de estudio (H1, ubicación durante enero-abril; H2, ubicación enero-diciembre) 18
2. Abundancia de fitoplancton en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Abundancia total de especies identificadas incluyendo diatomeas, dinoflagelados, euglenoides, criptofitas etc. (A). Específicamente del grupo de las diatomeas (B) y dinoflagelados (C). 26
3. Abundancia absoluta (A) de *Pseudo-nitzschia* tipo *australis* y abundancia relativa de todas las especies de este género (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012 28
4. Abundancia absoluta (A) y relativa (B) de *Lingulodinium polyedrum* en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012 30
5. Abundancia absoluta (A) y relativa (B) de *Dinophysis spp* en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012 31
6. Abundancia absoluta de *Dinophysis acuminata* (A) y *Dinophysis fortii* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012 33
7. Abundancia absoluta de *D. rotundata* (A), *D. caudata* (B) y *D. tripos* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012 35

8. Abundancia relativa de *D. fortii* y *D. acuminata* (A). *D. rotundata*, *D. caudata*, *D. tripos*, *D. odiosa* y *D. mitra* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. 37
9. Variación de la temperatura aproximadamente a 4 m de profundidad en el área de Rincón de Ballenas (A), en superficie y a 10 m cerca de la Isla de Todos Santos (B). En el panel A la línea azul representa la mediciones realizadas en la primera posición del anclaje y la línea negra corresponde a la medición después de su relocalización (ver sección de Materiales y Métodos) 38
10. Concentración de toxinas lipofílicas tipo DSTx (AO+DTX2+PTX) en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de organismos del género *Dinophysis* detectada en superficie (línea azul) y 10 m (línea verde) de profundidad (panel A). El panel B muestra la abundancia relativa de estos organismos en muestras de red. La línea horizontal amarilla representa la concentración máxima permitida de estas toxinas en moluscos bivalvos (160 µg eq AO/kg). 48
11. Relación entre la concentración de AO y PTX en mejillones cultivados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Los símbolos rojos representan las muestras que presentaron una relación PTX a AO mas alta ($[PTX] = -0 + 0.084 [AO]$, $r^2 = 0.71$) que el resto de las muestras (símbolos negros; ($[PTX] = -0.18 + 0.018 [AO]$, $r^2 = 0.91$))..... 50
12. Variación de la razón PTX/AO en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de *Dinophysis acuminata* (línea azul) y *Dinophysis fortii* (línea verde) detectadas en superficie (A) y 10 m de profundidad (B). 51

13. Concentración de yesotoxinas (mg/kg) en muestras de cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectados en la región de Rincón de Ballenas durante enero a noviembre 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de tres especies de dinoflagelados, *Ceratium furca* (A), *Lingulodinium polyedrum* (B) y *Prorocentrum micans* (C) detectadas en superficie (línea azul) y 10 m de profundidad (línea verde).
..... 53
14. Concentración de espirólidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectadas en la región de Rincón de Ballenas durante enero a noviembre de 2012. 55
15. Concentración de gimnodiminas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en mejillón mediterráneo procedente de la región de Rincón de Ballenas 56
16. Periodos de cierre de la zona de cosecha del área de Rincón de Ballenas por vedas sanitarias implementadas por la COFEPRIS (Barras color amarillo). Se presentan asimismo los periodos de cierre que correspondieran a los resultados obtenidos por medio de bioensayo en ratón por HP (Barras color verde; A), bioensayo en ratón por cuerpo completo (Barras color verde; B). De igual manera de acuerdo a los resultados por LC-MS/MS, se presentan las vedas que corresponderían a la presencia de yesotoxinas (Barras color rosa; C) y por la presencia de toxinas de tipo diarreico (Barras color verde; C), tomando como referencia el nivel regulatorio establecido (Línea continua amarilla). 63

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La diversidad y abundancia de la comunidad fitoplanctónica está determinada por la respuesta de las especies del fitoplancton a diversas variables ambientales, como la cantidad de luz incidente en la columna de agua, la disponibilidad de nutrientes, salinidad y temperatura. En muchas ocasiones, estos factores facilitan la reproducción masiva de una o varias especies, lo que se conoce como florecimiento algal (FA). Estos florecimientos pueden adquirir un carácter nocivo (FAN) cuando la comunidad fitoplanctónica alcanza densidades que pueden afectar a otros organismos o cuando ciertas especies producen toxinas que pueden ser acumuladas por organismos filtradores (Lewis *et al.*, 1995).

En las últimas décadas, los FAN han aumentado tanto en frecuencia como en su distribución geográfica, causando cambios drásticos en el ambiente (Reguera, 2002; Hallegraeff, 2003). Se han reconocido aproximadamente 300 especies de microalgas formadoras de FA, pero el porcentaje que logra producir compuestos tóxicos es muy pequeño (Prety *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto que estas especies tóxicas pueden tener sobre la salud pública y economía de las poblaciones costeras es significativo (Lewitus *et al.*, 2012).

Las especies tóxicas pueden producir compuestos bioactivos hidro o liposolubles que pueden causar, dependiendo de su estructura molecular y estado de conversión, efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos; de igual manera, la dosis consumida y la susceptibilidad hacia la toxina, influyen en la respuesta fisiológica de las personas a estos compuestos (Hallegraeff, 2003).

Las ficotoxinas son producidas por especies de microalgas de distintos grupos filogenéticos. Sin embargo, el grupo de los dinoflagelados es el más nocivo ya que se han identificado más de 50 especies con potencial tóxico (Smayda, 1997). En contraste, en el grupo de las diatomeas, sólo el género *Pseudo-nitzschia* es productor de toxinas y son muy pocas especies las que han producido intoxicaciones humanas, muerte de aves y mamíferos marinos (Bates y Trainer, 2006).

El vector principal de intoxicación para los humanos es el consumo de moluscos bivalvos, ya que estos organismos al filtrar grandes volúmenes de agua pueden acumular una alta concentración de toxinas en sus diferentes tejidos. Sin embargo, otros organismos como ciertos pescados, tortugas, cangrejos y algas también pueden contener ficotoxinas, pero suelen presentar bajas concentraciones y su consumo a nivel mundial es mínimo (Alfonso, 2008).

Las ficotoxinas pueden alterar el transporte de iones en las membranas y pueden actuar como inhibidores metabólicos (Hall, 1991). De acuerdo a sus efectos en humanos se han clasificado como toxinas marinas paralizantes, neurotóxicas, amnésicas, diarreicas y ciguanotoxinas. Los síndromes más comunes que las ficotoxinas producen en humanos son la intoxicación paralizante por consumo de mariscos o PSP por sus siglas en inglés (*Paralytic Shellfish Poisoning*; PSP), intoxicación diarreica por consumo de mariscos (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*; DSP), intoxicación amnésica por consumo de mariscos (*Amnesic Shellfish Poisoning*; ASP) y la intoxicación neurotóxica por consumo de mariscos (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*; NSP). (Yasumoto y Murata, 1993).

En México, se han registrado casos de intoxicaciones del tipo PSP y las únicas muertes reconocidas por intoxicación por ficotoxinas están asociadas a este síndrome

(Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008). Se han identificado casos de intoxicación por ciguanotoxinas (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998) y de NSP (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998). Asimismo, la presencia de la toxina que produce la ASP (ácido domoico) ha sido documentada para la región norte (García-Mendoza *et al.*, 2009) y sur (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2007) de la península de Baja California. Aunque no ha ocurrido algún caso de intoxicación en humanos por ácido domoico en México, se ha reportado la muerte masiva de mamíferos y aves marinas asociadas a la presencia de esta toxina en el ambiente (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997). De manera similar, no existe ningún caso reconocido de intoxicación por toxinas de tipo diarreico en México, pero se ha detectado la presencia de estas toxinas en la Bahía de Todos Santos y lagunas costeras al sur de esta región en el análisis de muestras asociadas al Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB). En el 2010 se implementaron en estas áreas las primeras vedas sanitarias en México asociadas a toxinas de tipo diarreico (<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20roja>).

En México, el monitoreo de la toxinas de tipo diarreico (y lipofílicas) se lleva a cabo por medio de bioensayo en ratón. Este método puede presentar problemas de selectividad e inespecificidad, por lo que generalmente ante resultados positivos se confirma la presencia de toxinas de tipo lipofílico por medios analíticos. Durante las vedas sanitarias del 2010 no se comprobó la presencia de toxinas de este tipo en las muestras que resultaron positivas por bioensayo en ratón. Por lo tanto, para evaluar si la presencia de toxinas de tipo lipofílico es un problema emergente en la región o si es un problema inherente a la técnica de detección, en el presente trabajo se realizó un monitoreo durante el 2012 de la comunidad fitoplanctónica en la Bahía de Todos Santos y se caracterizó la presencia de toxinas de tipo lipofílico en el mejillón mediterráneo (*Mytilus*

galloprovincialis) cultivado en la región. Se evaluó la concentración de estos compuestos por medio de bioensayo en ratón y por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

II.I. INTOXICACIÓN DIARREICA POR MOLUSCOS (DSP)

El DSP es uno de los problemas más importantes a nivel mundial dado la amplia distribución geográfica de las especies de fitoplancton que producen las toxinas asociadas a este síndrome. En la década de los 60's se describieron intoxicaciones por consumo de mariscos con síntomas tipo DSP (diarrea, náusea, vómito y dolor abdominal), sin embargo hasta 1978 se caracterizó que cierto tipo de toxinas con carácter lipofílico estaban involucradas en el DSP y se implementó el bioensayo en ratón para su detección (Yasumoto *et al.*, 1978; 1979). Posteriormente, Murata *et al.* (1982) identificaron que el ácido okadaico (AO), originalmente descrito para la esponja *Halichondria okadai* (Tachibana *et al.*, 1981), es la toxina responsable del DSP.

El DSP se caracteriza por la presencia de síntomas como diarrea, náusea, vómito y en algunos casos dolor abdominal. Los síntomas comienzan entre los 30 minutos y las 3 horas después de haber consumido moluscos que han sido expuestos y duran entre 3 y 4 días (Sar *et al.*, 2010). Las toxinas causantes de este síndrome se acumulan en moluscos bivalvos, los mejillones son el vector más común hacia el humano y la cantidad de toxinas que pueden acumular depende de la profundidad en la que se encuentren, ya que se ha detectado mayor toxicidad en organismos presentes a menor profundidad (Botana *et al.*, 1996).

El DSP está asociado a la presencia de diversas especies del género *Dinophysis*. Yasumoto *et al.* (1980) reportaron que *Dinophysis fortii* Pavillard produce la dinofisistoxina (DTX), la cual detectaron en mejillones y fitoplancton. Posteriormente, Lee *et al.* (1989) reportaron que *D. acuminata* Claparède & Lachmann, *D. acuta* Ehrenberg, *D. fortii* Pavillard, *D. mitra* (Schütt) Abe, *D. norvegica* Claparède & Lachmann, *D. rotundata*

Claparède & Lachmann y *D. tripos* Gourret, son productoras de toxinas de tipo diarreico (AO y DTX). La lista de especies toxígenas se ha ido ampliando y se reconoce que *Dinophysis caudata* Saville- Kent (Fernández *et al.*, 2001), *D. sacculus* Stein (Masselin *et al.*, 1992), *D. miles* Cleve (Marasigan *et al.*, 2001) y *D. ovum* Schütt (Raho *et al.*, 2008) también son productoras de AO y/o DTX.

Se han reportado casos de DSP en Japón, diversos países de Europa, Chile, Tailandia y Canadá, entre otros (Sar *et al.*, 2002 y Reguera *et al.*, 2008). El primer registro confirmado de DSP fue en Japón en 1978 (Yasumoto *et al.*, 1978), donde afectó drásticamente el cultivo de pectinidos. En ese mismo país, se registraron aproximadamente 1300 casos de DSP entre 1976 y 1982, en España se registraron más de 5000 casos en 1981, y en 1983 se reportaron aproximadamente 3300 en Francia (Van Egmond *et al.*, 2011). En algunos casos la industria del mejillón ha permanecido cerrada durante periodos muy largos, afectando económicamente a las empresas productoras de moluscos bivalvos. Por ejemplo, en 1984, la industria del mejillón permaneció cerrada prácticamente todo un año en Suecia por toxinas tipo DSP (Van Egmond *et al.*, 2011).

II.II. TOXINAS LIPOFÍLICAS

Indistintamente se consideraba como toxinas tipo DSP al conjunto de toxinas con un carácter lipofílico obtenidas mediante una extracción con solvente orgánico. Sin embargo, las toxinas de tipo diarreico (DSTx) son solo el ácido okadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (DTX1, DTX2, DTX3). Como estas moléculas se coextraen con otro tipo de toxinas como las pectenotoxinas (PTXs), las yesotoxinas (YTXs) y los azaspirácidos (AZAs), entre otras, al conjunto de las moléculas que se extraen por medio de solventes orgánicos se les conoce en la actualidad como toxinas lipofílicas (Hess, 2010).

II.II.I. ACIDO OKADAICO Y DINOFIGISTOXINAS (OA, DTXs)

La toxina principal que causa el DSP es el ácido okadaico (AO) y sus análogos las dinofisistoxinas 1 (DTX1) y 2 (DTX2) como congéneres primarios (Murata *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1985). Este grupo de toxinas (DTXs) son poliéteres estables al calor con carácter lipofílico y por lo tanto se acumulan principalmente en los tejidos adiposos de los moluscos (Van Egmond, 2011). Tanto el OA como las DTXs actúan inhibiendo las fosfatasa tipo serina o treonina (específicamente PP2A y PP1) (Cohen, 1989).

Las fosfatasa son un grupo de enzimas importantes involucradas en muchos procesos metabólicos esenciales de la célula. La fosforilación y desfosforilación de proteínas son dos de los principales procesos de regulación y señalización en células eucariotas. Entre los procesos metabólicos más importantes regulados por la fosforilación y desfosforilación de proteínas está el transporte y la secreción en la membrana, la contractilidad y la división celular. La causa de la diarrea en el ser humano es la hiperfosforilación de enzimas y proteínas que controlan la secreción de sodio de las células intestinales o un aumento de la fosforilación de las proteínas citoesqueléticas o de unión, responsables de regular la permeabilidad a los solutos, lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos (Van Egmond, 1993, 2011; Hallegraeff, 1995).

Simultáneamente con el efecto diarreico se presentan náuseas, vómitos y dolor abdominal (Fernández *et al.*, 2002). Aunado a estos síntomas, se ha comprobado que en ratones las toxinas tipo DSP pueden causar efectos secundarios por exposición crónica, actuando como promotores potentes de tumores (Fujiki *et al.*, 1988). Por lo tanto, la elevada morbilidad y las importantes pérdidas económicas causadas a la industria acuícola y pesquera, convierte al AO y sus análogos como las toxinas de origen fitoplanctónico más importantes (Van Egmond, 2011).

II.II.II. YESOTOXINAS (YTXs)

Las yesotoxinas (YTXs) eran consideradas anteriormente como toxinas diarreicas por ser extraídas junto con el OA y las DTXs. Sin embargo, no inducen ningún tipo de diarrea después de su ingestión. No existen reportes de intoxicaciones en humanos por este tipo de toxinas, pero fueron descubiertas ya que tienen una toxicidad muy alta en ratones (Speijers *et al.*, 2011).

Las yesotoxinas son poliéteres disulfatados de elevado peso molecular que poseen un esqueleto de 47 carbonos en forma de escalera (Murata *et al.*, 1987). Se han caracterizado diversos análogos de esta toxina y se ha encontrado que la YTX es producida por tres tipos de dinoflagelados: *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Draisci *et al.*, 1999) y *Gonyaulax spinifera* (Rhodes *et al.*, 2004). Las YTXs se han detectado principalmente en pectinidos y mejillones, acumulándose en las glándulas digestivas pero pueden existir en el tejido muscular en menor porcentaje (Blanco *et al.*, 2005).

No se conoce cuál es la sintomatología específica de las YTXs en humanos, si es que existe, pues hasta la fecha siempre han aparecido asociadas a toxinas DSP, originando sintomatología gastrointestinal (Blanco *et al.*, 2005).

II.II.III. PECTENOTOXINAS (PTXs)

De manera similar a las YTXs, las pectenotoxinas (PTXs) fueron descubiertas por su toxicidad aguda en ratones. Las PTXs son poliéteres y a la fecha se han logrado aislar diez análogos de estas toxinas y sólo seis se han identificado químicamente (Yasumoto *et al.*, 2011). A diferencia del AO, las PTXs no inhiben a las fosfatasa PP2A y PP1, por lo que no causan síntomas diarreicos (Fladmark *et al.*, 1998). Los organismos productores de las

PTXs son varias especies de *Dinophysis* (Suzuki *et al.*, 1998), y están siempre acompañadas por toxinas del grupo del AO en los moluscos.

No se tiene evidencia clara sobre el efecto de estas toxinas en humanos. En ratón los síntomas de intoxicación se caracterizan por letargo, dificultad para coordinar movimientos y dificultad para respirar. Las muertes por lo regular ocurren entre las 4 y 10 horas después de la inyección (Miles *et al.*, 2004).

II.II.IV. AZASPIRACIDOS (AZAs)

La intoxicación por azaspirácidos (AZAs) se detectó por primera vez en Holanda en 1995, después del consumo de mejillones cultivados en Irlanda. Los síntomas presentes en los afectados fueron similares a los producidos por el DSP, pero las concentraciones detectadas de ácido okadaico eran muy bajas (McMahon y Silke, 1996; Satake *et al.*, 1998). Tampoco se observaron organismos productores de toxinas DSP en las muestras de agua recolectadas por lo que se sospechó de una toxina nueva de carácter lipofílico, que posteriormente fue caracterizada como AZAs.

Los AZAs son poliéteres con un espiro arreglo que es único entre las ficotoxinas, asimismo presenta una amina cíclica y un ácido carboxílico (Ryan *et al.*, 2011). Se han detectado aproximadamente 20 análogos de esta toxina (Satake *et al.*, 1998b). Se han encontrado cantidades elevadas de AZAs en moluscos bivalvos (Hess *et al.*, 2003; Furey *et al.*, 2003) y recientemente se han detectado en crustáceos como los cangrejos (Torgersen *et al.*, 2008). Hasta el momento no se conoce la distribución de estas toxinas en el interior de los organismos. Existen estudios que indican que están presentes principalmente en la glándula digestiva (Hess, 2005). Sin embargo, otros sugieren su presencia en otros tejidos,

ya que la estructura molecular de los AZAs, con una parte polar y otra apolar, haría posible su movimiento por todo el cuerpo de los moluscos (Ryan *et al.*, 2011). Los síntomas observados en episodios tóxicos en humanos fueron náuseas, vómitos, diarrea y calambres en el estómago, similares a los de las toxinas diarreicas, sin haberse registrado casos de mortalidad (Alfonso, 2008).

Los síntomas de la intoxicación por AZAs en ratón se caracterizan por saltos y rascado de los animales de prueba, con una parálisis lenta y progresiva, lo que corresponde a una sintomatología neurotóxica diferente a la provocada por las toxinas responsables del DSP (Flanagan *et al.*, 2000; Satake *et al.*, 1998a).

II.II.V. OTRAS TOXINAS LIPOFÍLICAS (IMINAS CÍCLICAS)

Las iminas espirocíclicas son un grupo de toxinas que contienen un grupo funcional imino como parte de su estructura cíclica (Pulido *et al.*, 2011). El grupo de las iminas cíclicas incluye a las gimnodiminas, espirolidos, pinnatoxinas, prorocentrólidos y espirocentriminas. Al igual que con otras toxinas lipofílicas; como las mencionadas anteriormente, la presencia de este grupo fue descubierta debido a la alta toxicidad observada en ratones al ser inyectados con extractos lipofílicos vía intraperitoneal. Cuando se presentan en altas concentraciones, pueden producir la muerte rápida de los ratones y su presencia puede interferir en el bioensayo. Sin embargo, en dosis subletales el ratón suele recuperarse rápidamente, lo que sugiere la rápida desintoxicación o excreción en los organismos (Richard *et al.*, 2001).

Los organismos que se han identificado como productores de esta toxina son *Karenia selliformis*, para gymnodiminas; *Alexandrium ostenfeldii*, para espirólidos; *Prorocentrum spp* para prorocentrólidos, y *Ostreopsis spp* para palitoxinas (Pulido *et al.*, 2011).

Los espirólidos no inhiben a las fosfatasas y tampoco afectan los canales de sodio pero sí son activadores de los canales de calcio (Hu *et al.*, 1995). Respecto a los síntomas presentes en los ratones, Gill *et al.* (2003) observaron que en dosis letales de espirólido C, al inicio los ratones se muestran aletargados y son incapaces de coordinar sus movimientos, en algunos casos se arquean y presentan piloerección. Finalmente extienden sus extremidades traseras, arquean la cola hasta la parte frontal de la cabeza y mueren por paro respiratorio.

No existen reportes de efectos adversos de estas toxinas en humanos y por lo tanto, no hay una regulación sanitaria asociada a la presencia de iminas cíclicas.

II.III. TECNICAS DE DETECCIÓN

La prevención de riesgos a la salud pública incluye la implementación de programas tanto de monitoreo de fitoplancton tóxico como de la concentración de ficotoxinas presentes en organismos vectores. Con el objetivo de prevenir que se consuman mariscos tóxicos existen programas en diferentes países para asegurar la inocuidad de productos marinos. El éxito de estos programas depende de una detección adecuada de las ficotoxinas en los productos marinos y en especial en moluscos bivalvos. Los métodos de detección de ficotoxinas, se

pueden agrupar en: químicos, inmunodetección, medición de la actividad de las toxinas y biológicos (bioensayos).

Básicamente se usan dos tipos de métodos para el análisis de biotoxinas en los programas de regulación sanitaria: Los bioensayos y los análisis químicos. Los primeros manejan un modelo animal, que en el caso de los programas de monitoreo actuales es el ratón. Este tipo de bioensayo proporciona un valor del contenido total de toxinas, basado en la medición de una respuesta biológica, que comprende la actividad de todos los análogos presentes en la muestra. Esta es una ventaja y en algunos protocolos la toxicidad puede ser cuantificable. Este método es el más usado, principalmente por su bajo costo en comparación con los métodos analíticos; sin embargo, presenta una alta variabilidad en los resultados y en algunos casos, baja especificidad que resulta en la presencia de falsos positivos o falsos negativos (Suzuki *et al.*, 1996).

Por otro lado, los métodos analíticos se basan en una caracterización y posterior cuantificación individual de las toxinas en función de una respuesta instrumental, que es proporcional a la concentración de cada una de las toxinas presentes en la muestra. Estos métodos de análisis incluyen los métodos de separación por afinidad de los analitos a una matriz específica. Entre éstos se encuentran la electroforesis capilar y la separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección UV/VIS, fluorescencia o por espectrometría de masas.

En la actualidad, la mayoría de los programas de control de ficotoxinas se basan en bioensayos en ratón. Sin embargo, la tendencia mundial es sustituir estas aproximaciones por métodos analíticos. En la Unión Europea a partir del 2014 se sustituirán los bioensayos en ratón por cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para cuantificar toxinas de tipo lipofílico (Reglamento UE No 15/2011).

En México, 4 de las 5 toxinas reguladas en la NOM-SSA1-242-2009 se detectan por bioensayo en ratón y solamente el ácido domoico se determina por medio de HPLC con detección por UV (HPLC-UV). En abril del 2011 al publicarse la NOM-SSA1-242-2009 se reconoce que las toxinas de tipo diarreico pueden afectar a la salud pública y se establece un nivel máximo permitido de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ en tejido de moluscos bivalvos. La NOM-SSA1-242-2009 hacía referencia a “la toxina diarreica” originalmente pero una modificación reciente en el Diario Oficial de la Federación, 27 de diciembre del 2012, ya especifica que se refiere al AO. Por otro lado, en la guía técnica del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB) se menciona que un área de cosecha de moluscos puede “cerrarse” (implementación de veda sanitaria) cuando se detecten, además de otras ficotoxinas, concentraciones mayores de 1 mg kg^{-1} de YTXs o más de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ de AZAs.

II.IV. DSP EN MÉXICO

La presencia de toxinas de tipo diarreico en varios países de Europa, Japón, Australia, Nueva Zelanda y Chile es el problema más importante relacionado con intoxicaciones y pérdidas económicas asociados a FAN (Sar *et al.*, 2002). Sin embargo, en México la información sobre este tipo de toxinas y del tipo lipofílico es prácticamente nula y no hay un caso de DSP reconocido por las autoridades sanitarias en el país.

El único reporte sobre la presencia de toxinas de tipo diarreico en el ambiente es el de Ochoa *et al.* (1997). Estos autores realizaron bioensayos en ratón en muestras colectadas en Bahía Concepción, en el Golfo de California durante 1992 a 1995. Se reportaron tres muestras positivas para DSP por bioensayo en ratón que coincidieron con concentraciones altas de saxitoxina detectadas en primavera de los años de 1992, 1994 y 1995 (Ochoa *et al.*,

1997). La presencia de toxinas de tipo lipofílico por métodos analíticos no se evaluó en ese estudio. El único reporte sobre la detección de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida acoplada a masas es el de Heredia-Tapia *et al.* (2002), quienes reportaron la presencia de AO y dinofisistoxina (DTX1) en cultivos de *Prorocentrum lima* aislados en la costa de isla el Pardito, Baja California Sur después de un evento de intoxicación con síntomas tipo ciguatera ocurrido en el área (Heredia-Tapia *et al.* 2002).

Otra sugerencia de la presencia de toxinas de tipo diarreico en México es la veda sanitaria implementada en mayo de 2010 por la COFEPRIS ante resultados positivos por bioensayo en ratón a partir de extractos de moluscos provenientes de Bahía de San Quintín, B.C. y Laguna de Guerrero Negro, B.C.S., (<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20roja>). Esta veda sanitaria impidió la extracción, consumo y comercialización de moluscos por más de un mes, lo que afectó a la industria acuícola en la zona. Asimismo en diciembre del mismo año, se detectaron resultados positivos por bioensayo en ratón en muestras de mejillón de la Bahía de Todos Santos, Baja California. Aunque no se implementó una veda sanitaria, la extracción de este producto fue suspendida por una semana aproximadamente (Ocean. Sergio Guevara, com. Per.¹).

Las acciones de regulación implementadas en la zona se basaron en resultados positivos obtenidos por bioensayo en ratón. Sin embargo, este protocolo no es específico para estas toxinas ya que otras toxinas de tipo lipofílico pueden afectar el resultado. Asimismo, mediante este protocolo se pueden presentar falsos positivos por la presencia de ácidos grasos en los organismos (Suzuki *et al.*, 1996). Ya que los resultados positivos de la

¹ Ocean. Sergio Guevara Escamilla. Presidente Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California.

presencia de toxinas diarreicas por bioensayo en ratón no fueron confirmados con métodos analíticos, no se puede establecer si existió un problema metodológico o si su presencia es un problema emergente en la región. En el presente trabajo se caracterizó la composición y abundancia de la comunidad fitoplanctónica en el área de Rincón de Ballenas de Bahía de Todos Santos de enero a diciembre del 2012. Se describe la presencia de especies con potencial tóxico, en particular el género *Dinophysis* asociadas a toxinas de tipo diarreico en moluscos bivalvos. Además, se evaluó la presencia de toxinas de tipo lipofílico en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas. Estas toxinas fueron medidas por medio de dos protocolos de bioensayo en ratón y por LC-MS/MS para confirmar la presencia de las toxinas.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de toxinas de tipo diarreico en la Bahía de Todos Santos.

III.II. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la presencia de especies fitoplanctónicas con potencial tóxico en muestras de agua colectadas en Rincón de Ballenas de enero a diciembre del 2012, asociando su presencia con las condiciones ambientales de la zona durante el periodo de estudio.

- Evaluar la presencia de toxinas de tipo diarreico por medio de bioensayo en ratón, en extractos de glándula digestiva y en cuerpo entero de moluscos bivalvos cultivados en el área de Rincón de Ballenas durante enero a noviembre del 2012.

- Caracterizar la concentración de toxinas de tipo lipofílico por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) en extractos de cuerpo completo de moluscos bivalvos cultivados en el área de Rincón de Ballenas durante enero a noviembre del 2012.

- Comparar los resultados de detección de toxinas diarreicas obtenidos por bioensayo en ratón con extracción en hepatopáncreas, bioensayo en ratón con extracción en cuerpo entero y HPLC-MS/MS en muestras de mejillón cultivados en la región de Rincón de Ballenas

IV. DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

La Bahía de Todos Santos (BTS) se localiza en la costa noroeste de Baja California entre los 31.7 y 31.9 de latitud N y 116.6 a 116.8 de longitud W, con un área aproximada de 250 km² (Torres, 2006). La BTS se caracteriza por tener una fuerte influencia oceánica; se encuentra limitada al norte por Punta San Miguel, al oeste por las Islas de Todos Santos y al Sur por Punta Banda. La mayor parte de la BTS tiene una profundidad entre los 10 y 50 metros y sólo una pequeña porción llega a tener hasta los 300 metros de profundidad debido al cañón submarino presente entre las Islas y Punta Banda (Argote *et al.*, 1991). La región posee un clima tipo mediterráneo caracterizado por veranos secos y cálidos, e inviernos húmedos y fríos (Carlucci *et al.*, 1986). Debido a surgencias costeras en el área adyacente, la BTS se ve enriquecida por aguas ricas en nutrientes, mientras que el aporte de agua baja en nutrientes se lleva a cabo por la corriente de California (Pérez-Brunius *et al.*, 2006).

Para este trabajo se colectaron muestras de los cultivos de mejillón mediterráneo pertenecientes a la empresa Acuicultura Oceánica S.A. de C.V. y AquaLap S.A. de C.V., localizados al sur de la BTS, en la región de Rincón de Ballenas. Esta zona se encuentra certificada para producir mejillón y ostión usando técnicas de cultivo en suspensión. Los cultivos se encuentran distribuidos en dos polígonos en el área certificada (Fig.1).

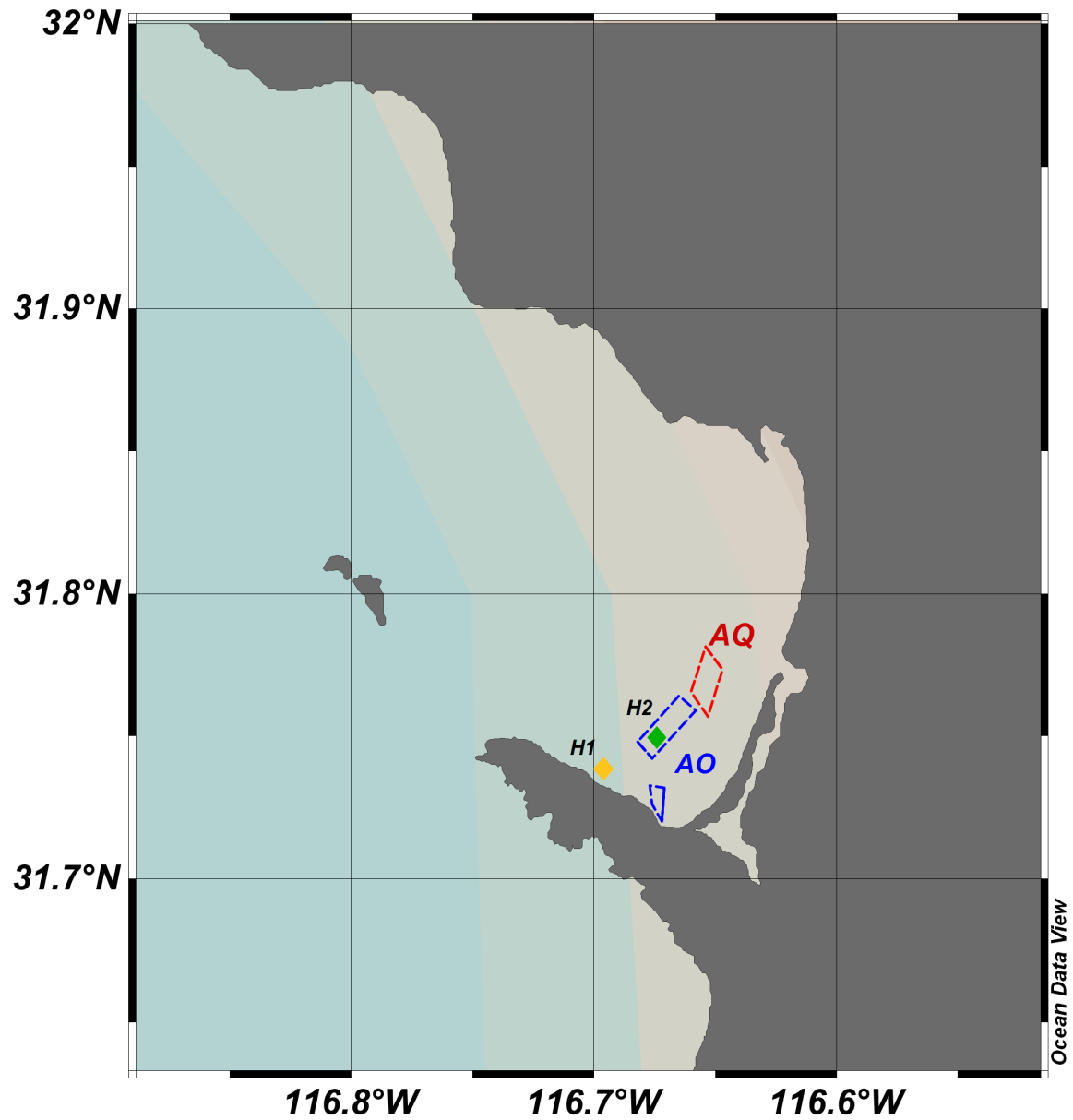


Figura 1. Ubicación del área certificada para cultivo de moluscos en el área de Rincón de Ballenas dentro de la Bahía de Todos Santos, Ensenada, Baja California. Se presentan, los polígonos concesionados para cultivo de moluscos (Azul: Acuicultura Oceánica, S.A. de C.V.; Rojo: Aqualap S.A. de C.V.). Asimismo, se presenta la ubicación de los sensores (Hobos) utilizados para la medición de temperatura en la zona de estudio (H1, ubicación durante enero-abril; H2, ubicación enero-diciembre).

V. METODOLOGIA

V.I. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se realizaron muestreos semanales para evaluar a la comunidad fitoplanctónica de enero a diciembre del 2012 en el área de rincón de Ballenas de la BTS, cerca de los cultivos de mejillón pertenecientes a Acuacultura Oceánica S.A. de C.V. En cada muestreo se colectaron aproximadamente 500 mL de agua en superficie y a 10 m de profundidad. Asimismo, se realizaron arrastres verticales con red para fitoplancton con luz de malla de 60 μm . Las muestras de agua se colocaron en botellas de plástico oscuro (Nalgene) y fueron fijadas con solución concentrada de lugol-acetato (Thronsen, 1978). Para determinar la concentración de ficotoxinas en organismos bivalvos, se colectaron de 30 a 60 mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* durante enero a noviembre del 2012.

V.II. VARIABLES AMBIENTALES

Durante el periodo de muestreo se registró la temperatura a diferentes profundidades mediante un arreglo de sensores (HOBO Water Temperature Pro v2 Data Logger-U22-001 marca Onset) con un intervalo de muestreo cada 10 minutos. Este arreglo se colocó en dos localidades distintas durante el periodo de estudio aproximadamente a 4 metros por debajo del nivel medio del mar. Inicialmente se posicionó a 31.737 N, 116.696 W del 01 de enero al 18 de abril del 2012 (Fig. 1) y posteriormente se instaló más cerca de los sitios de cultivo (31.749 N, 116.674 W; Fig. 1). Se obtuvieron, datos de temperatura medida diariamente a diferentes profundidades cerca de la Islas de Todos Santos en el área concesionada para el cultivo de peces en encierro. La información fue proporcionada por la compañía Baja Aquafarm S. A.

V.III. CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD FITOPLANCTONICA

El análisis de la comunidad fitoplanctónica se efectuó con un microscopio invertido LEICA modelo DMI3000B con objetivos de 10x, 20x, 40x y 63x. Se utilizaron cámaras de sedimentación de 10 ml, siguiendo el método de Utermöhl (Sournia, 1978), considerando un tiempo de sedimentación de 3 horas por cada centímetro de altura de la cámara (Margalef, 1969). Para la identificación y cuantificación de los organismos se analizó el fondo de la cámara hasta contar un mínimo de 400 células o en el caso de tener abundancias muy bajas se analizó la cámara completa. Aplicando la sistemática taxonómica (Cupp, 1943; Taylor, 1976; Balech, 1988 y Tomas, 1997) se identificaron las células de dinoflagelados y diatomeas a nivel de género, cuando fue posible la identificación se realizó al nivel de especie.

Aunque se trató de identificar a todas las especies presentes en las muestras, el análisis de la comunidad fitoplanctónica se enfocó en las especies asociadas al síndrome de intoxicación diarreaica. Se contaron todas las células del género *Dinophysis spp.* presentes en cada muestra. Las abundancias celulares de las muestra de 0 y 10 m de profundidad se expresan como número de células por litro (Cel L^{-1}) y los análisis de las muestras de red se expresan como abundancias relativas.

V.IV. DETERMINACIÓN DE TOXINAS

En cada muestreo se recolectaron aproximadamente 60 ejemplares del mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), se guardaron en bolsas con cierre hermético y se etiquetaron con la fecha y lugar de colecta. Las muestras se colocaron dentro de una hielera manteniéndolos entre 4°C y 10 °C. La mayoría de las muestras fueron recolectadas por

personal de la compañía Acuicultura Oceánica, S.A. Asimismo, se analizaron muestras consideradas dentro del esquema de recolección del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB). Al llegar al laboratorio las muestras asociadas al PMSMB se analizaron inmediatamente por medio del bioensayo en ratón y se congeló una submuestra de organismos a -20°C . Cuando las fechas de muestreo no coincidieron con el calendario del PMSMB, la muestra total fue inmediatamente congelada a -20°C . En el caso de contar con suficientes organismos se realizó la medición de toxinas de tipo lipofílicas por medio de tres métodos (bioensayo en ratón con hepatopáncreas, bioensayo en ratón con cuerpo entero y espectrometría de masas).

V.IV.I. CUANTIFICACIÓN DE TOXINAS LIPOFÍLICAS EN MOLÚSCOS BIVALVOS POR BIOENSAYO EN RATÓN A PARTIR DE HEPATOPÁNCREAS.

El método de bioensayo en ratón utilizado fue el descrito por Yasumoto *et al.* (1978), el cual consiste en homogenizar por 2 a 3 min 25 g de la glándula digestiva (hepatopáncreas) de moluscos bivalvos con 50 mL de acetona al 100 %. Se repite la extracción dos veces más con el mismo volumen de solvente. Se recupera el solvente orgánico de las tres extracciones y se rotoevapora a 40°C , el residuo se resuspende en 5 mL de Tween 60 al 1 %. El extracto se inyecta intraperitonealmente a un grupo de 3 ratones con un peso corporal de entre 19 a 21 g de la cepa Hsd:ICR. Los animales se mantienen en observación durante 24 horas. La muerte de dos ratones antes de las 24 horas representa una muestra positiva. Cuando el bioensayo es positivo se considera que existe la presencia de cualquiera de las toxinas lipofílicas (OA, DTXs, PTXs, AZAs y YTXs) arriba de los niveles permitidos en regulaciones internacionales (EC No. 15/2011). Los signos clínicos de los animales cuando

existe la presencia de toxinas de tipo diarreico (DSTx: OA y DTXs) son postración, debilidad y convulsiones.

V.IV.II. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR ARMONIZADO DE LA UNIÓN EUROPEA PARA LA DETECCIÓN DE TOXINAS LIPOFÍLICAS POR BIOENSAYO EN RATÓN A PARTIR DEL ORGANISMO COMPLETO.

Este método se basa en el protocolo descrito por Yasumoto *et al.*, (1984). Actualmente es el procedimiento oficial de la Unión Europea para la detección de toxinas lipofílicas y será sustituido en 2014 por el método de LC-MS/MS (EC No. 15/2011). Este bioensayo puede detectar al AO, DTXs, PTXs y AZAs al nivel regulatorio establecido en la EC No 853/2004, y YTXs aún por debajo de los niveles regulatorios. Algunas otras toxinas solubles en acetona, como las brevetoxinas, gymnodiminas, espirólidos, pinnatoxinas, ciguatoxinas y paralitoxinas pueden ser codetectadas por este método. Este protocolo, al igual que el de Yasumoto *et al.*, (1978) consiste en una extracción con solvente orgánico (acetona) de las toxinas presentes en el tejido del molusco. Posteriormente, se realiza una fraccionación del extracto acetónico con éter etílico (o diclorometano) y agua para eliminar toxinas más polares como el ácido domoico y saxitoxinas, además de sales.

En este trabajo se realizó una extracción en 100 g del cuerpo completo de mejillones con un volumen final de 500 mL de acetona. La acetona se elimina con rotoevaporación a 40 °C. Posteriormente se realiza una partición con 300 mL de diclorometano y dos enjuagues de 20 mL con agua desionizada. Se recupera el solvente orgánico y éste es evaporado a sequedad. El residuo resultante es suspendido en una solución de 4 mL de Tween 60 (1%). Un mililitro de este extracto es inyectado intraperitonealmente a 3 ratones con un peso entre 19 y 21 gr de la cepa Hsd:ICR. La muerte de dos ratones antes de las 24

horas representa un resultado positivo, considerando que la muestra presenta cualquiera de las toxinas lipofílicas (OA, DTXs, PTXs, AZAs y YTXs) en concentraciones superiores a los niveles permitidos en regulaciones internacionales (EC No. 15/2011).

V.IV.III. PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR ARMONIZADO PARA LA DETECCIÓN DE BIOTOXINAS MARINAS DE TIPO LIPOFÍLICO EN MOLÚSCOS POR LC-MS/MS.

El método consiste en una extracción orgánica con metanol al 100 % del tejido homogenizado del cuerpo completo de moluscos. Los extractos son posteriormente filtrados y directamente analizados mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS) para investigar la presencia de AO, DTX1, DTX2, PTX1, PTX2, AZ1, AZA2, AZA3, YTX, homo YTX, 45 OH YTX y 45 OH homo YTX en forma libre. Para determinar el contenido total de las toxinas del grupo del AO, es necesaria una hidrólisis alcalina del extracto metanólico antes del análisis por LC-MS/MS con el objetivo de convertir cualquier éster de AO y/o DTXs de AO y DTX1 o DTX2 libre. Dicha hidrólisis consiste en adicionar NaOH 2.5 M a una alícuota del extracto metanólico, homogenizar y calentar a 76 °C por 40 min. Una vez que se encuentre a temperatura ambiente, se homogeniza, se filtra y se inyecta en la columna cromatográfica.

Para los análisis por LC-MS/MS, en el laboratorio FICOTOX se realizó la primera parte de la extracción. Se trabajó con 2.5 g de tejido del cuerpo entero de mejillones a los cuales se les agregaron 10 mL de metanol al 100 % y se homogenizaron con Vortex por 3 min, posteriormente se adicionaron 10 mL más de metanol al 100 % y se homogenizó en Ultra Turrax por 1 minuto. El extracto se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se colectó el sobrenadante en viales de plástico de 2 mL, los cuales se conservaron a baja temperatura.

Los extractos metanólicos de cada muestra fueron enviados al Laboratorio Center for Environment, Fisheries and Aquaculture (CEFAS) en Inglaterra y al Centro de Investigaciones Marinas (CIMA) en España para realizar la parte restante de la extracción. El protocolo y/o aparato empleado para el análisis por LC-MS/MS dependió de las condiciones manejadas por cada laboratorio.

VI.RESULTADOS

VI.I. COMUNIDAD FITOPLANCTONICA Y VARIABLES AMBIENTALES

Los resultados del presente trabajo corresponden al monitoreo de la comunidad fitoplanctónica del 18 de enero al 26 de diciembre del 2012. Para la zona de Rincón de Ballenas se analizaron 44 muestras de agua superficial, 42 muestras colectadas a 10 metros de profundidad y 42 muestras de arrastres verticales de red. Los resultados de las muestras de red indican que el grupo de las diatomeas fue dominante durante la mayor parte del periodo de estudio, representando más del 90% de las abundancias relativas totales. Los dinoflagelados representaron una fracción importante (80%) de la comunidad fitoplanctónica solo en marzo y junio.

La dominancia de las diatomeas fue claramente reflejada en las abundancias absolutas de especies del fitoplancton (Fig. 2). En general, la abundancia total de especies de diatomeas fue similar en superficie y en 10 m de profundidad. Solo en pocas ocasiones la abundancia fue mayor a 10 m que en superficie (Fig. 2A). La abundancia máxima se detectó a finales de abril con $800 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en superficie y $1200 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ a 10 metros. En los meses de febrero, abril, mayo y julio los conteos celulares fueron superiores a $500 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$, pero los meses restantes no se superó esta abundancia (Fig. 2). Después de agosto la abundancia no fue mayor de las $200 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en ambas profundidades.

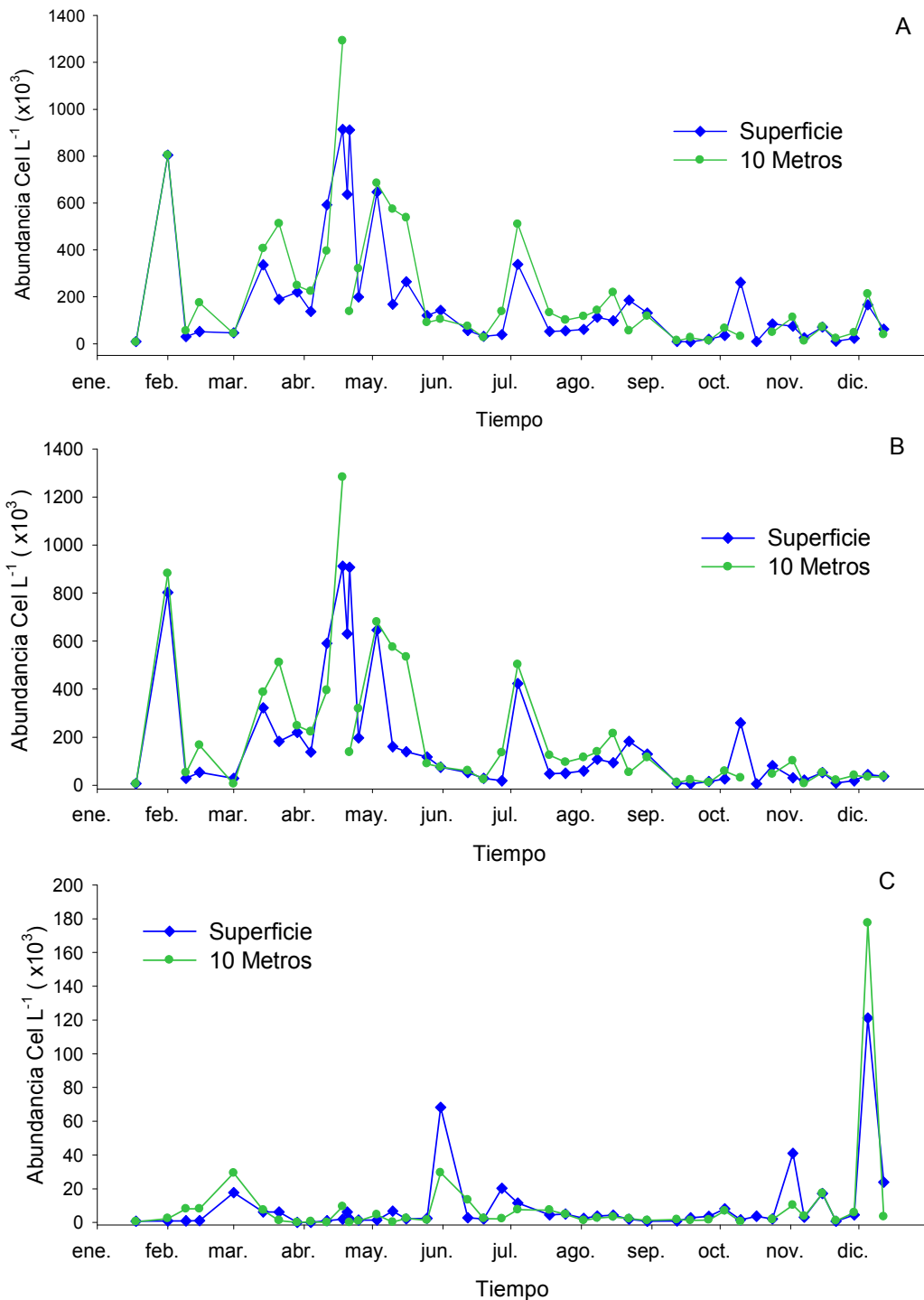


Figura 2. Abundancia de fitoplancton en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Abundancia total de especies identificadas incluyendo diatomeas, dinoflagelados, euglenoides, criptofitas etc. (A). Específicamente del grupo de las diatomeas (B) y dinoflagelados (C).

El grupo que contribuyó mayormente a la abundancia total fue el de las diatomeas con una concentración máxima de $1250 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ durante el mes de mayo y una abundancia menor de $200 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en los últimos meses de muestreo (Fig. 2B). En contraste, los dinoflagelados no presentaron abundancias significativas (Fig. 2C), a excepción del máximo en junio, con $60 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en superficie y $20 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ a 10 m. En marzo la abundancia fue de $30 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ y $20 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en superficie y 10 metros, respectivamente. Por último en noviembre la abundancia se incrementó a $40 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en superficie y $15 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ a 10 m. En los meses restantes la abundancia de dinoflagelados no superó las $10 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$.

VI.I.I. ABUNDANCIA DE ESPECIES CON POTENCIAL TÓXICO

La especie con potencial tóxico más común que se identificó para este estudio en la BTS es *Pseudo-nitzschia australis*. Durante el 2012 se registraron altas abundancias de esta especie en tres ocasiones (Fig. 3A). A mediados de febrero la abundancia de células del género *Pseudo-nitzschia* fue superior a $600 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ a 10 m; sin embargo, en esa fecha no se diferenció entre especies. Es a partir del 15 de febrero que se iniciaron los conteos por especie prestando especial atención a *Pseudo-nitzschia australis*.

En la última semana de abril y la primera de mayo la abundancia de esta especie fue superior a $200 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ tanto en superficie como a 10 m de profundidad. El resto del año la abundancia celular no superó las $100 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$. La menor abundancia celular se presentó a partir de septiembre con menos de $20 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$. En muestras de red (Fig. 3C) se observó la misma tendencia que en los análisis de abundancia absoluta, durante los meses de marzo y abril se observó una abundancia del 20 %, posteriormente aumentó al 50 % en mayo, junio y agosto. A partir de septiembre el número de células de *Pseudo-*

nitzschia no superó el 20 % de la abundancia total de organismos detectados en muestras de red.

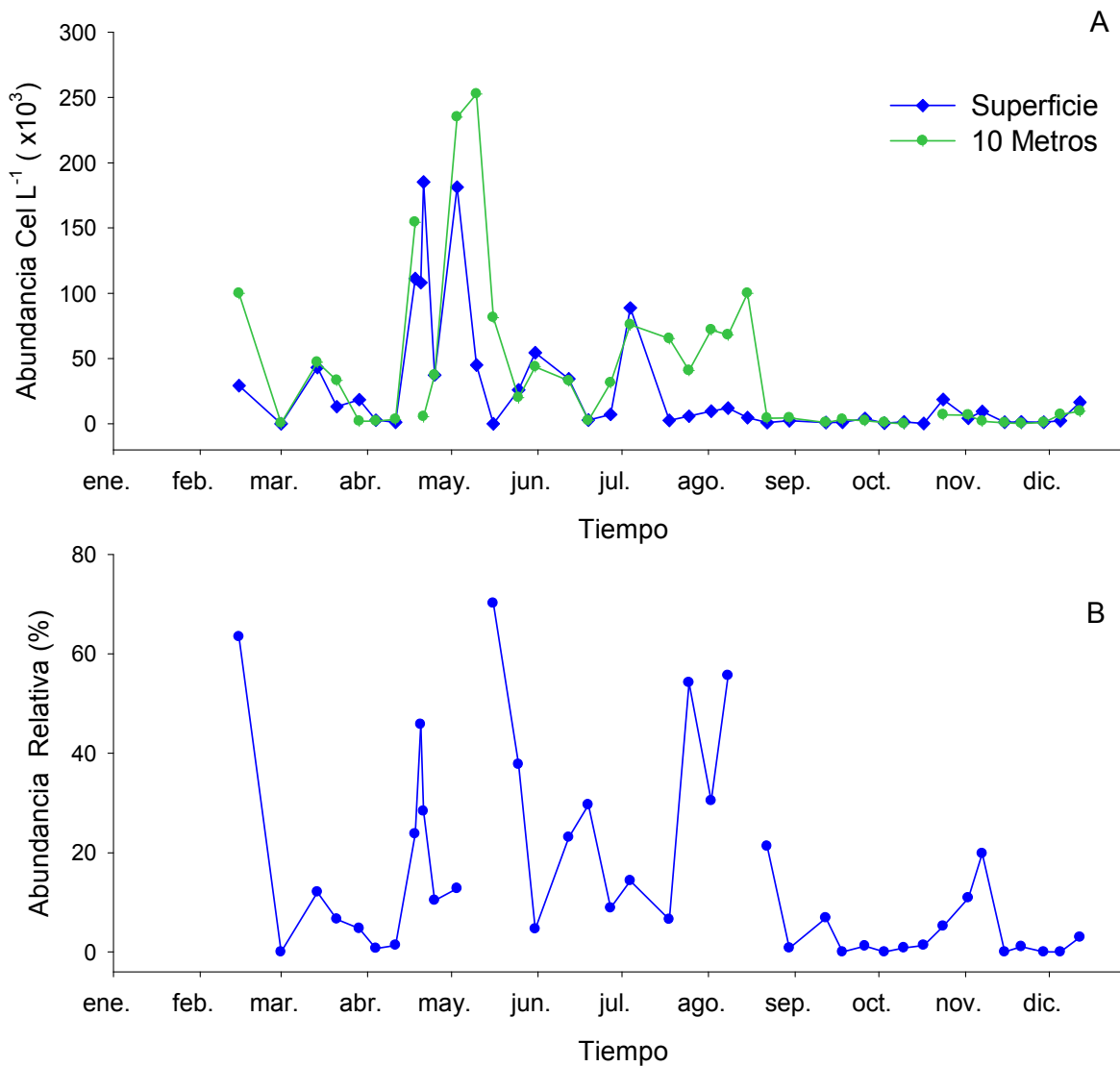


Figura 3. Abundancia absoluta (A) de *Pseudo-nitzschia* tipo *australis* y abundancia relativa de todas las especies de este género (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

Lingulodinium polyedrum es otra especie que comúnmente forma florecimientos algales en la Bahía de Todos Santos y se ha reconocido que puede producir yesotoxinas

(Paz *et al.*, 2004). Durante los primeros meses de este estudio no se detectó la presencia de *L. polyedrum*. Fue hasta junio cuando se detectó la presencia de esta especie en muestras de superficie (Fig. 4A) con abundancia de 1,200 Cel L⁻¹, posteriormente no se detectó y reapareció a principios de noviembre superando las 20000 Cel L⁻¹, conforme transcurrieron los días del mes su abundancia descendió drásticamente y hacia finales de noviembre se registraron conteos de 500 Cel L⁻¹. Sin embargo, durante las dos primeras semanas de diciembre presentó un aumento significativo de su abundancia alcanzando 60 x 10³ Cel L⁻¹.

Para las muestras colectadas a 10 m de profundidad, la especie aparece solo en 3 ocasiones durante el mes de noviembre pero nunca supera las 500 Cel L⁻¹, de forma similar a las muestras de superficie, las muestras de 10 m registraron un incremento en su abundancia a principios de diciembre, alcanzando 60 x 10³ Cel L⁻¹. Esta tendencia también se observó en las abundancias relativas, las cuales durante todo el año representaron menos del 1%, pero a finales de noviembre la población aumentó, representando el 30 % de la población total, llegando incluso a constituir más del 80 % en el mes de diciembre (Fig. 4B).

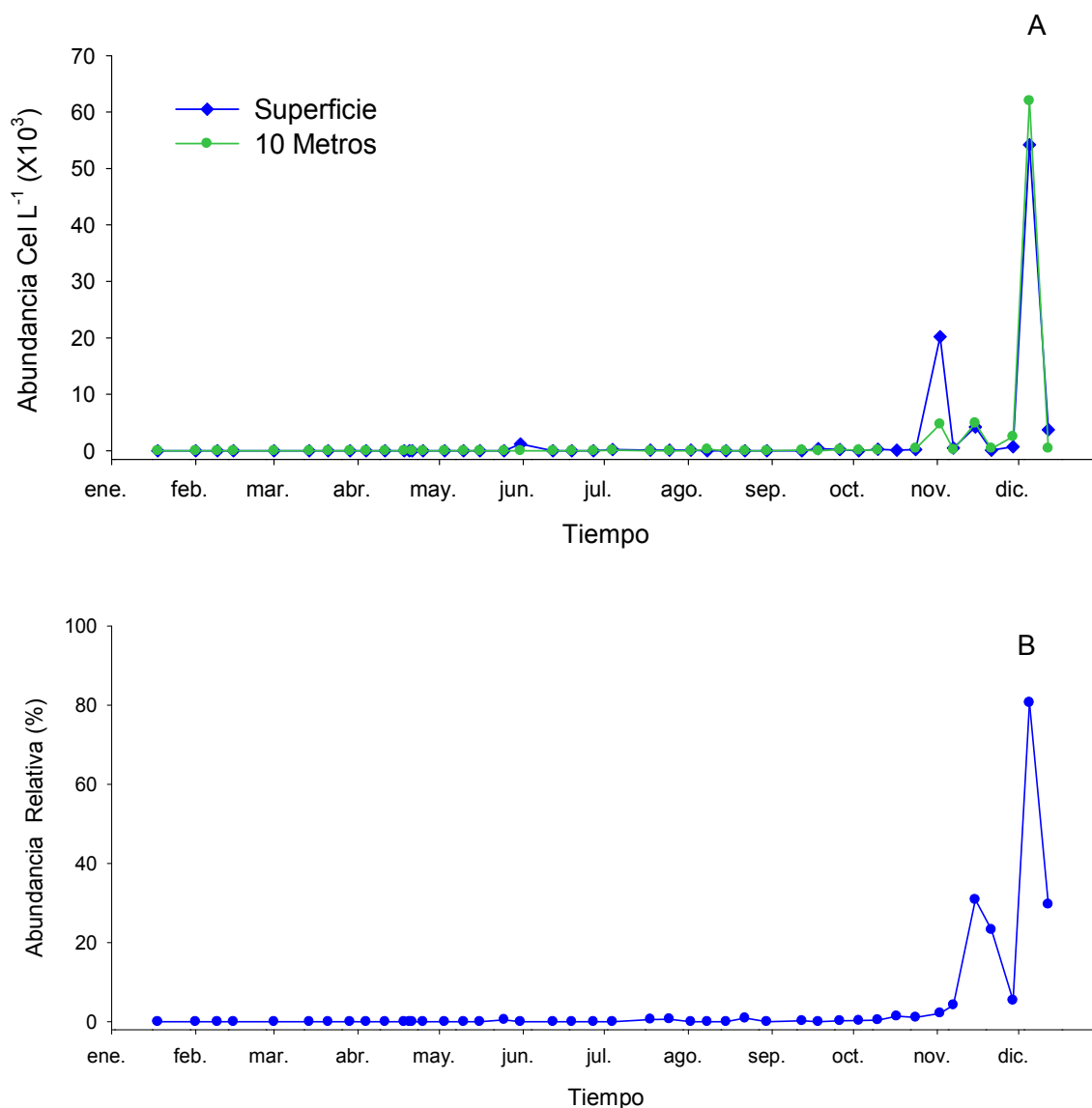


Figura 4. Abundancia absoluta (A) y relativa (B) de *Lingulodinium polyedrum* en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

VI.I.II. ESPECIES ASOCIADAS A TOXINAS LIPOFÍLICAS

La producción de toxinas lipofílicas, se asocia principalmente con el género *Dinophysis*. En las muestras analizadas para este estudio se registraron bajas abundancias de este género en comparación con otros dinoflagelados, los conteos no sobrepasaron las 5,000 Cel L⁻¹. Antes

de mayo del 2012 la abundancia celular se mantuvo entre las 100 Cel L⁻¹ y las 1000 Cel L⁻¹ en superficie y a 10 metros (Fig. 5A).

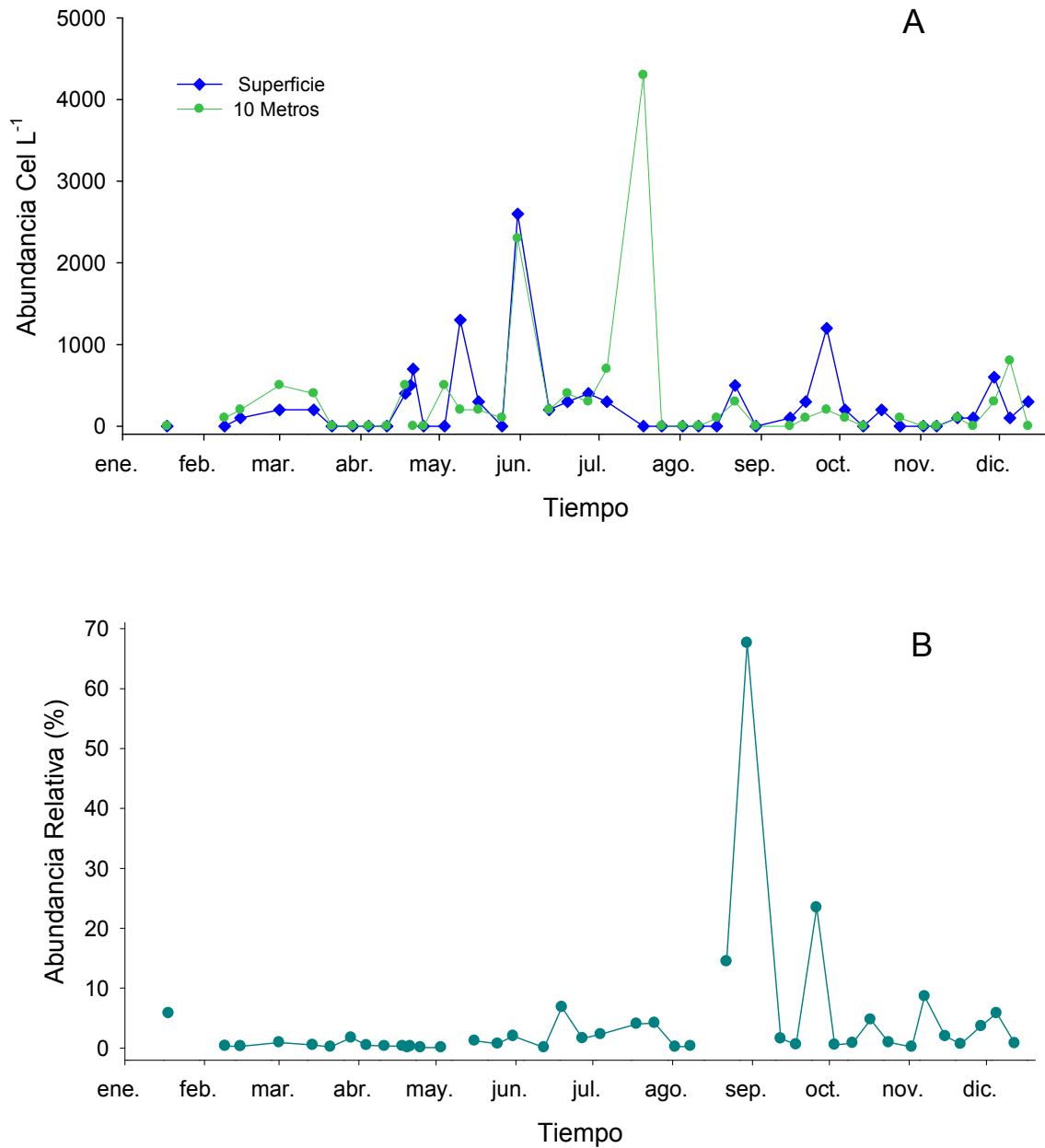


Figura 5. Abundancia absoluta (A) y relativa (B) de *Dinophysis spp.* en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

Entre mayo y agosto se observaron tres fechas con abundancias altas de *Dinophysis spp.* A principios de mayo su abundancia superó las 1,300 Cel L⁻¹ en superficie y a finales de este mismo mes se detectaron 2,600 Cel L⁻¹ en ambas profundidades. La máxima abundancia celular de este género se detectó a mediados de agosto con más de 4,000 Cel L⁻¹ a 10 metros de profundidad. Posteriormente, las abundancias disminuyeron hasta menos de 1,000 Cel L⁻¹ en diciembre de 2012(Fig. 5A).

Se evaluó la abundancia relativa de las especies de este género como otro indicador de su presencia en la comunidad fitoplanctónica (Fig. 5B). Desde enero hasta agosto, *Dinophysis spp* representó entre el 1 al 10 % de la abundancia relativa en muestras de red. Sin embargo, en los primeros días de septiembre la abundancia relativa fue de aproximadamente un 70 %. Posteriormente, esta abundancia disminuye a un 20 %, y continúa su disminución hasta finales de año, representando solo un 5 % de la comunidad fitoplanctónica en noviembre.

Utilizando la sistemática taxonómica se identificaron siete especies del género *Dinophysis* en las dos profundidades de muestreo: *D. acuminata* Claparède et Lachmann, *D. Caudata* Saville Kent, *D. fortii* Pavillard, *D. sp.cf. mitra*, *D. sp. cf. odiosa*, *D. rotundata* Claparède & Lachmann y *D. tripos* Gourret. Las especies recurrentes durante la mayor parte del año fueron *D. fortii* y *D. acuminata* (Fig. 6A, 6B), el resto de las especies se presentaron ocasionalmente en algunos muestreos.

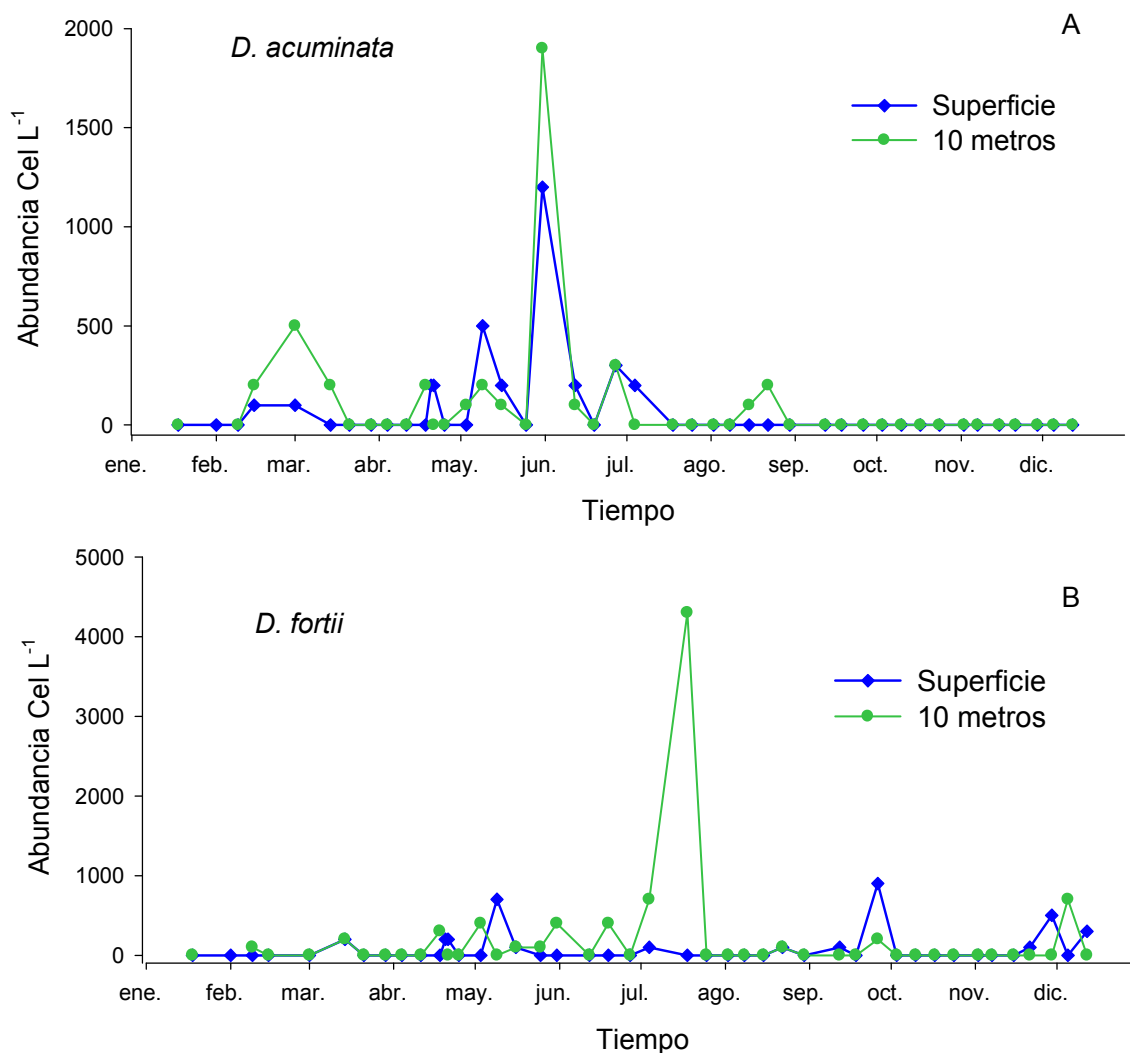


Figura 6. Abundancia absoluta de *Dinophysis acuminata* (A) y *Dinophysis fortii* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

En muestras de superficie y 10 m se presentaron 5 de las 7 especies identificadas. En los primeros días de marzo, *D. acuminata* (Fig. 6A) alcanzó una abundancia de 500 Cel L⁻¹ a 10 metros y aproximadamente de 100 Cel L⁻¹ en superficie. En mayo se detectaron nuevamente 500 Cel L⁻¹ en muestras superficiales y apenas 200 Cel L⁻¹ a 10 metros. En junio la abundancia aumentó a 2000 Cel L⁻¹ a 10 metros y menos de 1000 Cel L⁻¹ en

superficie, pero en julio la abundancia disminuye a 300 Cel L⁻¹ en ambas profundidades. En los últimos tres meses del año no se detectó a esta especie.

Por otra parte, *D. fortii* (Fig. 6B) también se detectó a partir de marzo con abundancia de 200 Cel L⁻¹ en ambas profundidades. Los 3 meses posteriores la abundancia de esta especie fue menor de 1,000 Cel L⁻¹. Sin embargo, a mediados de julio la población superó las 4,000 Cel L⁻¹. El número de células disminuyó a la semana siguiente y permaneció bajo todo el mes de agosto. En septiembre, octubre y diciembre vuelve a detectarse sin superar las 1000 Cel L⁻¹.

Dinophysis rotundata (Fig. 7A) fue la tercera especie que se presentó con más frecuencia durante el periodo de muestreo. De manera similar a *D. acuminata* y *D. fortii*, *D. rotundata* se presentó de mayo a julio y septiembre a octubre, con abundancias entre 200 Cel L⁻¹ a 400 Cel L⁻¹. En los meses restantes su abundancia fue menor a 100 Cel L⁻¹. En muestras de 10 metros se observó esta especie solamente en junio, octubre y noviembre con 100 Cel L⁻¹ y a finales de noviembre con 200 Cel L⁻¹.

Por otra parte, especies más raras como *D. caudata*, se presentó solo en dos ocasiones en muestras de superficie, la primera en junio con un abundancia de 1200 Cel L⁻¹ y en septiembre con 100 Cel L⁻¹. En muestras de 10 metros, se observó en los meses de octubre y noviembre sin superar las 200 Cel L⁻¹ (Fig. 7B). En el caso de *D. tripos* sólo se detectó en superficie, en el mes de octubre con abundancia de 200 Cel L⁻¹ (Fig. 7B).

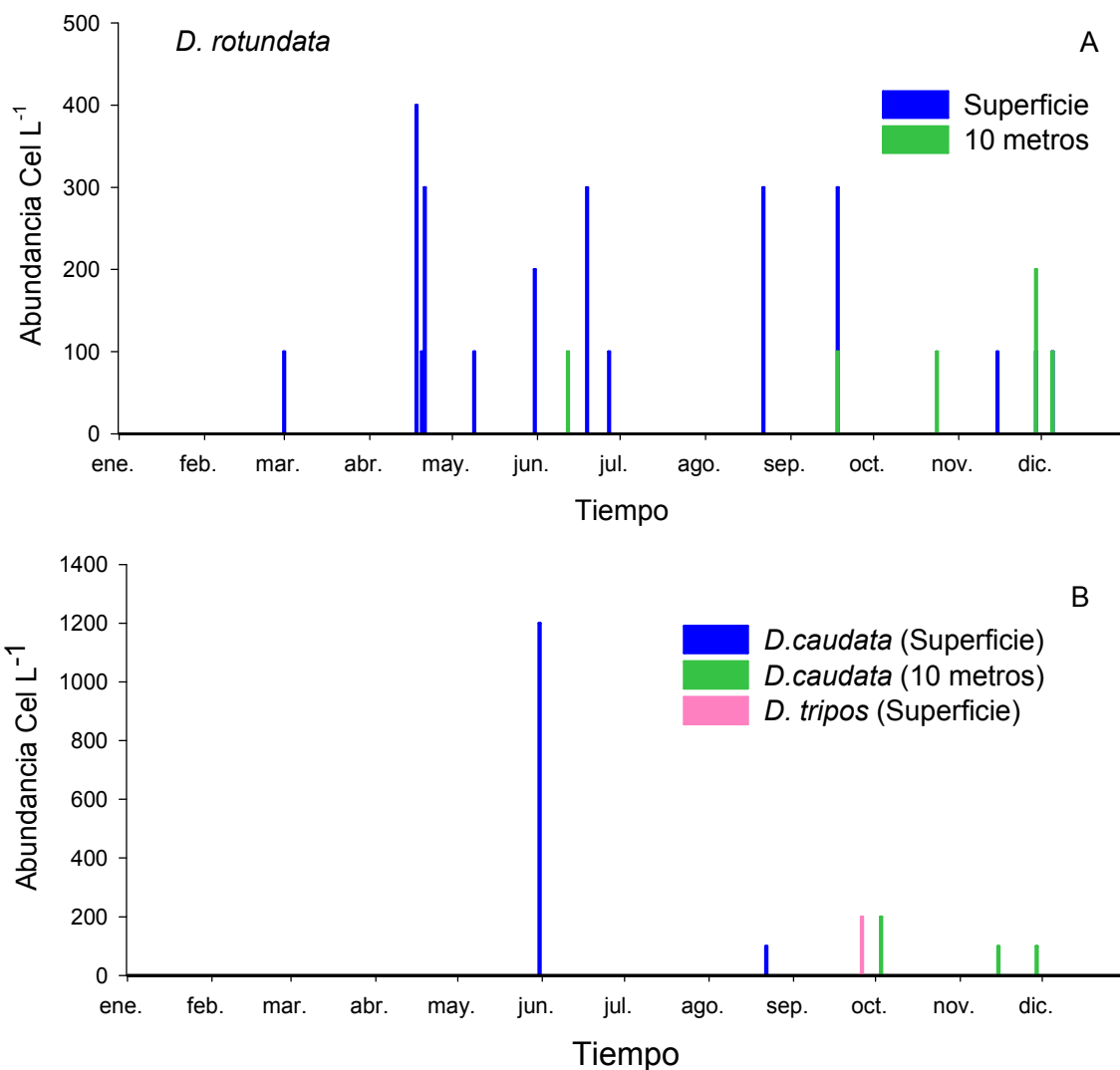


Figura 7. Abundancia absoluta de *D. rotundata* (A), *D. caudata* y *D. tripos* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

En muestras de red, se registraron además de las cinco especies descritas en superficie y 10 metros de profundidad, dos especies que no se presentaron en muestras discretas, las cuales corresponden a *D. odiosa* y *D. mitra*. Sin embargo, la frecuencia de aparición fue diferente y con relación a la presencia de toxinas de tipo diarreico (ver la sección siguiente), es importante analizar la contribución relativa de las diferentes especies del género *Dinophysis* a la comunidad fitoplanctónica. Las especies con mayores

abundancias relativas y frecuencia de aparición fueron *D. acuminata* y *D. fortii* (Fig. 8A). La suma de las abundancias relativas de éstas especies fue de aproximadamente 7 % al principio del año y posteriormente se reduce a menos del 1 % del total de organismos presentes en muestras de red. A finales de mayo se detecta un incremento en la abundancia relativa de estas especies, alcanzando un máximo de 5 % a mediados de junio. Posteriormente se observó una disminución en la abundancia de estas especies, pero el 31 de agosto la abundancia relativa de *D. fortii* fue mayor al 60 % de los organismos presentes en muestras de red. En octubre se observó el segundo valor más alto para esta especie con el 20 %. Por otra parte, *D. rotundata*, se presentó en la mayoría de los muestreos, pero con abundancias muy bajas, con un máximo del 4 % a finales de agosto (Fig. 8B).

D. caudata no fue tan común como las especies anteriores, ya que solo representó entre 0 y 3% de la abundancia total, detectándose los valores máximos durante noviembre. *D. tripos* fue encontrada solo tres veces en muestras de red con menos del 2 % de abundancia relativa en septiembre. *D. odiosa* y *D. mitra* fueron especies menos abundantes con un 0.5 % de abundancia relativa entre ambas especies y sólo se detectaron en los últimos tres meses de muestreo (Fig. 8B).

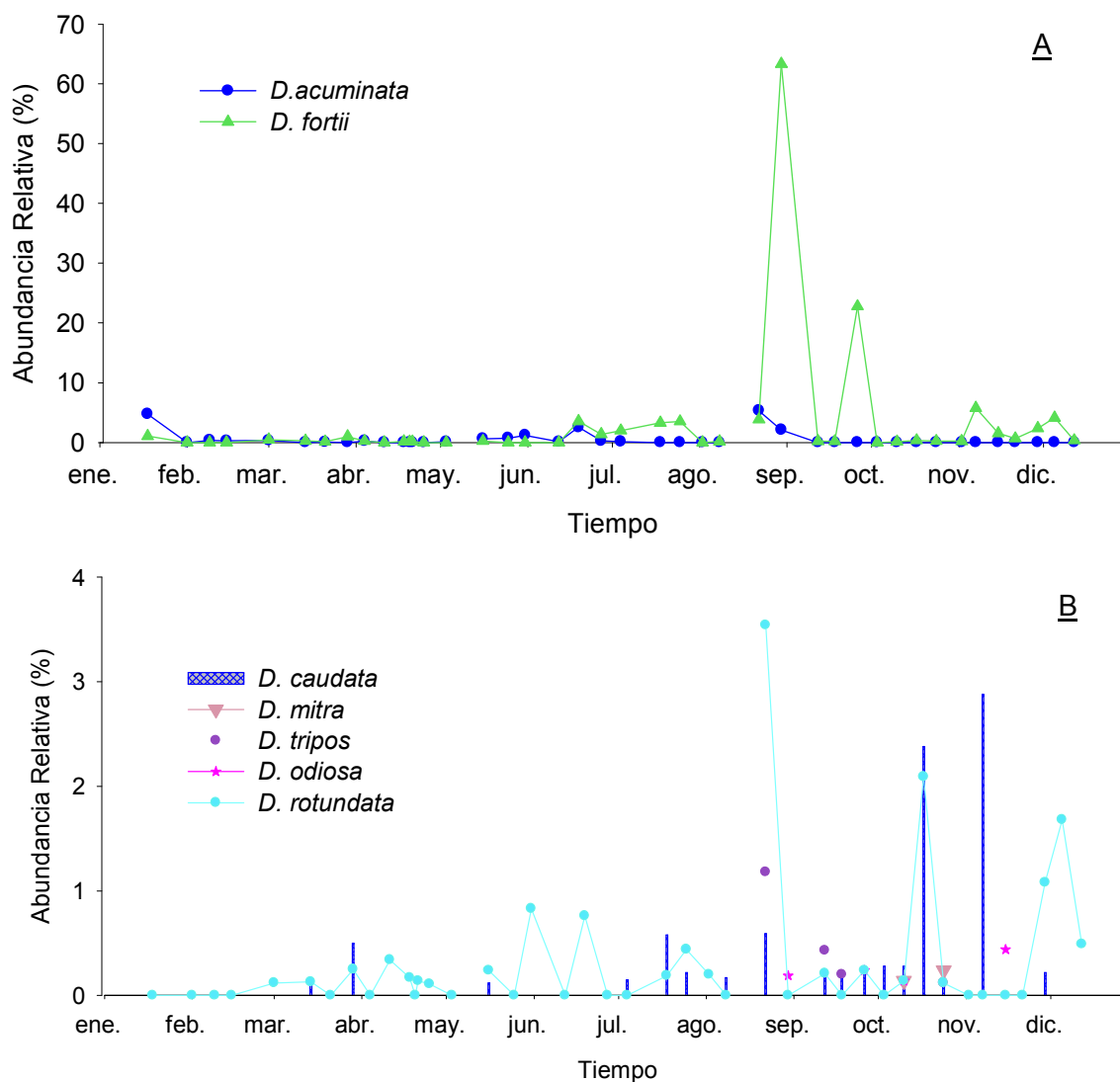


Figura 8. Abundancia relativa de *D. fortii* y *D. acuminata* (A). *D. rotundata*, *D. caudata*, *D. tripos*, *D. odiosa* y *D. mitra* (B) en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

VI.I.III. TEMPERATURA

En la figura 9 se presenta la variación de la temperatura superficial durante 2012 medida en el área del Rincón de Ballenas con un detector de alta frecuencia colocado a aproximadamente a 4 metros de la superficie (Fig. 9A). Asimismo, se presenta la

temperatura medida en superficie y a 10 m de profundidad cerca de la Isla de Todos Santos (Fig. 9 B).

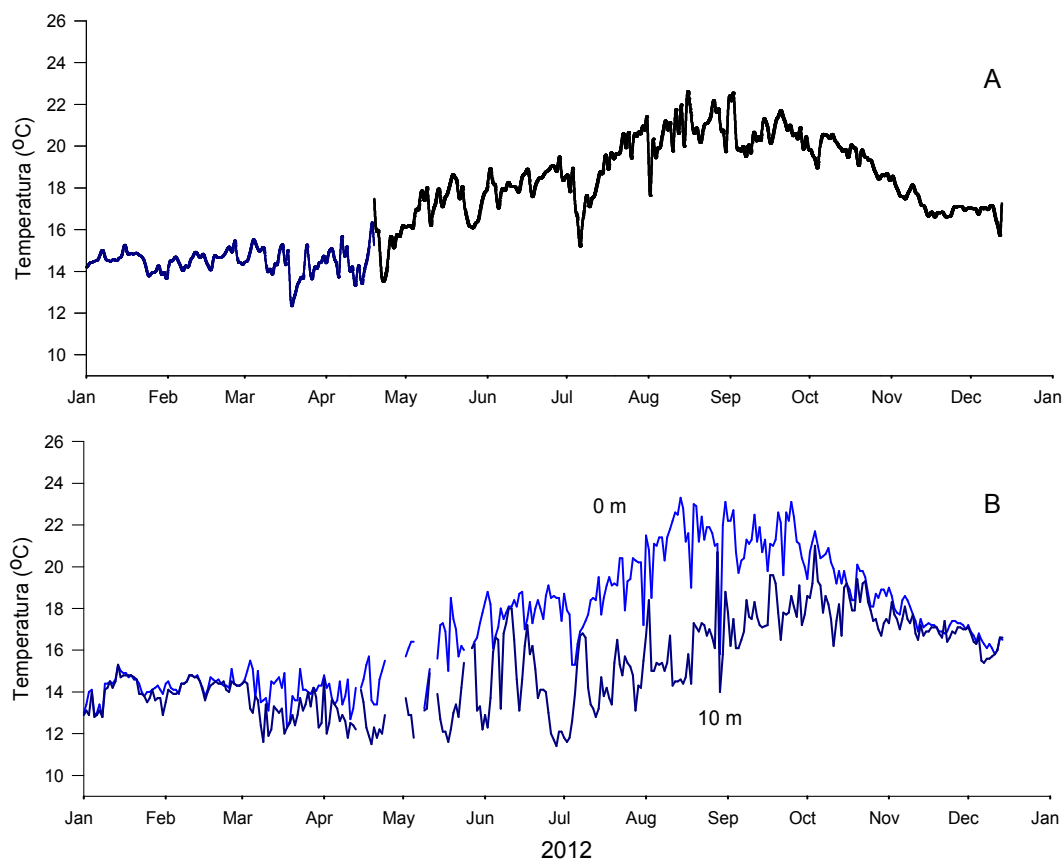


Figura 9. Variación de la temperatura a aproximadamente 4 m de profundidad en el área de Rincón de Ballenas (A) y en superficie y a 10 m cerca de la Isla de Todos Santos (B). En el panel A la línea azul representa las mediciones realizadas en la primera posición del anclaje y la línea negra son la medición después de su relocalización (ver sección de Materiales y Métodos).

En Rincón de Ballenas el arreglo de sensores de temperatura se colocó en dos sitios distintos. A principios del año se colocó a los 31.738 N 116.696 W (línea azul Fig. 9A) y posteriormente se cambió más cerca del área de cultivo de mejillones (31.749 N 116.674 W línea negra panel A). Se observó una alta similitud entre la temperatura medida en el área

de Rincón de Ballenas y la Isla de Todos Santos (Fig. 9). En ambos lugares se observó una clara variación estacional de la temperatura, presentándose los valores superficiales más altos (aproximadamente 22 °C) a mediados de agosto y hasta finales de octubre (Fig. 9). Las temperaturas menores se registraron en el primer cuatrimestre del año, presentándose una temperatura similar de aproximadamente 14 °C en superficie y a 10 m de profundidad. Durante la época de otoño se observó una fuerte estratificación de la columna de agua, presentándose una diferencia de más de 8 °C entre la temperatura medida a 10 m y superficie. Asimismo, se observan periodos cortos de descenso de la temperatura superficial, aparentemente inducidos por intrusión de agua de surgencia proveniente del exterior de la BTS. El descenso de temperatura más importante se presentó a principios de julio con una disminución en superficie de 18.5 °C a 14 °C (Fig. 9).

VI.II. DETECCION DE TOXINAS LIPOFÍLICAS

VI.II.I. BIOENSAYO EN RATÓN

Se analizaron un total de 62 muestras de mejillón por medio de bioensayo en ratón (BER), de las cuales solo 47 de ellas se procesaron a partir de la glándula digestiva y 51 con el organismo completo. Como se especificó en la sección de materiales y métodos, un resultado positivo implica la muerte de dos de los tres ratones de prueba, implicando que en las muestras existe una concentración de toxinas de tipo lipofílico mayor que la de los niveles regulatorios. En la tabla I se especifican asimismo, los tiempos de sobrevivencia de cada ratón, los cuales están relacionados con la concentración de toxina en la muestra. En la tabla I se consideran todas las muestras sin diferenciar entre áreas de colecta.

Tabla I. Resultados y tiempos de supervivencia de bioensayos en ratón por cuerpo completo, y hepatopáncreas en muestras de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012.

ID Muestra	Fecha Muestreo (M/D/A)	Bioensayo (Hepatopáncreas)		Bioensayo (Cuerpo Entero)	
		Tiempo de Supervivencia (h)	Resultado	Tiempo de Supervivencia (h)	Resultado
1	18/01/2012	>24, > 24, >24	NEGATIVO	-	-
2	01/02/2012	>24, > 24, >24	NEGATIVO	-	-
3	01/03/2012	>24, > 24, >24	NEGATIVO	-	-
4	07/03/2012	>24, >24, 13	NEGATIVO	-	-
5	14/03/2012	>24, > 24, >24	NEGATIVO	-	-
6	21/03/2012	4, 4, >24	POSITIVO	-	-
7	29/03/2012	0.2, <24, >24	POSITIVO **	-	-
8	11/04/2012	-- ,0.5, >24	INVALIDA *	17.4, 19.7, >24	POSITIVO ***
9	18/04/2012	16, 23, >24	POSITIVO	-	-
10	03/05/2012	0.4, 0.8, SA	POSITIVO **	-	-
11	09/05/2012	0.3, 0.8, > 24	POSITIVO **	18, 18, >24	POSITIVO ***
12	16/05/2012	1.5, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
13	25/05/2012	2, 17, >24	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
14	31/05/2012	>24, > 24, >24	NEGATIVO	23, >24, >24	NEGATIVO ***
15	12/06/2012	0.4, 7, >24	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
16	19/06/2012	2, 2, 2	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO ***
17	20/06/2012	1.3, 2, SA	POSITIVO	7.7, <22, >24	POSITIVO
18	20/06/2012	0.9, 0.9, SA	POSITIVO **	4.8, <22, >24	POSITIVO
19	20/06/2012	1.1, 1.3, SA	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
20	25/06/2012	2.3, >24, >24	NEGATIVO	-	-
21	25/06/2012	1.6, >24, >24	NEGATIVO	< 19, >24, >24	NEGATIVO
22	27/06/2012	5, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO ***
23	28/06/2012	1, 1.2, SA	POSITIVO	2.7, 3.5, >24	POSITIVO
24	28/06/2012	1, 1.2, SA	POSITIVO	1.7, 1.7, >24	POSITIVO
25	04/07/2012	4, <23, <23	POSITIVO	18, >24, >24	NEGATIVO ***
26	04/07/2012	1.5, 2, 3	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
27	04/07/2012	1.2, 1.5, SA	POSITIVO	-	-
28	05/07/2012	1, 1, SA	POSITIVO	< 14, < 14, < 14	POSITIVO
29	11/07/2012	1.5, 1.5, 1.5	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
30	11/07/2012	0.2, 0.2, SA	POSITIVO **	>24, >24, >24	NEGATIVO
31	13/07/2012	15, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
32	13/07/2012	0.2, 0.2, SA	POSITIVO **	>24, >24, >24	NEGATIVO
33	16/07/2012	0.4, 0.5, >24	POSITIVO **	17, 22.4, SA	POSITIVO
34	16/07/2012	16, 16, >24	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
35	18/07/2012	6, 20, >24	POSITIVO	21.7, 21.7, >24	POSITIVO
36	18/07/2012	0.5, 1, 1.5	POSITIVO **	< 23, >24, >24	NEGATIVO
37	18/07/2012	0.6, 0.6, 0.8	POSITIVO **	>24, >24, >24	NEGATIVO
38	20/07/2012	2.7, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
39	20/07/2012	0.3, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
40	25/07/2012	0.1, 6, >24	POSITIVO **	17.7, 17.7, >24	POSITIVO ***
41	25/07/2012	4.3, 4.5, >24	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
42	25/07/2012	>24, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
43	02/08/2012	3, 6, 7.5	POSITIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
44	08/08/2012	-	-	18.4, >24, >24	NEGATIVO
45	15/08/2012	0.5, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
46	15/08/2012	>24, >24, >24	NEGATIVO	>24, >24, >24	NEGATIVO
47	22/08/2012	>24, >24, >24	NEGATIVO	19.4, >24, >24	NEGATIVO
48	12/09/2012	2.3, 7.2, >24	POSITIVO	4.8, 6, 6	POSITIVO
49	18/09/2012	-	-	-	-
50	19/09/2012	-	-	17, 17, 17	POSITIVO
51	19/09/2012	-	-	5, 6, SA	POSITIVO
52	21/09/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
53	21/09/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
54	26/09/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
55	26/09/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
56	28/09/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
57	28/09/2012	-	-	2.3, 2.3, 2.3	POSITIVO
58	03/10/2012	-	-	>24, >24, >24	NEGATIVO
59	03/10/2012	-	-	2, 2, SA	POSITIVO
60	04/10/2012	-	-	< 10, < 10, < 10	POSITIVO

61	17/10/2012	-	-	2.5, 2.5, 2.5	POSITIVO
62	17/10/2012	-	-	2, 2, SA	POSITIVO
63	19/10/2012	-	-		NEGATIVO
64	19/10/2012	-	-		NEGATIVO
65	19/10/2012	-	-		NEGATIVO
66	24/10/2012	-	-		NEGATIVO
67	26/10/2012	-	-	22.4, 22.4, SA	POSITIVO
68	26/10/2012	-	-		NEGATIVO
69	31/10/2012	-	-		NEGATIVO
70	14/11/2012	-	-		NEGATIVO
71	12/12/2012	-	-		NEGATIVO

* Muerte por mala inyección: Muestra Inválida **Muerte rápida: < 1 Hora

***Presencia de síntomas tipo neurotóxicos 10min después de la inyección SA: Sacrificio tras la muerte de 2 de 3 ratones

De los 47 bioensayos realizados utilizando el hepatopáncreas para la extracción de toxinas lipofílicas se obtuvieron 29 resultados positivos, 17 negativos y un resultado inválido asociado a una mala inyección (Tabla I). El número mayor de muestras positivas consecutivas se presentaron en los meses de mayo a julio. En algunas muestras se registraron muertes de los ratones en menos de una hora después de la inyección. Aunque es probable que existiera la interferencia de algún otro compuesto en estos bioensayos, las pruebas se consideraron como positivas con fines de comparación con otras metodologías. Los síntomas más comunes observados en los animales de prueba fueron debilidad, postración, diarrea y convulsiones. Cabe destacar que en el laboratorio FICOTOX se sustituyó el BER utilizando el hepatopáncreas como tejido de prueba por el de cuerpo completo a partir de septiembre. Por lo tanto, a partir de esta fecha se cuenta solo con resultados utilizando organismo completo como tejido de prueba y realizando en el extracto una partición con agua (ver materiales y métodos).

En el caso del BER utilizando organismo completo, se obtuvieron 19 resultados positivos y 32 negativos. El mayor número de resultados positivos se presentaron en julio y posteriormente en el mes de septiembre hasta finales de noviembre (Tabla I). Es importante resaltar que en siete bioensayos, los animales de prueba mostraron signos no asociados con toxinas de tipo diarreico. Estos signos se presentaron en los primeros 10 min después de ser

inyectados y consistían en que los ratones se mostraban aletargados con una marcha anormal (dismetría), pérdida de coordinación motriz (ataxia), manifestaban espasmos musculares o brincos involuntarios y en ocasiones se presentaba una contracción de los músculos posteriores e inferiores (opistótonos). Generalmente al transcurrir 20 min de la prueba los ratones se recuperaban completamente y solo en 3 ensayos existió muerte de los organismos en la primera hora después de la inyección.

Comparando los dos métodos, se observa que existió una coincidencia en 10 muestras positivas. Se presentaron 11 resultados negativos en las mismas muestras probadas con ambos métodos y 14 resultados fueron diferentes (Tabla I). De estas 14 discrepancias, los resultados siempre fueron positivos al usar el protocolo con extracción en hepatopáncreas. Por lo tanto, el número de resultados positivos disminuyó al realizar el ensayo por cuerpo completo.

VI.II.II. CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se analizaron muestras del cuerpo completo del mejillón por cromatografía líquida con detección mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en colaboración con el Dr. Juan Blanco del Centro de Investigaciones Marinas (CIMA) en España y el Dr. Andrew Turner del Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture (CEFAS) en Inglaterra.

En este trabajo se reportan los resultados obtenidos en CEFAS donde se analizaron 53 muestras en dos sistemas cromatográficos diferentes. El primero fue un sistema Aquity Xevo TQ MS/MS con el cual se detectaron 5 grupos de toxinas: ácido okadaico, dinofisistoxinas, pectenotoxinas, yesotoxinas, espirólidos y gymnodiminas (Tabla II). El

segundo aparato fue un Aquity I-Class Xevo TQ-S con el cual se detectaron solo las cuatro primeras toxinas mencionadas anteriormente. Ya que este sistema es mucho más sensible se analizaron muestras diluidas al centrarse la medición en toxinas tipo DSTx como el ácido okadaico (Tabla III). Por lo tanto, se reportan los resultados de la concentración de este tipo de toxinas detectadas en ambos aparatos y la concentración de otras toxinas se reportan a partir del sistema Xevo TQ MS/MS en el cual se analizaron muestras sin diluir.

La Tabla II resume los resultados del análisis de toxinas lipofílicas por LC-MS/MS. Se detectaron 5 grupos de toxinas diferentes. Del grupo de ácido okadaico, se detectó a este compuesto en forma libre y esterificada y a la dinofisistoxina 2 (DTX2; Tabla II). Del grupo de las yesotoxinas se detectaron cuatro análogos: yesotoxinas (YTX), homoyesotoxinas (HYTX), 45-Hidroxi-yesotoxina (OHYTX) y 45-Hidroxi-1a-homoyesotoxina (OH hYTX). Asimismo, se detectó a la pectenotoxina 2 (PTX2), espirólido 1 (SPX1) y a la gymnodimina (GYM) (Tabla II).

El AO presentó las concentraciones más altas de las diferentes toxinas de tipo lipofílico detectadas en las muestras de mejillón colectadas en 2012. Este compuesto se presenta en forma libre y esterificada, la cual se detecta después de realizar una hidrólisis de las muestras. La cantidad de AO libre fue muy variable y representó entre el 1 % y 28 % del AO total (libre + esterificado) presente en las muestras (Tabla II). La concentración máxima de AO total fue de 2317 $\mu\text{g}/\text{kg}$ detectada a partir del Xevo-TQ

El segundo tipo de toxinas con una mayor concentración fue del grupo de las yesotoxinas con un máximo de 1081 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La HYTX fue el análogo que presentó una concentración mayor de este grupo de toxinas (Tabla II). Después de las yesotoxinas, la PTX2 sigue en orden de importancia en cuanto a su concentración, con un máximo de 46.48 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las toxinas con una concentración baja pero mayor a los niveles de detección

de los protocolos usados fueron el SPX1 y la GYM, asimismo la frecuencia de aparición de estos compuestos fue menor al resto de la toxinas lipofílicas detectadas (Tabla II).

Tabla II. Concentración de toxinas lipofílicas detectadas en el cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos de enero a diciembre del 2012. Las toxinas fueron detectadas por LC-MS/MS mediante un sistema Aquity Xevo TQ MS/MS.

ID	FECHA (M/D/A)	PTX2 (µg/kg)	SPX1 (µg/kg)	DTX2 (µg/kg)	YTX (µg/kg)	HYTX (µg/kg)	OHYTX (µg/kg)	OH hYTX (µg/kg)	GYM (µg/kg)	AO LIBRE (µg/kg)	AO EST (µg/kg)	AO TOTAL (µg/kg)
1	1/18/2012									40.13	77.81	117.94
2	2/1/2012									10.90	24.46	35.36
4	3/7/2012	1.06								21.70	68.41	90.12
5	3/14/2012		3.06							22.71	26.88	49.59
6	3/21/2012		0.69							17.02	34.30	51.32
7	3/29/2012		4.86							7.17	14.86	22.04
8	4/11/2012									5.49	5.29	10.78
8 B	4/11/2012		1.50								8.07	8.07
10	5/3/2012										9.66	9.66
10 B	5/3/2012		1.66									
11	5/9/2012	0.67								7.32	26.57	33.89
11 B	5/9/2012		1.11							6.17	23.04	29.21
12	5/16/2012									8.74	40.25	48.99
12 B	5/16/2012	0.71	2.72		91.45	112.81		67.61		9.24	21.94	31.19
13	5/25/2012	0.15	2.39									
14	5/31/2012	16.33	0.36							6.47	22.30	28.77
15	6/12/2012		0.76			81.90					17.31	17.31
16	6/19/2012	0.12	1.3		101.80	140.86	48.40	36.94		4.1	6.44	10.54
17	6/20/2012	6.43	1.63		195.87	283.96	57.02	82.29	1.22	9.06	18.57	27.63
19	6/20/2012		1.64		77.31	115.55		87.54			15.80	15.80
22	6/27/2012		1.87		100.27	182.17	39.92	79.28			9.29	9.29
23	6/28/2012	10.30	0.83		94.85	167.69	65.98	158.35		8.63	22.51	31.14
24	6/28/2012	2.69	1.92		281.69	473.18	90.48	235.67	1.38	11.93	32.97	44.90
25	7/4/2012		1.418			104.385		54.809			8.087	8.087
26	7/4/2012	6.18	0.58		131.40	248.05		77.23		13.43	46.77	60.20
27	7/4/2012	19.97	1.62		85.59	202.17		128.96		15.24	40.71	55.95
28	7/5/2012		2.36		163.58	381.41	42.08	88.46	1.69	4.71	10.95	15.66
30	7/11/2012	26.39	2.52		103.34	167.05	91.19	75.53		31.30	113.24	144.54
31	7/13/2012		0.82		61.27			37.05				
33	7/16/2012	12.63	1.34		39.73	80.21		26.70		29.30	243.07	272.36
34	7/16/2012		1.71		50.59	56.02					8.58	8.58
35	7/18/2012	2.96	2.13		55.91	93.85		30.50		20.47	48.68	69.15
36	7/18/2012	11.30	2.16	4.52		86.30			0.13	49.80	153.39	203.19
37	7/18/2012	46.48	1.32	3.99	66.96	45.30				89.59	396.10	485.69
38	7/20/2012	2.88	2.36		71.66	108.03		39.47	1.37	50.77	137.71	188.48
39	7/20/2012	2.93	1.48		57.98	93.20		41.54	0.52	31.21	106.60	137.81
40	7/25/2012	0.32	0.48							25.99	118.22	144.21
41	7/25/2012	3.38	2.52		52.21	122.53		45.42		46.96	125.23	172.19
43	8/2/2012		0.60								7.13	7.13
44	8/8/2012	9.24	1.58	0.11						101.55	156.00	257.55
45	8/15/2012	5.52	2.36		27.31	41.01			2.00	19.17	42.39	61.56
47	8/22/2012	2.96	1.74			66.43		45.54		35.73	85.77	121.50
49	9/18/2012	22.00	2.05						1.95	190.26	692.88	883.14
50	9/19/2012	26.20	0.93							148.70	1142.75	1291.45
51	9/19/2012	20.15	2.84			39.84			3.47	355.70	967.55	1323.25
52	9/21/2012	0.51	1.64						1.89	14.55	39.82	54.37
53	9/21/2012	7.47	0.55							105.04	380.82	485.86
54	9/26/2012		0.24								87.12	87.12
55	9/26/2012	0.92	1.77	5.28	66.82	53.67		30.02	1.94	79.63	178.02	257.64
56	9/28/2012	38.27	1.79						1.69	59.77	444.03	503.80
57	9/28/2012	27.96	1.53							205.44	1327.11	1532.55
58	10/3/2012	0.38	2.40			51.25			3.64	14.79	56.77	71.56
59	10/3/2012	32.66	0.89						0.23	205.10	1409.30	1614.40
60	10/9/2012	13.92	0.57	6.97						140.85	1133.90	1274.74

61	10/17/2012	19.70	0.71			134.94	929.27	1064.21
62	10/17/2012	18.68	0.75	8.44		143.65	837.16	980.81
67	10/26/2012	4.78	1.07			1.13	51.84	255.80

*B: muestras analizadas en dos ocasiones.

Tabla III. Concentración de toxinas lipofílicas medidas en muestras del cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectado en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las toxinas fueron detectadas por LC-MS/MS mediante un sistema Aquity Xevo TQS MS/MS.

ID	FECHA (M/D/A)	PTX2 (µg/kg)	DTX1 (µg/kg)	AO LIBRE (µg/kg)	AO EST (µg/kg)	AO TOTAL (µg/kg)
7	3/29/2012			2.13	10.07	12.20
8	04/11/2012				1.81	1.81
10	05/03/2012				1.09	1.09
11	05/09/2012			4.38	19.89	24.27
12	5/16/2012			4.26	15.97	20.23
13	5/25/2012			0.18	3.08	3.26
14	5/31/2012	6.012		3.49	20.32	23.81
15	6/12/2012			4.02	16.37	20.39
16	6/19/2012			0.44	1.91	2.34
17	6/20/2012	0.66		3.13	16.41	19.54
19	6/20/2012			2.11	13.98	16.08
22	6/27/2012				5.72	5.72
23	6/28/2012	7.22		4.47	33.66	38.13
24	6/28/2012	0.20				0
25	7/04/2012				1.69	1.69
26	7/04/2012	2.70		12.89	56.57	69.46
27	7/04/2012	7.58		12.36	47.82	60.18
28	7/05/2012				6.88	6.88
30	7/11/2012	12.95		30.20	161.93	192.13
31	7/13/2012				1.90	1.90
33	7/16/2012	9.95		44.1	255.75	299.85
34	7/16/2012				3.03	3.03
35	7/18/2012	0.08		14.88	62.97	77.84
36	7/18/2012	3.87		34.63	203.23	237.86
37	7/18/2012	33.37		120.24	534.69	654.93
38	7/20/2012			39.94	195.79	235.72
39	7/20/2012	0.39		25.19	148.81	174.01
40	7/25/2012			29.21	191.86	221.07
41	7/25/2012	0.39		31.87	138.13	169.99
43	8/02/2012				3.16	3.16
44	8/08/2012	2	0.11	73.53	390.45	463.98
45	8/15/2012	2.02		10.86	50.01	60.88
47	8/22/2012	0.40		34.51	134.58	169.09
49	9/18/2012	8.78		202.78	1102.52	1305.29
50	9/19/2012	21.95		266.23	1701.18	1967.41
51	9/19/2012	8.32		346.89	1413.32	1760.20
52	9/21/2012			15.09	44.01	59.10
53	9/21/2012	7.12		193.44	588.57	782.02
54	9/26/2012			11.00	123.58	134.58
55	9/26/2012			72.35	265.47	337.82
56	9/28/2012	16.88		62.30	678.83	741.13
57	9/28/2012	23.12		399.07	1792.97	2192.04
58	10/03/2012			15.58	80.86	96.44
59	10/03/2012	26.38		350.06	1967.89	2317.96
60	10/09/2012	12.51		265.57	1538.96	1804.53
61	10/17/2012	15.04		234.69	1375.81	1610.50
62	10/17/2012	9.32		125.55	1150.58	1276.13
67	10/26/2012	1.10		52.25	399.90	452.15

VI. III. VARIACIÓN TEMPORAL DE TOXINAS DE TIPO LIPOFÍLICO Y SU RELACIÓN CON LA COMUNIDAD FITOPLANCTÓNICA

Para identificar a las especies productoras de las toxinas lipofílicas detectadas en los mejillones se analizó la aparición temporal de estas moléculas durante el periodo de muestreo.

VI. III. I. TOXINAS TIPO DSTx (AO, DTX y PTX)

En la figura 10 se presenta la suma de la concentración de AO, PTX y DTX (DSTx) expresada en $\mu\text{g OA eq kg}^{-1}$ durante el periodo de muestreo. Este tipo de toxinas es producido por especies del género *Dinophysis*, y aunque solamente el AO y la DTX son consideradas como causantes del DSP, para cuestiones de regulación se considera la suma de las tres para la toma de decisiones (EC No 853/2004). Específicamente, la suma de AO, DTX y PTX no debe de rebasar los $160 \mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$. Los resultados en los dos sistemas presentan una tendencia similar y en las gráficas se presentan los resultados del sistema Xevo-TQS, en el cual se detectaron concentraciones ligeramente mayores que con el sistema TQ (ver Tablas II y III). Como se mencionó previamente las concentraciones en el sistema Xevo-TQS fueron de 0 a $2300 \mu\text{g kg}^{-1}$, mientras que el Xevo-TQ el máximo fue de $1700 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esto se debe probablemente a que el Xevo-TQS presenta una mayor sensibilidad.

De enero a junio las concentraciones de las DSTx no sobrepasaron los $160 \mu\text{g OA-eq/kg}$, aunque el 18 de enero se presentó una concentración de $117 \mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$. Después de junio se presentaron dos periodos donde la concentración de DSTx superó los $160 \mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$. Se detectaron concentraciones arriba del límite máximo permitido en muestras provenientes de las dos empresas que cultivan mejillón en el área de Rincón de Ballenas

(A. Oceánica y Aqualap; Fig. 10). Se detectaron valores altos de la concentración de toxinas entre el 16 de julio y el 15 de agosto, y posteriormente a partir de septiembre y hasta finalizar el periodo de muestreo. Durante el primer periodo se detectó una concentración máxima de $700 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el TQS y TQ, respectivamente. En el periodo de septiembre se detectaron concentraciones que superan los $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ (TQS) y $1700 \mu\text{g kg}^{-1}$ (TQ). En total se encontraron 22 muestras por arriba del nivel regulatorio con el sistema TQ, mientras que con el TQS la cantidad de muestras que sobrepasan el nivel máximo fue de 19 (Fig. 10).

Las concentración de toxinas tipos DSTx se puede relacionar con la presencia de organismos del género *Dinophysis* en la BTS. En la figura 10 se observa que en julio, el primer periodo con concentraciones altas de esta toxina, se detectó una abundancia de *Dinophysis spp* de $4 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ a 10 m de profundidad. *D. fortii* fue la especie asociada a esta alta abundancia celular (c.f. Fig. 6B). En dos muestreos anteriores cercanos a esta fecha de máxima abundancia de *Dinophysis spp*, se detectaron abundancias por arriba de las 1000 Cel L^{-1} de *Dinophysis spp*, en superficie y a 10 m de profundidad durante la primera y última semana de mayo. Por lo tanto, *Dinophysis spp* causó la acumulación de toxinas tipo DSTx en los mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas. Sin embargo, una relación entre el número de células y la cantidad de toxinas es difícil de establecer. Esto es particularmente evidente para el periodo de septiembre a octubre. Las altas concentraciones detectadas durante este periodo no coinciden con una abundancia alta de *Dinophysis* a 0 y 10 m (Fig. 10A). Se detectaron concentraciones arriba de los $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ en varias muestras empleando el modelo Xevo-TQS. Sin embargo, al utilizar el modelo Xevo-TQ las concentraciones más altas estuvieron en el orden de los $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$; mientras que la abundancia de *Dinophysis* apenas superó las 1000 Cel L^{-1} en una sola fecha

de muestreo (26 de septiembre; Fig. 10). Sin embargo, dos semanas antes de que se detectaran concentraciones altas de toxinas DSTx, *Dinophysis* representó más de un 60% de los organismos presentes en muestra de red (Fig. 10B).

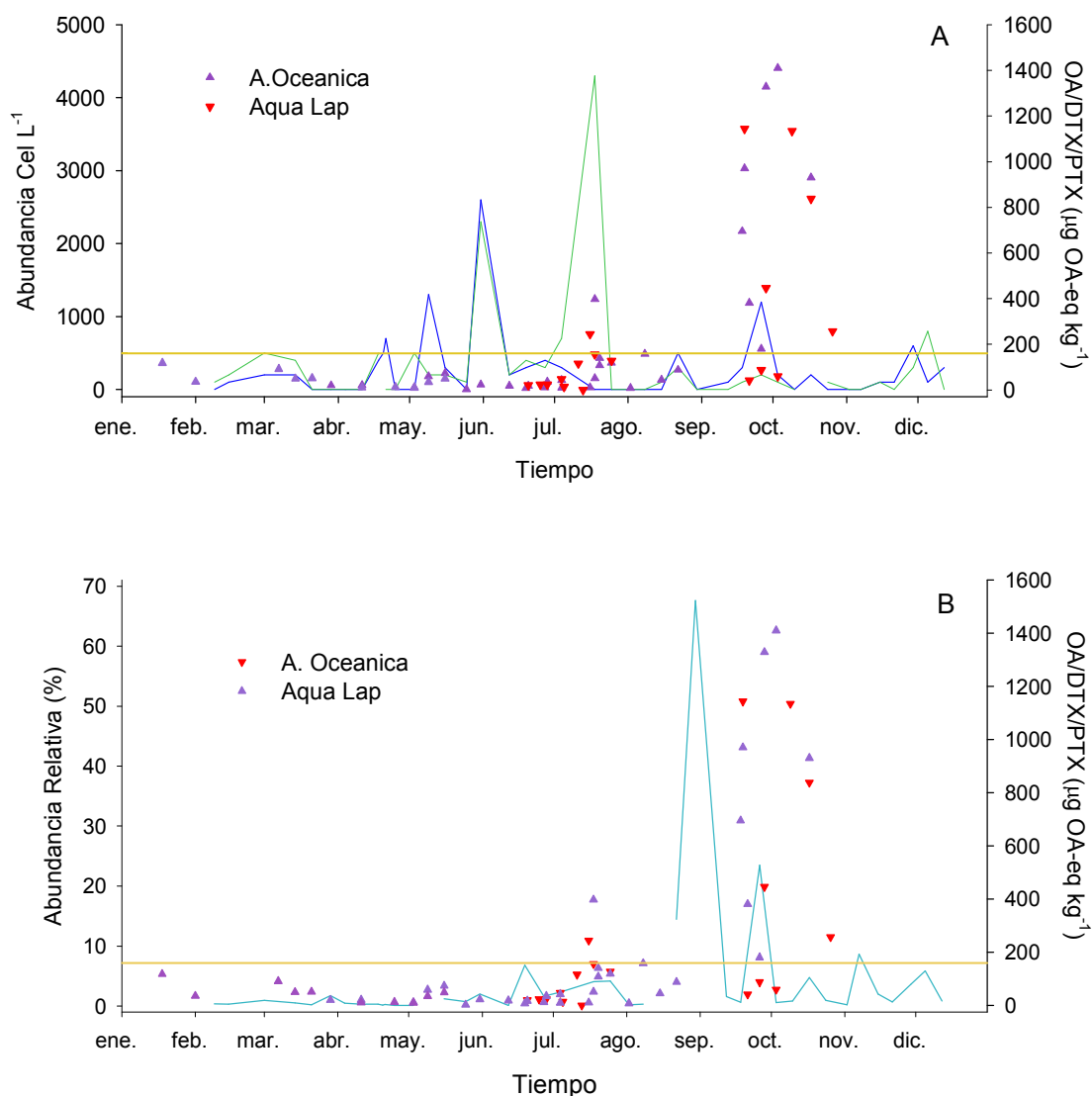


Figura 10. Concentración de toxinas lipofílicas tipo DSTx (AO+DTX2+PTX) en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de organismos del género *Dinophysis* detectada en superficie (línea azul) y 10 m (línea verde) de profundidad (panel A). El panel B muestra la abundancia relativa de estos organismos en muestras de red. La línea horizontal amarilla representa la concentración máxima permitida de estas toxinas en moluscos bivalvos (160 µg eq AO/kg).

Asimismo, se detectó una abundancia relativa de *Dinophysis* del 20 % durante la semana en la que se detectó la máxima concentración de toxinas DSTx (Fig. 10B). Durante julio a agosto que también se detectó una concentración alta de toxinas DSTx, la abundancia relativa de *Dinophysis* fue de aproximadamente 5 % durante este periodo.

La cantidad total de toxinas tipo DSTx estuvo representada mayormente por el AO, al ser la toxina con una concentración mucho mayor que las PTX y DTX (c.f. Tabla II). Este último grupo de toxinas (DTX2) se detectó solo en cuatro muestras. Por otro lado, las PTX estuvieron presentes en la mayoría de las muestras que resultaron positivas para AO. La concentración de PTX respecto al AO (PTX/AO) fue muy variable. La cantidad relativa de PTX detectada respecto al AO fue de entre 0 y un 50 %. A pesar de la variabilidad de la razón PTX/AO, se detectaron dos patrones de esta relación. Existe un conjunto de muestras donde la pendiente de la relación entre de PTX a AO es relativamente baja ($[PTX] = -0 + 0.084 [AO]$, $r^2 = 0.71$) y otro donde es alta ($[PTX] = -0.18 + 0.018 [AO]$, $r^2 = 0.91$; Fig. 11).

Para reconocer la especie potencialmente productora de PTX se analizó la variación de la relación PTX/AO respecto a la variación de las especies más abundantes de *Dinophysis*. La variación en la concentración de PTX presentó un comportamiento similar al del AO. Las PTX se detectaron hasta el mes de junio con una concentración de aproximadamente $17 \mu\text{g kg}^{-1}$ y aumentó en los meses posteriores superando los $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ en julio (c.f. Tabla II). En el mes de octubre las PTX rebasaron los $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabla II), hecho que coincide con la alta abundancia de *D. fortii* en superficie y 10 metros.

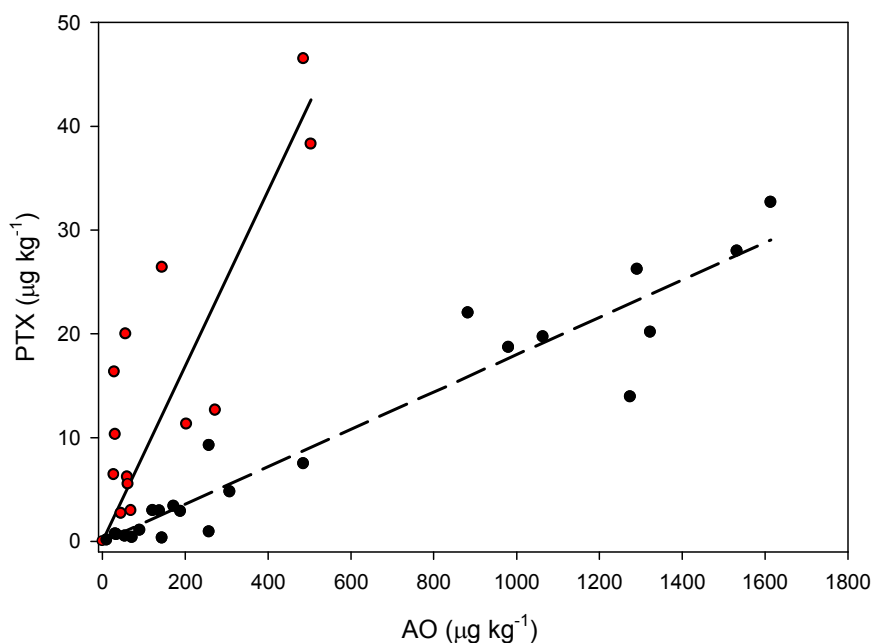


Figura 11. Relación entre la concentración de AO y PTX en mejillones cultivados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Los símbolos rojos representan las muestras que presentaron una relación PTX a AO mas alta ($[PTX] = -0 + 0.084 [AO]$, $r^2 = 0.71$) que el resto de las muestras (símbolos negros; $[PTX] = -0.18 + 0.018 [AO]$, $r^2 = 0.91$)

Sin embargo, cuando se analizó la variación de la razón PTX a AO con el tiempo y su relación con la presencia de las diferentes especies de *Dinophysis* (Fig. 12), se detecta que la mayor producción de PTX estuvo asociada a *D. acuminata*. El periodo en el cual se presentaron las abundancias mayores de esta especie coincide con el periodo en el que se detectaron las razones PTX/AO más altas (Fig. 12). La falta de coincidencia de la presencia de *D. fortii* durante los meses de junio y julio con las relaciones altas de PTX/OA, confirma que *D. acuminata* es la especie responsable de una acumulación relativa mayor de PTX en las muestras de mejillón (Fig. 12).

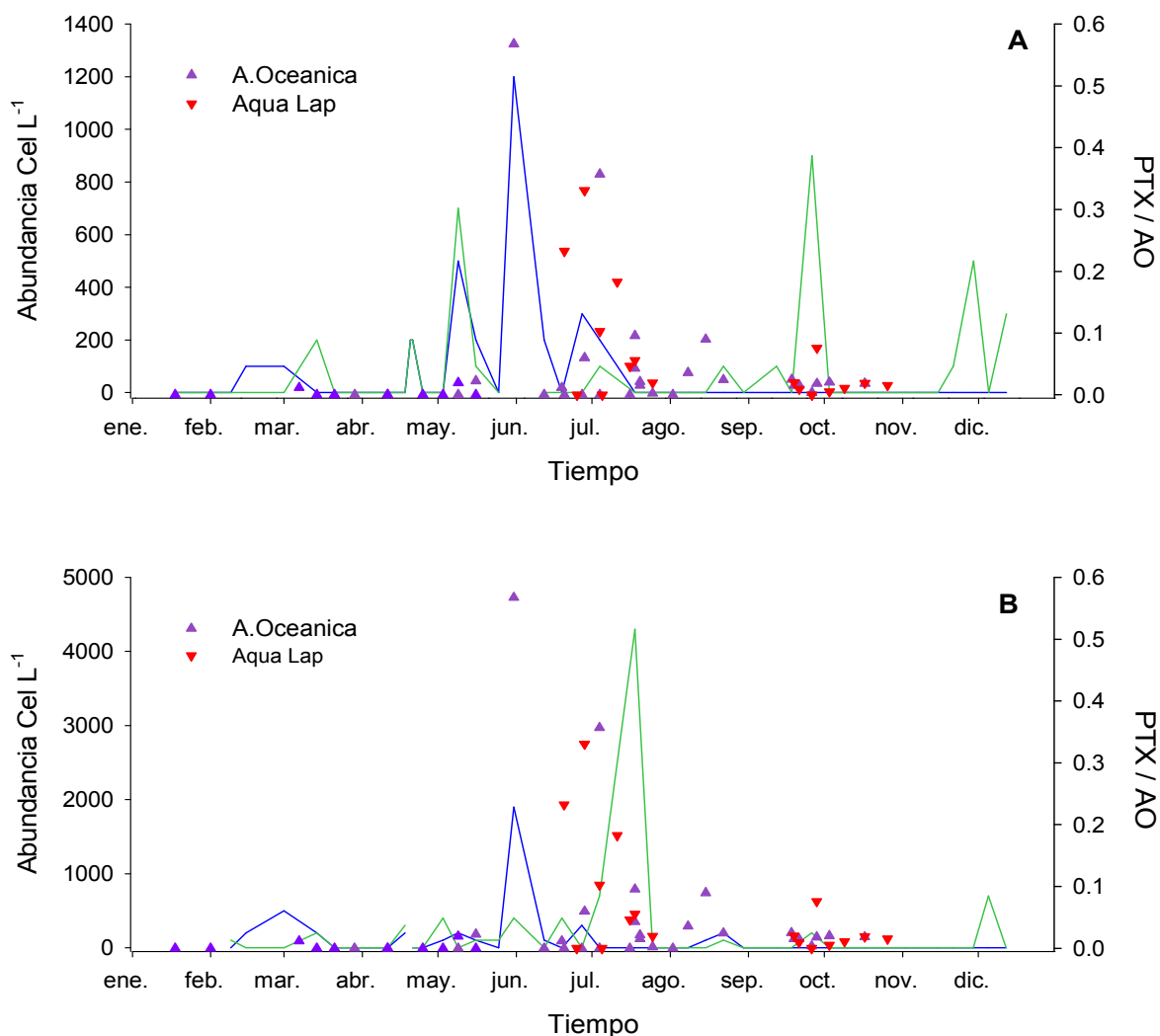


Figura 12. Variación de la razón PTX/AO en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos durante enero a diciembre del 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de *Dinophysis acuminata* (línea azul) y *Dinophysis fortii* (línea verde) detectadas en superficie (A) y 10 m de profundidad (B).

VI.III.II. YESOTOXINAS

Otro grupo importante de toxinas lipofílicas son las yesotoxinas, de las cuales se detectaron varios análogos (hYTX, OHYTX y OH h YTX; c.f. Tabla II). La variación de la concentración de este grupo de toxinas presentó una temporalidad muy marcada. Las

concentraciones más altas se detectaron de junio a agosto con valores de entre 0.1 y más de 1 mg/kg (Fig. 13). Posterior a este periodo, disminuye la concentración de YTXs y vuelven a presentarse muestras positivas entre los meses de octubre a noviembre con concentraciones menores a los 0.2 mg/kg (Fig. 13). Las altas concentraciones las YTX coinciden con una alta abundancia de dinoflagelados que se presentaron una semana antes de la detección de estas toxinas. *Lingulodinium polyedrum* has sido reconocida como una especie productora de YTX en el área de la Jolla en San Diego, USA (Howard *et al.*, 2008). En el periodo de muestreo de este estudio *L. polyedrum* no se presentó en concentraciones importantes, Como se describió en la sección VI.I.I. La abundancia mayor de organismos ($20 \times 10^3 \text{ Cel} \cdot \text{L}^{-1}$) de esta especie se presentó hasta el mes de noviembre. Por lo tanto, la presencia de YTX no se puede asociar a la presencia de *L. polyedrum* (Fig. 13B). Sin embargo, durante el periodo de muestreo se presentaron dos especies de dinoflagelados que contribuyeron significativamente a la abundancia total de este grupo durante el mes de junio, estos fueron *Ceratium furca* y *Prorocentrum micans*. La primer especie presentó una abundancia el día 31 de mayo de $45,000 \text{ Cel L}^{-1}$ y $14,400 \text{ Cel L}^{-1}$ en superficie y a 10 m de profundidad, respectivamente. Posteriormente presentó abundancias importantes en dos ocasiones, el 27 de junio presentó una abundancia de aproximadamente 9000 Cel L^{-1} y el 5 diciembre superó las 25000 Cel L^{-1} , en ambos casos en superficie. Respecto a la abundancia relativa, durante marzo y mayo *C. furca* representó más del 70% de los organismos detectados en muestras de red, posteriormente en junio alcanza el 20% y durante los últimos tres meses de muestreo varió entre el 1% y el 20%. *Prorocentrum micans* presentó su máxima abundancia durante el 1 de marzo con aproximadamente 12000 Cel L^{-1} en superficie y 20000 Cel L^{-1} a 10 metros de profundidad. El 31 de mayo aparece con poco más de 10000 Cel L^{-1} en ambas profundidades y finalmente el 4 de julio alcanzó una

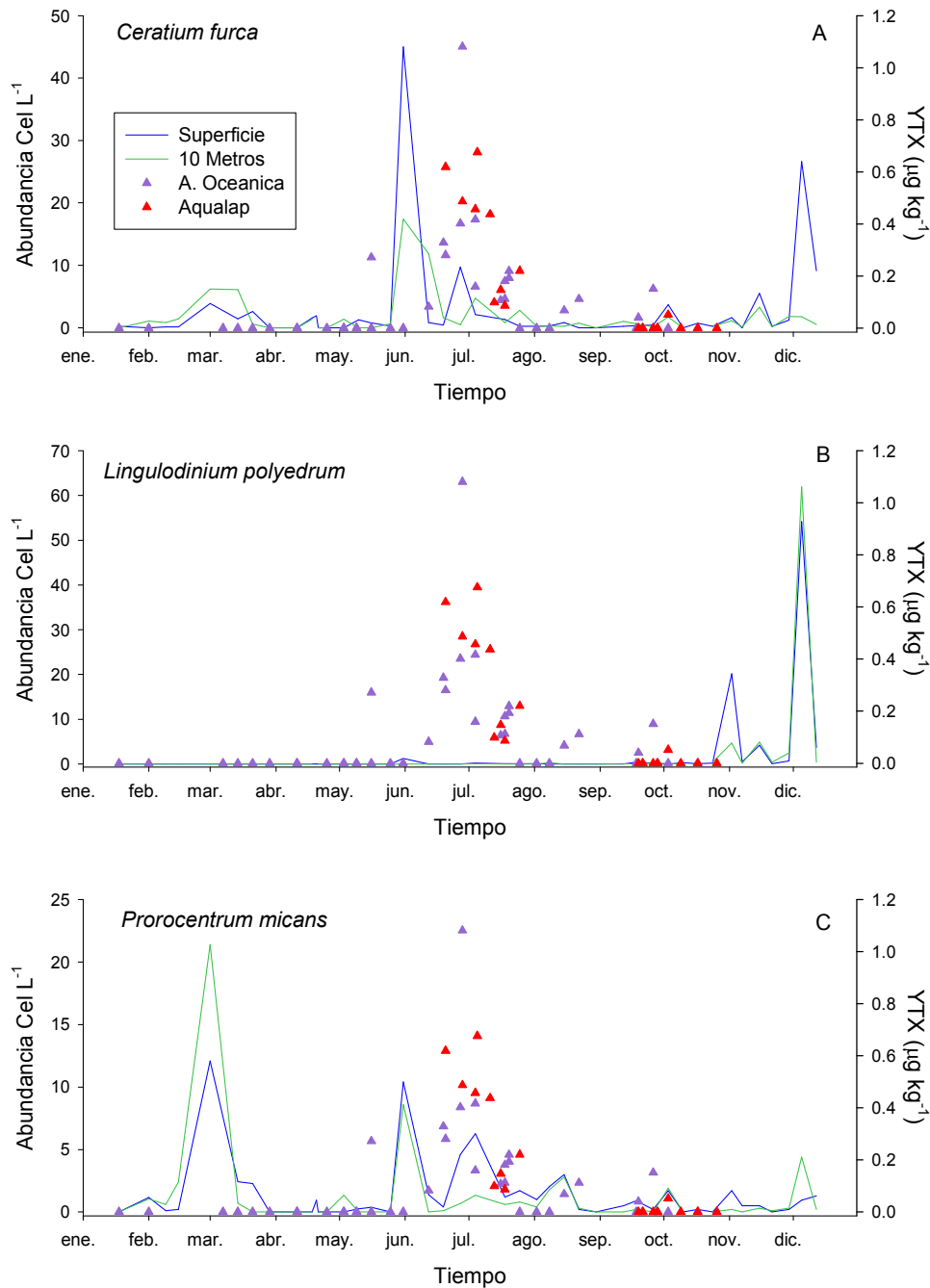


Figura 13. Concentración de yesotoxinas (mg/kg) en muestras de cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectados en la región de Rincón de Ballenas durante enero a-noviembre 2012. Las muestras se colectaron en dos zonas de cultivo (A. Oceánica y Aqualap). Las líneas continuas representan la abundancia absoluta de tres especies de dinoflagelados, *Ceratium furca* (A), *Lingulodinium polyedrum* (B) y *Prorocentrum micans* (C) detectadas en superficie (línea azul) y 10 m de profundidad (línea verde).

abundancia superficial de 6000 Cel L⁻¹. Esta especie mostró una abundancia relativa baja con un máximo del 20% en marzo; el resto del año permaneció por debajo del 10% de la población fitoplanctónica.

Como se observa en la figura 13 las YTX estuvieron presentes principalmente durante los meses de junio y julio, aproximadamente de 1 a 2 semanas antes de presentarse la abundancia máxima de *Ceratium furca* en superficie, asimismo coincide con una abundancia mayor a las 5,000 Cel L⁻¹ de *Prorocentrum micans*. Sin embargo, ninguna de estas especies ha sido reportada como tóxica, por lo que se necesita probar que las YTX son producidas por alguna de estas especies.

VI.III.III. IMINAS CÍCLICAS

Además del grupo de las toxinas con mayor concentración como las DSTx y YTX, también se detectaron a los espirólidos y las gymnodiminas, ambos pertenecientes al grupo de las iminas cíclicas (c.f Tabla II). Los espirólidos (SPX1) fueron detectados en la mayoría de las muestras pero la variación de su concentración no presentó un patrón estacional evidente (Fig. 14). La concentración más alta se detectó a finales de marzo con una concentración máxima de aproximadamente 5 µg kg⁻¹ y disminuye en los meses subsecuentes variando su concentración alrededor de los 1.5 µg kg⁻¹ durante el resto del año. Asimismo, no se observó una tendencia diferente en muestras provenientes de las dos áreas de cultivo (Fig. 14) que se localizan en Rincón de Ballenas.

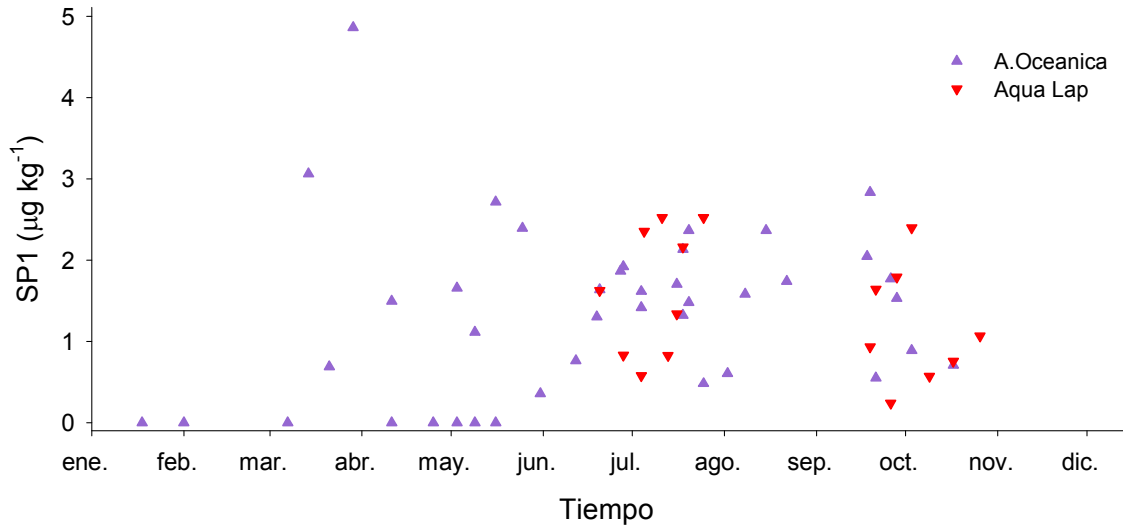


Figura 14. Concentración de espirólidos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de cuerpo entero de mejillón mediterráneo colectadas en la región de Rincón de Ballenas durante enero a noviembre de 2012.

La especie reconocida como productora de espirólidos es *Alexandrium ostenfeldii* (Pulido *et al.*, 2011). En las muestras de fitoplancton no se detectó a esta especie u otra especie de este género, por lo que no se logró asociar la presencia de SPX1 a un organismo en particular.

El otro tipo de imina cíclica detectada en las muestras, la gimnodimina (GYM), se detectó en menos muestras en comparación con los SPX1. En contraste con los SPX1, la GYM presentó un patrón estacional de variación. Se detectaron muestras con GYM a finales de junio y durante julio con concentraciones de $1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ aproximadamente (Fig. 15). Posteriormente, en septiembre y principios de octubre se detectan las concentraciones más altas de esta toxinas ($3.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ aproximadamente) en muestras colectadas de las dos áreas de cultivo.

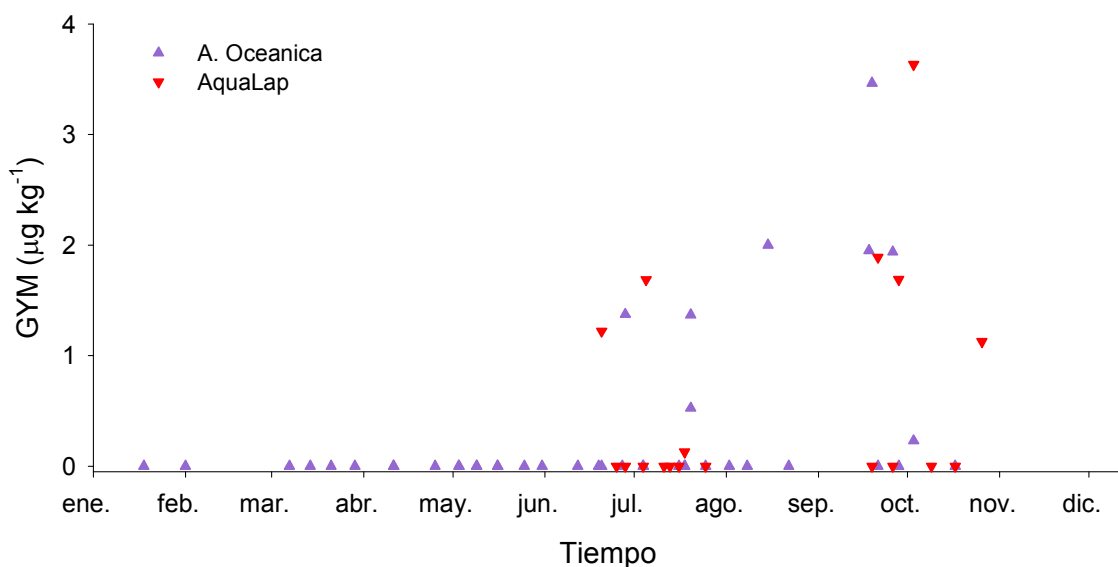


Figura 15. Concentración de gimnodiminas ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en mejillón mediterráneo procedente de la región de Rincón de Ballenas.

No se logró asociar la presencia de las GYM con un organismo en particular. La especie reconocida como productora de GYM es *Karenia selliformis* (Pulido *et al.*, 2011), y aunque se han identificado especies de *Karenia* com. per.¹, no se detectaron organismos de este género durante el periodo de muestreo de este trabajo.

VI.IV. REGULACIÓN

El bioensayo en ratón es el método de referencia en México para el monitoreo de toxinas de tipo diarreico (DSTx), únicas toxinas de tipo lipofílico consideradas dentro de la NOM-SSA-242-2009. Sin embargo, no existe un protocolo normado por medio de bioensayo en ratón para la detección de estas toxinas. Este método puede presentar problemas de selectividad e inespecificidad, por lo que ante resultados positivos es necesario realizar la

¹ Dr. José Luis Peña Manjarrez. Jefe del Departamento de Investigación. CETMAR No. 11. Ensenada, B.C.

confirmación de las toxinas por métodos analíticos y en específico, por LC-MS/MS, que ya es reconocido como método de referencia en la Unión Europea.

Se analizó la especificidad de los dos protocolos de bioensayo en ratón utilizados en el laboratorio FICOTOX en la detección de toxinas de tipo diarreico (DSP). En las tablas IV y V se presentan los resultados obtenidos por bioensayo en ratón utilizando el protocolo de extracción de toxinas presentes en hepatopáncreas de moluscos bivalvos, los resultados utilizando la extracción de toxinas en cuerpo completo y los resultados obtenidos por LC-MS/MS en ambos sistemas (XEVO-TQ y XEVO-TQS). Para la comparación entre los diferentes métodos, la suma de las concentraciones de AO, DTX y PTX medidas por LC-MS/MS mayores a los 160 $\mu\text{g AO-eq kg}^{-1}$ se catalogaron como muestras positivas.

Tabla IV. Comparación de los resultados de la presencia de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón utilizando el protocolo de extracción en hepatopáncreas (HP) y en cuerpo completo (CC) con los resultados de toxinas de tipo diarreico detectadas por LC-MS/MS (Xevo- TQ)

ID	FECHA (M/D/A)	HP	OC	Total OA/DTXs/PTXs ($\mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$)	Total YTXs (mg YTX-eq kg^{-1})
1	1/18/2012	(-)		117.94	
2	02/01/2012	(-)		35.36	
3	03/01/2012	(-)			
4	03/07/2012	(-)		91.18	
5	3/14/2012	(-)		49.59	
6	3/21/2012	(+)		51.32	
7	3/29/2012	(+)**		22.04	
8	04/11/2012			10.78	
8 B	04/11/2012	IN *	(+)***	8.07	
9	4/18/2012	(+)		9.66	
10	05/03/2012			0.00	
10 B	05/03/2012	(+)**		34.55	
11	05/09/2012			29.21	
11 B	05/09/2012	(+)**	(+)***	34.55	
12	5/16/2012			31.89	0.27
12 B	5/16/2012	(-)	(-)	48.99	0.27
13	5/25/2012	(+)	(-)	0.15	0.00
14	5/31/2012	(-)	(-)**	45.09	0.00
15	06/12/2012	(+)	(-)	17.31	0.08

16	6/19/2012	(+)	(-) ***	11.96	0.33
17	6/20/2012	(+)	(+)	34.06	0.62
18	6/20/2012	(+)**	(+)		
19	6/20/2012	(+)	(-)	15.80	0.28
20	6/25/2012	(-)			
21	6/25/2012	(-)	(-)		
22	6/27/2012	(-)	(-) ***	9.29	0.40
23	6/28/2012	(+)	(+)	41.43	0.49
24	6/28/2012	(+)	(+)	47.59	1.08
25	07/04/2012	(+)	(-) ***	8.09	0.16
26	07/04/2012	(+)		66.38	0.46
27	07/04/2012	(+)		75.92	0.42
28	07/05/2012	(+)	(+)	15.66	0.68
29	07/11/2012	(+)	(-)	0.00	
30	07/11/2012	(+)**	(-)	170.93	0.44
31	7/13/2012	(-)	(-)	0.00	0.10
32	7/13/2012	(+)**	(-)	0.00	
33	7/16/2012	(+)**	(+)	285.00	0.15
34	7/16/2012	(+)	(-)	8.58	0.11
35	7/18/2012	(+)	(+)	72.10	0.18
36	7/18/2012	(+)**	(-)	214.48	0.09
37	7/18/2012	(+)**	(-)	532.18	0.11
38	7/20/2012	(-)	(-)	191.37	0.22
39	7/20/2012	(-)	(-)	140.74	0.19
40	7/25/2012	(+)**	(+) ***	144.53	0.00
41	7/25/2012	(+)	(-)	175.57	0.22
42	7/25/2012	(-)	(-)	0.00	
43	08/02/2012	(+)	(-)	7.13	0.00
44	08/08/2012		(-)	266.78	0.00
45	8/15/2012	(-)	(-)	67.08	0.07
46	8/15/2012	(-)	(-)	0.00	
47	8/22/2012	(-)	(-)	124.46	0.11
48	09/12/2012	(+)	(+)	0.00	0.00
49	9/18/2012			905.14	0.00
50	9/19/2012		(+)	1317.65	0.00
51	9/19/2012		(+)	1343.40	0.04
52	9/21/2012		(-)	54.89	0.00
53	9/21/2012		(-)	493.33	0.00
54	9/26/2012		(-)	87.12	0.00
55	9/26/2012		(-)	258.56	0.15
56	9/28/2012		(-)	542.07	0.00
57	9/28/2012		(+)	1560.51	0.00
58	10/03/2012		(-)	71.94	0.05
59	10/03/2012		(+)	1647.06	0.00
60	10/09/2012		(+)	1288.67	0.00
61	10/17/2012		(+)	1083.91	0.00
62	10/17/2012		(+)	999.49	0.00
67	10/26/2012		(+)	312.42	0.00

* Muerte por mala inyección: Muestra Invalida

**Muerte rápida: < 1 Hora

***Presencia de síntomas tipo neurotóxicos 10min póstumos a inyección

SA: Sacrificio tras la muerte de 2 de 3 ratones

Tabla V. Comparación de los resultados de la presencia de toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón utilizando el protocolo de extracción en hepatopáncreas (HP) y en cuerpo completo (CC) con los resultados de toxinas tipo diarreico detectadas por LC-MS/MS (Xevo- TQS)

ID	FECHA (M/D/A)	HP	CC	Total OA/DTXs/PTXs ($\mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$)
1	1/18/2012	(-)		
2	2/01/2012	(-)		
3	3/01/2012	(-)		
4	3/07/2012	(-)		
5	3/14/2012	(-)		
6	3/21/2012	(+)		
7	3/29/2012	(+)**		12.20
8	4/11/2012	IN *	(+)***	1.81
9	4/18/2012	(+)		
10	5/03/2012	(+)**		1.09
11	5/09/2012	(+)**	(+)***	24.27
12	5/16/2012	(-)	(-)	20.23
13	5/25/2012	(+)	(-)	3.26
14	5/31/2012	(-)	(-)**	29.82
15	6/12/2012	(+)	(-)	20.39
16	6/19/2012	(+)	(-)**	2.34
17	6/20/2012	(+)	(+)	20.20
18	6/20/2012	(+)**	(+)	
19	6/20/2012	(+)	(-)	16.08
20	6/25/2012	(-)		
21	6/25/2012	(-)	(-)	
22	6/27/2012	(-)	(-)**	5.72
23	6/28/2012	(+)	(+)	45.35
24	6/28/2012	(+)	(+)	0.20
25	7/04/2012	(+)	(-)**	1.69
26	7/04/2012	(+)		72.16
27	7/04/2012	(+)		67.76
28	7/05/2012	(+)	(+)	6.88
29	7/11/2012	(+)	(-)	
30	7/11/2012	(+)**	(-)	205.07
31	7/13/2012	(-)	(-)	1.90
32	7/13/2012	(+)**	(-)	
33	7/16/2012	(+)**	(+)	309.80
34	7/16/2012	(+)	(-)	3.03
35	7/18/2012	(+)	(+)	77.92
36	7/18/2012	(+)**	(-)	241.72
37	7/18/2012	(+)**	(-)	688.30
38	7/20/2012	(-)	(-)	235.72
39	7/20/2012	(-)	(-)	174.39
40	7/25/2012	(+)**	(+)**	221.07
41	7/25/2012	(+)	(-)	170.38
42	7/25/2012	(-)	(-)	
43	8/02/2012	(+)	(-)	3.16
44	8/08/2012		(-)	466.10
45	8/15/2012	(-)	(-)	62.90
46	8/15/2012	(-)	(-)	
47	8/22/2012	(-)	(-)	169.49
48	9/12/2012	(+)	(+)	
49	9/18/2012			1314.07
50	9/19/2012		(+)	1989.35
51	9/19/2012		(+)	1768.52

52	9/21/2012	(-)	59.1
53	9/21/2012	(-)	789.14
54	9/26/2012	(-)	134.58
55	9/26/2012	(-)	337.82
56	9/28/2012	(-)	758.01
57	9/28/2012	(+)	2215.16
58	10/03/2012	(-)	96.44
59	10/03/2012	(+)	2344.34
60	10/09/2012	(+)	1817.04
61	10/17/2012	(+)	1625.54
62	10/17/2012	(+)	1285.46
67	10/26/2012	(+)	453.25

* Muerte por mala inyección: Muestra Invalida

**Muerte rápida: < 1 Hora

***Presencia de síntomas tipo neurotóxicos 10min póstumos a inyección

SA: Sacrificio tras la muerte de 2 de 3 ratones

Es evidente la concordancia entre los resultados por las pruebas de ratón con los resultados por LC-MS/MS, pero asimismo, se evidencia la ocurrencia de falsos positivos y falsos negativos en ambos tipos de bioensayo (Tabla VI). Un falso positivo es la obtención de un resultado positivo por prueba en ratón cuando la concentración de toxinas tipo DSTx fue menor a de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$. Por otro lado, un falso negativo es la obtención de un resultado negativo cuando la concentración de toxinas rebasa el nivel regulatorio.

La comparación de las concentraciones obtenidas por el sistema Xevo-TQS y el bioensayo por hepatopáncreas demuestra que de un total de 37 muestras medidas por los dos métodos solamente 16 resultados concuerdan (43%). De las muestras en las que los resultados no concuerdan, 20 fueron falsos positivos y se presentó solo 1 falso negativo (Tabla VI). Por lo tanto, del 57 % de errores en las determinaciones la mayoría se debe a la presencia de falsos positivos (Tabla VI).

La evaluación del bioensayo a partir del cuerpo completo mostró que de 43 muestras medidas con este protocolo y el LC-MS/MS, 26 determinaciones concuerdan (60.5 %). De las muestras que no concuerdan se detectaron solo 8 falsos positivos, pero el número de falsos negativos fue de 9. Este protocolo presentó una concordancia mucho mayor con el LC-MS/MS en comparación con el bioensayo usando el hepatopáncreas, pero asimismo, presentó una mayor proporción de falsos negativos. El porcentaje de concordancia ente los protocolos de bioensayo en ratón y los resultados obtenidos mediante los dos sistemas de LC-MS/MS fueron similares (Tabla VI).

Tabla VI. Concentrado de los resultados de la comparación de la detección de toxinas de tipo diarreico (DSTx) por medio de bioensayo en ratón con extracción en hepatopáncreas (HP) y cuerpo entero (CC) con respecto a resultados obtenidos por LC-MS/MS en dos sistemas cromatográficos (XEVO-TQ y XEVO-TQS).

	XEVO - TQ		XEVO-TQS	
	HP	CC	HP	CC
TOTAL	37	43	31	43
FALSOS POSITIVOS	20	8	17	7
FALSOS NEGATIVOS	1	9	3	11
COINCIDENCIAS	16	26	11	26
% ERROR	57	39.5	64.5	41.8

Durante el 2012, la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) implementó tres vedas sanitarias en la zona de Rincón de Ballenas a partir de resultados positivos en bioensayo en ratón (BER) en muestras de mejillón. Del 4 al 16 de abril se implementó la primera veda al obtenerse resultados positivos por bioensayo en ratón mediante protocolo interno de la Comisión Analítica y Ampliación de Cobertura

(CCAYAC) de la COFEPRIS. Posteriormente, del 29 de junio al 31 de julio se implementó otra veda sanitaria al detectarse muestras positivas por el protocolo en extracción en hepatopáncreas en el laboratorio FICOTOX. La última veda fue del 17 de septiembre al 16 de noviembre por resultados positivos en bioensayo en ratón con extracción por cuerpo completo (Fig. 16).

Los resultados de los bioensayos en muestras analizadas dentro del marco del Programa Mexicano de Sanidad de Molusco Bivalvos (PMSMB) que dieron origen a las vedas descritas anteriormente, se comparan con los resultados obtenidos en este trabajo. Considerando los resultados obtenidos con el BER basado en la extracción del hepatopáncreas, la zona de Rincón de Ballenas se habría mantenido cerrada desde el 21 de marzo del 2012 hasta el 22 de agosto del mismo año (Fig. 16A). Se considera el levantamiento de la veda sanitaria cuando se presentan dos resultados negativos consecutivos de acuerdo al apéndice 9 de la guía del PMSMB. Esto implica que la actividad de producción de moluscos en el área hubiera estado cerrada por 6 meses al considerar los resultados de este protocolo. Posteriormente se presentó otro resultado positivo el 12 de septiembre, lo que conllevaría a otro periodo de veda (Fig. 16A). La duración de la misma no se puede inferir ya que no se realizaron más determinaciones por el protocolo en hepatopáncreas ya que no se contó con el número de organismos suficientes para este tipo de prueba.

Puesto que la última veda se implementó con base a resultados en BER a partir del cuerpo completo del molusco, los periodos de cierre incluyendo los resultados de muestras de este trabajo y el implementado por la COFEPRIS son muy similares (Fig. 16B). La primer muestra positiva a partir de BER por cuerpo completo es del 11 de abril y posteriormente se presentó otra muestra positiva el 9 de mayo, pero no se tuvieron

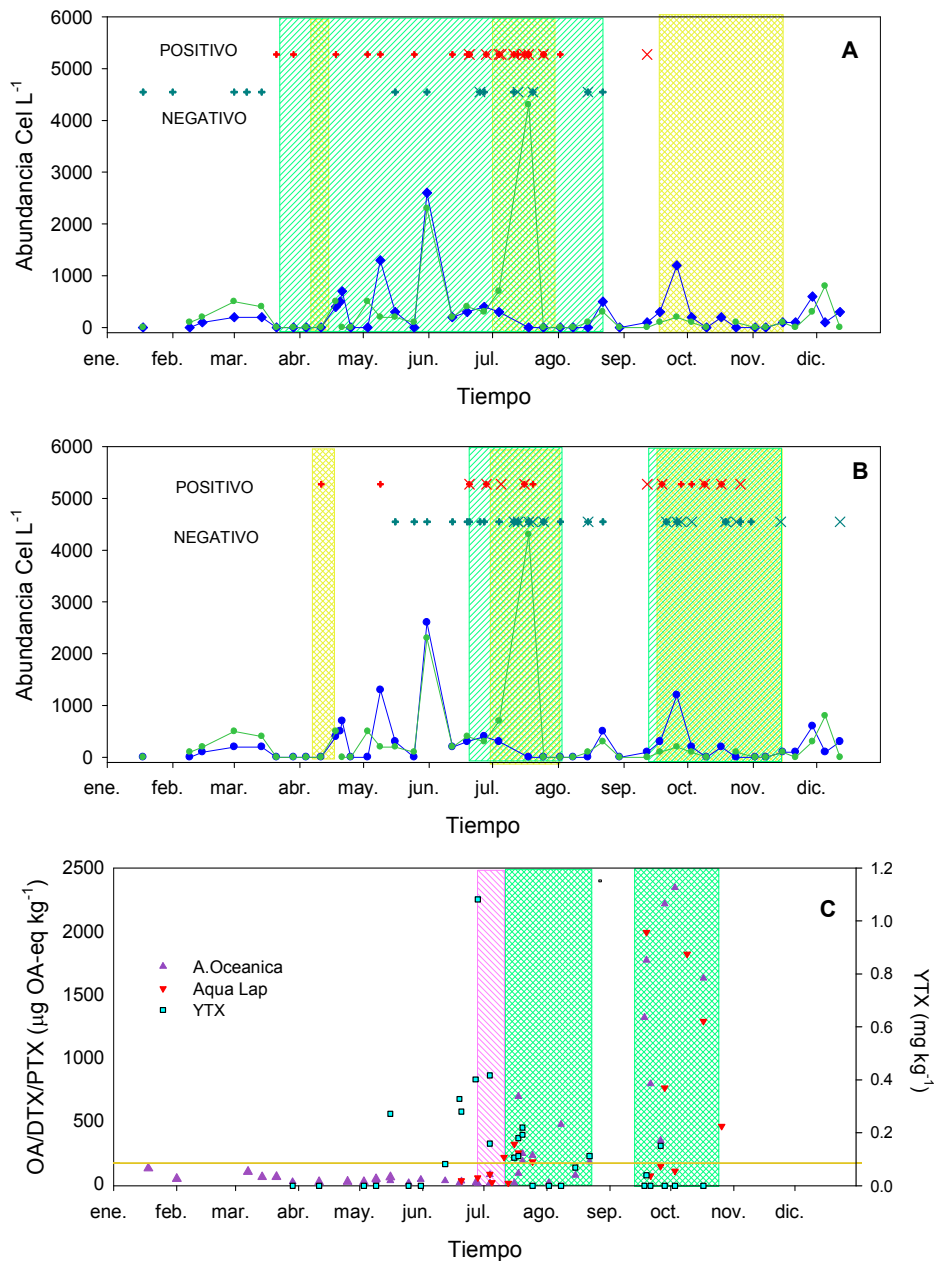


Figura 16. Periodos de cierre de la zona de cosecha del área de Rincón de Ballenas por vedas sanitarias implementadas por la COFEPRIS (Barras color amarillo). Se presentan asimismo los periodos de cierre que correspondieran a los resultados obtenidos por medio de bioensayo en ratón por HP (Barras color verde; A), bioensayo en ratón por cuerpo completo (Barras color verde; B). De igual manera de acuerdo a los resultados por LC-MS/MS, se presentan las vedas que corresponderían a la presencia de yesotoxinas (Barras color rosa; C) y por la presencia de toxinas de tipo diarreico (Barras color verde; C), tomando como referencia el nivel regulatorio establecido (Línea continua amarilla).

determinaciones intermedias por lo que no es posible inferir la duración de este primer periodo de veda (Fig. 16B). En el segundo periodo solo existió una discrepancia de una semana entre la implementación oficial con la obtención de resultados positivos por bioensayo en ratón en cuerpo completo (Fig. 16B).

De las toxinas detectadas por LC-MS/MS, dos grupos de ellas estarían relacionadas con una acción sanitaria ya que superaron el nivel máximo permitido en la regulación nacional. En la figura 16C se muestran los periodos de veda asociadas a las concentraciones detectadas del DSTx y de las YTX. Estas vedas no coinciden del todo con los periodos de cierre implementados por la COFEPRIS con base a los resultados del BER. No se detectaron concentraciones de AO o YTX arriba del nivel regulatorio a principios de año. Por lo tanto, el primer cierre de la zona de cosecha se implementó con base en falsos positivos por el BER, los cuales se presentaron tanto en extracto de hepatopáncreas como de cuerpo completo. En una muestra se detectó una concentración de YTX arriba de 1 mg kg^{-1} el día 28 de junio lo que hubiera originado un cierre en la zona por un par de semanas al menos.

Se detectó una concentración de toxinas tipo DSTx (AO+DTX+PTX) de más de $500 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ del 11 de julio al 7 de agosto, esto es una semana después de haberse implementado el segundo cierre oficial por parte de la COFEPRIS en la región. Las concentraciones detectadas por LC-MS/MS fueron menores al nivel regulatorio hasta una semana después de ser reabierto la zona de cosecha (Fig. 16C). Por lo tanto, el periodo de veda con base a LC-MS/MS hubiera sido del 25 de junio al 22 de agosto. Esto representa una semana de retraso y es 22 días más largo que el implementado con base a los resultados del BER.

Del 17 de septiembre al 26 de octubre las concentraciones de toxinas lipofílicas vuelven a incrementarse superando el nivel regulatorio, lo cual coincide con el último periodo en el que la región de Rincón de Ballenas fue cerrada por la COFEPRIS. La implementación de la veda de acuerdo a los resultados por LC-MS/MS hubiera comenzado al menos (no se tiene muestras de las dos semanas anteriores) el día 18 de septiembre. No se puede inferir la fecha de apertura del área, ya que hasta el 26 de octubre aún se detectaron concentraciones arriba del nivel regulatorio ($453.2 \mu\text{g OA-eq kg}^{-1}$; Fig. 16A) y posterior a esta fecha ya no se realizaron análisis por espectrometría de masas. Suponiendo que en las dos fechas de muestreo posterior al 26 de octubre los resultados por LC-MS/MS hubieran sido menores al nivel regulatorio, los periodos de veda implementados con base a resultados de este método y BER hubieran sido muy similares. El cierre con base a BER se implementó solamente una semana antes del que se hubiera implementado por LC-MS/MS.

VII. DISCUSION

VII.I. COMUNIDAD FITOPLANCTÓNICA Y VARIABLES AMBIENTALES

Las diatomeas dominaron la comunidad fitoplanctónica la mayor parte del 2012. Este grupo representó más del 90% de los organismos detectados durante casi todo el año, excepto en marzo, junio y finales de agosto, donde los dinoflagelados representaron entre el 60 % y 80 % de la comunidad fitoplanctónica.

En general, la abundancia total de especies fue similar entre los 0 y 10 m de profundidad. Ya que no se detectaron florecimientos de dinoflagelados durante el 2012, las abundancias máximas durante este año fueron mucho menores que las reportadas para otros años. Cuando existen estos fenómenos en la Bahía, se han documentado abundancias de hasta 10^6 Cel L⁻¹ asociadas a la presencia de *Lingulodinium polyedrum* (Peña-Manjarrez, 2009) o de hasta 4×10^6 Cel L⁻¹ en un florecimiento de *Ceratium divaricatum* (García-Mendoza *et al.*, 2009). Por lo tanto, los cambios en la biomasa fitoplanctónica durante el 2012 estuvieron principalmente relacionados con la variación en la abundancia de las diatomeas.

Las diatomeas presentaron una abundancia de hasta 500×10^3 Cel L⁻¹ en los primeros meses del año y el máximo se detectó a finales de abril con 800×10^3 Cel L⁻¹ en superficie y 1200×10^3 Cel L⁻¹ a 10 m. Las altas abundancias de diatomeas estuvieron relacionadas a bajas temperaturas en superficie (12 a 15 °C) y a una mezcla de la columna de agua desde la superficie hasta los 10 metros. La diferencia de temperatura del agua entre la superficie y 10 m el primer cuatrimestre del año fue de 1 a 2 °C. Peña-Manjarrez, (2008) reporta que en los inviernos del 2002 al 2005 la temperatura superficial máxima registrada fue de aproximadamente 14 °C.

Durante la primavera se observó la formación de la termoclina estacional y la temperatura superficial se incrementó. Las temperaturas superficiales máximas se presentaron en agosto y fueron de entre 21 °C y 22 °C, tanto en Rincón de Ballenas como en el área de la Isla de Todos Santos con una influencia más oceánica. En verano y parte del otoño se observó una fuerte estratificación en la columna de agua con una diferencia de hasta 8 °C entre la superficie y los 10 m. Paralelo al incremento de la temperatura al final de la primavera, la abundancia de las diatomeas disminuyó y después del mes de agosto ésta no fue mayor que las $200 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$ en ambas profundidades.

Las condiciones para el crecimiento de las diatomeas y la sucesión de grupos fitoplanctónicos se ha descrito ampliamente para el sistema de la Corriente de California y para otras regiones templadas o márgenes occidentales con influencia de surgencias (Pennington y Chávez, 2000; Trainer *et al.*, 2010). Aguas frías con concentraciones altas de nutrientes promueven el crecimiento de las diatomeas y en condiciones de estratificación de la columna de agua, los dinoflagelados dominan la comunidad fitoplanctónica (Pennington y Chávez, 2000). Cuando se presentan surgencias la comunidad fitoplanctónica suele estar dominada por diatomeas de gran tamaño como *Chaetoceros*, *Pseudo-nitzschia* y *Nitzschia* (Pennington y Chávez, 2000). Posterior a estos eventos, existe un cambio de la estructura de la comunidad fitoplanctónica donde predominarán diatomeas más pequeñas y dinoflagelados debido a una disminución de nutrientes inorgánicos (Pennington y Chávez, 2000; Trainer *et al.*, 2010).

Aún cuando en verano y parte del otoño existió una fuerte estratificación en el área de estudio, no se presentaron florecimientos algales de dinoflagelados en el 2012. La abundancia máxima de este grupo fue de $70 \times 10^3 \text{ Cel L}^{-1}$; sin embargo, la presencia de

algunas especies con potencial tóxico de este grupo impactó la economía de la región por la implementación de vedas sanitarias, como se discutirá posteriormente.

VII.II. ESPECIES CON POTENCIAL TÓXICO Y NOCIVO

VII.III.I. DIATOMEAS

Del grupo de las diatomeas, la especie con potencial tóxico que se detectó durante el período de muestreo fue *Pseudo-nitzschia australis*. Esta especie fue la más abundante de todos los organismos identificados en la comunidad fitoplanctónica presentándose desde febrero. En abril y mayo se detectaron aproximadamente 200×10^3 Cel L⁻¹. Asimismo, en red especies del género *Pseudo-nitzschia* representaron hasta el 85% de los organismos detectados en muestras de red en algunas fechas de muestreo.

La abundancia máxima de esta especie fue mayor a la reportada (c.a. 380×10^3 Cel L⁻¹) durante un florecimiento de *Pseudo-nitzschia australis* en la región, en el que se detectaron concentraciones de hasta $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido domoico (AD) en material particulado (García-Mendoza *et al.*, 2009). Asimismo, la abundancia fue mayor a la detectada durante los monitoreos realizados en el laboratorio FICOTOX durante el 2010 (130×10^3 Cel L⁻¹) en donde se presentaron concentraciones de hasta $8 \mu\text{g L}^{-1}$ de AD en material particulado y hasta $700 \mu\text{g gr}^{-1}$ en vísceras de anchoveta durante el mes de agosto (Ernesto García, datos no publicados). Por otro lado, la abundancia de esta especie fue 350×10^3 Cel L⁻¹ cuando se detectaron concentraciones de AD arriba del nivel regulatorio ($20 \mu\text{gAD g}^{-1}$) en muestras de mejillón durante la primera veda implementada en la región en septiembre del 2011.

Por lo tanto, las abundancias detectadas durante el 2012 debieron estar asociadas a la acumulación de AD en moluscos bivalvos. Sin embargo, en muestras de mejillón tomadas durante este estudio la concentración de AD fue muy baja, (datos no presentados). Una abundancia alta de *Pseudo-nitzschia australis* por tan poco tiempo, probablemente no permitió la acumulación de AD en organismos filtradores. Otra explicación es que la especie de diatomea potencialmente productora de AD no fue *P. australis* o se presentó una cepa de esta especie con un potencial tóxico bajo. Ya que el objetivo de este trabajo se relaciona con toxinas de tipo lipofílico, no se implementó la toma de muestras para medir AD domoico en muestras de material particulado, lo que daría información sobre la producción de AD de las especies detectadas. El monitoreo de *P. australis* y su producción de AD es necesaria debido a su conocido potencial tóxico en la región (García-Mendoza *et al.* 2009; Santiago-Morales y García Mendoza 2011).

VII.II.II. DINOFLAGELADOS

La presencia de algunas especies de este grupo fitoplanctónico tuvo un impacto importante en la economía de la región al producir toxinas consideradas como un riesgo a la salud pública. Los organismos identificados como productores potenciales de toxinas fueron *Lingulodinium polyedrum* y varias especies de género *Dinophysis*. Estas especies producen toxinas lipofílicas. *L. polyedrum* fue la especie dominante durante el mes de noviembre pero no alcanzó las abundancias usualmente detectadas durante los florecimientos de esta especie en la BTS.

En el caso de *Dinophysis*, se identificaron siete especies: *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. sp. cf. mitra*, *D. sp. cf. odiosa*, *D. rotundata* y *D. tripos*. Estas especies han sido

descritas para diferentes regiones del Pacífico mexicano y existen varios reportes de su presencia en diferentes costas del país (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006). *Dinophysis* es un género cosmopolita que consiste de aproximadamente 100 especies (Gómez, 2005). En el de trabajo de revisión de los dinoflagelados presentes en las costas del Pacífico mexicano, Okolodkov y Gárate-Lizárraga (2006) reporta 35 especies de *Dinophysis*, lo que indica una alta riqueza de especies de este género en México. Sin embargo, son pocos los trabajos sobre la descripción de especies de este género para la península de Baja California y en específico para la región de la Bahía de Todos Santos.

Una de las descripciones más importantes sobre el género *Dinophysis* en la costa este de Baja California es el trabajo de Hernández-Becerril (1992). Este autor, describe 7 especies de este género en muestras de agua provenientes del Golfo de California. Las especies identificadas en muestreos realizados durante 1984 a 1986 fueron *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. diegensis*, *D. porodictyum*, *D. schuettii*, *D. taylorii* y *D. tripos*. Para la misma región, Lechuga *et al.* (1998) reportaron densidades de *D. caudata* de hasta 90×10^3 Cel l⁻¹ en muestras colectadas entre marzo del 1993 a abril 1994 en Bahía Concepción en Baja California Sur. Existen pocos registros de especies productoras de toxinas lipofílicas en región de la Bahía de todos Santos. Peña-Manjarrez (2008) identificó a 6 especies del género *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. rotundata*, *D. spp.* y *D. tripos*) y Almazán *et al.* (Datos no publicados) identifica aparte de las reportadas por Peña-Manjarrez (2008) a *D. mitra*.

Aún cuando existe una lista extensa de reportes de la presencia de especies del género *Dinophysis* en México (Okolodkov y Gárate-Lizárraga, 2006), existen pocos trabajos sobre la distribución y ecología de especies asociadas a este género potencialmente

productoras de toxinas. Este es el primer trabajo en México enfocado en la caracterización del cambio poblacional de especies del género *Dinophysis* como potenciales productoras de toxinas tipo DSTx y la variación en la concentración de este tipo de toxina en moluscos bivalvos. En varios países y en específico los que tienen una industria importante de producción de moluscos bivalvos, *Dinophysis* se ha convertido en un grupo de especies clave de los monitoreos de fitoplancton, debido al impacto socio-económico que tiene la presencia de toxinas asociadas a especies de este género (Reguera *et al.*, 2012).

Las especies que se presentaron ocasionalmente y en bajas abundancias durante el período de muestreo fueron *D. sp. cf. mitra*, *D. sp. cf. odiosa*, *D. rotundata* y *D. tripos*. Las especies más abundantes y que se detectaron la mayor parte del año fueron *D. fortii* y *D. acuminata*, las cuales estuvieron asociadas a la presencia de AO, DTX y PTX, lo que se discutirá posteriormente. Las abundancias más altas de estas especies se presentaron durante los meses de mayo, julio y septiembre.

D. fortii y *D. acuminata*, entre otras, son especies comunes en las costas del sistema de la Corriente de California, aunque se presentan en bajas abundancias (Sutherland, 2008). La acumulación de estas especies se observa en verano y otoño, asociado con temperaturas superficiales altas, una columna de agua estable y concentraciones de nutrientes bajas (Trainer *et al.*, 2010). *D. fortii* fue la primera especie que se identificó como productora de toxinas tipo DSP (Yasumoto *et al.*, 1980). Por otro lado, *D. acuminata* es la principal especie asociada a la acumulación de toxinas tipo DSTx y responsable de los cierres en la cosecha de moluscos bivalvos en las costas del Atlántico de Europa y especialmente, en las rías de Galicia (NW de España), donde existe una actividad acuícola importante del cultivo de mejillón (Blanco *et al.*, 1998).

En la zona de estudio de este trabajo, las abundancias más altas de *D. fortii* y *D. acuminata* se presentaron en el segundo semestre del año. De enero a junio las abundancias no rebasaron las 500 Cel L⁻¹; sin embargo, en junio la abundancia de *D. acuminata* aumentó hasta las 2,000 Cel L⁻¹ a 10 metros de profundidad y a mediados de junio la población de *D. fortii* superó las 4,000 Cel L⁻¹. Estas abundancias son relativamente bajas comparadas con las reportadas durante eventos de DSP para otras áreas. Por ejemplo, *D. fortii* alcanzó una concentración máxima de 1.1×10^5 Cel L⁻¹ durante un florecimiento en la Bahía Lambert en Sudáfrica (Reguera *et al.*, 2012). Para la misma zona, la abundancia record de *D. acuminata* es de 1.1×10^5 Cel L⁻¹ (Pitcher, 2011). En las rías de Galicia la abundancia record de esta especie es de 75×10^3 Cel L⁻¹ (Escalera *et al.*, 2012). Estas abundancias son mucho mayores comparadas con las abundancias máximas reportadas en este trabajo. Sin embargo, se puede considerar que se presentaron florecimientos de estas especies en la Bahía de Todos Santos durante el 2012. De acuerdo a Escalera *et al.* (2012) un florecimiento algal de *D. acuminata* es cuando se detecta una concentración mayor de las 10^3 Cel L⁻¹. Asimismo, cuando se presenta una abundancia mayor que 1×10^5 Cel L⁻¹ se considera como un pico de abundancia estacional (Escalera *et al.*, 2012). De acuerdo a esta clasificación, existió un florecimiento algal de *D. acuminata* a principios de junio y otro de *D. fortii* a mediados de julio.

La acumulación de especies de *Dinophysis* y en específico de *D. acuminata* se han relacionado a procesos físicos, específicamente a pulsos de surgencia seguido por períodos de estratificación después de la disminución del esfuerzo del viento (Trainer *et al.*, 2010. Reguera *et al.*, 2003 Reguera *et al.*, 2012, Velo-Suarez *et al.*, 2013). Por lo tanto, las poblaciones de *Dinophysis* aumentan cuando existe una estabilidad en la columna del agua

(Maestrini, 1998). Los florecimientos de *D. acuminata* detectados después de junio en este trabajo coinciden con el inicio de la estratificación en la columna de agua después de un período de mezcla vertical presente durante los primeros meses de año. Es necesario investigar si los florecimientos de *Dinophysis* se forman dentro de la Bahía de Todos Santos o afuera de ésta y son transportados por advección horizontal hacia las zonas de cultivo de moluscos bivalvos. Se ha reportado que los florecimientos de *Dinophysis* se originan en la plataforma continental como capas finas (“thin layers”) con alta densidad celular (10^4 a 10^5 Cel L⁻¹) y éstos son transportados hacia el interior de las bahías o hacia la costa después de que el esfuerzo del viento disminuye (Gentien *et al.*, 1995; Moita *et al.*, 2006; Velo-Suárez *et al.*, 2008; Farrell *et al.*, 2010).

Los florecimientos de *Dinophysis* no se explican solamente por la respuesta de las células al forzamiento físico. Se ha observado que una alta densidad del ciliado *Mesodinium rubrum* precede al incremento de la abundancia de *D. acuminata* en el Mar Báltico (Minnhagen, 2010), en el Golfo de México (Campbell *et al.*, 2010) y en las rías de Galicia (Velo-Suárez *et al.*, 2008; González-Gil *et al.*, 2010; Velo-Suarez *et al.*, 2013). El modelo propuesto de la formación de los florecimientos algales de *Dinophysis* en las costas de Galicia establece que *D. acuminata* es advectada por agua de surgencias de la plataforma adyacente a las rías (Velo-Suarez *et al.*, 2013). Estos organismos representan la población semilla y “nadarán” (*D. acuminata* presenta una migración vertical importante como otros dinoflagelados) hacia la picnoclina y se concentrarán en las capas superiores de la columna de agua. En estas capas, *D. acuminata* necesita encontrar a su presa *M. rubrum* para aumentar su población, ya que la alimentación heterotrófica provee los elementos nutricionales (plástidos) necesarios para incrementar su tasa de crecimiento (Kim *et al.*,

2008). Por lo tanto, la interacción entre *D. acuminata* y *M. rubrum* es un elemento clave para la formación y mantenimiento de los florecimientos de esta especie (Velo-Suárez *et al.* 2013). Se necesita investigar si la dinámica poblacional de las especies de *Dinophysis* detectadas en la Bahía de Todos Santos y especialmente las identificadas como productoras de toxinas tipo DSTx (*D. fortii* y *D. acuminata*) concuerda con este modelo propuesto para las Rías de Galicia, por lo que se debe de monitorear la presencia y abundancia de *M. rubrum* en la comunidad fitoplanctónica.

VII.III. TOXINAS LIPOFÍLICAS EN MUESTRAS DE MEJILLON

Se utilizaron dos sistemas de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (Xevo-TQS, Xevo-TQ) para medir la concentración de toxinas lipofílicas en muestras de mejillón. Los resultados de los dos sistemas fueron similares y en este trabajo se reportan principalmente los resultados obtenidos a partir del Xevo-TQ, ya que en el Xevo-TQS se diluyeron las muestras y por lo tanto alguna toxinas no se lograron detectar.

Se detectaron 5 grupos de toxinas diferentes en mejillones colectados en el área de Rincón de Ballenas durante el 2012. Se detectó al ácido okadaico en forma libre y esterificada y a la dinophysistoxina 2 (DTX2). Del grupo de las yesotoxinas se detectaron cuatro análogos diferentes: yesotoxinas (YTX), homo-yesotoxinas (HYTX), 45-Hydroxi-yesotoxina (OHYTX) y 45-Hydroxi-1a-homoyesotoxina (OH hYTX). Asimismo, se detectó a la pectenotoxina 2 (PTX2), espirólido 1 (SPX1) y a la gimnodimina (GYM). Este es el primer reporte en México de la presencia de estos tipos de toxinas lipofílicas en moluscos bivalvos y la confirmación de la presencia de las mismas por métodos analíticos en las costas del Pacífico de Norteamérica.

VII.III.I. TOXINAS DE TIPO DIARREICO (DSTX): ACIDO OKADAICO, DINOFIGISTOXINAS Y PECTENOTOXINAS.

De las diferentes toxinas lipofílicas detectadas en los mejillones colectados en la Bahía de Todos Santos, el AO presentó las concentraciones mayores. La concentración máxima de la suma de AO, DTX1 y PTX2 (DSTx) detectada con el sistema TQS fue de 2317 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$. Esta concentración de DSTx está dentro de intervalo de los niveles reportados en eventos de intoxicaciones diarreicas por consumo de moluscos o durante vedas sanitarias documentadas en otros países. En Grecia se reportó una concentración máxima de hasta 35,000 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ de hepatopáncreas en abril del 2005 (Mouratidou *et al.*, 2006). Posteriormente, se detectaron concentraciones de 508 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ hasta aproximadamente los 40,000 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ durante diciembre del 2006 a mayo del 2007 (Prassopoulou *et al.*, 2009). Las mediciones de estas concentraciones se realizaron por medio de HPLC con detección mediante fluorescencia. En algunos reportes donde la concentración de toxinas tipo DSTx se han medido por medio de LC-MS/MS las concentraciones máximas reportadas son de aproximadamente 12,000 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ en mejillones cultivados en Irlanda (Lawrence *et al.*, 2011) y de 1,300 $\mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ en el norte del mar Adriático (Gladan *et al.* 2011).

Desde los primeros casos de intoxicación diarreica ocurridos en Holanda en 1961 y posteriormente en Chile en 1970, se ha reportado la presencia de toxinas de tipo DSTx en varios países de diferentes partes del mundo (Blanco *et al.*, 2005). En Sudamérica se ha detectado la presencia de DSTx en bivalvos asociadas a la presencia de especies tóxicas del género *Dinophysis* desde hace más de una década en Chile (García *et al.*, 2013) y en Argentina (Sar *et al.*, 2012), principalmente. En Norteamérica solamente se ha confirmado

la presencia de toxinas tipo DSTx en las costas del Océano Atlántico. Durante julio a agosto de 1990 se presentó un florecimiento de *D. norvegica* en la Bahía de Bedford en Canadá con una acumulación de $450 \mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ en hepatopáncreas del pectínido *Placopecten magellanicus* (Rao, 1993). Por otro parte, el primer y único cierre asociado a la presencia de toxinas DSTx en Estados Unidos se implementó en la costa de Texas cuando se presentó un florecimiento de *D. cf. ovum* (Campbell *et al.*, 2010). En este evento que se presentó en el 2008 se encontraron concentraciones de $450 \mu\text{g AO-eq Kg}^{-1}$ en muestra de ostión (Trainer *et al.*, 2010).

En las costas del Océano Pacífico de Norteamérica solamente hay un caso reportado de intoxicación tipo DSP, aunque éste es dudoso. En México en 1997 cinco pescadores se intoxicaron al consumir peces de la Isla El Pardito en Baja California Sur (Heredia-Tapia *et al.*, 2002). Las personas presentaron síntomas característicos de intoxicación por ciguatoxinas y también característicos de DSP (Heredia-Tapia *et al.*, 2002). Sin embargo, no se detectaron toxinas tipo DSTx en muestras de peces y no se presentó una alta abundancia de especies productoras de estas toxinas, pero en un cepa aislada de *Prorocentrum lima* de la zona, se detectó AO y DTX1 (Heredia-Tapia *et al.*, 2002). Por otro lado, Ochoa *et al.* (1997) reportan que se presentaron tres muestras positivas para toxinas tipo DSTx por bioensayo en ratón en un estudio llevado a cabo en Bahía Concepción, en el Golfo de California durante 1992 a 1995. Sin embargo, ya que estos resultados se presentaron cuando existieron concentraciones altas de saxitoxina, es muy probable que existiera una interferencia de esta toxina con el protocolo utilizado (Yasumoto *et al.*, 1978) para detectar las toxinas lipofílicas. Aún cuando se menciona (Heredia-Tapia *et al.*, 2002) que se detectaron toxinas tipo DSTx por medio de HPLC, no se muestran los

resultados asociados, por lo que la presencia de toxinas de tipo lipofílico por métodos analíticos no se evaluó en este estudio. Por lo tanto, este es primer trabajo donde se confirma la presencia de toxinas tipo DSTx en moluscos bivalvos por métodos analíticos en México y en la costa oeste de Norteamérica.

La acumulación de toxinas DSTx en muestras de mejillón de la Bahía de Todos Santos estuvo asociada a la presencia de *D. acuminata* y *D. fortii*. La producción de toxinas DSTx (AO, DTX y PTX) se ha comprobado en 12 especies del género *Dinophysis*; de éstas, siete (*D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. miles*, *D. ovum*, *D. sacculus*) se han asociado a eventos de intoxicación DSP (Reguera *et al.*, 2012), en este trabajo las altas concentraciones de toxinas DSTx estuvieron relacionadas a la presencia de *D. fortii*. A pesar de la amplia distribución de las especies del género *Dinophysis*, parece ser que solamente especies particulares causan problemas importantes en áreas específicas (Blanco *et al.*, 2005). Por ejemplo, *D. fortii* es la especie responsable de los problemas de acumulación de toxinas DSTx en Japón, mientras que en el norte de Europa las especie problema son *D. norvegica* y *D. acuminata* y *D. caudata* en India y Singapur (Blanco *et al.*, 2005).

D. acuminata y *D. fortii*, al menos para el período que comprendió este estudio, son las especies problema para la región. Una relación entre el número de células detectadas y la cantidad de toxinas en los mejillones fue difícil de establecer. Se presentaron las concentraciones mayores de AO sin detectarse una abundancia significativa de *Dinophysis*. Sin embargo, una abundancia relativa de *D. fortii* en muestra de red, sí coincide con las altas concentraciones de toxinas. La distribución heterogénea de las especies de *Dinophysis* en la columna de agua puede explicar estos resultados. Existe bastante evidencia de que

estos organismos se acumulan en capas finas en concentraciones de hasta 10^4 a 10^5 Cel L⁻¹ (Gentien *et al.*, 1995; Moita *et al.*, 2006; Velo-Suárez *et al.*, 2008; Farrell *et al.*, 2010). Por lo tanto, los muestreos a profundidades puntuales, al menos de que se realice un muestreo intensivo en la vertical (toma de muestras con botella a diferentes niveles), puede subrepresentar el potencial tóxico de una población nociva. Por lo tanto, la información de la abundancia relativa es importante como indicador de la presencia de especies con potencial tóxico.

El potencial tóxico de una especie nociva está relacionado con la abundancia que puede alcanzar su población y a la producción de toxina por célula (cuota celular de toxinas). Al respecto, se han documentado diferencias de hasta un orden de magnitud entre el contenido de AO y DTX1 en poblaciones diferentes de una misma área (Blanco *et al.*, 2005). Esta es una de las razones del porque en muchos trabajos existe una correlación baja o nula entre la abundancia celular y el contenido de toxinas en moluscos bivalvos (Dahl and Johannessen, 2001; Holmes *et al.*, 1999; Hoshiai *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1993; Sampayo *et al.*, 1990; Sidari *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2007). También una baja correlación entre la abundancia de fitoplancton nocivo y toxinas en moluscos está asociada al tiempo de a retención de estas por los bivalvos, por lo que puede detectarse concentraciones altas de toxinas en moluscos mucho después de presentarse la presencia de la especie toxica (Moroño *et al.*, 2003). Sin embargo, también existen trabajos donde se reporta una alta correlación entre estas dos variables (Godhe *et al.*, 2002; Jørgensen and Andersen, 2007; Reguera *et al.*, 1993).

Otra variable que define el potencial tóxico de una especie, es el perfil de toxinas que presenta. Por ejemplo, para el caso de las DSTx, no se conoce el efecto negativo de la

PTX en los humanos, por lo que se pueden considerar menos tóxicas que el AO y los DTX. Sin embargo, para el ratón esto no es lo mismo y la presencia de las PTX tendrá un impacto en las decisiones de regulación cuando se usa la prueba de ratón como protocolo de medición de toxinas lipofílicas. El análisis de la relación de PTX a AO demostró que *D. acuminata* fue la especie relacionada a la presencia de esta toxina durante el periodo de muestreo. Por otro lado, las altas concentraciones de AO se pueden atribuir a la presencia de *D. fortii*. La producción de PTX2 ha sido comprobado en extractos de células de *D. acuminata* aisladas de Chile (Blanco *et al.*, 2007) y en cultivos de esta misma especie (Fux *et al.*, 2011). Se ha reportado que esta especie solo produce PTX2 (Blanco *et al.*, 2007). En contraste, *D. cf ovum* produce solo AO tanto en campo como en cultivos (Deeds *et al.*, 2010; Fux *et al.*, 2011) y *D. fortii* puede producir tanto AO como DTX y PTX2, pero estas dos últimas en menores cantidades (Lee *et al.*, 1989b; Suzuki *et al.*, 1997; 1998; 1999; Suzuki y Mitsuya, 2001). Esto indica que cepas particulares solo pueden producir un grupo de toxinas (Reguera *et al.*, 2012). Por lo tanto, se puede considerar que *D. fortii*, al alcanzar las abundancias tanto relativas como absolutas más altas y por el tipo de toxinas asociadas a esta especie, es la especie con el potencial tóxico más importante para provocar DSP en la región.

VII.III.II. YESOTOXINAS

De acuerdo a los niveles detectados en las muestras de mejillón, las YTXs representaron el segundo grupo en orden de importancia de la región. Se detectó a la yesotoxina (YTX) y tres análogos por medio del sistema de cromatografía TQ: hYTX, OHYTX y OH h YTX.

Al igual que el AO, y las PTXs, se detectaron las concentraciones más altas de YTXs de junio a agosto. Una muestra contenía hasta 1.08 mg/kg, la cual es una

concentración mayor al límite máximo permitido por las autoridades sanitarias. Las YTXs se han detectado en diferentes especies de mejillones en Noruega (Lee *et al.*, 1988) en Italia (Ciminiello *et al.*, 1997), en las Rías de Galicia (Arevalo *et al.*, 2006) Asimismo, las YTXs se han detectado en moluscos bivalvos (Villarroel, 2004; Yasumoto y Takizawa, 1997) y muestras de fitoplancton en Chile (Álvarez *et al.*, 2011; Krock *et al.*, 2009) y en el sur y centro de California (Howard *et al.*, 2008), en el continente americano.

En Noruega, los mejillones han presentado hasta 14.8 mg/kg de esta toxina (Lee *et al.*, 1988) y la concentración máxima en mejillones en Italia fue de 9 mg/kg (Ciminiello *et al.*, 1997). Estas concentraciones contrastan con la cantidad de YTX detectada (0.7 y 0.10 mg/kg) en dos muestras de mejillón colectadas del muelle de Scripps en la Jolla (sur de California) durante un florecimiento de *Lingulodinium polyedrum* (Howard *et al.*, 2008). Ese florecimiento del 2005 fue uno de los más intensos registrados en la región con abundancias de hasta 9×10^6 Cel L⁻¹ en la Bahía de Todos Santos (Peña-Manjarrez, 2008).

L. polyedrum es una de las tres especies identificadas como productoras de YTXs (Tubaro *et al.*, 1998) y se detectó durante el período de muestreo de este trabajo. Sin embargo, no se puede asociar las concentraciones de YTXs en los mejillones con la presencia de esta especie. Las abundancias mayores de *L. polyedrum* se presentaron a finales de noviembre, mientras que las altas concentraciones de YTX se presentaron durante junio y agosto. Asimismo, ya que la producción YTXs es extremadamente baja en *L. polyedrum* (Howard *et al.*, 2008; Paz, 2007) se necesitaría una abundancia muy alta de estos organismos para que se acumulara la cantidad de toxinas detectada en los mejillones durante junio.

Un resultado importante de este estudio es que durante el periodo de detección de concentraciones altas de YTXs, las especies más abundantes fueron *Ceratium furca* y *Prorocentrum micans*. Específicamente, la presencia de las YTXs parece estar relacionada con la presencia *C. furca*, ya que se detectó una abundancia superior a 45000 Cel L⁻¹ en superficie durante la última semana de mayo, lo que coincide con el aumento de YTX en las muestras de mejillón. La presencia de esta especie ocurrió de 1 a 2 días antes de detectar la concentración más alta de YTXs (1.08 mg kg⁻¹).

C. furca o *P. micans* ha sido reconocida como productora de YTXs. Se debe de comprobar si alguna de estas especies en la región produce YTXs o si existe otro agente causal que no fue detectado. *Protoceratium reticulatum* fue la primera especie reconocida que produce YTX, tiene una distribución geográfica amplia y es la más frecuentemente involucrada en la acumulación de esta toxina en moluscos bivalvos. Se ha detectado YTXs en moluscos producidas por *P. reticulatum* en Nueva Zelanda, Japón, Inglaterra, el mar Adriático, Noruega y Canadá (Blanco *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado que abundancias bajas de estos organismos (10³ Cel L⁻¹) pueden producir una acumulación significativa de toxina en moluscos bivalvos (Boni *et al.*, 2001). *P. reticulatum* se ha reportado para Bahía de Todos Santos (Peña-Manjarrez, 2008) sin embargo no se detectó en muestras de superficie, 10 metros o red en este estudio. Existe la posibilidad de que los mejillones se hayan contaminado por la presencia de quistes de *P. reticulatum* durante un evento de resuspensión de los mismos, que no fue detectado durante los muestreo de este trabajo. Se ha reportado que los quistes de este organismo pueden causar la acumulación de YTXs en moluscos bivalvos (Blanco *et al.*, 2005). El tiempo para que un molusco se vuelva tóxico varía y no solo depende de la presencia de algas tóxicas sino también de la

abundancia relativa de otras especies (Aune y Yndestad, 1993). Por ejemplo, Aasen *et al.*, (2005) reportaron que las YTX estaban presentes en mejillones durante todo el año y no solo en condiciones de florecimiento; estos autores sugirieron una contaminación previa por *P. reticulatum* aún en concentraciones relativamente bajas. Otra especie candidata es *Gonyaulax spinifera* la cual se reportó en la Bahía de Monterey cuando se detectaron las YTXs en el 2005 (Howard *et al.*, 2008).

Este es el primer trabajo que reporta la presencia de YTXs en México. Identificar la fuente de las YTXs detectadas en moluscos bivalvos de la región de la Bahía de Todos Santos y el efecto de las mismas en la ecología de la región y la salud pública, requiere de más investigación.

VII.III.III. IMINAS CICLICAS

Además de DSTx y las YTXs, también se encontraron toxinas de otra naturaleza, iminas cíclicas. En 48 muestras de las 53 analizadas por espectrometría de masas se hallaron espirólidos (SPX1). La concentración de esta toxina no presentó un patrón de variación evidente, ya que se detectaron $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ en marzo y posteriormente las concentraciones variaron entre los 0 y $3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Por otro lado, las gimnodiminas (GYM) presentaron concentraciones entre los $1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $3.5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta toxina se presentó siempre que se detectaron las demás toxinas (AO, PTXs, YTXs y SPX1). No se detectaron a las especies reportadas como productoras de SPX1 y GYM. Asimismo, no se logró establecer una relación entre su presencia y la abundancia de alguna especie durante el período de muestreo.

Las iminas cíclicas ocasionan muertes rápidas en ratón antecedidas de síntomas neurotóxicos y los organismos que no mueren logran recuperarse después de 20 minutos de iniciada la prueba (Pulido *et al.*, 2011). Richard *et al.* (2001) demostraron que tras recibir dosis letales de espirólidos, los ratones morían entre 3 y 20 min; sin embargo, si los animales sobrevivían después de 20 min, se recuperaban completamente y su estado continuaba normal hasta el final del ensayo. Se observaron reacciones similares en algunas pruebas realizadas en este trabajo.

Ya que durante los BER por hepatopáncreas y cuerpo completo se presentaron síntomas no reconocidos para toxinas tipo DSTx, probablemente la presencia de iminas cíclicas causaron este comportamiento en los organismos de prueba.

La tabla VII muestra los 7 casos en los que se presentaron tiempos de muerte menores a una hora para toxinas tipo DSTx en BER por extracción de hepatopáncreas. De estas 10 muestras, en cuatro (30, 33, 36 y 37) se presentaron concentraciones de DSTx arriba de los $160 \mu\text{g AO eq kg}^{-1}$, pero no tan altas como para causar la muerte del ratón en menos de una hora. Los espirólidos se detectaron en los 10 casos reportados con una concentración de 0.481 a $4.862 \mu\text{g kg}^{-1}$. En 5 casos se detectaron PTX y YTX con concentraciones de 0.32 a $46.48 \mu\text{g kg}^{-1}$ y 0.08 - $0.44 \mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente.

En la Tabla VII se presenta asimismo, el cálculo de la dosis de toxinas administrada al ratón. Ya que los análisis por LC-MS/MS se realizaron en extracciones en cuerpo completo del molusco, el cálculo de la dosis se realizó suponiendo que el hepatopáncreas represento un 20 % del peso total del organismo. Se observa que las dosis recibidas de PTX y SPX durante las pruebas no rebasan el LD_{50} reportado para estas toxinas. Munday *et al.*, (2004) reportaron para las gimnodiminas un LD_{50} de $74 \mu\text{g kg}^{-1}$. Richard *et al.* (2001)

reportaron que el LD50 de una mezcla de espirólidos, pero con una concentración predominante de 13-desmetil espirólido C es de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, sin embargo se han reportado un LD50 tan bajo como de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para este análogo Munday *et al.*, (2004).

Tabla VII. Concentración de toxinas lipofílicas excepto tipo DSTx en muestras de mejillón donde se detectaron muertes en tiempos menores a 1 hora después de la administración del extracto durante el bioensayo en ratón por hepatopáncreas.

ID	[PTX] ug/kg tejido	Dosis ug/kg	[SPX] ug/kg	Dosis ug/kg	[GYM] ug/kg tejido	Dosis ug/kg	[YTX] ug/kg tejido	Dosis ug/kg
7	0.00	0.00	4.86	6.08			0.00	0.00
10	0.00	0.00	1.66	2.07			0.00	0.00
11	0.00	0.00	1.11	1.39			0.00	0.00
18		0.00		0.00			0.00	0.00
30	26.39	32.99	2.54	3.18			430.00	537.50
32				0.00			0.00	0.00
33	12.63	15.79	1.34	1.67			140.00	175.00
36	11.30	14.12	2.16	2.70	0.13	0.16	90.00	112.50
37	46.48	58.11	1.32	1.65			110.00	137.50
40	0.32	0.40	0.48	0.60			0.00	0.00

A pesar de que en todas las muestras con tiempos de muerte de menos de una hora se detectaron SPX1, no se puede concluir que esta toxina fuera la responsable de los signos atípicos y muerte del ratón. Por otro lado, en el BER por cuerpo completo se presentaron en siete ocasiones síntomas atípicos (dismetría, ataxia, espasmos) al DSP, esto ocurría entre los 10 y 15 primeros minutos de la prueba y se recuperaban a partir de los 20 min. Los espirólidos también se presentan en todas las muestras con $0.3-1.8 \mu\text{g kg}^{-1}$, las YTX y PTX fueron encontradas solo en 3 de los casos. Probablemente las dosis suministradas a los organismos fueron la causa de los síntomas atípicos observados en los organismos de

prueba, ya que éstos no fueron letales. Sin embargo esto se debe probar con una investigación de dosis respuesta de cada una de las toxinas y mezclas de las mismas para evaluar un posible efecto aditivo o sinérgico.

Tabla VIII. Concentración de toxinas lipofílicas en muestras de mejillón donde se detectaron signos atípicos a las DSTx durante el bioensayo en ratón por cuerpo completo.

ID	[PTX]	Dosis	[SPX]	Dosis	[YTX]	Dosis
	ug/kg tejido	ug/kg	ug/kg	ug/kg	ug/kg tejido	ug/kg
8	0.00	0.00	1.50	1.87	0	0
11	0.00	0.00	1.11	1.39	0	0
14	16.33	20.41	0.36	0.45	0	0
16	0.12	0.16	1.30	1.63	327	408.75
22	0.00	0.00	1.87	2.33	401	501.25
25	0.00	0.00	1.42	1.77	159	198.75
40	0.32	0.40	0.48	0.60	0	0

VII.IV. REGULACIÓN

Para evitar riesgo sobre la salud pública, se prohíbe la extracción de moluscos bivalvos cuando la concentración de ficotoxinas rebasa los niveles máximos establecidos en las normas sanitarias. Por lo tanto, es necesario utilizar métodos robustos de detección de ficotoxinas que permitan tomar las decisiones adecuadas para salvaguardar la salud pública y afectar lo menos posible a la actividad económica costera.

En la Unión Europea, el análisis de detección de toxinas lipofílicas se realiza por cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a masas en tándem (LC-MS/MS) que

ha sustituido casi por completo al bioensayo en ratón (BER). Sin embargo, en otros países el método normado continúa siendo el bioensayo en ratón. En México, la NOM-SSA-242-2009 no establece que protocolo debe de utilizarse para detectar a las toxinas de tipo diarreico y no existe investigación sobre la especificidad de los diferentes métodos de detección de toxinas de tipo lipofílico. Por lo tanto, los resultados de la comparación de dos diferentes protocolos de BER para la detección de toxinas lipofílicas del presente trabajo tienen implicaciones importantes en la evaluación de las medidas de regulación en el país.

Se analizó la eficiencia de dos protocolos de BER utilizados en el laboratorio FICOTOX para la detección de toxinas lipofílicas consideradas en la regulación nacional. De acuerdo a la NOM-SSA-242-2009, el límite máximo permitido de la concentración de la “Toxina diarreica de moluscos (ácido okadaico)” es de 160 μg AO eq/kg. Asimismo, la guía técnica del PMSMB establece que un área de cosecha debe considerarse “cerrada” cuando los niveles de yesotoxinas y azaspirácidos rebasen los 1mg/kg y 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Para analizar la eficiencia en la detección de toxinas de tipo lipofílico se compararon los resultados de los dos protocolos de BER con los resultados obtenidos con LC-MS/MS. Inicialmente se empleó el BER establecido por Yasumoto et al. (1978) que consiste en una extracción con acetona de las toxinas presentes en la glándula digestiva de los moluscos bivalvos. Sin embargo, debido a la frecuencia en la obtención de resultados positivos con muertes rápidas de los organismos de prueba (menor a una hora después de la inyección) se implementó un BER con extracción en cuerpo completo y con una fraccionación del extracto orgánico con diclorometano y agua.

Con el BER con extracción en hepatopáncreas se observaron 16 resultados congruentes con las concentraciones evaluadas por LC-MS/MS obtenidas en este trabajo. Sin embargo se identificaron 20 falsos positivos y un falso negativo, lo que representa un 57 % de error en los resultados. En contraste, con el BER a partir del cuerpo entero, el porcentaje de error disminuye a un 39 %, presentándose 8 falsos positivos y 9 falsos negativos. Existen varios estudios que comparan los resultados obtenidos mediante BER y métodos analíticos. Prassopoulou *et al.*, (2009) reportan un 100 % de concordancia entre los resultados obtenidos por BER y con HPLC para la detección de AO. Sin embargo, la comparación de estos protocolos se realizó con muestras con un contenido de AO mayor a los 380 µg AO eq/kg (Prassopoulou *et al.*, 2009). Otro porcentaje de concordancia alto fue reportado por Mouratidou *et al.*, (2006), obteniendo un 91% de coincidencia entre BER y HPLC con detección de fluorescencia (FL). Louppis *et al.*, (2010) reporta también un 91% de concordancia entre BER y HPLC-FL, sin embargo, también reportan que la comparar con LC-MS/MS, el método por HPLC-FL falla en detectar el OA en forma esterificada. Una buena concordancia entre HPLC-FL y BER también fue reportada por Vale y Sampoyo (1996) al obtener un número de falsos positivos por BER bajo.

Por otro lado, la presencia de un porcentaje importante de falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) se ha reportado cuando se comparan los resultados del BER con LC-MS/MS. Específicamente, en Escocia se detectaron 48 FP de 349 (13.7 %) muestras evaluadas durante el 2003 al 2004, lo que probablemente ocasionó el cierre innecesario de ciertas áreas de cosecha en ese país (Turrel y Stobo, 2007). Asimismo estos autores reportan 11 FN de este conjunto de muestras evaluadas (Turrel y Stobo, 2007). La presencia de FP también fue reportada para Japón, aunque en una menor proporción (6 de

196; 3.06 %), sin embargo el porcentaje de FP fue significativamente alto (61 de 196; 31 %) (Suzuki *et al.*, 2005). En este trabajo se asocian los FN a la probable presencia de ácidos grasos libres (Suzuki *et al.*, 2005), que pueden interferir en el bioensayo en ratón (Suzuki *et al.* 1996). Por otro lado, la alta proporción de FN se asocia a la presencia de las YTXs, ya que éstas se incluyeron en el cálculo de la toxicidad por medio de LC-MS/MS y el BER utilizado, subestima la concentración de este tipo de toxinas (Suzuki *et al.* 2005).

La presencia de FP y FN influyen de manera importante en las decisiones que se toman para cerrar o no una zona de cosecha. De acuerdo a la guía del PMSMB se implementa una veda sanitaria cuando la concentración de toxinas reguladas es mayor a los niveles máximos permitidos y se levanta cuando se obtengan dos resultados negativos consecutivos considerando un muestreo con intervalos de 4 días. Con base en esta guía, la COFEPRIS implementó tres periodos de veda; del 4 al 16 de abril, del 29 de junio al 31 de julio y del 17 de septiembre al 16 de noviembre (c.f Fig. 16). La segunda veda sanitaria se implementó con base a resultados de BER en hepatopáncreas en análisis realizados en FICOTOX. Si se hubiera considerado este bioensayo desde el principio del año y no se hubiera implementado el BER en cuerpo completo, la zona de Rincón de Ballenas se habría mantenido cerrada desde el 21 de marzo del 2012 hasta el 22 de agosto del 2012(c.f. Fig. 16). Dos semanas después del 22 de agosto se detectó un resultado positivo el 12 de septiembre, pero posterior a esa fecha ya no se continuaron los análisis con este protocolo, por lo que no se podría asegurar la duración de una probable veda asociada a este resultado positivo. Por lo tanto, con los resultados del BER en hepatopáncreas el cierre en la actividad de extracción de moluscos bivalvos en la zona hubiera sido de al menos 6 meses.

Los periodos de veda implementados por la COFEPRIS en el segundo semestre del año se basan principalmente en el bioensayo a partir de cuerpo completo. En el primer semestre del año se presentaron dos resultados positivos que concuerdan con el cierre en abril que se implementó con base a resultados de BER realizados en el laboratorio de referencia nacional (CCAYAC). A excepción de esta veda sanitaria de abril, los períodos de cierre de la Bahía hubieran coincidido si se hubieran utilizado los resultados de LC-MS/MS. La diferencia entre las acciones de regulación con base a resultados del BER en cuerpo completo y LC-MS/MS es de aproximadamente solo dos semanas de diferencia. Considerando los resultados de este último protocolo, el cierre hubiera comenzado antes del implementado por la COFEPRIS ya que en julio se detectaron niveles de YTXs mayores los niveles máximos permitidos y posteriormente se presentaron concentraciones altas de DSTx. Asimismo, el último dato de la concentración de toxinas lipofílicas por LC-MS/MS fue mayor del nivel regulatorio para DSTx por lo que no se conoce hasta cuándo hubiera durado la veda sanitaria implementada a finales del año.

Este análisis demuestra que las acciones regulatorias basadas en los resultados con BER con extracción en cuerpo completo con una partición con diclorometano y agua, concuerda con los cierres hipotéticos basados en la evaluación de toxinas por medio LC-MS/MS. El alto porcentaje de FP al utilizar el hepatopáncreas como tejido de prueba hubiera afectado de manera importante a la actividad acuicultural en la Bahía de Todos Santos. La presencia de FP en los bioensayos puede estar asociada a la presencia de otro tipo de toxinas en las muestras. La coocurrencia de yesotoxinas, espirólidos y gimnodiminas pueden tener un probable efecto aditivo o sinérgico que pudiera causar la muerte de los ratones independientemente, o en conjunto con la presencia de DSTx. Esta

posibilidad se ha reportado para explicar la presencia de FP en otros trabajos (Suzuki *et al.*, 2005; Turrel y Stobo, 2007). Específicamente, al no existir una partición con agua del extracto del organismo en el protocolo de Yasumoto *et al.*, (1979) la cantidad de YTX será mucho mayor que en el protocolo con cuerpo entero y con partición con agua. Debido a la sensibilidad del ratón a esta tipo de toxinas, se presentan resultados positivos en los BER aún a concentraciones mucho más bajas que el nivel regulatorio (Blanco *et al.*, 2005). Por lo tanto, la presencia de diferentes toxinas lipofílicas durante el segundo semestre del año probablemente fue la causa de la alta tasa de FP, especialmente en el BER con hepatopáncreas. Asimismo, la probable interferencia de ácidos grasos del mejillón en la prueba no debe descartarse. El BER con extracción en cuerpo completo parece ser que es el método más adecuado para fines de regulación, sin embargo se tiene que analizar las causas del número significativo de FN asociados a este protocolo. Un falso negativo puede ser causado por una extracción inadecuada o pérdida de toxinas durante el proceso de fraccionación Mouratidou *et al.*, (2006). En el presente trabajo no se presentó ningún problema técnico que pudiera afectar los resultados; asimismo, se utilizó diclorometano en lugar de éter etílico para la partición entre la fase acuosa y orgánica. El diclorometano tiene una eficiencia de extracción mayor que el éter etílico de las toxinas hidrofóbicas (Fernández *et al.*, 2002). Ya que no se puede asociar los FN a un problema metodológico se realiza un análisis más detallado de la presencia de éstos (Tabla IX). Es evidente que en 3 muestras (30, 38 y 41, Tabla IX), las concentraciones de DSTx están cerca del nivel de regulación. Por lo tanto, considerando la incertidumbre inherente a cualquier protocolo analítico y la variabilidad en los bioensayos en animales, éstas se puedan considerar como resultados similares. Asimismo, aunque no se presentaron muertes de los ratones, estos presentaron síntomas claros de la presencia de toxinas tipo DSTx en estas muestras. Otra

observación importante es que de los FN en los que se presentaron concentraciones altas de DSTx, se detectó una de las proporciones más altas de AO esterificado. Específicamente, en tres muestras (muestras 37,53 y 56) el AO esterificado representó cerca del 80 % del AO total. Las formas de AO esterificado son mucho menos tóxicas que las toxinas acidificadas (Hu *et al.*, 1992). Por lo tanto, es probable que cuando exista una cantidad importante de toxinas esterificadas el BER tiene un nivel de detección menor a los 160 µg AO-eq /kg de tejido de molusco.

La concentración promedio de las DSTx (DTX+PTX+AO) detectadas en los FN es de 316.14 ± 158.75 µg AO-eq kg⁻¹. Esto representaría el nivel de detección de la BER por cuerpo completo implementado en el laboratorio FICOTOX. Por debajo de este nivel, solo se presentó una muestra (33) que fue positiva por BER y por LC-MS/MS. Sin embargo, si no se consideran las muestras con una proporción alta de AO esterificado (muestras 37 y 56) la concentración promedio de las DSTx disminuye a 253 ± 112.54 µg AO-eq kg⁻¹ y no se presentó ninguna muestra positiva por BER y LC-MS/MS por debajo de este nivel.

Tabla IX. Concentración de toxinas tipo DSTx en muestras en que el bioensayo en ratón dio como resultado un falso negativo en comparación con la concentración detectada por LC-MS/MS.

ID	BER	AO LIBRE	AO ESTERIFICADO	AO TOTAL	AO ESTER/ AO TOTAL	AO ESTER/LIBRE	DTX/PTX/ AO
30	CC	31.30	113.24	144.54	0.78	3.62	170.93
36	CC	49.80	153.39	203.19	0.75	3.08	214.48
37	CC	89.59	396.10	485.69	0.82	4.42	532.18
38	CC/HP	50.77	137.71	188.48	0.73	2.71	191.37
41	CC	46.96	125.23	172.19	0.73	2.67	175.571
44	CC	101.55	156.00	257.55	0.61	1.54	266.78
53	CC	105.04	380.82	485.86	0.78	3.63	493.33
55	CC	79.63	178.02	257.64	0.69	2.24	258.56
56	CC	59.77	444.03	503.80	0.88	7.43	542.07

A pesar de que este nivel de detección es aproximadamente 1.5 veces el nivel establecido en la regulación del país, el BER con extracción en cuerpo completo y la medidas de regulación establecidas con base a los resultados de este protocolo ayudaron a reducir los riesgos sanitarios de la presencia de toxinas de tipo lipofílico presentes en moluscos bivalvos del área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos. Asimismo, este protocolo redujo el número de falsos positivos que hubieran afectado de manera importante la actividad de las empresas productoras de la región.

La detección inequívoca de diferentes toxinas de tipo lipofílico y la identificación del agente causal para algunas de ellas, demuestra que la presencia de este tipo de toxinas en moluscos bivalvos, es un problema emergente en la región de la Bahía de Todos Santos. Por lo tanto, el monitoreo adecuado de las mismas es fundamental para reducir riesgos sanitarios y pérdidas económicas. Mientras no se implementen métodos analíticos en México para la detección de toxinas de tipo lipofílico, se debe utilizar un bioensayo adecuado en ratón, identificando la sintomatología asociada a los diferentes tipos de toxinas. Aún con los problemas asociados a este método, el bioensayo en ratón ha sido efectivo para fines de protección a la salud pública en programas de monitoreo de varios países (Blanco *et al.*, 2005) y fue efectivo durante la problemática que se presentó en el 2012 en la región.

VIII. CONCLUSIONES

- Durante 2012, la Bahía de Todos Santos presentó registros de especies fitoplanctónicas potencialmente tóxicas. En el primer semestre se detectó la presencia de *Pseudo-nitzschia australis* con abundancias mayores a 200×10^3 Cel L⁻¹. Mientras que *Lingulodinium polyedrum* se presentó durante noviembre y diciembre con abundancias máximas de 30×10^3 Cel L⁻¹.
- Se reportan siete especies del género *Dinophysis* en la región de Rincón de Ballenas: *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. odiosa*, *D. rotundata* y *D. tripos*. Se observó un florecimiento algal de *D. acuminata* a principios de junio y otro de *D. fortii* a mediados de julio. La presencia de estas especies se asoció a un período de estabilidad en la columna de agua.
- Mediante el bioensayo en ratón a partir de la glándula digestiva y el organismo completo del molusco se obtuvieron resultados positivos para la presencia de toxinas lipofílicas durante tres períodos (febrero, mayo-julio, y septiembre–octubre), presentando síntomas atípicos no correspondientes a este síndrome en algunas muestras debido a posibles interferencias por toxinas de otra naturaleza en el método.
- Mediante LC-MS/MS se detectaron diversas toxinas de tipo lipofílico. De las toxinas de tipo diarreico (DSTx) se encontró principalmente al ácido okadaico en concentraciones superiores a $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ durante julio y mayores a $1500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de

- septiembre a noviembre, sobrepasando el límite durante estos meses. La pectenotoxina 2 fue detectada en un gran número de muestras pero en concentraciones entre 0.1 a 46.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, presentando la misma estacionalidad que el AO. Las dinofisistoxina 1 y 2 sólo se presentaron en tres ocasiones en concentraciones menores a 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

- Se detectaron yesotoxinas (YTX), presentándose tres análogos homo-yesotoxinas (HYTX), 45-Hidroxi-yesotoxina (OHYTX) y 45-Hidroxi-1a-homoyesotoxina (OHhYTX), con valores de 0.03 a 1.08 mg kg^{-1} principalmente durante los meses de mayo a julio. No se detectó a las especies reportadas como productoras de este grupo de toxinas; sin embargo, las concentraciones altas de YTX coincidieron con la presencia del dinoflagelado *Ceratium furca*.

- Se identificaron dos toxinas del grupo de las iminas cíclicas. Se detectó el espirólido 1 (SPX1) en la mayoría de las muestras, sin presentar una estacionalidad marcada de la variación de su concentración (0 a 4.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Se detectaron asimismo, a las gimnodiminas (GYM) presentándose en 15 muestras con concentraciones de 0.1 a 3.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No se detectaron a las especies reportadas como productoras de estas toxinas.

- Mediante el bioensayo en ratón con extracción en hepatopáncreas se observaron 16 resultados congruentes con las concentraciones evaluadas por LC-MS/MS. Sin embargo se identificaron 20 falsos positivos y un falso negativo, lo que representa un 57 % de error en los resultados. En contraste, con el BER a partir del cuerpo

entero, el porcentaje de error disminuye a un 39 %, presentándose 8 falsos positivos y 9 falsos negativos. Las medidas regulatorias establecidas en la región con base en los resultados mediante el bioensayo en ratón con extracción en cuerpo completo fueron efectivas para reducir los riesgos sanitarios de la presencia de toxinas de tipo lipofílico presentes en moluscos bivalvos del área de Rincón de Ballenas de la Bahía de Todos Santos.

IX. REFERENCIAS

Aasen, J., Samdal, I.A., Miles, C.O., Dahl, E., Briggs, L.R., Aune, T., 2005. Yessotoxin in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Prorocentrum reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon*. 45:265-272.

Alfonso, M. C., 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura. Tesis doctoral. Universidad de Compostela. 128pp.

Álvarez, G., Uribe, E., Díaz, R., Braun, M., Mariño, C., Blanco, J., 2011. Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile. *Journal of Sea Research* 65: 427-434.

Arévalo, F., Pazos, Y., Correa, J., Salgado, C., Moroño, A., Paz, B., Franco, J.M., 2006. First report of yessotoxins in mussels of Galician Rías during a bloom of *Lingulodinium polyedrum* Stein (Dodge). En: Henshilwood, K., Deegan, B., McMahon, T., Cusack, C., Keaveney, S., Silke, J., O'Kinneide, M., Lyons, D., Hess, P. (Ed.). V International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS), Galway, Ireland. 184-189.

Argote, E., M.L., Gavidia, F.J., Amador, A., 1991. Wind-induced circulation in Todos Santos Bay, B.C., México. *Atmósfera*. 4:101-115.

Aune, T., Yndestad, M., 1993. Diarrhetic shellfish poisoning. En Falconer, I.R. (Ed.). 1993. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, London, UK, Academic Press. 87-104.

Balech, E., 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publ. Espec., Inst. Español Oceanográfico* 1. 310 pp.

Bates, S. S., Trainer, V. L., 2006. The ecology of harmful diatoms. En: Granéli, E., Turner, J. (ed). *Ecology of harmful algae*. Heidelberg, Springer-Verlag. 81-93.

Blanco, J., Moroño, A., Pazos, Y., Maneiro, J., Mariño, J., 1998. Trends and Variations of the Abundance of Main PSP and DSP Producing Species in the Galician Rías: Environmental and Biological Influences. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Ed.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Santiago de Compostela. 204-207.

Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 176: 153-163.

Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M.L., 2005. Toxic Episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Revista galega de recursos mariños (Monograph)*. 170 pp.

Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 50: 1011-1018.

Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R., Pompei, M., 2001. Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridiniales, Dinophyta) in the north-western Adriatic Sea (Italy). En: Hallegraef, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J., (Ed). Harmful Algal Blooms 2000. IOC of UNESCO. 137-40.

Botana, L.M., Rodríguez, M., Vieites, J.M., Leira, F., 1996. Process based on the inhibition of phosphatases for detecting and quantifying diarrhetic shellfish poison. España, patente de invención, WO/1996/040983. 1996-12-19.

Campbell, L., Olson, R. J., Sosik, H. M., Abraham, A., Henrichs, D. W., Hyatt, C. J., Buskery, E. J., 2010. First harmful *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales) bloom in the U.S. is revealed by automated imaging flow cytometry. *J. Phycol.* 46:66-75.

Carlucci, A. F., Eppley, R. W., Beers, J.R., 1986. Introduction to the Southern California Bight. En: Eppley RW (ed.), *Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies: Plankton Dynamics of the Southern California Bight*. Springer-Verlag, New York. 1–12.

Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R., Yasumoto, T., 1997. Yessotoxin in mussels of the Northern Adriatic Sea. *Toxicon*. 35: 177-183.

Cohen, P., 1989. The structure and regulation of protein-phosphatases. *Annual Review in Biochemistry*. 58: 453-508.

EC-Nº 15/2011 de la Comisión del 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos Diario Oficial de la Unión Europea L 6/3.

EC- Nº 2074/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005. Diario Oficial de la Unión Europea L 338/27.

EC-Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004. Diario Oficial de la Unión Europea L 139/55.

Cortés-Altamirano, R., Sierra-Beltrán, A. P., 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algae blooms occurring in México. *Toxins reviews*. 27: 27-77.

Cupp, E.E., 1943. Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America. *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography*. 5: 1-238.

Dahl, E., Johannesen, T., 2001. Relationship between occurrence of *Dinophysis* species and shellfish toxicity. *Phycologia*. 40:223-227.

Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M., 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*. 37(8): 1187-1193.

Deeds, J.R., Wiles, K., Heideman, G., White, K., Abraham, A., 2010. First U.S. report of shellfish harvesting closures due to confirmed okadaic acid in Texas Gulf coast oysters. *Toxicon*. 55: 1138–1146.

Escalera, L., Pazos, Y., Doval, M. D., Reguera, B., 2012. A comparison of integrated and discrete depth sampling for monitoring toxic species of *Dinophysis*. *Marine Pollution Bulletin*. 64:106-113.

Farrell, H., Fernand, L., Gentien, P., Lunven, M., Raine, R., 2010. Observations of transport of *Dinophysis acuta* in a coastal jet along the coast of Ireland. En: Ho, K. C., Zhou, M. J., Qi, Y. Z. (ed). *Harmful algae 2008*. Environmental publication house, Hong Kong, China. 21-24.

Fladmark, K.E., Serres, M. H., Larsen, N. L., Yasumoto, T., Aune, T., Doskeland, S. O., 1998. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicon*. 36:1101-1114.

Flanagan, A.F., Donlon, J., Palmer, R., Kane, M., 2000. Bioanalytical detection of azaspiracid, a newly discovered phycotoxin. *Biochem. Soc. Transact*. 28 (Part I): A46.

Fernández, M.L., Reguera, B., Ramilo, I., Martínez, A., 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D.acuta* and *D.caudata* from the Galician Rías Bajas. En: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Ed.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris. 360-363.

Fernández, M. L., Míguez, A., Cacho, E., Martínez, A., Diogene, J., Yasumoto, T., 2002. Bioensayos con mamíferos y ensayos bioquímicos y celulares para la detección de ficotoxinas. En: Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B. (Ed.). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Pontevedra. 77-120.

Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T., 1988. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. Cancer Res*. 79(10):1089–1093.

Furey, A., Moroney, C., Magdalena, A.B., Fidalgo, M. J., Lehane, M., James, K., 2003. Geographical, temporal, and species variation of the polyether toxins, Azaspiracids, in shellfish. *Environmental Science and Technology*. 37(14): 3078–3084.

Fux, E., Smith, J.L., Tong, M., Guzmán, L., Anderson, D.M., 2011. Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon*. 57: 275–287.

Gárate-Lizarraga, I., Band-Schmidt, C. J., López-Cortés, D.J., Bustillos-Guzmán, J.J, Erler, K., 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (June-July 2006). *Harmful Algae News*. 33: 6-7.

García, C., Rodríguez-Unda, N., Contreras, C., Barriga, A., Lagos, N., 2013. Lipophilic toxin profiles detected in farmed and benthic mussels populations from the most relevant production zones in Southern Chile. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 29(6):1011-1020.

García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C., Peña-Manjarrez, J.L., 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, México. *Harmful Algae*. 8:493-503.

Gentien, P., Lunven, M., Lehaître, M., Dunvent, J.L., 1995. In situ depth profiling of particles sizes. *Deep Sea Res*. 42:1297–1312.

Gill, S., Murphy, M., Clausen, J., Richard, D., Quilliam, M., MacKinnon, S., LeBlanc, P., Mueller, R., Pulido, O., 2003. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology*. 24:593–604.

Godhe, A., Svensson, S., Rehnstam-Holm, A.S., 2002. Oceanographic settings explain fluctuations in *Dinophysis* spp. and concentrations of diarrhetic shellfish toxin in the plankton community within a mussel farm area on the Swedish west coast. *Marine Ecology Progress Series*. 240:71-83.

Gómez, F., 2005. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *Acta Bot. Croat*. 64:129–212.

González-Gil, S., Velo-Suárez, L., Gentien, P., Ramilo, I., Reguera, B., 2010. Phytoplankton assemblages and characterization of a *Dinophysis acuminata* population during an upwelling–downwelling cycle. *Aquat. Microb. Ecol*. 58:273–286.

Hall, S., 1991. Natural Toxins. En: D.R. Ward y C. Hackney (Ed.). *Microbiology of marine food products*. An avi Book. New York. 305 pp.

Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Ed.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing. 25-50.

Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B.O., Nuñez-Vásquez, E.J., Yasumoto, T., Yasuda, M., Ochoa, j.l., 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviella lima*) and diarrhetic

shellfish poisoning (DSP) risk assesment in the Gulf of California. Mexico. *Toxicon*. 40: 1121-1127.

Hernández-Becerril, D.U., 1992. *Dinophysis taylorii*, sp.nov. y otros *Dinophysis* de Baja California, México (Dinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* 40:101-109.

Hess, P., McMahon, T., Slattery, D., Swords, D., Dowling, G., McCarron, M., Clarke, D., Gibbons, W., Silke, J., O'Conneide, M., 2003. En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R., (Ed). *Molluscan shellfish safety*. Xunta de Galicia and intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela.

Hess, P., Nguyen, L., Aasen, J., Keogh, M., Kilcoyne, J., McCarron, P., Aune, T., 2005. Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon*. 46:62-71.

Hess, P., 2010. Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and oficial control. *Anal Bioanal Chem.* 397: 1683-1694.

Holmes, M.J., Teo, S.L.M., Lee, F.C., Khoo, H.W., 1999. Persistent low concentrations of diarrheic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the johor strait, Singapore: first record of diarrhoeic shellfish toxins from South-East Asia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181:257-268.

Hoshiai, G., Suzuki, T., Onodera, T., Yamasaki, M., Taguchi, S., 1997. A case of non-toxic mussels under the presence of high concentrations of toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Fisheries Science*. 63(2): 317-318.

Howard, M.D., Silver, M., Kudela, R.M., 2008. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californianus*) and phytoplankton samples from the U.S. west coast. *Harmful Algae*. 7:646-652.

Hu, T., Marr, J., DeFreitas, A.S.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, J.L.C., Pleasance, S., 1992. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*, *Journal of Natural Products*, 55: 1631-7.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1995. Identification of DTX-4 a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 5:597-599.

Jørgensen, K., Andersen, P., 2007. Relation between the concentration of *Dinophysis acuminata* and Diarrheic Shellfish Poisoning toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) during a toxic episode in the Limfjord (Denmark), 2006. *J. Shellfish Res.* 26:1081-1087.

Kim, S., Kang, Y.G., Kim, H.S., Yih, W., Coats, D.W., Park, M.G., 2008. Growth and grazing responses of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* as functions of light intensity and prey concentration. *Aquat. Microb. Ecol.* 51:301–310.

Koukaras, K., Nikolaidis, G., 2004. *Dinophysis* blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf NW Aegean Sea). *J. Plankton Res.* 26:445–457.

Krock, B., Tilman, U., John, U., Cembella, A.D., 2009. Characterization of azaspirácidos in plankton size fractions and isolation of azaspirácidos-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae.* 8:254-263.

Lechuga-Devéze, C.H., Morquecho-Escamilla, M.L., 1998. Early spring potentially harmful phytoplankton in Bahía Concepcion, Gulf of California. *Bulletin of marine science.* 63(3): 503-512.

Lee, J.S., Tangen, K., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1988. Diarrhetic shellfish toxins in Norwegian mussels. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 54:1953-1957.

Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology.* 1:47–152.

Lewis, J., Higman, W., Kuenster, S., 1995. Occurrence of *Alexandrium* sp. cysts in sediments from the North East coast of Britian. En: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentine y C. Marcaillou-LeBaut (Ed.). *Harmful marine algal blooms.* Lavoisier Science Publishers, Paris. 175–180.

Lewitus, A., Horner, R., Caron, D., Garcia-Mendoza, E., Hickey, B., Hunter, M., Huppert, D., Kudela, R., Langlois, G., Largier, J., Lessard, E., RaLonde, R., Rensel, J., Strutton, P., Trainer, V., Twedde, J., 2012. Harmful algal blooms along the North American west coast region: history, trends, causes and impacts. *Harmful Algae.* 19:133–159.

Louppis, A.P., Badeka, A.V., Katikou, P. Paleologos, E.K., Kontominas, M.G., 2010. Determination of okadaic acid, dinophysistoxina-1 and related esters in Greek mussels using HPLC with fluorometric detection, LC-MS/MS and mouse bioassay. *Toxicon.* 55:724-733.

Maestrini, S.Y., 1998. Bloom dynamics and ecophysiology of *Dinophysis* spp. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Ed.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms.* NATO ASI Series, Series G, Ecological Science. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 243–266.

McMahon, T., Silke, J., 1996. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News.* 14:2.

- Marasigan, A.N., Sato, S., Fukuyo, Y., Kodama, M., 2001. Accumulation of a high level of diarrhetic shellfish toxins in the green mussel *Perna viridis* during a bloom of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis miles* in Saipan Bay, Panay Island, the Philippines. *Fish. Sci.* 67: 994–996.
- Margalef, R., 1969. Counting. En: R.A. Vollenweider, J.F. Talling y D.F. Westlake (Ed.). A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments including a chapter on bacteria. London International Biological Programme. (IBP Handbk 12), Blackwell Scient. Publ., Oxford. 7-14.
- Masselin, P., Lassus, P., Bardouil, M., 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. From the French coast. *Journal of Applied Phycology*. 4: 385-389.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Munday, R., Dines, M.H., Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V., 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon*. 43:1–9.
- Minnhagen, S., 2010. Kleptoplasty by *Dinophysis* spp. Ecological role and evolutionary implications. Linnaeus University Dissertations. 19.
- Moita, M. T., Sobrinho-Goncalvez, L., Oliveira, P.B. Palma, S., Falcao, M., 2006. A bloom of *Dinophysis acuta* in a thin layer off North-West Portugal. *Afr. J. Mar. Sci.* 28:265-269.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., Blanco, J., 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.* 62:269-280.
- Mouratidou, T., Kaniou-Grigoriakao, I., Samara, C., Kouimtzis, T., 2006. Detection of the marine toxin okadaic acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Termaikos Golf Greece, using biological chemical and immunological methods. *Sci. Total Environ.* 366:894-904.
- Munday, R., Miles, C.O., Hawkes, A.D., Selwood, A., Buezenberg, V., 2004. Unpublished observations, AgResearch, Hamilton, New Zealand and Cawthron Institute, Nelson, New Zealand.
- Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 48:549-552.

Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S., Yasumoto, T., 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.* 28:5869-5872.

NORMA Oficial Mexicana, 2011. NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario oficial de la federación. Jueves 10 de febrero de 2011, México, D.F.

Ochoa, J.L., Sánchez-Paz, A., Cruz-Villacorta, A., Núñez-Vázquez, E., Sierra-Beltrán, A., 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of Mexico during 1992-1995: origin and impacts. *Hidrobiología.* 352:195-200.

Okolodkov, Y.B., Garate-Lizárraga, I., 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botanica Mexicana.* 74:1-154.

Paz, B., Riobo, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon.* 44:251-258.

Paz, B., 2007. Producción de YTX por cultivos de *Protoceratium reticulatum*: variabilidad en el perfil de toxinas de diferentes cepas. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo del CSIC. 189 pp.

Pennington, J.T., Chávez, F.P., 2000. Seasonal fluctuations of temperature, salinity, nitrate, chlorophyll and primary production at station H3/M1 over 1989–1996 in Monterey Bay, California. *Deep-Sea Res. II.* 47: 947–973.

Peña-Manjarrez, J.L., 2008. Ecología de Dinoflagelados Productores de Florecimientos en la Bahía de Todos Santos, Baja California. Tesis de Doctorado. CICESE. 196 pp.

Peña-Manjarrez, J.L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Factores ambientales que influyen en la variabilidad de la producción de quistes de *Lingulodinium polyedrum* y *Scripsiella trochoidea* (Dinophyceae). *Ciencias Marinas.* 35(1): 1-14.

Pérez-Brunius, P., López, M., Pineda, J.P., 2006. Hydrographic conditions near the coast of northwestern Baja California: 1997-2004. *Continental Shelf Research.* 26(8): 885-901.

Petry, M., Sanz, M.A., Langlais, C., Bonnelye, V., Durand, J.P., Guevara, D., Nardes, W.M., Saemi, C.H., 2007. The El Coloso (Chile) reverse osmosis plant. *Desalination.* 203: 141-152.

Pitcher, G.C., Krock, B., Cembella, A.D., 2011. Accumulation of Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins in the oyster *Crassostrea gigas* and the mussel *Choromytilus meridionalis* in the southern Benguela ecosystem. *Afr. J. Mar. Sci.* 33:273–281.

Prassopoulou, E., Katikou, P., Georgantelis, D., Kyritsakis, A., 2009. Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon*. 53:214-227.

Pulido, O., Frémy, J.M., Munday, R., Quilliam, M.A., 2011. Cyclic imines (gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocontrolide and spiro-prorocentrimine). En: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551. Rome, FAO. 99-110.

Rao, D.V.S., Pan, Y., Zitko, V., Bugden, G., Mackeigan, K., 1993. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. *Marine Ecology Progress Series*. 97(2): 117-126.

Raho, N., Pizarro, G., Escalera, L., Reguera, B., Marín, I., 2008. Morphology, toxin composition and molecular analysis of *Dinophysis ovum* Schütt, a dinoflagellate of the *Dinophysis acuminata* complex. *Harmful Algae*. 7:839-848.

Reguera, B., Bravo, I., Mariño, J., Campos, M.J., Fraga, S., Carbonell, A., 1993. Trends in the occurrence of *Dinophysis* spp. in Galician coastal waters. En: Smayda, T.J., Shimizu, Y., (Ed.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam. 559-564.

Reguera, B., 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En: Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B. (Ed). *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Madrid. 19-54.

Reguera, B., Garcés, E., Bravo, I., Pazos, Y., Ramilo, I., 2003. In situ division rates of several species of *Dinophysis* estimated by a postmitotic index. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249:117-131.

Reguera, B., Pizarro, G., 2008. Planktonic flagellates which produce polyether toxins of the old ‘‘DSP Complex’’. En: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. 2nd ed. CRC Press, London. 798 pp.

Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., Myung, G.P., 2012. Harmful *Dinophysis* species: A review. *Harmful Algae*. 14:87-107.

Rhodes, L., McNabb, P., Beuzenberg, V., Briggs, L., 2004. Waitaria Bay G14: Yessotoxin in Greenshell mussels and the dinoflagellate *Gonyaulax* cf. *spinifera*. Report No. 937. Nelson, New Zealand, Cawthron Institute.

Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M., 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. En Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Ed.). *Harmful algal blooms*

2000. Proceedings, 9th International Conference on Harmful Microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 383–386.

Ryan, M., Ito, E., Speijers, G., Hess, P., 2011. Azaspiracids. En: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551. Rome, FAO. 33-49.

Sampayo, M.A.M., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I., 1990. *Dinophysis spp.* toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Ed.). Toxic marine phytoplankton. Elsevier, New York. 215-220.

Santiago-Morales, I.S., García-Mendoza, E., 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two ratios. Harmful Algae. 12: 82-94.

Sar, E.A., Ferrario, M.E., Reguera, B., 2002. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía. Madrid, España. 311 pp.

Sar, E.A., Sunesen, I., Lavigne, A.S., Goya, A.B., 2010. *Dinophysis spp.* asociadas a detección de rocinas diarreicas en moluscos y a intoxicación diarreica en humanos (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45:451-460.

Sar, E.A., Sunesen, I., Goya, A.B., Lavigne, A.S., Tapia, E., García, C., Lagos, N., 2012. First report of diarrhetic Shellfish toxins in mollusks from Buenos Aires Province (Argentina) associated with *Dinophysis spp.*: evidence of okadaic acid, dinophysistoxina-1 and their acyl-derivatives. Bol. Soc. Argent. Bot. 47 (1-2):5-14.

Satake, M., MacKenzie, L. & Yasumoto, T. 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the Biogenetic origin of Yessotoxin. *Nat. Toxin.* 5:164-167.

Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998a. New toxic event caused by Irish mussels. En Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M., T. Wyatt, (Ed). 1997. Harmful Algae, Proceedings of the VIII International Conference on Harmful Algae, (June 1999, Vigo, Spain): 468-469. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO.

Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998b. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.

Sidari, L., Nichetto, P., Cok, S., Sosa, S., Tubaro, A., Honsell, G., Della Loggia, R., 1998. Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. *Marine Biology.* 131(1): 103-111.

Sierra-Beltran, A.P., Cruz, A., Nunez, E., Del Villar, L.M., Cerecero, J., Ochoa, J.L., 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon*. 36(11): 1493-1502.

Sierra Beltrán, A., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*. 35(3): 447-453.

Smayda, T.J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*. 42: 1137–1153.

Sournia, A., 1978. *Phytoplankton Manual*. UNESCO. Monographs on Oceanographic Methodology. 6: 337 pp.

Southerland, C.M., 2008. Diarrhetic shellfish toxins linked to local *Dinophysis* population in the California coastal waters of Monterey Bay. Master Thesis in Marine Sciences. University of California at Santa Cruz.

Speijers, G., Rossini, G.P., Aune, T., Holland, P., McNabb, P., Miles, C.O., 2011. Yessotoxins. En: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551. Rome, FAO. 2011. 235-270.

Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T., Yamasaki, M., 1996. Interference of Free Fatty Acids from the Hepatopancreas of Mussels with the Mouse Bioassay for Shellfish Toxins. *Lipids*. 31(6): 641-645.

Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M. 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection: Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *J. Chromatogr.* 815: 155-160.

Suzuki, T., Mitsuya, T., 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Pactinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 39:905-908.

Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E., Yasumoto, T., 2005. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Pactinopecten yessoensis*. *Fish. Sci.* 71(4):948-955.

Tachibana, K., Scheuer, P.J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2469–2471.

Takahashi, E., Qiming, Y., Eaglesham, G., Connell, D.W., McBroom, J., Costanzo, S., Shaw, G.R., 2007. Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. *Marine Environmental Research*. 64: 429-442.

Taylor, F.J.R., 1976. Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report on material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963-1964. Institute of Oceanography and Department of Botany, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 132 pp.

Thronsen, J., 1978. Phytoplakton preservation and storage. En: A., Sournia. (Ed.). *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris. 69-74.

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

Tomas, C.R., 1997. *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego, California. 858 pp.

Torgersen, T., Brunn B. N., Rundberget, T., Aune, T., 2008. Structural confirmation and occurrence of azaspirácidos in Scandinavian brown crabs (*Cancer pagurus*). *Toxicon*. 51(1):93-101.

Torres CR, Mejía A, Argote ML, Ramírez I, Mancillas M. 2006. Three-dimensional circulation in Todos Santos Bay, Ensenada, BC, México. In: Gámez B, Ojeda D, Larrazabal G, Cerrolaza M. (Ed.), *Simulación y Modelado en Ingeniería y Ciencias*. SVMNI: MF115–MF122.

Tubaro, A., Sirari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T., 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from the northern Adriatic Sea. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T., (Ed). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO. Santiago de Compostela. 470-472.

Tubaro, A., Dell'Ovo, V., Sosa, S., Florio, C., 2010. Yessotoxins: a toxicological overview. *Toxicon*. 56:163-172.

Turrell, E. A., Stobo, L., 2007. A comparison of the mouse bioassay with liquid chromatography-mass spectrometry for the detection of lipophilic toxins in shellfish from Scottish waters. *Toxicon*. 50:442-447.

Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommung der quatitativen phytoplankton- methodik. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 9: 1–38.

Vale, P., Sampayo, A., 1996. DTX-2 in Portuguese bivalves. In Yasumoto T., Y., Oshima Y., Fukuyo, Y., (Ed.). *Harmful and Toxic Algal Blooms*. IOC of UNESCO: 539-542.

Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G. & Waldock, M. 1993. Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins*. 2: 41-83.

Van Egmond, H.P., 2011. Okadaic acid. En: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551. Rome, FAO. 2011. 163-192.

Velo-Suárez, L., González-Gil, S., Gentien, P., Lunven, M., Bechemin, C., Fernand, L., Raine, R., Reguera, B., 2008. Thin layers of *Pseudo-nitzschia spp.* and the fate of *Dinophysis acuminata* during an upwelling–downwelling cycle in a Galician Ria. *Limnol. Oceanol.* 53:1816–1834.

Velo-Suarez, L., González-Gil, S., Pazos, Y., Reguera, B., 2013. The growth season of *Dinophysis acuminata* in an upwelling system embayment: A conceptual model based on in situ measurements, Deep-Sea Research II, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.03.033>.

Villarroel, O., 2004. Detección de toxina paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la XI región por cromatografía de alta resolución (HPLC) y bioensayo de ratón. *Ciencia y Tecnología del Mar*. 27:33-42.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44:1249–1255.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1979. Occurrence of a new type of toxic shellfish in Japan and chemical properties of the toxin in D.L. Taylor and H.W. Seliger (Ed.). *Toxic dinoflagellate blooms*, Elsevier, New York. 395-398.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46:1405–1411.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto K., Clardy, J., 1984a. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In Ragelis E.P (ed.), *Seafood Toxins*. ACS Symposium series 262. American Chemical Society, Washington D.C. 207-214.

Yasumoto, T., U. Raj & R.Bagnis, 1984 b. Seafood Poisonings in Tropical Regions. *Symposium on Seafood Toxins in Tropical Regions*. Kagoshima: 1-25.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. & Clardy, J. 1985. Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron*. 41(6): 1019-1025.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J., 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*. 41:1019–1025.

Yasumoto, T., Murata M., 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909.

Yasumoto, T., Takizawa, A., 1997. Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by highpressure liquid chromatography. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 61:1775-1777.

Yasumoto, T., Ito, E., Kuiper-Goodman, T., Munday, R., Suzuki, T., 2011. Pectenotoxins. En: Lawrence, J., Loreal, H., Toyofuku, H., Hess, P., Karunasagar, I., Ababouch, L., Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 551.* Rome, FAO. 2011. 193-206.

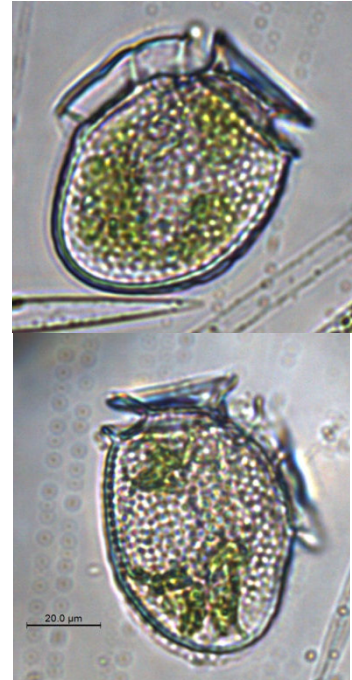
ANEXO

Dinophysis acuminata Claparède et Lachmann

Los ejemplares encontrados coinciden con los reportados por Balech (1988) y Hernández (1992). Son de tamaño medio con una longitud aproximada de 51.714 μm , son células con forma ovalada y ligeramente alargadas, relativamente angostas con 48.220 μm . Los velos cingulares se encuentran casi paralelos, siendo el velo anterior más ancha que el posterior. La superficie de las tecas presenta areolas gruesas.

Respecto a los velos sulcales, el derecho es difícil de distinguir; sin embargo, el velo sulcal izquierdo aunque no es muy grande se extiende aproximadamente hasta la mitad de la célula con los tres radios en ángulos casi rectos, dejando el segundo radio (R2) más cercano a R1 que a R3.

Durante este trabajo *D. acuminata* fue una especie muy común y abundante en la BTS. Los conteos celulares durante junio llegaron a las 1,000 Cel L⁻¹ en muestras de superficie y casi 2,000 Cel L⁻¹ en la profundidad de 10 metros. En muestras de red presentó abundancias relativas desde 0 hasta el 10% de la población total.



Dinophysis caudata Saville-Kent

Es una especie con ejemplares grandes (L: 82.068 μm , H: 41.903 μm), se caracteriza por presentar una hipoteca alargada con una proyección en la parte posterior de entre el 20-40% de su longitud total. La aleta cingular anterior es más ancha que la posterior y posee numerosos radios bien marcados. La aleta sulcal izquierda es ancha y de gran tamaño; al



término de ésta casi pegada a R3 la teca presenta una curvatura muy variable (gradual o abrupta) para formar la proyección. Fue muy común encontrarla unida a otra célula por la parte dorsal en la región más ancha de la célula.



Esta especie no fue muy común durante el periodo de estudio, en superficie se presentó en junio con 1,200 Cel L^{-1} y en septiembre con apenas 100 Cel $\cdot\text{L}^{-1}$; en muestras de 10 metros fue encontrada sólo en octubre y noviembre sin superar las 200 Cel L^{-1} . Sin embargo en muestras de red se encontró en marzo con menos del 1%, mientras que en el periodo de junio a noviembre llegó a presentar hasta el 3% de la abundancia total.

***Dinophysis tripos* Gourret**

Son especímenes relativamente grandes (L: 105.717 μm , H: 51.990 μm), con dos proyecciones en la hipoteca que la diferencian de *D. caudata*; dichas proyecciones no son simétricas ya que la dorsal suele ser más corta que la ventral.

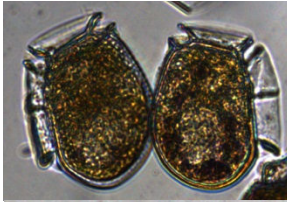
El margen ventral es casi recto hasta llegar a la aleta sulcal donde se curva bruscamente para formar la proyección. La parte dorsal es recta solo hasta la altura de R1, ligeramente inclinada hacia la parte externa hasta la altura de R2 y nuevamente recta hasta formar la proyección. Posee una aleta cingular anterior sobresaliente con radios muy marcados. La aleta sulcal izquierda es grande y ancha llegando hasta la base de la proyección ventral, sus costillas son casi rectas pero de diferente tamaño, siendo R3 el más largo y R1 el más corto.

Esta especie se encontró en red con menos del 1.5% de abundancia relativa en septiembre y octubre, sólo se presentó en una ocasión en muestras de superficie con 200 Cel L⁻¹ a finales de septiembre.



***Dinophysis fortii* Pavillard**

Son células grandes de forma ovalada con una longitud entre 56.697 y 58.376 μm . La aleta cingular anterior es ancha y con radios bien definidos. La región ventral es recta hasta la



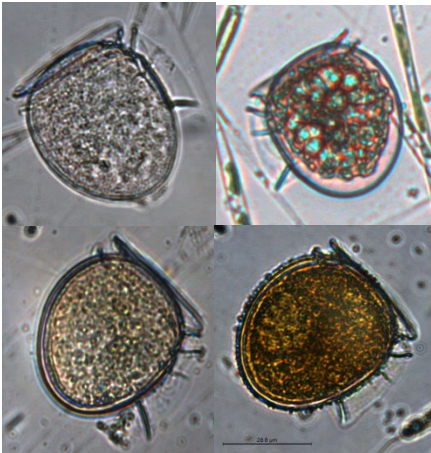
altura de R3, donde comienza a curvarse dejando la parte posterior de la célula muy redondeada. Presenta entre 40.719 y 44.695 μm de ancho.



La aleta sulcal izquierda es muy amplia, con radios muy marcados; R1 y R3 son inclinados mientras que R2 es recto y se encuentra casi a la misma distancia de R1 que de R3.

Esta especie fue la más común durante la investigación ya que se encontró durante casi todo el año a partir de marzo con 200 Cel L⁻¹ en superficie y 10 metros de profundidad, las bajas abundancias continuaron hasta julio, cuando se registraron conteos de hasta 4,000 Cel L⁻¹, en los meses posteriores continua presente con abundancias menores a 1,000 Cel L⁻¹.

***Dinophysis rotundata* Claparède & Lachmann**



Los ejemplares de este grupo son células pequeñas de aproximadamente 51.714 μm de longitud. Se caracterizan por su forma circular, con anchura de 44.686 μm , la parte más ancha de la célula se encuentra entre R2 y R3 de la aleta sulcal izquierda.

Tanto la aleta cingular anterior como la posterior son angostas y a diferencia de otras especies no se observan radios. Su aleta sulcal izquierda es larga pero relativamente más estrecha que en otras especies, ninguno de sus radios es recto, R2 se encuentra más cercana a R1 que a R3.

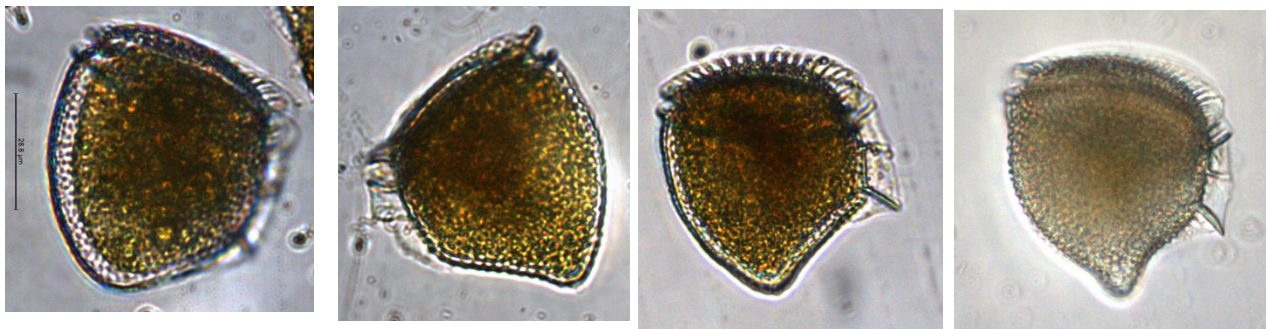
En el 2012 esta especie fue común, pero sus abundancias no fueron elevadas, los conteos máximos se registraron durante mayo a julio y septiembre a octubre, con valores entre 200 Cel L^{-1} y 400 Cel L^{-1} ; los meses restantes presentó menos de 100 Cel L^{-1} . En muestras de red permaneció con abundancias muy bajas por debajo del 4% durante casi todo el año.

Dinophysis sp. cf. odiosa



Esta especie solo se encontró en muestras de red, a finales de septiembre y principios de noviembre con apenas el 0.5% del porcentaje total de la población fitoplanctónica. Presentan una longitud aproximada de 67.459 μm y una anchura de 48.227 μm . R2 se encuentra más cercano a R1 que a R3, siendo este último más largo que los otros dos. R1 y R3 son inclinados y R2 es recto, el velo sulcal es más ancho en R3. La posición de la espina apical y su forma suele ser variable.

Dinophysis sp. cf. mitra



Solo se presentó en dos ocasiones en las primeras dos semanas del noviembre en muestras de red con menos del 0.5% de la abundancia total de la comunidad. No se encontró en muestras de superficie y 10 metros. Su longitud es aproximadamente de 62.325 μm , y su anchura de 53.398 μm .