



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

EFECTO DEL FÓSFORO Y NITRÓGENO EN LA  
PRODUCCIÓN DE TOXINAS PARALIZANTES DEL  
DINOFLAGELADO *Alexandrium tamiyavanichii*.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología )

P r e s e n t a

**Jorge Gerardo Pichardo Velarde**

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2020.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, BCS, siendo las 10 horas del día 03 del mes de Diciembre del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### "EFECTO DEL FÓSFORO Y NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS PARALIZANTES DEL DINOFLAGELADO *Alexandrium tamiyavanichii*"

Presentada por el alumno:

#### Jorge Gerardo Pichardo Velarde

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES con orientación en **BIOTECNOLOGÍA.**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

---

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de Tesis

#### LA COMISIÓN REVISORA

---

Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Co-Directora de Tesis

---

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Tutor de Tesis

---

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad  
Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

### **Jurado de Examen**

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

### **Suplente**

Dra. María Concepción Lora Vilchis

## Resumen

*Alexandrium tamiyavanichii* es un dinoflagelado marino productor de toxinas paralizantes (TP), que afecta a diversos organismos. Se han caracterizado 57 análogos de las TP entre los que destacan la saxitoxina (STX) y las gonyautoxinas (GTX). Los dinoflagelados aumentan la producción de TP y en algunas ocasiones la síntesis de análogos de mayor potencia tóxica en condiciones de estrés, tal como la limitación de fósforo (LF) y/o exceso de nitrógeno (EN). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento poblacional y la producción de TP en cultivos de *A. tamiyavanichii* aislado de la bahía de La Paz, en condiciones de LF y EN. Asimismo, se evaluó la dinámica de los nutrientes en el medio de cultivo a lo largo de la curva de crecimiento. Se cultivó a *A. tamiyavanichii* en medio GSe con diferentes condiciones de nutrientes: 1) medio GSe sin modificaciones (control), 2) LF y 3) EN. Se realizaron muestreos cada tercer día para evaluar la concentración celular, analizar los nutrientes disueltos en el medio de cultivo (nitritos, nitratos, amonio y ortofosfatos, por técnicas colorimétricas), así como, identificar y cuantificar las TP por medio del método oficial AOAC 2005.06 (HPLC-FLD). Se realizó una curva de crecimiento de 33 días a  $24^{\circ}\text{C} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ;  $100 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 12 h luz:12 h oscuridad. La fase estacionaria de la curva de crecimiento estuvo ausente en todos los tratamientos. El crecimiento poblacional en el tratamiento LF, provocó un aumento de 3.4 veces la concentración celular con respecto al control y EN ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento en el control y EN ( $p > 0.05$ ). La mayor concentración de toxinas resultó en el control, el día 21 ( $309 \text{ fmol PSP c\acute{e}l}^{-1}$ ), que corresponde a la fase exponencial. No se encontraron diferencias significativas en la producción de toxinas en los tratamientos propuestos con respecto al control ( $p > 0.05$ ). La SXT fue el análogo que se encontró en mayor proporción en todos los tratamientos ( $>40\%$ ) y en todos los días de muestreo. Aun cuando al tratamiento de LF no se le adicionó ortofosfato, se determinaron concentraciones superiores al agua de mar utilizada en el cultivo. Se concluye que los tratamientos de LF y EN no afectaron la producción de TP de *A. tamiyavanichii*, solo la LF promovió el crecimiento poblacional del dinoflagelado con respecto al control. Este trabajo describe por primera vez la toxicidad de una cepa de *A. tamiyavanichii* aislada de costas mexicanas., así como las condiciones en las que se promueve el crecimiento.

**Palabras clave:** *Alexandrium tamiyavanichii*, exceso de nitrógeno, limitación de fósforo, nutrientes, toxinas paralizantes.

ORCID de Pichardo-Velarde: 0000-0002-3513-0492

---

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de Tesis

---

Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Co-Directora de Tesis

## Summary

*Alexandrium tamiyavanichii* is a marine dinoflagellate that produces paralyzing toxins (PT), which affects various organisms. More than 57 analogs have been characterized, among which the saxitoxin (STX) and the gonyautoxins (GTX) stand out. Dinoflagellates increase the production of TP and, on some occasions, the synthesis of analogs of higher toxic potency under stress conditions, such as the limitation of phosphorus (LF) and/or excess nitrogen (EN). This work aimed to evaluate the population growth and TP production in cultures of *A. tamiyavanichii* isolated from the Bay of La Paz under conditions of LF and EN. Likewise, the dynamic of the nutrients in the culture medium was evaluated along the growth curve. *A. tamiyavanichii* was grown in GSe medium with different nutrient conditions: 1) GSe medium without modifications (control), 2) LF, and 3) EN. Samples were carried out every third day to evaluate the cell concentration, analyze the nutrients dissolved in the culture medium (nitrites, nitrates, ammonium, and orthophosphates, by colorimetric techniques), as well as, identify and quantify the TP through the official method AOAC 2005.06 (HPLC-FLD). A growth curve of 33 days was made at  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $100\text{ }\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ; 12 h light: 12 h dark. The stationary phase of the growth curve was absent in all treatments. The stationary phase of the growth curve was absent in all treatments. The population growth in the LF treatment caused an increase of 3.4 times the cell concentration concerning the control and EN ( $p < 0.05$ ). No significant differences were found between growth in control and EN ( $p > 0.05$ ). The highest concentration of toxins resulted in the control on day 21 ( $309\text{ fmol PSP cell}^{-1}$ ), which corresponds to the exponential phase. No significant differences were registered in toxins production in the proposed treatments concerning the control ( $p > 0.05$ ). SXT was the analog found in the highest proportion in all treatments ( $> 40\%$ ) and all sampling days. Even when orthophosphate was not added to the LF treatment, concentrations higher than the seawater used in the culture were determined. It is concluded that the LF and EN treatments did not affect the production of PT of *A. tamiyavanichii*; only the LF promoted the population growth of the dinoflagellate concerning the control. This work describes for the first time the toxicity of a strain of *A. tamiyavanichii* isolated from Mexican coasts, as well as the conditions in which growth is promoted.

**Key words:** *Alexandrium tamiyavanichii*, nitrogen excess, phosphorus limitation, nutrients, paralyzing toxins.

ORCID Pichardo-Velarde: 0000-0002-3513-0492

---

Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz  
Co-Directora de Tesis

---

Dra. Rosalba Alonso Rodríguez  
Co-Directora de Tesis

## Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a esa persona que vio un potencial en mí, confió en mi criterio y me dio la facilidad de explorar el mundo de la investigación.

Infinitamente gracias por darme la libertad de proponer ideas y concretarlas en el experimento y sobre todo, de dejarme trabajar a su lado en todo este tiempo.

## **Agradecimientos**

Al CIBNOR La Paz, B.C.S. por la formación académica brindada, así como las facilidades para hacer uso de la infraestructura de Posgrado. A todas aquellas personas que contribuyeron para el desarrollo de mis estudios de Posgrado: Ing. Horacio Sandoval Gómez, Tania Verónica Núñez Valdez, Lic. Leticia González Rubio Rivera y Lic. Osvelia Ibarra Morales, gracias por todo el apoyo brindado a lo largo de estos dos años.

A la Dra. Norma Hernández Saavedra, quien fue un gran apoyo para solucionar diversos problemas durante mi estancia en el CIBNOR en su gestión como Directora de Posgrado, fue un gran alivio platicar con usted en esas ocasiones. A la Dra. Gracia Gómez Anduro, actual Directora del Posgrado, por todas las facilidades brindadas en su gestión.

Al CONACyT por la beca de Maestría otorgada (#921250) y la beca mixta para realizar una estancia de investigación de 6 meses en el Laboratorio de Biotoxinas Marinas – ICMYL Unidad Académica Mazatlán, Sinaloa.

Este estudio fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP CONACyT A1-S-37026 “Caracterización de cepas de dinoflagelados potencialmente tóxicos aisladas del Pacífico Mexicano en el contexto de Cambio Climático”, así mismo, a través del proyecto UNAM DGAPA PAPIIT IN112914 “Efecto de la resuspensión de sedimentos, nutrientes y temperatura en la formación de florecimientos algales nocivos por dinoflagelados productores de toxinas paralizantes en el Pacífico Mexicano”, ambos proyectos a cargo de la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez y el proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACyT 258122 “Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la toxicocinética y toxicodinámica de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos” a cargo de la Dra. Norma Estrada.

Al ICMYL-UNAM Unidad Mazatlán por financiar parte de esta investigación a través del proyecto institucional #326 “Biotoxinas marinas y sus efectos sobre organismos” a cargo de la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez.

A mis Co-Directoras de Tesis, Dra. Norma Estrada y Dra. Rosalba Alonso, por dirigir este trabajo, por compartir conmigo su experiencia, por tenerme tanta paciencia durante el proceso de escritura. Gracias por todo el apoyo que me brindaron en el ámbito académico y personal.

A mi Co-Tutor de Tesis, el Dr. Felipe Ascencio, por dedicarme el tiempo, escucharme y brindarme palabras de ánimo en todo momento.

A la Ing. Biot. Lidia Iliana Moreno Hernández, por el análisis de toxinas paralizantes en el método oficial AOAC 2005.06.

Al Mat. Germán Ramírez Reséndiz, gracias por su paciencia, por ayudarme en los estadísticos y en la explicación de los mismos, gracias por explicarme de mil formas para entender lo que trataba de explicarme. Gracias por sus consejos y por compartir su experiencia conmigo.

A la M. en C. Sonia Jeanette Delgado del Villar por facilitarme material bibliográfico para complementar algunas tablas de mi tesis, así como por su apoyo emocional durante mi estancia en el laboratorio de Biotoxinas Marinas del ICMYL.

A mis compañeros de maestría: Fanny, Bardo, Vivi, Paco y Dani, por hacer de este proceso una carga fácil de llevar. Muchas gracias chicos por todas las veces que me escucharon y apoyaron, gracias por las risas y la diversión.

Fanny, nunca dejes que te opaquen, sigue luchando por ti y por tu bienestar. Eso siempre será lo que te caracterizará. Gracias, pequeña por estar siempre en el momento en que te necesité.

A Moni Rojas Virgen, por recibirme en La Paz y brindarme un espacio en su hogar. Gracias Moni por adoptarme como tu “guapo”, gracias por escucharme cada vez que lo necesite, por hacer el papel de mamá que mira que te sale muy bien, gracias por todo lo que me apoyaste, por confiar en mí y en mi criterio.

A Enrique Avalos Flores, gracias por esas clases de vida disfrazas de clases de yoga. Tu enseñanza me ha llevado a valorar tantas cosas. En serio, gracias.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	i
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vi
<b>Lista de figuras</b> .....	viii
<b>Lista de tablas</b> .....	x
<b>Nomenclaturas</b> .....	xi
<b>Unidades</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Floraciones Algas Nocivas (FAN) y dinoflagelados tóxicos .....	1
1.2 Toxinas paralizantes (TP) y <i>Alexandrium</i> spp. ....	2
1.3 Dinoflagelado tóxico <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> .....	4
1.4 Rol de los nutrientes en la producción de TP .....	5
1.5 El fósforo en la producción de TP .....	6
1.6 El nitrógeno en la producción de TP .....	7
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	8
2.1 <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> .....	8
2.2 <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> en México .....	10
2.3 El rol de los nutrientes en la producción de TP en el género <i>Alexandrium</i> .....	11
2.4 El rol del fósforo en la producción de TP en el género <i>Alexandrium</i> .....	12
2.5 El rol del nitrógeno en la producción de TP en el género <i>Alexandrium</i> .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	17
5.1 Objetivo general .....	17
5.2 Objetivos particulares .....	17
<b>6. MATERIAL Y METODOS</b> .....	18
6.1 Obtención de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> .....	18
6.2 Diseño experimental .....	19
6.3 Curva de crecimiento .....	20
6.4 Determinación de nutrientes: amonio, nitritos, nitratos y ortofosfatos .....	20
6.5 Identificación y cuantificación de toxinas paralizantes en el medio de cultivo .....	22
6.6 Análisis estadísticos .....	23
<b>7. RESULTADOS</b> .....	25
7.1 Características del crecimiento celular .....	25
7.2 Curvas de crecimiento .....	25
7.3 Producción de toxinas paralizantes .....	27
7.4 Nutrientes disueltos en el medio de cultivo .....	31
7.4.1 Ortofosfatos .....	31
7.4.2 Amonio .....	32
7.4.3 Nitrito .....	33
7.4.4 Nitrato .....	34
<b>8. DISCUSION</b> .....	36

8.1 Crecimiento de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> a 24°C .....	36
8.2 Producción de TP en el cultivo de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> a 24°C .....	37
8.3 Nutrientes disueltos en el cultivo de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> .....	38
8.3.1 Ortofosfato en el medio de cultivo .....	38
8.3.2 Amonio en el medio de cultivo .....	39
8.3.3 Nitrito en el medio de cultivo .....	39
8.3.4 Nitrato en el medio de cultivo .....	39
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	41
<b>11 ANEXOS</b> .....	51
<b>Anexo A.</b> Formato de cesión de uso de la cepa AYVP-1. ....	52
<b>Anexo B.</b> Preparación del medio de cultivo GSe (80). ....	54
<b>Anexo C.</b> Modificaciones propuestas al medio de cultivo GSe (80).....	58
<b>Anexo D.</b> Determinación de ortofosfatos en el medio de cultivo (84). ....	60
<b>Anexo E.</b> Determinación de amonio en el medio de cultivo (85). ....	62
<b>Anexo F.</b> Determinación de nitritos en el medio de cultivo (87). ....	64
<b>Anexo G.</b> Determinación de nitratos en el medio de cultivo (88). ....	66

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de acumulación de toxinas de dinoflagelados a lo largo de la cadena trófica hasta llegar al consumidor final, el humano (fuente propia).....	2
<b>Figura 2.</b> Microfotografías de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> (cepa AYPV-1). Barra de escala = 30 $\mu\text{m}$ (fuente propia).....	5
<b>Figura 3.</b> Estudios relacionados con el dinoflagelado <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> alrededor del mundo (fuente propia). .....	8
<b>Figura 4.</b> Ruta de dispersión del Pacífico Occidental al Este Sudafricano. Modificado de Ruiz-Sebastián <i>et al.</i> (37).....	9
<b>Figura 5.</b> Diagrama del diseño experimental establecido para la realización de este proyecto (fuente propia).....	19
<b>Figura 6.</b> Curvas de crecimiento de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> durante 33 días a 24°C, en el control y en los tratamientos de limitación de fósforo (LF) y enriquecimiento de nitrógeno (EN). Los valores están representados por su media $\pm$ desviación estándar.....	26
<b>Figura 7.</b> Concentración celular de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> expresada en Logaritmo Natural (LN), con una tendencia lineal en el control y los tratamientos de limitación de fósforo (LF) y enriquecimiento de nitrógeno (EN). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (*). .....	26
<b>Figura 8.</b> Concentración e identificación de análogos de TP de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> a 24°C en el tratamiento control. Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX <sub>2-3</sub> (gonyautoxina <sub>2-3</sub> ) y dcGTX <sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina <sub>2-3</sub> ). Las columnas representan la concentración de TP (fmol $\text{cél}^{-1}$ ) por día de muestreo.....	28
<b>Figura 9.</b> Concentración e identificación de análogos de TP de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> a 24°C en el tratamiento de limitación de fósforo. Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX <sub>2-3</sub> (gonyautoxina <sub>2-3</sub> ), carbamoil <sub>1-2</sub> (C <sub>1-2</sub> ) y dcGTX <sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina <sub>2-3</sub> ). Las columnas representan la concentración de TP (fmol $\text{cél}^{-1}$ ) por día de muestreo.....	29
<b>Figura 10.</b> Concentración e identificación de análogos de TP de <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> a 24°C en el tratamiento de enriquecimiento de nitrógeno (EN). Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX <sub>2-3</sub> (gonyautoxina <sub>2-3</sub> ) y dcGTX <sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina <sub>2-3</sub> ). Las columnas representan la concentración de TP (fmol $\text{cél}^{-1}$ ) por día de muestreo. ....	30
<b>Figura 11.</b> Concentración e identificación de análogos de TP de <i>A. tamiyavanichii</i> al inicio y fin del experimento (día 0 y día 33). Control indica medio GSe sin modificaciones, LF, limitación de fósforo y EN, enriquecimiento de nitrógeno. Los valores están representados por su media $\pm$ desviación estándar. Las líneas continuas separan los tratamientos realizados. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos con respecto al control (a,b). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el mismo tratamiento (*). .....	31
<b>Figura 12.</b> Concentración de ortofosfatos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno). Los valores están representados por su media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (*). .....	32
<b>Figura 13.</b> Concentración de amonio en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno), en el cultivo de <i>A. tamiyavanichii</i> a 24°C. Los valores están representados por su media $\pm$ desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control. ....	33
<b>Figura 14.</b> Concentración de nitritos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno) en el cultivo de <i>A. tamiyavanichii</i> a 24°C. Los valores están	

representados por su media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control (*). .....	34
<b>Figura 15.</b> Concentración de nitratos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno) en el cultivo de <i>A. tamiyavanichii</i> a 24°C. Los valores están representados por su media $\pm$ desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control (*). .....	35

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Factor de Equivalencia Tóxico (FET) para diversos análogos de las toxinas paralizantes (TP). Modificada de EFSA (39), FAO/WHO (16) y Turnbull <i>et al.</i> (34). .....	4
<b>Tabla II.</b> Diluciones de las muestras analizadas para cada nutriente.....	21
<b>Tabla III.</b> Valores utilizados para la transformación de los resultados volumétricos de cromatografía líquida a valores de concentración y concentración basada en toxicidad. ....	23
<b>Tabla IV.</b> Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ ) y tiempo de generación promedio (Tg) para <i>Alexandrium tamiyavanichii</i> en el control y los tratamientos.....	27
<b>Tabla V.</b> Soluciones stock de macronutrientes. ....	56
<b>Tabla VI.</b> Preparación de la solución stock de metales traza. ....	57
<b>Tabla VII.</b> Preparación de soluciones individuales de vitaminas. ....	57
<b>Tabla VIII.</b> Preparación de solución stock de vitaminas.....	57
<b>Tabla IX.</b> Preparación de la solución de nutrientes del medio GSe.....	58
<b>Tabla X.</b> Preparación del medio GSe.....	59
<b>Tabla XI.</b> Medio GSe y modificaciones al medio de cultivo propuestas. ....	61
<b>Tabla XII.</b> Construcción de curva de calibración para ortofosfatos.....	63
<b>Tabla XIII.</b> Construcción de curva de calibración para amonio.....	65
<b>Tabla XIV.</b> Construcción de curva de calibración para nitritos. ....	67
<b>Tabla XV.</b> Construcción de curva de calibración para nitrato. ....	69

## Nomenclaturas

Abreviatura	Significado
$\Delta t$	Delta t (Diferencial del tiempo)
$\Delta X$	Delta X (Diferencial de la densidad celular para este trabajo)
$^{15}\text{N}$	Isótopo estable del nitrógeno
(*)	Diferencias significativas con respecto al control
a,b	Diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control
A.	<i>Alexandrium</i> (para este trabajo)
Ác.	Ácido
AMS	Agua de Mar Sintética
ANCOVA	Análisis de covarianza
ASP	Intoxicación amnésica, por sus siglas en inglés, <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>
BCS	Baja California Sur
BR	Blanco reactivo
C	Carbamoil-toxina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CODIMAR	Colección de Dinoflagelados Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
dcGTX	Decarbamoil gonyautoxina
dcNEOSTX	Decarbamoil-neosaxitoxina
dcSTX	Decarbamoil-saxitoxina
DSP	Intoxicación diarreaica, por sus siglas en inglés, <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>
EF	Enriquecimiento de fósforo
EN	Enriquecimiento de nitrógeno
ES	Medio de cultivo ES (94)
ES-DK	Medio de cultivo ES modificado (94)
Est.	Estándar
f	Medio de cultivo f (95)
f/8	Medio de cultivo f, diluido 8 veces
FAN	Floraciones Algaes Nocivas
Fig.	Figura
GSe	Medio de cultivo G modificado y adicionado con selenio (80)
GTX	Gonyautoxina
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico (fórmula química)
HCl	Ácido clorhídrico (formula química)
HPLC-FLD	Cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia
Ing. Biot.	Ingeniero Biotecnólogo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fósforo monobásico de potasio (fórmula química)
LF	Limitación de fósforo
LN	Limitación de nitrógeno
N	Nitrógeno
N-NH <sub>4</sub>	Nitrógeno como amonio

<b>N-NO<sub>2</sub></b>	Nitrógeno como nitrito
<b>N-NO<sub>3</sub></b>	Nitrógeno como nitrato
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio (fórmula química)
<b>Na<sub>v</sub></b>	Canales de sodio dependientes de voltaje
<b>NED</b>	N- (1-naftil) – etilendiamina dihidroclorhídrica
<b>NEOSTX</b>	Neosaxitoxina
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Amonio
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio (fórmula química)
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>NSP</b>	Intoxicación neurotóxica, por sus siglas en inglés, <i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>
<b>P</b>	Fósforo
<b>p&gt;0.05</b>	No se encontraron diferencias significativas con respecto al control
<b>p&lt;0.05</b>	Diferencias significativas con respecto al control
<b>P-PO<sub>4</sub></b>	Fósforo como ortofosfato
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Ortofosfato
<b>PSP</b>	Intoxicación paralizantes, por sus siglas en inglés, <i>Paralyzing Shellfish Poisoning</i>
<b>sp.</b>	Especie
<b>spp.</b>	Especies
<b>STX</b>	Saxitoxina
<b>Tg</b>	Tiempo de generación
<b>TP</b>	Toxinas paralizantes
<b>vs.</b>	Versus

---

## Unidades

Unidad	Significado
% mol	Porcentaje molar, unidad de medición del porcentaje de análogos de toxinas
°C	Grado Celsius
μ	Tasas específica de crecimiento (para este trabajo, divisiones por día)
μg	Microgramo = $10^{-6}$ g
μL, μL <sup>-1</sup>	Microlitro, por microlitro = $10^{-6}$ L
μM	Micromolar = $10^{-6}$ molar
μm	Micrómetro = $10^{-6}$ metros
μmol L <sup>-1</sup>	Micromoles por litro = $10^{-6}$ moles por litro
μmoles de fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Unidad de medición de la irradiancia lumínica
cél, cél <sup>-1</sup>	Célula, por célula
cél mL <sup>-1</sup>	Células por mililitro
d <sup>-1</sup>	tasas de adición de medio de cultivo fresco (para este trabajo)
eq.	Equivalente
fmoles	Femtomoles = $10^{-15}$ moles
fmol cél <sup>-1</sup>	Femtomoles de toxinas paralizantes por célula, unidad de concentración
pg de STX eq. cél <sup>-1</sup>	Picogramo de saxitoxina equivalente por célula, unidad de concentración basada en la toxicidad de la saxitoxina
g, g <sup>-1</sup>	Gramo, por gramo
h	Hora
L, L <sup>-1</sup>	Litro, por litro
lb pulg <sup>-2</sup>	Libra por pulgada cuadrada, unidad de medición de la presión
LN	Logaritmo Natural
M	Molar, unidad de concentración= peso molecular por litro
mL, mL <sup>-1</sup>	Mililitro, por mililitro = $10^{-3}$ L
N	Normal, 1 equivalente de soluto por litro de solución
nm	Nanómetro = $10^{-9}$ metros
pmol mL <sup>-1</sup>	Picomol= $10^{-12}$ moles por mililitro, unidad de concentración
rpm	Revoluciones por minuto

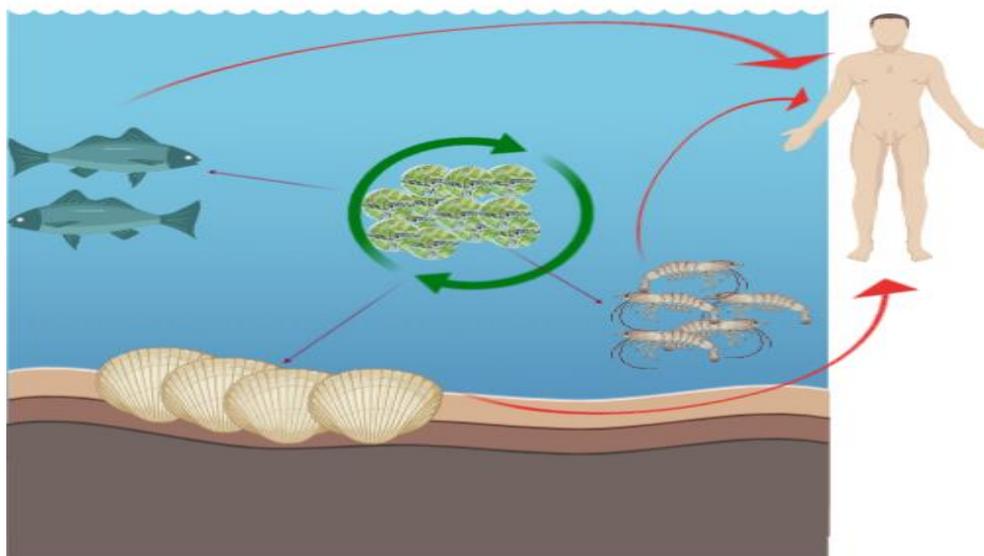
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Floraciones Algales Nocivas (FAN) y dinoflagelados tóxicos

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN) son eventos naturales que se dan en ambientes acuáticos, por la proliferación excesiva y en corto tiempo de ciertas especies de microalgas que pueden presentarse en miles a millones de células por mililitro ( $10^3$  a  $10^6$  cél mL<sup>-1</sup>) (1). Se han descrito alrededor de 5000 especies de microalgas, de las cuales aproximadamente 300 especies son dinoflagelados (Clase: Dinophyceae) que pueden producir floraciones algales, donde 180 especies han sido registradas como nocivas y 94 especies han sido consideradas como tóxicas (2, 3).

Las toxinas de los dinoflagelados han sido descritas como de las más potentes encontradas en la naturaleza (1). Estas toxinas pueden transferirse a través de la cadena trófica a los moluscos y peces que se alimentan de los dinoflagelados (Fig. 1) y provocar daño a diversos organismos como el humano (4 - 9).

Se conocen diversos patrones de intoxicación asociados al tipo de toxina implicada. Entre las intoxicaciones más frecuentes por consumo de mariscos están: intoxicación paralizante (*Paralyzing Shellfish Poisoning*; PSP), intoxicación diarreica (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP), intoxicación amnésica (*Amnesic Shellfish Poisoning*, ASP) y la intoxicación neurotóxica (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*, NSP) (10, 11). En los últimos años, el incremento en intensidad, duración y distribución geográfica de las ocurrencias de las FAN ocasionada por los dinoflagelados tóxicos, sumados a los reportes de casos de intoxicación humana, han causado severas pérdidas económicas en la industria pesquera y originado una mayor preocupación en temas de salud pública (1).



**Figura 1.** Diagrama de acumulación de toxinas de dinoflagelados a lo largo de la cadena trófica hasta llegar al consumidor final, el humano (fuente propia).

### 1.2 Toxinas paralizantes (TP) y *Alexandrium* spp.

Entre los dinoflagelados tóxicos están los del género *Alexandrium* spp. (División *Pyrrhophyta*: Filo *Dinophyceae*). Este género agrupa más de 42 especies (2), de las cuales se conoce que al menos la mitad de ellas producen algún tipo de toxina, entre las cuales destacan las Toxinas Paralizantes (TP) (1, 12 - 18). En Latinoamérica se reconoce la presencia de especies potencialmente tóxicas del género *Alexandrium*, tales como *A. catenella*, *A. monilatum*, *A. ostenfeldii*, *A. tamarensense* y *A. tamiyavanichii* en las costas tanto del Océano Pacífico como del Atlántico (19).

Las TP constituyen un grupo de compuestos tetrahidropurínicos estrechamente relacionados, de potencia y actividad biológica variable. La saxitoxina (STX) es la molécula hidrofílica más potente de las TP y es considerada el compuesto activo responsable de la intoxicación paralizante por consumo de mariscos (PSP), además es la primera toxina paralizante caracterizada químicamente (20). Las TP bloquean los canales de sodio dependientes de voltaje ( $Na_v$ ) en células del sistema nervioso, inhibiendo la generación del potencial de acción en membranas excitables, produciendo parálisis neuromuscular en vertebrados (9, 20 - 24).

Los efectos letales de las TP varían de acuerdo al tipo de organismo afectado (crustáceos, moluscos, peces y humanos) (25 - 27). Los signos clínicos en humanos sujetos a una intoxicación a bajas concentraciones de la toxina sugieren entumecimiento de extremidades, la cual, si se trata de una exposición prolongada y a altas concentraciones de las TP, puede provocar paro cardio-respiratorio en el individuo y como consecuencia, la muerte (28 - 30).

Se han caracterizado fisicoquímica y toxicológicamente más de 57 análogos de las TP, los cuales varían en potencia toxica y se subclasifican en grupos de alta a baja toxicidad (grupo carbamoil>sulfocarbamoil>decarbamoil>benzoatos) (20, 31). Además, bajo condiciones ácidas, las TP pueden transformarse a análogos de mayor potencia tóxica (32, 33). La Tabla I muestra la potencia tóxica máxima de 19 análogos de STX presentes en muestras de moluscos bivalvos contaminados con TP, donde los Factores de Equivalencia Tóxicos (FET) están representados con la STX como análogo de referencia por ser el de mayor potencia tóxica (11, 34).

La toxicidad de los dinoflagelados varía según su especie y la región en que habitan. El género *Alexandrium* independientemente de la región en la que se encuentre, es capaz de producir TP y otras toxinas de tipo lipofílicas. Dentro de las TP, puede producir en mayor proporción análogos del tipo carbamoil (GTX<sub>1,2,3 y 4</sub>) y sus epímeros  $\alpha$  y  $\beta$  (1, 9, 15, 35). Sin embargo, para los mares que rodean Latinoamérica, se ha encontrado que es capaz de producir análogos del tipo sulfocarbamoil (C<sub>1-2</sub> y B<sub>1</sub>) y carbamoil (GTX<sub>1-4</sub>) (19). Igualmente, se ha identificado que la producción de toxinas por la misma especie es dependiente de las variables fisicoquímicas y/o regionales, ya que al estudiar la misma especie en diferentes zonas geográficas se ha detectado que la concentración de TP se puede ver afectada pero no la proporción de los análogos registrados (36 - 38).

**Tabla I.** Factor de Equivalencia Tóxico (FET) para diversos análogos de las toxinas paralizantes (TP). Modificada de EFSA (39), FAO/WHO (11) y Turnbull *et al.* (34).

Análogo de STX	FET	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )
SXT	1.00	299.3
GTX <sub>1</sub>	1.00	411.4
GTX <sub>2</sub>	0.36	395.4
GTX <sub>3</sub>	0.64	395.4
GTX <sub>4</sub>	0.73	411.4
GTX <sub>1-4</sub>	0.99	411.4
GTX <sub>2-3</sub>	0.64	395.4
NEOSTX	2.00	315.3
GTX <sub>5</sub> (B <sub>1</sub> )	0.06	379.4
GTX <sub>6</sub> (B <sub>2</sub> )	0.05	395.4
C <sub>1</sub>	0.01	475.4
C <sub>2</sub> (GTX <sub>8</sub> )	0.10	475.4
C <sub>3</sub>	0.01	491.4
C <sub>4</sub>	0.06	491.4
dcGTX <sub>2</sub>	0.15	352.3
dcGTX <sub>3</sub>	0.38	352.3
dcGTX <sub>2-3</sub>	0.37	352.3
dcSTX	0.51	256.3
dcNEOSTX (GTX <sub>7</sub> )	0.20	345.2

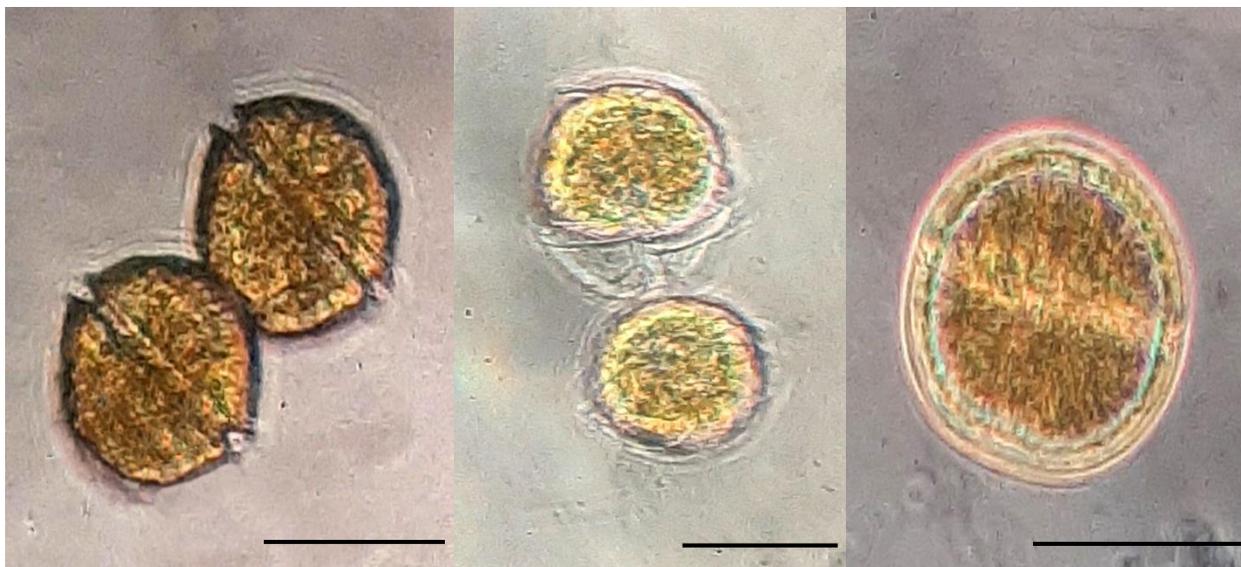
STX, saxitoxina; GTX, gonyautoxina; dc-GTX, decarbamoil gonyautoxina; C, carbamoil; NEOSTX, neosaxitoxina; dcSTX, decarbamoilsaxitoxina; dcNEOSTX, decarbamoil-neosaxitoxina; Colores indican grupos **carbamoil**, **sulfocarbamoil** y **decarbamoil**.

Por otro lado, se ha observado que algunas especies del género *Alexandrium* son capaces de desarrollar morfotipos y/o ribotipos para adaptarse a las condiciones medioambientales específicas (temperatura, calidad del agua, luz y/o predadores). Esta variabilidad hace que la distribución global del género, el perfil toxicológico para cada especie o bien, su morfología sean difíciles de establecer (40 - 44).

### 1.3. Dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamiyavanichii*

*Alexandrium tamiyavanichii* (Balech, 1994) (45) es un dinoflagelado marino planctónico tecado productor de TP. En el medio silvestre, *A. tamiyavanichii* tiene una longitud de 31-41 µm, así como un transdiámetro de 26-35 µm (Fig. 2) (46). Durante su ciclo de crecimiento, *A. tamiyavanichii* se reproduce mediante división binaria, por lo cual, la presencia de cadenas de 2 o más células es común tanto en el medio silvestre como en laboratorio, sin embargo, se han encontrado cadenas de 8 o más células en el medio natural (46). Se distribuye en diversas partes del mundo,

principalmente en aguas costeras de ambientes cálidos. La especie se ha registrado en países como Japón (47), Malasia (36, 38, 48, 49), Sur de África (37), Noreste de Brasil (42) y el Pacífico Central de México (50 - 52).



**Figura 2.** Microfotografías de *Alexandrium tamiyavanichii* (cepa AYPV-1). Barra de escala = 30  $\mu\text{m}$  (fuente propia).

#### 1.4. Rol de los nutrientes en la producción de TP

La capacidad que tienen los dinoflagelados para producir metabolitos secundarios está en función de un déficit y/o competencia por nutrientes del medio, como mecanismo de defensa contra predadores, como medio de almacenamiento de ciertos nutrientes, o bien, porque cuentan con el gen necesario para producir diferentes toxinas (12, 13, 35, 53, 54). La concentración de TP producidas por los dinoflagelados puede estar influenciada tanto por factores ambientales (irradiación, temperatura y salinidad), como por la concentración y proporción de los macronutrientes como fósforo o nitrógeno, que son esenciales para el crecimiento (12, 55 - 60).

En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que la toxicidad a menudo varía entre las especies de *Alexandrium* y las cepas de la misma especie que tienen un estado nutricional diferente (12, 56, 61 - 64). Los dinoflagelados se caracterizan por una disminución en las tasas fotosintéticas máximas y altos costos de respiración y por lo tanto, se consideran especies de crecimiento lento (65). Sin embargo a pesar de una aparente desventaja competitiva bajo una limitación de nutrientes, los dinoflagelados coexisten con otros grupos de microalgas de

crecimiento rápido, e incluso florecen frecuentemente en aguas pobres en nutrientes u oligotróficas (66).

Se ha sugerido que la producción de toxinas podría ser una adaptación que los dinoflagelados utilizan para compensar la desventaja ecológica de su baja afinidad por los nutrientes. Así, las toxinas podrían actuar como disuasivo de alimentación para los herbívoros (67, 68) y la producción de toxinas podría mejorar la competencia interespecífica al re-dirigir la presión de pastoreo hacia especies de fitoplancton no tóxicas que son competidores potenciales (53).

Entre los macronutrientes que se han estudiado ampliamente en relación a la producción de toxinas por dinoflagelados, se encuentran: el fósforo (P) y el nitrógeno (N). Estos macronutrientes modulan la producción de TP, dependiendo de la disponibilidad de las especies inorgánicas, disueltas y reactivas del P (ortofosfato) y N (amonio, nitrito y nitrato) (12, 56, 62, 69 - 71). Se ha reportado que la producción de toxinas en dinoflagelados tóxicos es elevada bajo condiciones limitantes de ortofosfato, P-PO<sub>4</sub> (71, 72) y la mayoría de los estudios coinciden en que la limitación de N o P reduce el crecimiento de los dinoflagelados (63, 73 - 75).

### **1.5. El fósforo en la producción de TP**

El fósforo en el medio de cultivo, es un macronutriente que juega un papel importante debido a que las microalgas lo utilizan en diversos procesos de su metabolismo primario, es importante en el tamaño celular, división celular y en el propio metabolismo energético (15, 90). En algunos dinoflagelados tóxicos, la limitación del fósforo (LF) tiene un efecto positivo en el ciclo de crecimiento cuando el cultivo llega a la fase estacionaria (13), así como un aumento significativo en la producción de TP y análogos de mayor potencia tóxica en comparación con condiciones control y/o limitaciones de otros nutrientes esenciales para el crecimiento del dinoflagelado (12, 16).

## 1.6. El nitrógeno en la producción de TP

El exceso de N, induce la producción de análogos de mayor potencia tóxica, así como mayor concentración de TP a lo largo de su ciclo de crecimiento, debido a que se ha calculado que el 33% del peso molecular de una TP es  $\text{NH}_4^+$  y, por lo tanto, el N es necesario para la biosíntesis de toxinas (12, 58, 59, 76). Asimismo, se ha comprobado mediante el uso del isótopo estable  $^{15}\text{N}$ , como fuente de nitrógeno de un dinoflagelado productor de TP, que el aminoácido arginina puede transformarse a STX dependiendo de la disponibilidad de N en el medio, esto se determinó mediante la posible ruta intermedia en la síntesis de las TP (9).

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo, disminuye la producción de toxinas (62), dando como resultado una disminución en la regulación de los genes asociados a la actividad de los cloroplastos, por lo que se sugiere que en dicha condición es necesario enfocar la energía obtenida a otros procesos regulatorios del metabolismo de la célula (13). Igualmente, otros dinoflagelados tienen la capacidad de generar reservas internas de nutrientes tanto de nitrógeno y fósforo, por lo que al someterlos a un estrés, es decir la limitación de estos nutrientes, no se generan cambios en el crecimiento o producción de sus toxinas (12, 13).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Alexandrium tamiyavanichii*

El dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamiyavanichii*, ha sido poco estudiado con referencia al posible efecto de la disponibilidad de nutrientes en la producción de TP. Los trabajos a nivel mundial que se han realizado con *A. tamiyavanichii* (Fig. 3) tratan sobre su taxonomía, dispersión, crecimiento y producción de toxinas.



**Figura 3.** Estudios relacionados con el dinoflagelado *Alexandrium tamiyavanichii* alrededor del mundo (fuente propia).

En el Indopacífico, se estudió el efecto de la salinidad en la producción de TP en una cepa de *A. tamiyavanichii* aislada en Malasia. Se encontró que, *A. tamiyavanichii* presentó un crecimiento óptimo a una salinidad de 25, así como una concentración de 80 fmol cél<sup>-1</sup> y una proporción mayor de análogos GTX con respecto a los demás análogos. No se encontraron efectos significativos entre la salinidad y la producción de las TP y se reportó que el perfil tóxico de *A. tamiyavanichii* fue similar a los perfiles tóxicos estudiados en Japón y Tailandia por Lim *et al.* (38), sin embargo, la concentración de toxinas varió debido al sitio de origen de la cepa. Este análisis, estableció que el sitio de origen de la microalga estudiada influye en la concentración de toxinas producidas, pero no en el perfil de toxinas de esta especie (36).

Lim *et al.* (38), estudiaron los posibles efectos de la temperatura y la concentración de luz en un cultivo de *A. tamiyavanichii* y evaluaron el crecimiento poblacional, la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo y la producción de TP. Los resultados muestran que *A. tamiyavanichii* presenta mayor proporción de análogos GTX<sub>4</sub> y GTX<sub>3</sub> y en menor grado la presencia de los análogos STX, GTX<sub>1-4</sub>, GTX<sub>2-3</sub> y C<sub>2</sub>. Asimismo, se estableció el rango de temperatura óptima para el crecimiento, la cual fue de 20°C a 25°C. El estrés por temperatura o irradiancia lumínica no afectó la proporción de análogos detectados, sin embargo, la concentración de TP aumentó con la intensidad lumínica de 100  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obteniendo una concentración cercana a 186  $\text{fmol cél}^{-1}$  a 25°C.

En el sur de África, en una región cercana al Indo Pacífico, se reportó la presencia de algunas especies de *Alexandrium*, entre ellas *A. tamiyavanichii* por primera vez para el continente (37). Se sugirió que esta especie fue transportada hasta el sur del continente por la ruta de dispersión del Pacífico Occidental al este Sudafricano debido a que la cepa establecida presentó afinidad filogenética al clado Asiático Tropical de *A. tamiyavanichii* (Fig. 4). La toxicidad celular de esta especie en África fue menor a lo reportado por los investigadores asiáticos (36, 38), con una toxicidad de 0.26 fmoles STX eq.  $\text{cél}^{-1}$  (0.14  $\mu\text{g STX eq. cél}^{-1}$ ) conservando la proporción de derivados típicos de la especie *Alexandrium*, con la incorporación del análogo STX, el cual, de acuerdo a Anderson (1), no es una toxina común para el género *Alexandrium*.



**Figura 4.** Ruta de dispersión del Pacífico Occidental al Este Sudafricano. Modificado de Ruiz-Sebastián *et al.* (37).

En el 2010, se reportó un FAN formado por *A. tamiyavanichii* en Japón a partir del cual lograron establecer cultivos del dinoflagelado (47). Se reportó que en el medio silvestre *A. tamiyavanichii* produjo 2,410 fmol cél<sup>-1</sup> y un promedio de 283 fmol cél<sup>-1</sup> en cultivo, con un aporte mayormente del grupo carbamoil (GTX<sub>1-4</sub>), siendo esta concentración y el perfil de toxinas producidas por el dinoflagelado, similar a lo reportado por Lim & Ogata (36).

También en el 2010 se registró por primera vez al dinoflagelado *A. tamiyavanichii* en el noroeste de Brasil, en muestras obtenidas del medio natural (42). Este estudio señala que la corriente de dispersión Pacífico Occidental al este Sudafricano podría transportar al dinoflagelado de las costas de África al noreste brasileño, sin embargo, mediante los estudios moleculares, se determinó que la cepa de Brasil pertenece a un clado diferente al clado asiático. En cuanto a la producción de toxinas, la cepa brasileña contiene los análogos STX, GTX<sub>3</sub>, GTX<sub>4</sub>, NEOSTX, dcGTX<sub>2</sub> y dcGTX<sub>3</sub> con una concentración total de 16.85 fmol cél<sup>-1</sup>, con una mayor presencia de STX (67% mol). Dicho reporte junto con el estudio de Ruiz-Sebastián (37), demuestran que la producción de toxinas varía según el lugar de origen de la cepa.

Uno de los reportes más recientes para *A. tamiyavanichii* fue en 2014 cuando la especie presentó un FAN en el puerto Kuantan, Malasia en donde provocó envenenamiento en seres humanos por consumo de moluscos contaminados con TP (3,560 µg de STX eq. 100 g<sup>-1</sup> de tejido de molusco). Se aislaron durante el FAN, tres cepas en diferentes tiempos de muestreo y se obtuvo una relación de menor toxicidad con respecto al tiempo de aislamiento (1) 5,960 fmol cél<sup>-1</sup>, 2) 3,070 fmol cél<sup>-1</sup> y 3) 1,027 fmol cél<sup>-1</sup>, respectivamente). Estos autores solo estudiaron el perfil de las GTXs, obteniendo como resultado la presencia de GTX<sub>1-4</sub>, GTX<sub>2-3</sub> y GTX<sub>5</sub>: la cepa 3, presentó mayor proporción del análogo GTX<sub>5</sub>, mientras que las cepas 1 y 2 presentaron mayor proporción del epímero GTX<sub>1-4</sub> (49).

## **2.2. *Alexandrium tamiyavanichii* en México**

En México, se tiene el primer registro de *A. tamiyavanichii* en las costas del Golfo de California desde 1995 (77), sin embargo fue hasta el 2003 en donde se obtuvo el primer aislamiento de *A. tamiyavanichii*, en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) dentro de la Colección de Dinoflagelados Marinos (50). Asimismo, Alonso-Rodríguez *et al.* (78), reportan a la

especie en las costas mexicanas de Baja California Sur, mientras que Esqueda-Lara & Hernández-Becerril (51), reportaron la presencia del dinoflagelado en las costas de Colima, siendo la publicación de Hernández-Becerril *et al.* (52), el reporte más reciente en las costas del Pacífico Central Mexicano. En estos estudios no se realizó la determinación de TP o la identificación morfológica de la especie, por lo que se desconoce si el dinoflagelado en las costas mexicanas pertenece al clado asiático o al clado establecido para la cepa de Brasil, así como la toxicidad que pudiera presentar durante un FAN.

### **2.3. El rol de los nutrientes en la producción de TP en el género *Alexandrium***

Diversos estudios se han enfocado en el rol que tienen los factores fisicoquímicos y los nutrientes en la producción de las TP en el cultivo de *Alexandrium spp.*, entre ellos se encuentra el estudio de Etheridge & Roesler (40), en el que proponen que para *A. fundyense*, la temperatura, irradiancia lumínica y salinidad afectan a la producción de TP de diferentes cepas aisladas a lo largo del Golfo de Maine (Estados Unidos) y de la Bahía de Fundy (Cánada). Estos autores reportaron que la temperatura es el factor con mayor contribución al cambio en la toxicidad celular con respecto a la irradiancia lumínica o a la salinidad, siendo esta última la que menor impacto tuvo sobre la toxicidad celular, concordando con lo establecido por Maclean *et al.* (79).

De igual forma, para las especies *A. tamiyavanichii* y *A. minutum*, se determinó el efecto que provoca la temperatura y la salinidad, así como el aprovechamiento del nitrógeno disuelto en el medio de cultivo en la producción de TP (38). Se encontró que las tasas de crecimiento y la producción de TP de los dinoflagelados están influenciados por la temperatura y la irradiancia lumínica, obteniendo mayores tasas de crecimiento y producción de TP en un rango de temperatura de 20 a 25°C a una irradiancia lumínica de 100  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . También, el nitrato disuelto en el medio de cultivo disminuyó conforme el paso del tiempo en todas las condiciones, sin embargo, la temperatura y la irradiancia lumínica afectaron el aprovechamiento del nitrato, debido a que a mayor irradiancia y temperatura, el nitrato se encontró a menores concentraciones con respecto a aquellos cultivos en donde la irradiancia lumínica y la temperatura era menor.

Por otra parte, se han estudiado poblaciones naturales de *A. catenella* aisladas del Golfo de Maine, donde se investigó la divergencia genética generada por nutrientes tales como silicatos y nitrito + nitrato (44). En este estudio, se determinaron por lo menos 3 agrupaciones genéticamente distintas de *A. catenella* debido a la dispersión de la especie en el Golfo. Cada agrupación puede generar FAN dependiendo de la carga de nutrientes a la cual estén expuestos en el medio natural. Aun cuando en el estudio no se determinó la producción de TP en cada agrupación, se propone que la producción de TP varía en cada uno de ellos debido a las condiciones a las cuales están expuestos en el medio natural y por la diferenciación genética provocada.

#### **2.4. El rol del fósforo en la producción de TP en el género *Alexandrium***

Se han estudiado diferentes especies del género *Alexandrium* en condiciones de limitación de fósforo (LF) para evaluar el efecto que tiene este nutriente sobre la producción de TP. Anderson *et al.* (56) encontraron que la LF en un cultivo de *A. fundyense* provoca una disminución en el ion fosfato por célula, incrementando a su vez 3 veces la concentración total de TP registradas con respecto al control. Asimismo, en *A. tamarensis*, la concentración de TP liberadas al medio siguió un patrón similar al crecimiento de la especie, en donde la concentración aumentó hasta llegar al pico máximo de producción (hasta 160 fmol cél<sup>-1</sup>, dependiendo el tratamiento) y disminuyó la producción conforme el cultivo llegó a la fase estacionaria.

En perspectiva, algunos estudios apuntan que la LF en cultivo de ciertas especies del género *Alexandrium*, entre ellas *A. tamarensis* y *A. minutum*, no afecta el crecimiento poblacional con respecto a los controles (12, 13), esto puede deberse a reservas de fósforo intracelulares, a la concentración de fósforo natural en el agua de mar o bien, debido al fósforo adicionado por el inóculo. Boyer *et al.* (12) notaron la aparición de quistes temporales en la fase exponencial del cultivo de *A. tamarensis* e infieren que fue debido a la falta del ortofosfato, sin embargo el enquistamiento no se presentó de manera estadísticamente significativa. En este estudio, los autores encontraron una concentración de TP 1.5 veces mayor en el tratamiento LF con respecto al control, sin presentar una modificación en la proporción de los análogos de TP registrados.

Perini *et al.* (15) estudiaron la LF en 4 diferentes cepas de *A. minutum* aisladas del mar Mediterráneo. El crecimiento de la especie estuvo caracterizado por una fase exponencial corta y un bajo aprovechamiento del fósforo disuelto en el cultivo, lo que confirma que las reservas energéticas del dinoflagelado fueron suficientes para crecer en el tratamiento LF (12, 13), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción de TP.

La limitación inicial de nitrógeno LN y el fósforo LF en cultivos de *A. minutum* y posteriormente a los mismos cultivos se someten a una adición de los nutrientes faltantes (enriquecimiento de nitrógeno, EN y enriquecimiento de fósforo, EF), muestra que los cultivos no presentan diferencias en cuanto al aprovechamiento de los nutrientes disueltos en el medio de cultivo, sin embargo, la concentración intracelular de los nutrientes se mantiene en un estado de limitación, así como, la producción de toxinas es mayor en condiciones LF y menor en condiciones LN (13).

Otros autores se han enfocado en analizar cultivos continuos en fase exponencial de diferentes especies del género *Alexandrium*, entre ellas *A. pacificum*, utilizando diferentes concentraciones de nutrientes (cultivo control, LF, LN, EF y EN), así como diferentes tasas de adición de medio de cultivo fresco (0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 d<sup>-1</sup>) para conocer cuál era el efecto que las diferentes tasas en el crecimiento poblacional y en la producción de TP (16). Reportaron que en el tratamiento de LF, la concentración celular aumentó rápidamente entre los primeros días de muestreo hasta alcanzar la fase estacionaria, con respecto a los demás tratamientos. Únicamente la tasa de adición del medio de 0.1 d<sup>-1</sup> en el tratamiento de LF provocó una diferencia significativa en la producción de TP con respecto a las demás tasas de adición y los demás tratamientos (de 17 a 80 veces mayor concentración de TP), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración celular y la producción de toxinas a lo largo del experimento en dicho tratamiento.

## **2.5. El rol del nitrógeno en la producción de TP en el género *Alexandrium***

En el caso del nitrógeno en el medio de cultivo, se han realizado diversos estudios en cuanto al efecto que genera el LN y EN en diferentes especies de *Alexandrium*. John & Flynn (62) evaluaron dichas variables en la formulación del medio de cultivo en el dinoflagelado *A. fundyense* y se concluye que la adición de nitrato al medio de cultivo provoca altas concentraciones celulares,

sin embargo, estas concentraciones no se pueden sobrepasar debido a que el cultivo entró en una LF provocada por el crecimiento y la producción de TP en el tratamiento de EN estuvo por debajo del control. Inclusive, cuando se adicionaron bajas concentraciones de nitrato, se obtuvieron mayores concentraciones de TP, de más de un orden de magnitud con respecto al control.

El efecto de la LN y EN en cultivos de *A. fundyense* con una posterior adición de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) al cultivo en la fase de limitación de nutrientes, mostró que las células en cultivo con EN presentaron un crecimiento moderado con respecto al control, así como una mayor concentración de TP con respecto al tratamiento de LN (58). Dado lo anterior, se concluyó, que la adición de  $\text{CO}_2$  al cultivo, funcionó para que la célula reenfoque la energía requerida para procesar el carbono del medio, en la asimilación de otros nutrientes, lo que puede significar a una mayor producción de TP.

### 3. JUSTIFICACION

*A. tamiyavanichii* es un dinoflagelado marino productor de toxinas paralizantes (TP), consideradas como unas de las toxinas más potentes encontradas en la naturaleza. Estos compuestos, además de provocar severos daños a la fauna marina e intoxicación en humanos, son de gran interés debido a su potencial en la medicina humana para tratar diversas enfermedades neurológicas y como analgésico, entre otros usos. Su concentración y purificación de estas toxinas ha permitido la producción de estándares analíticos para identificar y cuantificar toxinas en muestras contaminadas, así como para realizar experimentos que permiten conocer sus posibles aplicaciones en biomedicina.

La producción de toxinas de los dinoflagelados para fines de investigación requiere, entre otras cosas, del entendimiento de las necesidades nutricionales del dinoflagelado en cultivo para identificar las variables que modulan el crecimiento, la concentración de toxinas y el tipo de análogos que presentan. De esta manera, también se puede llegar a comprender el desarrollo de una floración algal tóxica y su adaptación ecológica en condiciones de estrés.

#### 4. HIPÓTESIS

Las toxinas paralizantes (TP) son resultado del metabolismo secundario de *Alexandrium tamiyavanichii* y la producción de las mismas se modifica en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, entonces:

**H1:** Si el dinoflagelado se encuentra en condiciones estresantes tales como la limitación de fósforo (LF) o exceso de nitrógeno (EN), se producirá mayor concentración de toxinas paralizantes del tipo carbamoil, derivados de mayor potencia tóxica, con respecto al control.

**H2:** Al limitar en fósforo al dinoflagelado, su crecimiento poblacional se verá disminuido con respecto al control.

**H3:** Al enriquecer en nitrógeno el medio de cultivo, el crecimiento poblacional del dinoflagelado aumentará con respecto al control.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de los nutrientes en el medio de cultivo sin modificaciones y en condiciones de limitación de fósforo y exceso de nitrógeno, sobre la producción de toxinas paralizantes (TP) durante el ciclo de crecimiento del dinoflagelado *Alexandrium tamiyavanichii*.

### **5.2 Objetivos particulares**

**5.2.1** Comparar el crecimiento poblacional del dinoflagelado.

**5.2.3** Evaluar la dinámica de los nutrientes en el medio de cultivo.

**5.2.2** Comparar la producción de toxinas paralizantes y el perfil toxicológico del dinoflagelado.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Obtención de *Alexandrium tamiyavanichii*

La cepa de *A. tamiyavanichii* (AYPV-1) se obtuvo de la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR (50; Anexo A). Esta cepa fue aislada por Diana Góngora González en abril de 2003 de forma vegetativa de la Bahía de La Paz, BCS, México (24° 17' 12.66" N, 110° 20' 31.92" O) y fue caracterizada taxonómicamente con análisis morfométrico y molecular (secuenciación genética del gen marcador 28S ADNr de la subunidad mayor ribosomal) por el Laboratorio de Taxonomía y Ecofisiología de Dinoflagelados Marinos por la Dra. Lourdes Morquecho Escamilla.

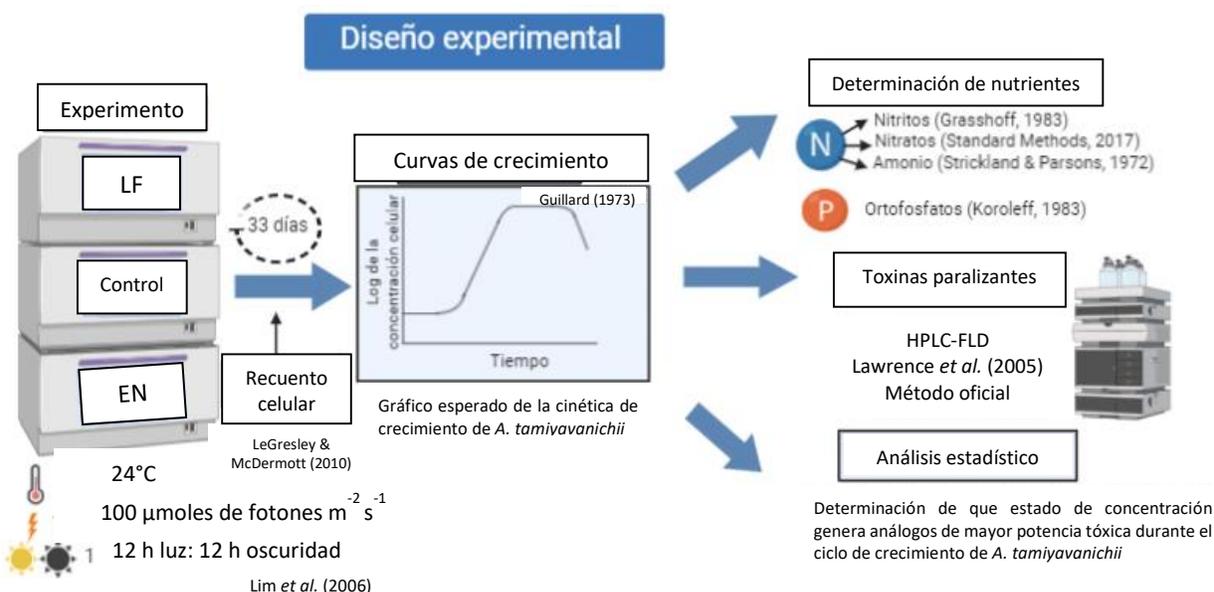
Para el mantenimiento de la cepa, las células se cultivaron en medio GSe (80; Anexo B), en condiciones de temperatura constante ( $21 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad, a una irradiancia lumínica de  $35 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y salinidad entre 34 y 36. Se utilizaron frascos de cultivo (BIOLITE) de poliestireno con recubrimiento antiadherente de células con capacidad de 75 mL con tapas de polietileno de alta densidad, inoculados al 10% v:v, inóculo del cultivo de dinoflagelado:medio de cultivo.

La aclimatación de la cepa para las condiciones de los tratamientos del experimento, se realizó en una incubadora de gradiente (RIT 450, marca REXMED). Se llevaron a cabo 4 resiembras con 21 días de diferencia cada una, aumentando  $1^{\circ}\text{C}$  en cada resiembra, comenzando a una temperatura de  $21^{\circ}\text{C}$  hasta  $24^{\circ}\text{C}$ . Una vez habituada a  $24^{\circ}\text{C}$ , se procedió a la aclimatación de la cepa a una mayor irradiancia lumínica, la cual fue de  $35 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a  $100 \pm 10 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mediante 2 resiembras a los 15 días de crecimiento. Una vez comprobada la supervivencia del cultivo a la irradiancia lumínica y la temperatura propuesta, se prosiguió al escalamiento del cultivo, en matraces de vidrio de 1 L de capacidad al 50% del volumen con un inóculo del 20% para cada matraz, dejando un espacio del 30% para suministro de aire.

## 6.2 Diseño experimental

La fase experimental (Fig. 5) consistió en determinar los efectos de los macronutrientes disueltos de fósforo y nitrógeno sobre la cinética de crecimiento de *Alexandrium tamiyavanichii* en dos respuestas principales:

1. Dinámica de los nutrientes en el medio de cultivo (medio control, limitación de fósforo y altas concentraciones de nitrógeno).
2. Producción y modificación de los análogos de toxinas paralizantes (TP) sintetizados por la disponibilidad de nutrientes.



**Figura 5.** Diagrama del diseño experimental establecido para la realización de este proyecto (fuente propia).

El diseño experimental consistió en inocular el cultivo primario obtenido de *A. tamiyavanichii* en tres condiciones experimentales. Para esto se utilizaron 126 frascos de poliestireno (BIOLITE) de 250 mL, los cuales se clasificaron aleatoriamente en tres grupos experimentales de 42 frascos cada uno: 1) medio GSe como medio control (80); 2) medio GSe limitado en fósforo y 3) medio GSe con exceso de nitrógeno. La variación en la cantidad de fósforo y nitrógeno en el medio de cultivo se calcularon de acuerdo a lo presentado en el Anexo C. En cada caso, se adicionaron 125 mL de medio de cultivo con un 10% de inóculo proveniente del cultivo primario.

El experimento se mantuvo durante 33 días a una temperatura constante de  $24 \pm 0.2^\circ\text{C}$  en una incubadora RIT 450 (REXMED). El fotoperiodo consistió en ciclos de 12h luz: 12 h oscuridad y una irradiancia lumínica constante de  $100 \pm 10 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante el ciclo luminoso, la cual se registró cada día con un luxómetro (Extech modelo 407026). Se añadieron dos controles de los medios de cultivo sin dinoflagelados para dar seguimiento a la variación de las concentraciones de cada nutriente durante la fase experimental: se utilizaron 3 matraces por tratamiento con capacidad de 1 L con medio de cultivo al 50% del volumen máximo. Cada tercer día se muestrearon aleatoriamente tres frascos de cultivo de cada tratamiento sin reposición del frasco. Para el día 0 y el día 33 se muestrearon 6 frascos.

### 6.3 Curva de crecimiento

Para el recuento celular se obtuvieron alícuotas de 2 mL de cada recipiente experimental por duplicado y se fijaron con solución ácida de lugol al 1% final (81). El conteo se llevó a cabo con una cámara de Sedgewick-Rafter de 1 mL de capacidad (82), en un microscopio Olympus (IX50). La concentración celular se expresó en  $\text{cél mL}^{-1}$ . Se estimó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ; ecuación 1) y el tiempo de generación ( $T_g$ ; ecuación 2) de acuerdo a Guillard (83), mediante las ecuaciones que se muestran a continuación:

$$\mu = \text{LN} \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (1)$$

Dónde:  $\mu$  = divisiones / día;  $x$  = densidad celular;  $t$  = tiempo

$$T_g = \frac{\text{LN } 2}{\mu} \quad (2)$$

Dónde:  $T_g$  (días);  $\mu$  = tasa de crecimiento específica

### 6.4 Determinación de nutrientes: amonio, nitritos, nitratos y ortofosfatos

Para la determinación de nutrientes se tomaron 60 mL de cada frasco experimental muestreado y se filtraron con filtros de jeringa de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de poro. De cada frasco se tomaron 20 mL del sobrenadante por duplicado y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

La determinación de nutrientes disueltos en el medio de cultivo consistió en la cuantificación de fósforo inorgánico como ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), nitrógeno inorgánico como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito

(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Para la determinación de nutrientes se descongelaron las muestras y se realizaron diluciones tal como se describe en la Tabla II.

**Tabla II.** Diluciones de las muestras analizadas para cada nutriente.

Dilución	Nitritos	Nitratos	Ortofosfatos
1:10	X	-	X
1:50	-	X	X
1:100	-	X	X

Para cuantificar la concentración de fósforo inorgánico, como ortofosfatos, se utilizó la técnica de Koroleff (84) donde se hace reaccionar los iones fosfato disueltos en el medio con molibdato de amonio y ácido sulfúrico para generar ácido fosfomolibdico de coloración amarilla, posteriormente se reduce por el ácido ascórbico al complejo azul de molibdeno cuya absorbancia se mide a 880 nm (Anexo D).

En el caso de la determinación de amonio se utilizó la metodología descrita por Strickland & Parsons (85), utilizando como estándar de amonio la preparación de Koroleff (86). La técnica se basa en la reacción del amonio presente en la muestra con fenol e hipoclorito de sodio, dando como intermediario monocloramina, utilizando nitropusiato de sodio se cataliza la reacción para producir el compuesto azul de indofenol, el cual se detecta a 640 nm (Anexo E).

Para la determinación de nitritos se realizó la metodología descrita por Grasshoff (87) en la cual se hace reaccionar los iones nitrito con sulfanilamida, produciendo un compuesto azo colorido con una máxima absorbancia a 540 nm a un rango de pH entre 1.5 y 2 (Anexo F).

En el caso del nitrógeno inorgánico como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se realizó la determinación por el método descrito en Standard Methods (88) en donde se realizan las mediciones de absorbancia a 220 nm y 275 nm, eliminando la interferencia ocasionada por la materia orgánica a 220 nm, de igual manera, la adición de HCl 1 N previene interferencias de hidróxidos y carbonatos de hasta 1 g L<sup>-1</sup> (Anexo G).

Una vez analizadas las curvas patrón para cada nutriente disuelto, así como las muestras, se realizó regresión lineal en Excel para transformar las lecturas de absorbancia a concentraciones en micromoles del nutriente por litro de medio de cultivo= micromolar ( $\mu\text{mol L}^{-1} = \mu\text{M}$ ).

### **6.5 Identificación y cuantificación de toxinas paralizantes en el medio de cultivo**

Para la identificación y cuantificación de toxinas se tomaron 60 mL de cada frasco muestreado, se llevaron a congelación y descongelación 3 veces y se filtraron con filtros de jeringa de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. De cada alícuota se tomaron 20 mL del sobrenadante por duplicado y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La determinación de la toxicidad y perfil tóxico se realizó de manera individual para el sextuplicado inicial y final, sin embargo, para las muestras del día 3 al día 30, se realizaron muestras compuestas del triplicado de muestreo en 30 mL (1:1:1).

La detección y cuantificación de TP fue realizada por la analista Ing. Biot. Lidia Iliana Moreno Hernández en el Laboratorio de Biotoxinas Marinas mediante el método oficial AOAC 2005.06 (89, 90) por cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD), con oxidación pre-columna. Se incluyeron los controles sin células en la identificación y cuantificación de TP con la finalidad de probar que el medio de cultivo no genera interferencias en la determinación de los análogos.

Las TP se identificaron mediante el tiempo de retención de los analitos en los cromatogramas de cada muestra y comparándolos con los obtenidos de los estándares. Las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo de líquidos después de aplicar lisis celular por el método de congelación y descongelación, por lo cual no se realizó una hidrólisis de la muestra con la finalidad de conocer el perfil toxicológico nativo de *Alexandrium tamiyavanichii*. Se midió el área de los picos y tiempos de retención de cada derivado detectado para conocer la concentración de cada derivado. La transformación de unidades de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de los estándares a concentración de TP ( $\text{fmol c\acute{e}l}^{-1}$ ), así como la toxicidad ( $\mu\text{g de STX eq. c\acute{e}l}^{-1}$ ) se realizó con base en los pesos moleculares y factores de toxicidad de Oshima (91, 92), los cuales se enlistan en la Tabla III.

Los estándares utilizados para la determinación de HPLC-FLD fueron adquiridos al Institute for Marine Biosciences (National Research Council of Canada), cuyo derivado y número de lote fueron: STX (20110316), dcSTX (20110713), NEOSTX (20170411), dcNEOSTX (20170413), GTX<sub>1-4</sub>

(20160608), GTX<sub>2-3</sub> (20170419), GTX<sub>5</sub> (20120301), GTX<sub>6</sub> (20140313), dcGTX<sub>2-3</sub> (20141203) y C<sub>1-2</sub> (20110706).

**Tabla III.** Valores utilizados para la transformación de los resultados volumétricos de cromatografía líquida a valores de concentración y concentración basada en toxicidad.

Análogo	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Factor de toxicidad
STX	299.3	1
GTX <sub>2-3</sub>	352.3	0.638
dcGTX <sub>2-3</sub>	352.3	0.377
C <sub>1-2</sub>	475.4	0.096

## 6.6 Análisis estadísticos

Para conocer las diferencias significativas en el crecimiento poblacional del dinoflagelado entre los tratamientos y el control, se realizó la conversión del crecimiento de cél mL<sup>-1</sup> a logaritmo natural (LN). Se hizo una comparación de pendientes, de modo que el crecimiento exponencial se consideró como una tendencia lineal. Por último, se realizó una comparación de pendientes en pares por medio de un análisis de covarianza (ANCOVA), el tratamiento control vs. LF, el control vs. EN y finalmente LF vs. EN.

Para conocer las diferencias significativas en la producción de TP entre el control y los tratamientos propuestos, se realizó una prueba *t* para medias de muestras emparejadas en las cuales se comparó la concentración inicial y final de cada análogo (STX, GTX<sub>2-3</sub>, C<sub>1-2</sub> y dcGTX<sub>2-3</sub>) en cada tratamiento (control, LF y EN). Posterior a ello, para conocer cuál fue el efecto en los análogos registrados en el control y en los tratamientos LF y EN, se realizó un análisis de varianza de un factor en donde se comparó el mismo análogo (inicial y final, por separado) entre tratamientos. Por último, para conocer qué estado del medio de cultivo generó una mayor concentración de TP, se hizo una prueba *t* para medias de dos muestras emparejadas donde se tomó la concentración total de TP por cada día de muestreo y se comparó entre tratamientos (control y LF; control y EN; LF y EN). Todos los estadísticos tuvieron un nivel de confianza del 95%.

Para el caso de los nutrientes, por cada nutriente, se realizó una prueba  $t$  para medias de muestras emparejadas por tratamiento: control y LF; control y EN y por último, LF y EN. Cada estadístico se realizó con un nivel de confianza del 95% utilizando la media de cada determinación.

## 7. RESULTADOS

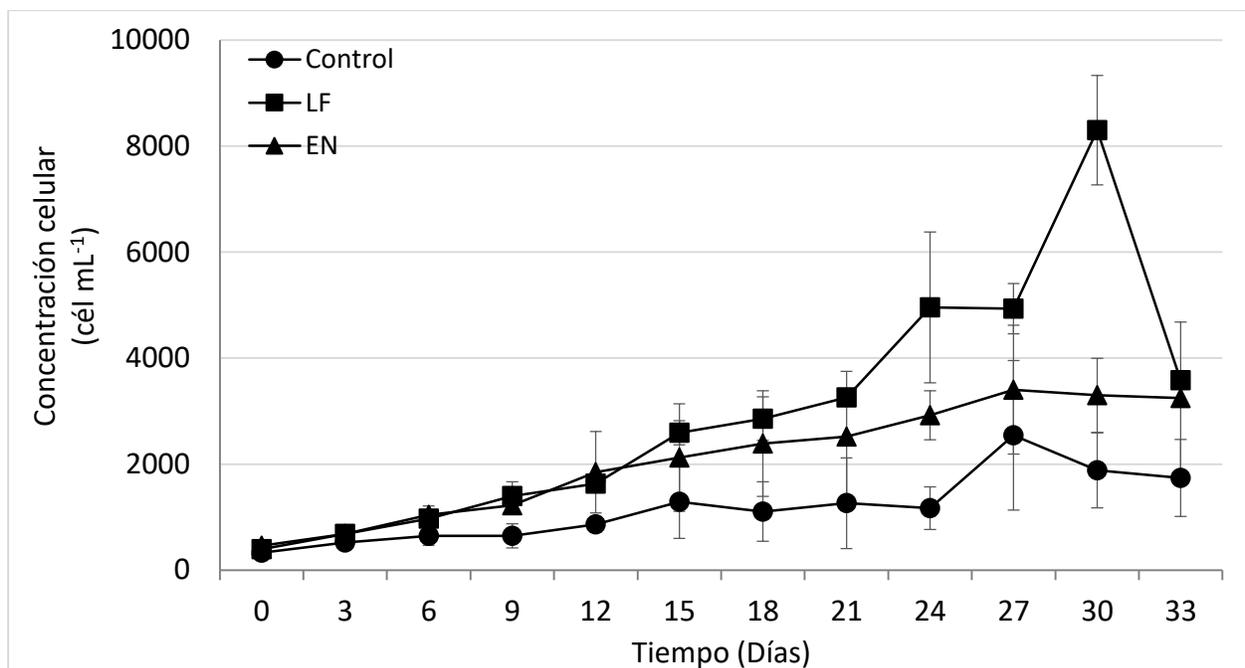
### 7.1 Características del crecimiento celular

Durante el período de cultivo del dinoflagelado se observaron diferencias morfológicas entre las cadenas formadas por el dinoflagelado en los tratamientos. Al inicio del experimento en el control y los tratamientos LF y EN, la cepa estudiada presentó organismos de forma individual, así como, cadenas de 2 a 5 células, con forma ovoide y el cíngulo marcado. No se observaron cadenas mayores a 6 células en ningún tratamiento. Sin embargo, en el tratamiento LF hubo mayor presencia de cadenas de 2 células y ausencia de cadenas de 4 células a partir del día 09, mientras que en el tratamiento EN se encontraron células redondeadas y sin presencia de cíngulo a partir del día 12 y generalmente de manera individual.

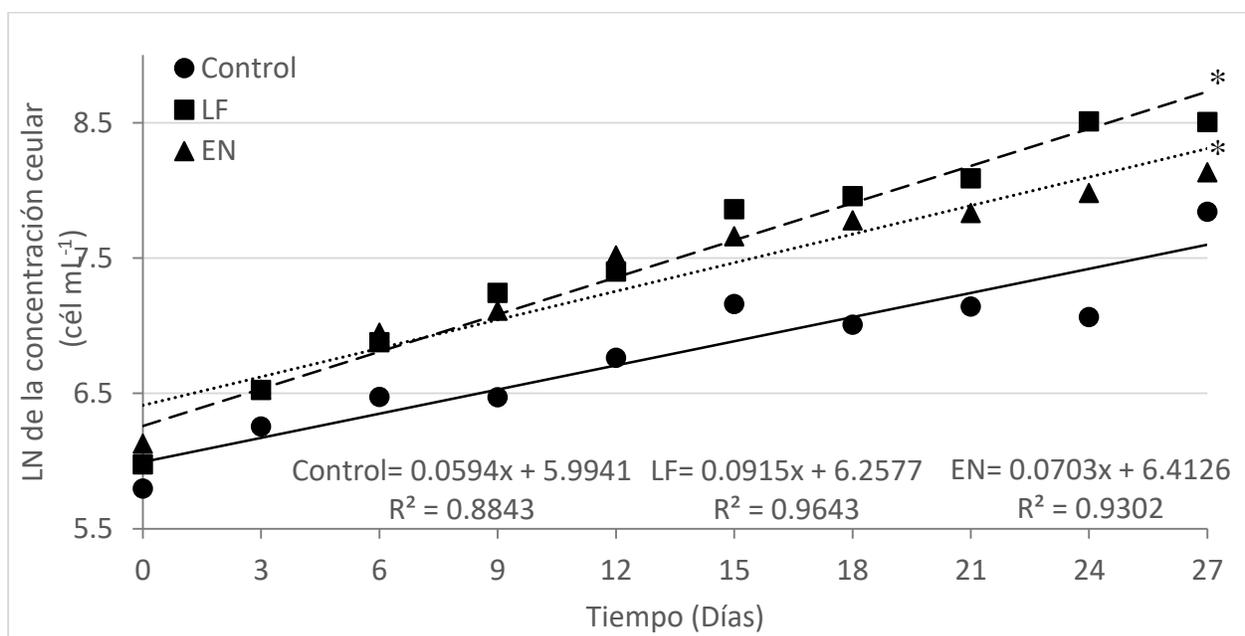
### 7.2. Curvas de crecimiento

En el cultivo de *A. tamiyavanichii* en el control y el tratamiento LF se registraron las fases de crecimiento: latencia, exponencial y muerte, mientras que en el tratamiento EN solo se obtuvieron la fase exponencial y de muerte. En todos los casos, la fase estacionaria no fue muy clara ya que se observó que la fase de decaimiento se presentó rápidamente después de alcanzar la máxima densidad celular. El tratamiento LF presentó un mayor crecimiento poblacional con respecto al control y al tratamiento de EN. El incremento en la LF fue de 3.4 veces mayor en el pico máximo de crecimiento (día 30) que en el tratamiento control y 2.4 veces mayor que EN (Fig. 6).

Se observaron diferencias significativas en el crecimiento del dinoflagelado entre LF y EN con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre la condición de LF y EN ( $p > 0.05$ ) (Fig. 7).



**Figura 6.** Curvas de crecimiento de *Alexandrium tamiyavanichii* durante 33 días a 24°C, en el control y en los tratamientos de limitación de fósforo (LF) y enriquecimiento de nitrógeno (EN). Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 7.** Concentración celular de *Alexandrium tamiyavanichii* expresada en Logaritmo Natural (LN), con una tendencia lineal en el control y los tratamientos de limitación de fósforo (LF) y enriquecimiento de nitrógeno (EN). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (\*).

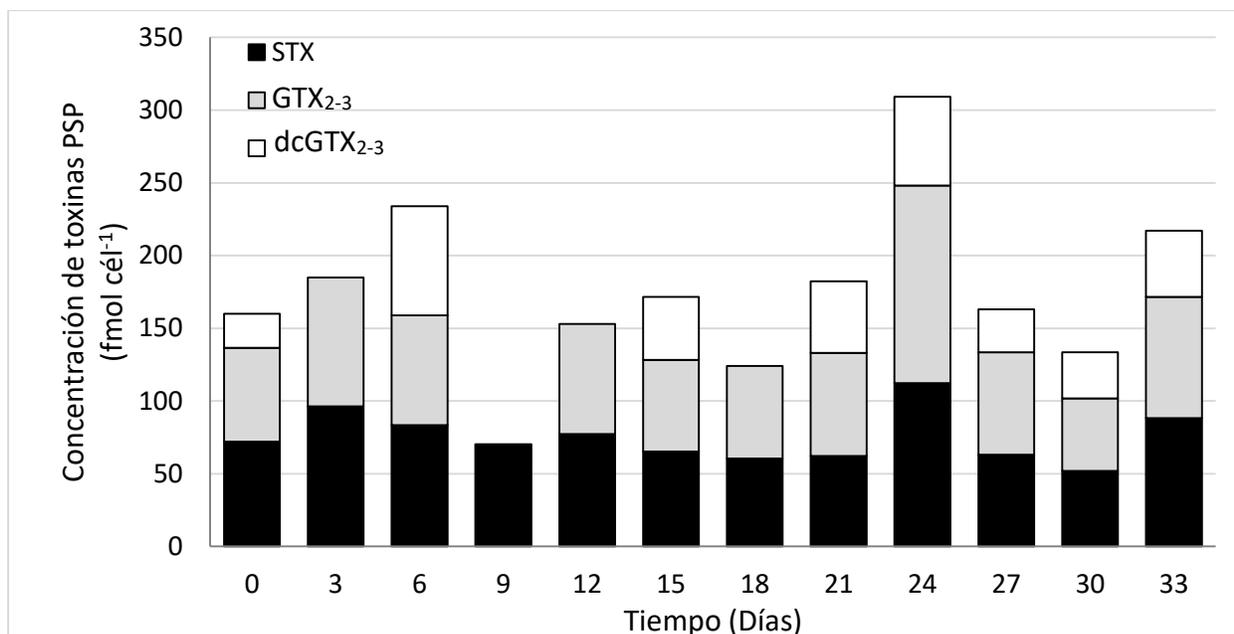
Se obtuvieron las tasas promedio de crecimiento para cada condición (Tabla IV), siendo en el medio control y el medio LF, donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento con 0.13 y 0.15 divisiones día<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que en el tratamiento EN se presentó una menor tasa siendo de 0.11 divisiones día<sup>-1</sup>.

**Tabla IV.** Tasas de crecimiento promedio ( $\mu$ ) y tiempo de generación promedio (Tg) para *Alexandrium tamiyavanichii* en el control y los tratamientos.

Tratamiento	Tasa de crecimiento promedio día <sup>-1</sup> ( $\mu$ )	Tiempo de generación promedio día <sup>-1</sup> (Tg)
Control	0.13	9.90
Limitación de fósforo	0.15	9.43
Enriquecimiento de nitrógeno	0.11	14.14

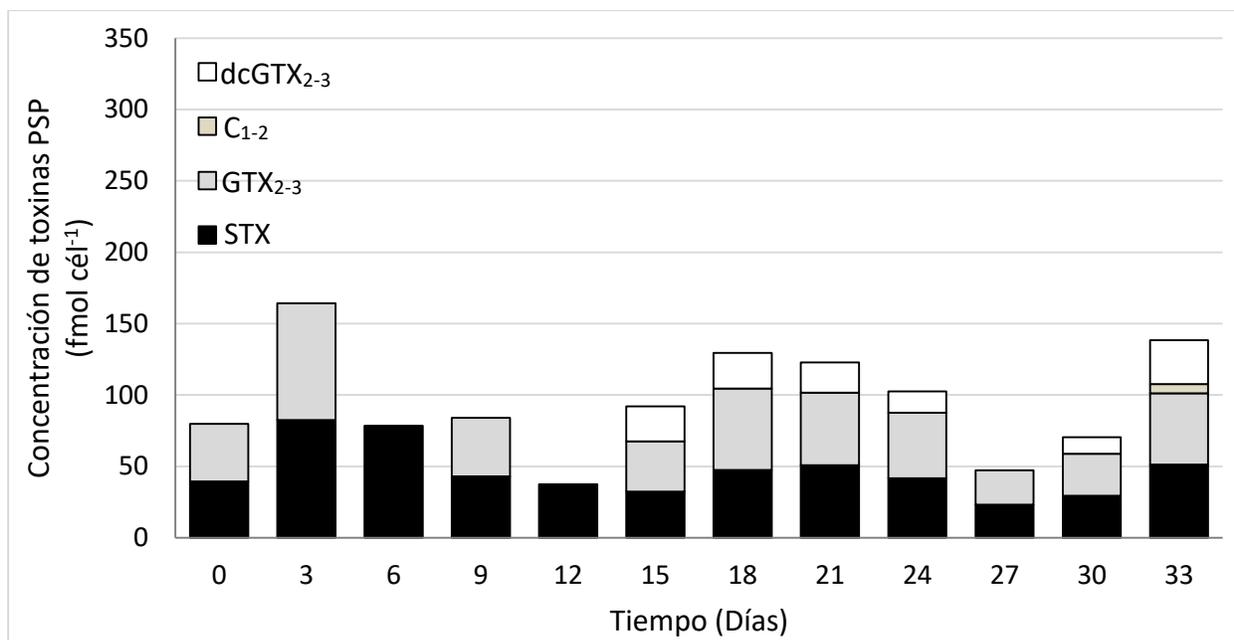
### 7.3. Producción de toxinas paralizantes

En el medio control, la concentración de toxinas muestran que la cepa de *A. tamiyavanichii* (AYPV-1) contiene 309 fmol cél<sup>-1</sup> (72 pg de STX eq. cél<sup>-1</sup>) a los 24 días de crecimiento y la composición de los análogos corresponde al 47% mol de STX, 42% mol de GTX<sub>2-3</sub> y 11% mol de dcGTX<sub>2-3</sub> (Fig. 8). En los días de muestreo 9, 18 y 30, se registró una disminución en la concentración total de TP, sin embargo, durante los días de muestreo mencionados, el análogo STX se presentó en mayor proporción con respecto a los demás días de muestreo. La concentración del análogo dcGTX<sub>2-3</sub> incrementa gradualmente a lo largo del experimento, excluyendo los días donde la concentración de TP fue menor (día 9, 18 y 30).



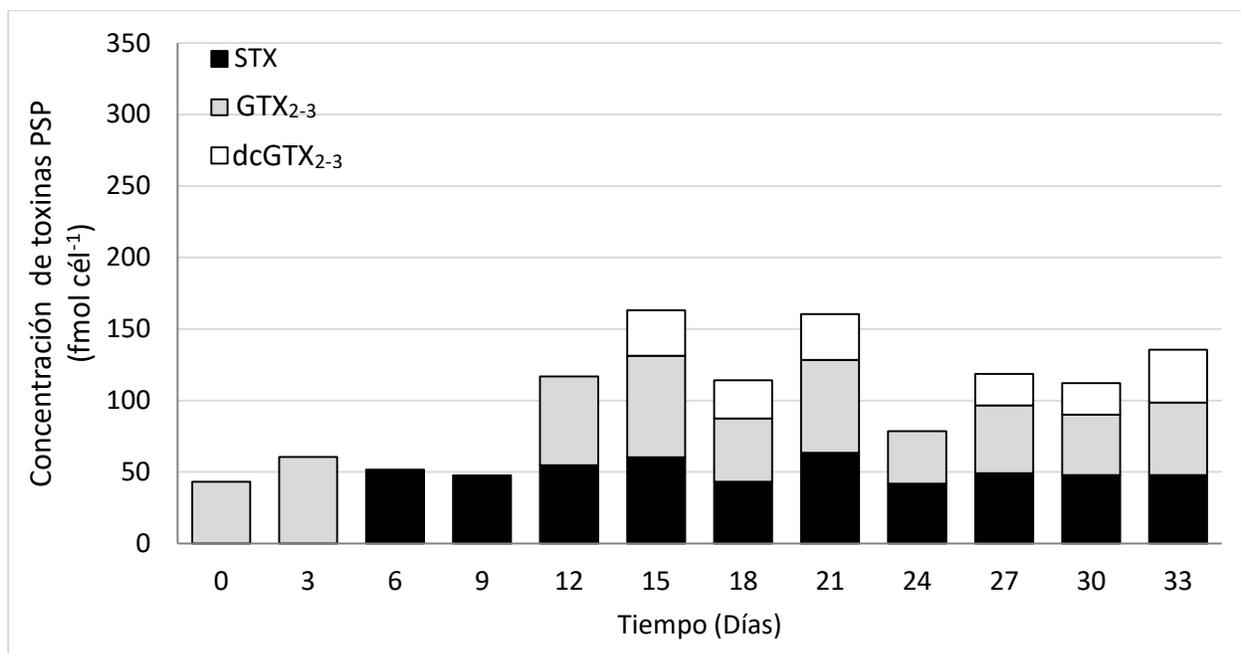
**Figura 8.** Concentración e identificación de análogos de TP de *Alexandrium tamiyavanichii* a 24°C en el tratamiento control. Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX<sub>2-3</sub> (gonyautoxina<sub>2-3</sub>) y dcGTX<sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina<sub>2-3</sub>). Las columnas representan la concentración de TP (fmol célula<sup>-1</sup>) por día de muestreo.

En el tratamiento de LF, este provocó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la producción de TP del dinoflagelado con respecto al control. La concentración más alta registrada fue de 164 fmol célula<sup>-1</sup> (74 pg de STX eq. célula<sup>-1</sup>) al tercer día de crecimiento. El perfil toxicológico fue similar al del control, registrando a la STX en mayor proporción con respecto a los demás análogos registrados. El análogo GTX<sub>2-3</sub> estuvo ausente en el día 6 y 12, donde la STX representó el 100% de los análogos registrados, sin embargo, la concentración total de TP registrada para estos días fue menor con respecto a los demás días de muestreo. El análogo dcGTX<sub>2-3</sub> se presentó a partir del día 15, hasta el final del experimento. El tratamiento se caracterizó por la aparición del análogo de baja toxicidad C<sub>1-2</sub> al finalizar el experimento en el día 33, sin embargo, la concentración fue de 6 fmol célula<sup>-1</sup> (2 pg de STX eq. célula<sup>-1</sup>) (Fig. 9).



**Figura 9.** Concentración e identificación de análogos de TP de *Alexandrium tamiyavanichii* a 24°C en el tratamiento de limitación de fósforo. Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX<sub>2-3</sub> (gonyautoxina<sub>2-3</sub>), carbamoil<sub>1-2</sub> (C<sub>1-2</sub>) y dcGTX<sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina<sub>2-3</sub>). Las columnas representan la concentración de TP (fmol cél<sup>-1</sup>) por día de muestreo.

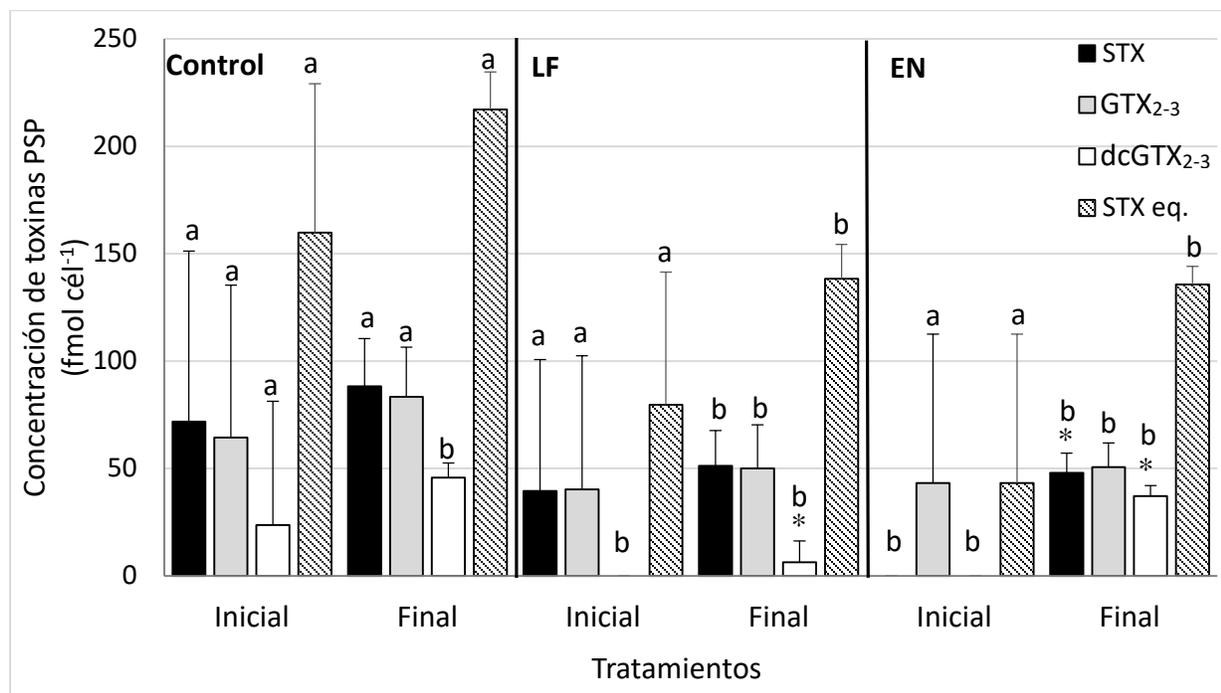
En el tratamiento de EN, se presentó una menor concentración de TP con respecto al control y similar al tratamiento de LF, siendo la máxima concentración registrada en el tratamiento de 163 fmol cél<sup>-1</sup> (38 pg de STX eq. cél<sup>-1</sup>) a los 21 días de crecimiento. La concentración total de TP en los primeros 4 muestreos (día 0, 3, 6 y 9) se mantuvo en los mismos niveles, mientras que en los días subsecuentes (12, 15 y 21) la concentración total de TP aumentó considerablemente. Al final del experimento en los días 27 al 33, la concentración registrada de TP se estabilizó entre 122 ± 12 fmol cél<sup>-1</sup> (29 ± 2 pg de STX eq. cél<sup>-1</sup>). El perfil toxicológico en el EN al inicio del experimento (día 0 y 3), registró únicamente el análogo GTX<sub>2-3</sub>, seguido (día 6 y 9) al análogo STX en un 100% con respecto a los demás días de muestreo. La aparición del análogo dcGTX<sub>2-3</sub> fue estable a partir del día 15 y estuvo ausente al día 24 de muestreo, similar a la LF donde estuvo ausente al día 27 de muestreo (Fig. 10).



**Figura 10.** Concentración e identificación de análogos de TP de *Alexandrium tamiyavanichii* a 24°C en el tratamiento de enriquecimiento de nitrógeno (EN). Los análogos registrados fueron STX (saxitoxina), GTX<sub>2-3</sub> (gonyautoxina<sub>2-3</sub>) y dcGTX<sub>2-3</sub> (decarbamoil gonyautoxina<sub>2-3</sub>). Las columnas representan la concentración de TP (fmol célula<sup>-1</sup>) por día de muestreo.

Se encontraron diferencias significativas en la producción de TP al finalizar el experimento en los tratamientos LF y EN con respecto al control ( $p < 0.05$ , en cada caso), en el cual se registró la mayor producción de TP. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la producción final de TP de la LF y EN ( $p > 0.05$ ) (Fig. 11).

La concentración total de TP al iniciar el experimento se considera homogénea al no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), sin embargo, no se puede afirmar que la producción final de TP en los tratamientos sea diferente a la concentración inicial de los mismos ( $p > 0.05$ ). Únicamente para los casos seleccionados con (\*) en la Fig. 11 se encontraron diferencias significativas en la concentración inicial y final del tratamiento ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Concentración e identificación de análogos de TP de *A. tamiyavanichii* al inicio y fin del experimento (día 0 y día 33). Control indica medio GSe sin modificaciones, LF, limitación de fósforo y EN, enriquecimiento de nitrógeno. Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar. Las líneas continuas separan los tratamientos realizados. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos con respecto al control (a,b). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el mismo tratamiento (\*).

El perfil toxicológico si se vio afectado al iniciar cada tratamiento con respecto al control, debido a que en la limitación de fósforo no se detectó al inicio del experimento la presencia del análogo dcGTX<sub>2-3</sub>, mientras que en el tratamiento de enriquecimiento de nitrógeno no se detectó la presencia de los análogos de STX y dcGTX<sub>2-3</sub>.

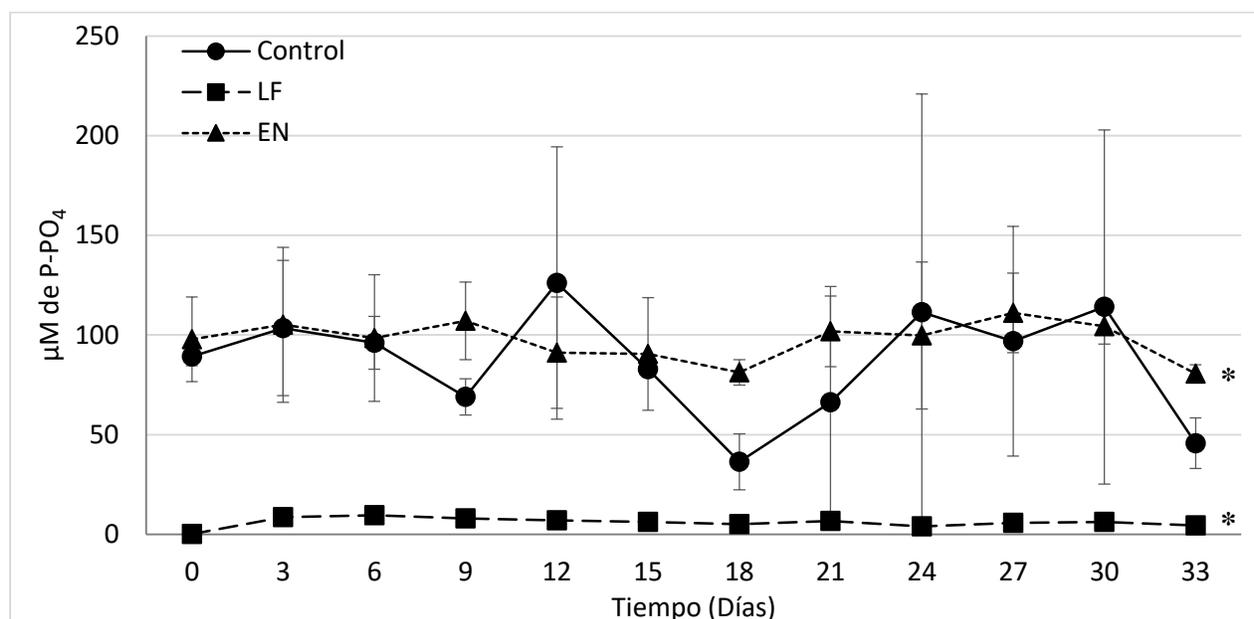
## 7.4. Nutrientes disueltos en el medio de cultivo

### 7.4.1. Ortofosfatos

La concentración de fósforo inorgánico, como ortofosfatos disueltos, mostró variaciones en el control durante el desarrollo del experimento, el día 18 y nuevamente al día 33 cuando solo se determinó la mitad de la concentración suministrada al inicio del experimento. Sin embargo, en los días 12, 24 y 27, la presencia del nutriente superó la concentración adicionada originalmente al medio de cultivo. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones

determinadas en las condiciones LF y EN durante el experimento con respecto al control. De igual forma, se encontraron diferencias significativas en la concentración registrada entre la LF y el EN, esto debido a que la limitación de fósforo estuvo caracterizada por la no adición del nutriente al medio de cultivo ( $p < 0.05$ ).

La concentración de ortofosfato en el medio de cultivo EN no varió con respecto a la concentración inicial del experimento, manteniéndose entre los 90 y 110  $\mu\text{M}$  de  $\text{P-PO}_4$  a lo largo del experimento. Esta condición se cumplió en el tratamiento LF, donde no se adicionó ortofosfato al medio de cultivo y se registró únicamente el ortofosfato del agua de mar que se utilizó para preparar el medio (Fig. 12).

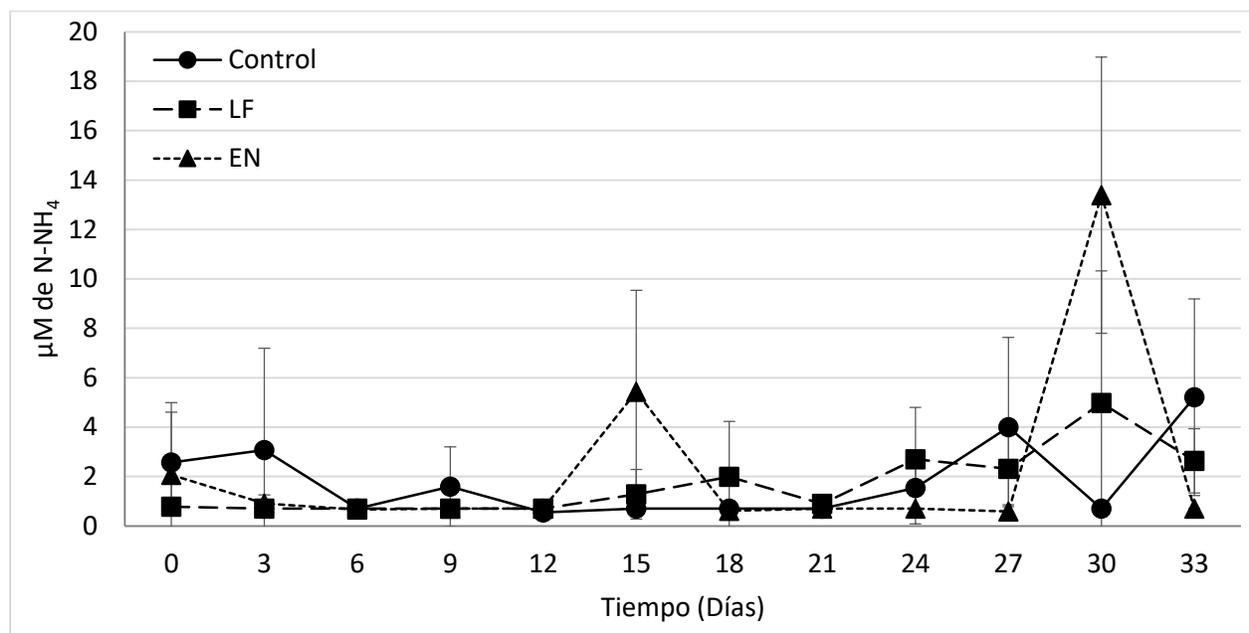


**Figura 12.** Concentración de ortofosfatos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno). Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (\*).

#### 7.4.2. Amonio

La determinación de amonio en el medio de cultivo estuvo caracterizada por una disminución del nutriente una vez que se le adicionó el dinoflagelado en los tratamientos LF y EN. El tratamiento EN presentó mayor concentración del nutriente disuelto en el medio de cultivo (12  $\mu\text{M}$  de  $\text{N-NH}_4$ ) con respecto al control y a LF, los cuales no alcanzaron los 6  $\mu\text{M}$  de  $\text{N-NH}_4$  (Fig. 13).

Ningún tratamiento (LF y EN) presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración de amonio durante del experimento con respecto al control. Sin embargo, los días 15 y 30 en el tratamiento EN, se presentaron picos del nutriente disuelto, superiores a los encontrados en el control y la LF.

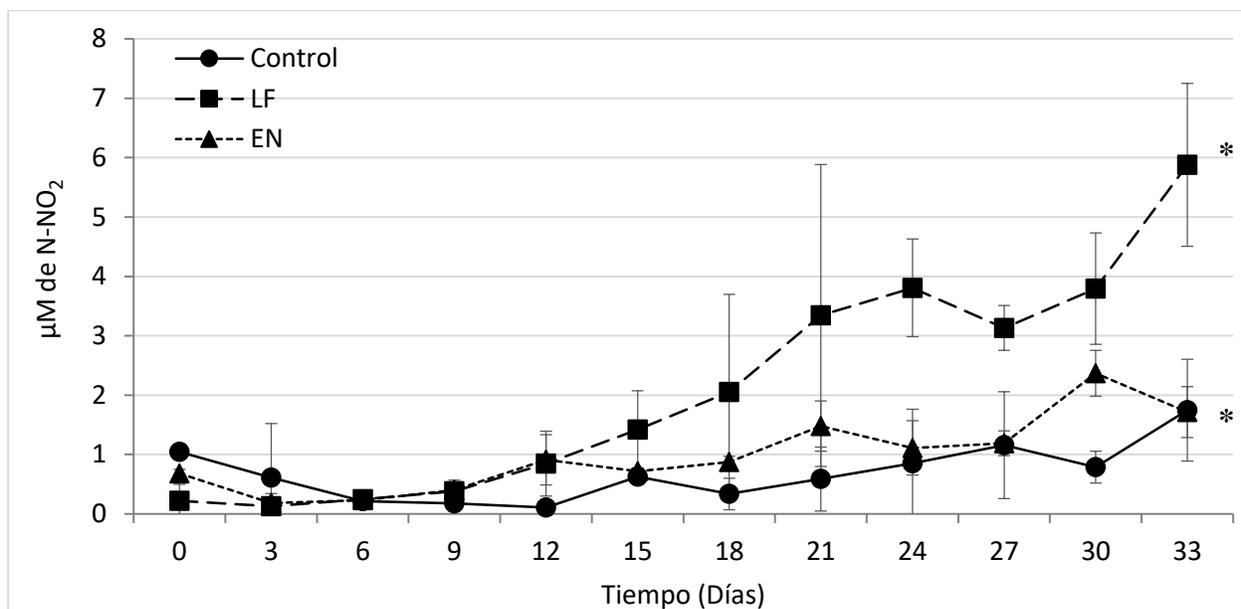


**Figura 13.** Concentración de amonio en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno), en el cultivo de *A. tamiyavanichii* a 24°C. Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control.

#### 7.4.3 Nitrito

El tratamiento LF durante el experimento generó un aumento en la concentración de nitrito hasta alcanzar los 6  $\mu\text{M}$  de  $\text{N-NO}_2$  al día 33 con respecto al tratamiento control que no alcanzó en el mismo punto de muestreo los 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{N-NO}_2$ . De igual manera, en el tratamiento de EN se puede observar un aumento de nitritos cada 9 días a partir del día 12 (Fig. 14).

En el control y los tratamientos, el registro de nitrito se vio influenciado por el paso del tiempo. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el control y los tratamientos LF y EN, siendo los tratamientos donde se registraron mayores concentraciones. De igual forma, se encontraron diferencias significativas entre la LF y el EN ( $p < 0.05$ ), en donde la LF la detección del nutriente fue mayor.



**Figura 14.** Concentración de nitritos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno) en el cultivo de *A. tamiyavanichii* a 24°C. Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control (\*).

#### 7.4.4 Nitrato

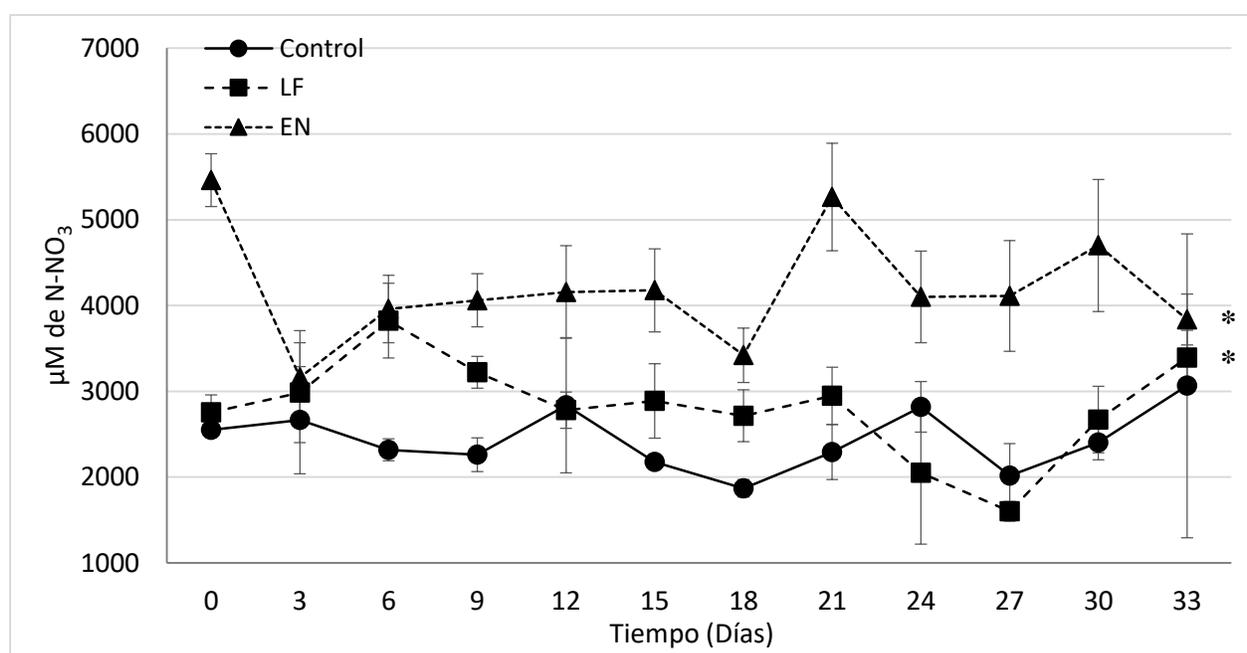
Los resultados obtenidos en la determinación de nitrato en el medio de cultivo en los primeros muestreos de cada uno de los tratamientos mostraron que, la concentración nominal no coincidió con la obtenida del nutriente analizado, sin embargo, en el tratamiento control y LF son similares, concordando con las formulaciones realizadas en el Anexo 3 (Fig. 15).

El control se caracterizó por una tendencia decreciente de nitrato al paso del tiempo, sin embargo, en los días 12, 24 y 33, se presentaron picos del nutriente. En el caso del tratamiento de LF, se presentó un aumento de nitrato desde el inicio del experimento hasta el día 6 y posterior a ello, la concentración disminuyó considerablemente hasta el día 27, la cual fue la menor registrada para todos los tratamientos (cerca a los 1600  $\mu\text{M}$  de  $\text{N-NO}_3$ ).

Asimismo, el nitrato en el tratamiento de EN, presentó una mayor concentración al inicio del experimento, la cual estuvo cerca a la duplicación del ion con respecto al tratamiento control y al tratamiento LF, dicha condición cumple con lo propuesto para el experimento, en donde el EN se caracterizó por duplicar la concentración nominal del ion al inicio del experimento (Fig. 15).

Ningún tratamiento presentó déficit de nitrato a lo largo del experimento, por lo que este nutriente no se considera un limitante de crecimiento. Sin embargo, se observa una disminución del nutriente al día 27 en el control y el tratamiento LF, los cuales tuvieron un inicio homogéneo en la concentración del nutriente disuelto.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la concentración registrada en los tratamientos LF y EN a lo largo del experimento con respecto al control, sin embargo, no se puede decir que las concentraciones registradas en el tratamiento LF con respecto al tratamiento de EN sean distintas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 15.** Concentración de nitratos en el control y los tratamientos LF (Limitación de fósforo) y EN (Enriquecimiento de nitrógeno) en el cultivo de *A. tamiyavanichii* a 24°C. Los valores están representados por su media  $\pm$  desviación estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con respecto al control (\*).

## 8. DISCUSION

### 8.1. Crecimiento de *Alexandrium tamiyavanichii* a 24°C

*Alexandrium tamiyavanichii* presentó un crecimiento atípico en las condiciones propuestas (control, LF y EN) debido a que la fase de latencia y estacionaria típicas en el cultivo de microalgas se omitió en todos los casos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Lim *et al.* (38) para la misma especie en donde los primeros 15 días de crecimiento no se presentó la fase de adaptación y llegó a su pico máximo de crecimiento a los 14 días de cultivo, a 25°C con una irradiancia de 100  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Varios autores argumentan que la adición de nutrientes como el nitrógeno y la limitación del fósforo provocan una disminución en el crecimiento poblacional de diferentes especies de dinoflagelados productores de TP (64, 73, 74, 75). En el presente trabajo se observó lo contrario, debido a que los tratamientos EN y LF provocaron aumentos significativos en la concentración celular detectada a lo largo del experimento con respecto a la condición control. Lo anterior se puede deber a que la concentración de fósforo presente en el agua de mar, utilizada para la preparación del medio limitado, fue la concentración idónea para el crecimiento del dinoflagelado (12). También, otro factor a considerar es que los dinoflagelados tienen reservas energéticas las cuales pueden utilizar en condiciones de estrés por lo que al verse limitado en algún nutriente como el fósforo puede no tener un efecto negativo (13).

En experimentos de limitación de nutrientes donde se estudió organismos del género *Alexandrium* y no se adicionó P y N, los dinoflagelados aprovecharon el N y/o P disuelto en el medio de cultivo (12, 16, 71, 79). En el presente estudio, no se llevó a cabo dicho proceso ya que las concentraciones de ambos nutrientes se mantuvieron estables a lo largo del crecimiento de *A. tamiyavanichii* en LF y EN. Otros autores (53, 56, 58, 59, 62, 93) se han enfocado en diluir el medio de cultivo para llegar a los estados de limitación de nutrientes, estos estudios han demostrado que el estado limitante de nutrientes aun cuando se adicionan en bajas concentraciones causan una mayor producción de toxinas con respecto al control. Adicionalmente, algunos autores han trabajado con agua de mar sintética (AMS) donde no se reporta la remoción de nutrientes por los dinoflagelados, sin embargo los trabajos de AMS se han realizado para ensayos moleculares, para esclarecer rutas metabólicas o bien, para la

incorporación de isótopos estables de N o P en el cultivo como lo describen Cho *et al.* (9) y Laabir *et al.* (35).

En cuanto al tratamiento EN, John & Flynn (62) y Eberlein *et al.* (58), mencionan que el N añadido provoca un mayor crecimiento poblacional, similar a lo que encontramos en el presente estudio. Sin embargo, estos autores detectaron una disminución en el P debido a la alta concentración celular en el medio. Esta limitación de P no se observó en el presente trabajo ya que la concentración de fósforo en el tratamiento EN se mantuvo estable.

## 8.2. Producción de TP en el cultivo de *Alexandrium tamiyavanichii* a 24°C

Respecto a la concentración de TP en *Alexandrium tamiyavanichii*, Lim & Ogata (36), Lim *et al.* (38) y Sagara *et al.* (47), reportan una producción de TP de 60 a 359 fmol cél<sup>-1</sup>, dependiendo del medio de cultivo utilizado [Medio ES (94), 380 µM NO<sub>3</sub> y 12 µM PO<sub>4</sub> y Medio ES-DK (94); 430 µM NO<sub>3</sub> y 13 µM PO<sub>4</sub>]. Estos resultados son similares a las concentraciones de TP reportadas en este trabajo, siendo el tratamiento control donde se detectó la mayor concentración de TP. Sin embargo, Mohammad-Noor *et al.* (49) reportó 3 cepas de *A. tamiyavanichii*, capaces de producir de 1,026 a 5,962 fmol cél<sup>-1</sup> (Medio f/8, 22 µM NO<sub>3</sub> y 1 µM PO<sub>4</sub> (95)) superior a lo registrado en las otras cepas. Además, el único registro que se tiene de una cepa americana con respecto a la producción de TP en condiciones de laboratorio es de Menezes *et al.* (42), en el que la concentración de toxinas es inferior con 15.56 fmol cél<sup>-1</sup> (Medio f/2, 88 µM NO<sub>3</sub> y 4 µM PO<sub>4</sub>).

Asimismo, referente a la presencia de los análogos de STX, el registro que se obtuvo no correspondió a lo reportado por otros autores, debido a que la mayoría ha identificado para *A. tamiyavanichii* una mayor producción de Gonyautoxinas del tipo 1 a 4 (36, 37, 38, 42, 47, 49), siendo que en el presente estudio se identificaron los análogos STX, GTX<sub>2-3</sub>, dcGTX<sub>2-3</sub> y C<sub>1-2</sub>. En todos los tratamientos, la presencia de STX representó el mayor porcentaje de los análogos registrados a lo largo del experimento, sin embargo, conforme avanzó el tiempo de cultivo, se presentaron análogos de menor potencia tóxica, como el análogo dcGTX<sub>2-3</sub>, a partir del día 21 de cultivo en el control y a partir del día 15 en los tratamientos LF y EN. Frangópulos *et al.* (71) y Guerrini *et al.* (72), encontraron resultados diferentes a los reportados en este trabajo en otras

especies del género *Alexandrium*, donde argumentan que a mayor tiempo de cultivo, se presentaron análogos con mayor potencia tóxica.

Por otra parte, el EN provocó análogos de mayor potencia tóxica en el cultivo a partir del día 6 y 9, cuando solo se presentó la STX en un 100% con respecto a los demás análogos. Este efecto concuerda con lo reportado con diversos autores, en donde la adición de nitrato al medio de cultivo favorece la presencia de análogos de mayor potencia tóxica (12, 56, 62, 69, 70, 71, 72).

### **8.3. Nutrientes disueltos en el cultivo de *Alexandrium tamiyavanichii***

#### **8.3.1. Ortofosfato en el medio de cultivo**

La disminución en la concentración de ortofosfato en el control no tienen una relación aparente con el crecimiento poblacional, sin embargo para los días 9 y 18, esta disminución se derivó en análogos de mayor potencia tóxica con respecto a los demás días de muestreo. Este aumento de TP concuerda con lo establecido por diversos autores (12, 13, 15, 16), sin embargo, los resultados de producción de TP que se reportan corresponde a una limitación de P en el medio de cultivo, mientras que en el presente estudio, este efecto no se pudo apreciar debido a que la concentración de ortofosfatos se mantuvo estable en el control y en el tratamiento EN.

Con el tratamiento de LF, el ortofosfato del agua de mar utilizada fue la concentración óptima para el crecimiento poblacional del dinoflagelado, siendo similar a la reportada por Mohammad-Noor *et al.* (49) para la misma especie en donde al agua de mar se le agregó 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{P-PO}_4$ . Aún cuando los autores (12, 13, 15, 16), concuerdan que bajo LF se obtiene una mayor producción de TP, en el presente trabajo, no se encontró dicho efecto ya que los niveles de ortofosfato en el experimento aumentaron durante los primeros 2 días de muestreo, sin agregar el nutriente en el medio.

En el tratamiento de EN, debido a la poca variación del ortofosfato presente en el medio de cultivo, así como un crecimiento poblacional constante, se considera que el ortofosfato no afectó el crecimiento poblacional, ni tampoco favoreció la síntesis de análogos de mayor potencia tóxica tal como lo indica Han *et al.* (16) cuando el cultivo se encuentra enriquecido en nitrógeno.

### **8.3.2. Amonio en el medio de cultivo**

El amonio en el medio de cultivo presentó un aumento a partir del día 15 y 18 en el caso del EN y LF, respectivamente; esto se atribuye a que el crecimiento poblacional aumentó significativamente. Frangopolus *et al.* (71) argumentan que este crecimiento poblacional aumenta la respiración celular, liberando amonio al medio como desecho metabólico, una vez que los cultivos llegan a la fase de decaimiento o muerte.

La determinación de amonio en el control y los tratamientos (LF y EN), mostró bajas concentraciones a lo largo del experimento. Esto se puede deber a que el tipo de muestreo fue sin repetición, por lo que el frasco de cultivo solo fue abierto una vez para obtener la muestra, lo que demuestra una buena calidad del medio y una baja producción de desechos metabólicos (9, 59).

### **8.3.3. Nitrito en el medio de cultivo**

De igual forma que en el caso del amonio, la presencia del ion nitrito estuvo asociado a la fase de crecimiento del dinoflagelado en todos los tratamientos, al transcurrir el tiempo de crecimiento, la disponibilidad de nitrito aumentaba, es por ello que se habla de un aprovechamiento del nitrato en el medio de cultivo para su posterior paso a nitrito, sin embargo, no se encontró algún efecto tal como lo describe Brandenburg *et al.* (60), en donde la presencia de nitrato facilitó la producción de toxinas de mayor potencia tóxica en ninguno de los tratamientos.

### **9.3.4. Nitrato en el medio de cultivo**

La disponibilidad de nitrato en el medio de cultivo presentó grandes fluctuaciones en los medios de cultivo de todos los tratamientos. En el caso de la LF se observó que en los días de muestreo 3 y 6 hubo un aumento de este nutriente con respecto al inicio, lo cual es contrario a lo reportado por diversos autores (53, 66, 71). Sin embargo, a partir del día 9, el cultivo empezó a consumir el nitrato disponible, lo cual explica las concentraciones celulares detectadas a lo largo de este tratamiento. Se puede suponer que la célula, al encontrarse con nutrientes de alta calidad como lo es el nitrato, enfocó su energía en reproducción, generando de esta manera mayor concentración celular con respecto al control y al EN.

A su vez en el tratamiento de EN, se registró un consumo de la mitad de la concentración administrada de nitrato del día inicial al día 3, sin embargo, esto no favoreció un mayor crecimiento poblacional o la presencia de análogos de mayor potencia tóxica al día consecutivo de muestreo, fue hasta el día 9 cuando *A. tamiyavanichii* solo produjo STX en un 100% con respecto a los otros análogos registrados en los días anteriores, concordando con la ventaja adquirida por el EN que Brandenburg *et al.* (60) reportan para *A. ostenfeldii*.

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ El crecimiento poblacional de *Alexandrium tamiyavanichii* en la condición LF fue mayor con respecto al control en el pico máximo de concentración celular detectada, de igual forma la condición LF no fue limitante para el crecimiento del dinoflagelado o la producción de toxinas paralizantes.
- ✓ Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento poblacional en la condición EN con respecto al control, por lo que la adición de nitrógeno aumentó el crecimiento poblacional del dinoflagelado, sin embargo esta condición no afectó la producción de toxinas.
- ✓ Se encontraron diferencias significativas entre la producción de toxinas paralizantes (TP) en el cultivo de *A. tamiyavanichii* en el control con respecto a LF y EN, la cual fue de 2 veces mayor, siendo la STX el análogo con mayor proporción en todos los casos (C, LF y EN).
- ✓ En todos los casos, la producción de TP por *A. tamiyavanichii* se comportó de la misma manera, conforme el cultivo avanzó en el tiempo, se registraron análogos de menor potencia tóxica con respecto al inicio del experimento.
- ✓ El estrés provocado por la LF en cultivo provocó que la cepa presentara mayor variedad de análogos de TP, por lo que fue posible cuantificar dcGTX<sub>2-3</sub> en un menor tiempo de cultivo y el análogo C<sub>1-2</sub> al finalizar el experimento, ambos análogos considerados de menor potencia con respecto al grupo carbamoil (STX y GTX<sub>2-3</sub>).

## 10. LITERATURA CITADA

- 1 Anderson DM, Alpermann TJ, Cembella AD, Collos Y, Masseret E, Montresor M. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*. 2012;(14): p. 10-35.
- 2 Guiry MD. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2020. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 17 July 2020.
- 3 Moestrup Ø, Akselmann-Cardella R, Churro C, Fraga S, Hoppenrath M, Iwataki M, *et al.* IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. [Online]; 2020. Acceso 18 de 10de 2020. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/hab> on 2020-10-18.
- 4 Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries*. 2002;(25): p. 704-726.
- 5 Usup G, Leaw CP, Asmat A, Lim PT. *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysian waters. *Harmful Algae*. 2002;(1): p. 264-275.
- 6 Ben-Gigirey B, Rodríguez-Velasco ML, Otero A, Vieites JM, Cabado AG. A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish. *Toxicon*. 2012;(60): p. 864-873.
- 7 Solter PF, Beasley VR. 38: Phycotoxins. En Rousseaux H&. *Handbook of Toxicologic Pathology*. Third Edition ed.; 2013. p. 1155-1186.
- 8 Lee KH, Jeong HJ, Kwon JE, Kang HC, Kim JH, Jang SH, *et al.* Mixotrophic ability of the phototrophic dinoflagellates *Alexandrium andersonii*, *A. affine* and *A. fraterculus*. *Harmful Algae*. 2016;(59): p. 67-81.
- 9 Cho Y, Tsuchiya S, Omura T, Kioke K, Oikawa H, Konoki K, *et al.* Metabolomic study of saxitoxin analogues and biosynthetic intermediates in dinoflagellates using <sup>15</sup>N-labelled sodium nitrate as a nitrogen source. *Nature: Scientific Reports*. 2019; 9(3460).
- 10 FAO. *Biotoxinas Marinas*. Roma: Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. 2005: p. 5-36.
- 11 FAO/WHO. *Technical paper on Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs* Roma; 2016: p. 108.
- 12 Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Harrison PJ, Taylor FJR. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Marine Biology*. 1987;(96): p. 123-128.

- 13 Yang I, John U, Beszteril S, Glöckner G, Krock B, Goesmann A, *et al.* Comparative gene expression in toxic versus non-toxic strains of the marine dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *BMC Genomics*. 2010; 11(248).
- 14 Gu H, Zeng N, Liu T, Yang W, Müller A, Krock B. Morphology, toxicity and phylogeny of *Alexandrium* (Dinophyceae) species along the coast of China. *Harmful Algae*. 2013;(27): p. 68-81.
- 15 Perini F, Galluzzi L, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Tartaglione L, Ricci F, *et al.* *SxtA* and *sxtG* Gene Expression and Toxin Production in the Mediterranean *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *Marine Drugs*. 2014;(12): p. 5258-5276.
- 16 Han M, Lee H, Anderson DM, Kim B. Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures. *Marine Pollution Bulletin*. 2016;(104): p. 34-43.
- 17 Borcier E, Morvezen R, Boudry P, Miner P, Charrier G, Laroche J, *et al.* Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*. *Aquatic Toxicology*. 2017;(184): p. 142-154.
- 18 Roltana A, Vigniera J, Volety A, Shumway S, Bricelj M, Soudant P. Impacts of exposure to the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* on reproduction of the northern quahog, *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic toxicology*. 2018: p. 153-162.
- 19 Band-Schmidt CJ, Durán-Riveroll LM, Bustillos-Guzmán, JJ, Leyva-Valencia I, López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez EJ, *et al.* Paralytic Toxin Producing Dinoflagellates in Latin America: Ecology and Physiology. *Frontiers in Marine Science*. 2019; 6(42): p. 1-39.
- 20 Faber S. Saxitoxin and the induction of paralytic shellfish poisoning. *Journal of Young Investigators*. 2012; 23(1): p. 1-7.
- 21 Choudhary G, Shang L, Li X, Dudley SC. Energetic Localization of Saxitoxin in its Channel Binding Site. *Biophysical Journal*. 2002;(83): p. 912-919.
- 22 Llewellyn LE. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Products Reports*. 2006;(23): p. 200-222.
- 23 García C, Rodríguez-Navarro A, Díaz JC, Torres R, Lagos N. Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon*. 2009;(53): p. 206-213.
- 24 Walker JR, Novick PA, Parsons WH, McGregor M, Zablocki J, Pande VS, *et al.* Marked difference in saxitoxin and tetrodotoxin affinity for the human nociceptive voltage-gated sodium channel (Na<sub>v</sub>1.7). *PNAS*. 2012; 109(44): p. 18102-18107.

- 25 Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*. 2003; 55(4): p. 575-578.
- 26 Llewellyn L, Negri A, Robertson A. Paralytic Shellfish Toxins in Tropical Oceans. *Toxin Reviews*. 2006; 26(2): p. 159-196.
- 27 Álvarez G, Díaz PA, Gogoy M, Araya M, Ganuza I, Pino R, *et al.* Paralytic Shellfish Toxins in Surf Clams *Mesodesma donactium* during a Large Bloom of *Alexandrium catenella* Dinoflagellates Associated to an Intense Shellfish Mass Mortality. *Toxins*. 2019; 11(188).
- 28 Hallegraeff GM. Harmful algal blooms: a global overview. En Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, editores. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: UNESCO Publishing; 2003. p. 25-49.
- 29 Stommel EW, Watters MR. Marine neurotoxins: Ingestible toxins. *Current Treatment Options in Neurology*. 2004; 6: p. 105-114.
- 30 Knaack J, Porter K, Jacob J, Sullivan K, Forester M, Wang R, *et al.* Case diagnosis and characterization of suspected paralytic shellfish poisoning in Alaska. *Harmful Algae*. 2016; 57: p. 45-50.
- 31 Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Mofitt MC, Neilan BA. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*. 2010; 20(8): p. 2185-2191.
- 32 Oshima Y, Yasumoto T. Toxic Dinoflagellate Blooms. En Taylor DL, Seliger HH, editores. *Proceedings of the 2nd International Conference, Key Biscayne 1978 (Developments in marine biology)*. Amsterdam: Elsevier-North Holland; 1979. p. 377-380.
- 33 García C, Barriga A, Díaz JC, Lagos M, Lagos N. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon*. 2010; 55: p. 135-144.
- 34 Turnbull AR, Tan JYC, Ugalde S, Hallegraeff GM, Campbell K, Harwood DT, *et al.* Single-Laboratory Validation of the Neogen Qualitative Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels and Oysters. *Journal of AOAC International*. 2017; 101(2): p. 480-489.
- 35 Laabir M, Collos Y, Masseret E, Grzebyk D, Abadie E, Savar V, *et al.* Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs*. 2013;(11): p. 1583-1601.
- 36 Lim PT, Ogata T. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon*. 2005;(45): p. 699-710.

- 37 Ruiz-Sebastián C, Etheridge DM, Cook PA, O'Ryan C, Pitcher GC. Phylogenetic analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) isolates from South Africa: Implications for the global phylogeography of the *Alexandrium tamarensis* species complex. *Phycologia*. 2005; 44(1): p. 49-60.
- 38 Lim, P.-T., C.-P. Leaw, G. Usup, A. Kobiyama, K. Koike and T. Ogata. Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 2006. 42: 786–799.
- 39 EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish - Saxitoxin Group. *The EFSA Journal*. 2009; 1019: p. 1-76.
- 40 Etheridge SM, Roesler CS. Effects of temperature, irradiance and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. *Deep-Sea Research Part II*. 2005;: p. 2491-2500.
- 41 Penna A, Fraga S, Masó M, Giacobbe MG, Bravo I, Garcés E, *et al.* Phylogenetic relationships among the Mediterranean *Alexandrium* (Dinophyceae) species based on sequence of 5.8S gene and Internal Transcript Spacers of the rRNA operon. *European Journal of Phycology*. 2008; 43(2): p. 163-178.
- 42 Menezes M, Varela D, de-Oliveira PLA, da-Silva TM, Paredes J. Identification of the toxic algae *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) from the northeastern Brazil: A combined morphological and rDNA sequence (Partial LSU and ITS) approach. *Journal of Phycology*. 2010;(46): p. 1239-1251.
- 43 Murray S, Wiese M, Neilan B, Orr RJS, de-Salas M, Brett S, *et al.* A reinvestigation of saxitoxin production and *sxtA* in the "non-toxic" *Alexandrium tamarensis* Group V clade. *Harmful Algae*. 2012;(18): p. 96-104.
- 44 Gao Y, Sassenhagen I, Richlen ML, Anderson DM, Martin JL, Erdner DL. Spatiotemporal genetic structure of regional-scale *Alexandrium catenella* dinoflagellate blooms explained by the extensive dispersal and environmental selection. *Harmful Algae*. 2019;(86): p. 46-54.
- 45 Balech E. Three new species of the genus *Alexandrium* (Dinoflagellata). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 1994;(113): p. 216-220.
- 46 Faust MA, Gullledge RA. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium*. 2002; 42.
- 47 Sagara T, Taniyama S, Yoshimatsu S, Takatani T, Hashimoto T, Nishibori N, *et al.* Toxicity and toxin profile of the dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* and toxic mussels in

Harima-Nada of Seto Inland sea, Japan. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 2010; 51(4): p. 170-177.

- 48 Lim PT, Leaw CP, Ogata T. Morphological variation of two *Alexandrium* species responsible for paralytic shellfish poisoning in Southeast Asia. Bot. Mar. 2007;(50): p. 14-21.
- 49 Mohammad-Noor N, Adam A, Lim PT, Leaw CP, Lau ELS, Liow GT, *et al.* First report of paralytic shellfish poisoning (PSP) caused by *Alexandrium tamiyavanichii* in Kuantan Port, Pahang, East Coast of Malaysia. Phycological Research. 2018;(66): p. 37-44.
- 50 CODIMAR. Colección de Dinoflagelados Marinos. Morquecho, L., Reyes-Salinas, A., 2004 en adelante. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, México. Se accedió en <http://www.cibnor.mx/investigacion/colecciones-biologicas/codimar> el 2020/10/20
- 51 Esqueda-Lara K, Hernández-Becerril DU. Dinoflagelados microplanctónicos marinos del Pacífico central de México (Isla Isabel, Nayarit y costas de Jalisco y Colima): Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México; 2010: p. 206.
- 52 Hernández-Becerril DU, Lau WLS, Hii KS, Leaw CP, Varona-Cordero F, Lim PT. Abundance and Distribution of the Potentially Toxic Thecate Dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* (Dinophyceae) in the Central Mexican Pacific, Using the Quantitative PCR Method. Frontiers in Marine Science. 2018; 5(366).
- 53 Guisande C, Frangópulos M, Maneiro I, Vergara AR, Riveiro I. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. Marine Ecology Progress Series. 2002;(225): p. 169-176.
- 54 Tran D, Ciutat A, Mat A, Massabuau JC, Hégaret H, Lambert C, *et al.* The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. Aquatic Toxicology. 2015;(158): p. 41-49.
- 55 Ogata T, Ishimaru T, Kodama M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. Marine Biology. 1987;(95): p. 217-220.
- 56 Anderson DM, Kullis DM, Sullivan JJ, Hall S, Lee C. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Marine Biology. 1990;(104): p. 511-524.
- 57 Ogata T, Koike K, Nomura S, Kodama M. Utilization of organic substances for growth and toxin production by *Alexandrium tamarensis*. En Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y,

- editores. Harmful and Toxic Algal Blooms.: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 343-346.
- 58 Eberlein T, Van-de-Waal DB, Brandenburg KM, John U, Voss M, Achterber EP, *et al.* Interactive effects of ocean acidification and nitrogen limitation on two bloom-forming dinoflagellate species. *Marine Ecology Progress Series*. 2016;(543): p. 127-140.
- 59 Accoroni S, Ceci M, Tartaglione L, Romagnoli T, Campenelli A, Marini M, *et al.* Role of temperature and nutrients on the growth and toxin production of *Prorocentrum hoffmannianum* (Dinophyceae) from the Florida Keys. *Harmful Algae*. 2018; 80: p. 140-148.
- 60 Brandenburg K, Wohlrab S, John U, Kremp A, Jerney J, Krock B, *et al.* Intraspecific trait variation and trade-offs within and across populations of a toxic dinoflagellate. *Ecology letters*. 2018;(21): p. 1561-1571.
- 61 Béchemin C, Grzebyk D, Hachame F, Hummert C, Maestrini SY. Effect of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the toxin content in *Alexandrium minutum*. *Aquat Microb Ecol.* ;(20): p. 157-165.
- 62 John EH, Flynn KJ. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *European Journal of Phycology*. 2000; 35(1): p. 11-23.
- 63 Hamasaki K, Horie M, Tokimitsu S, Toda T, Taguchi S. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* isolated from Hiroshima Bay, Western Japan, as a reflection of changing environmental conditions. *Journal of Plankton Research*. 2001;(23): p. 271-278.
- 64 Wang DZ, Hsieh DPH. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* HK9301 isolated from the South China Sea. *Harmful Algae*. 2005;(4): p. 401-410.
- 65 Tang EPY. The allometry of algal growth rates. *Journal of Plankton Research*. 1995; 17(6): p. 1325-1335.
- 66 Smayda TJ. Dinoflagellate bloom cycles: what is the role of cellular growth rate and bacteria? En Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y, editores. Harmful and Toxic Algal Blooms.: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1997. p. 331-334.
- 67 Turner JT, Tester PA. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers and pelagic food webs. *Limnol. Oceanogr.* 1997;(42): p. 1203-1214.
- 68 Griffith AW, Gobler CJ. Harmful Algae Blooms: A Climate Change Co-Stressor in Marine and Freshwater Ecosystems. *Harmful Algae*. 2020; 91(101590).

- 69 Johansson N, Granéli E. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios. 1999. *Marine Biology*; (135): p. 209-217.
- 70 Beani L, Bianchi C, Guerrini F, Marani L, Pistocchi R, Tomasini MC, *et al.* High sensitivity bioassay of paralytic (PSP) and amnesic (ASP) algal toxins based on fluorimetric detection of  $[Ca^{2+}]_i$  in rat cortical primary cultures. *Toxicon*. 2000; 38(9): p. 1283-1297.
- 71 Frangópulos M, Guisande C, deBlas E, Maneiro I. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. *Harmful Algae*. 2004;(3): p. 131-139.
- 72 Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Fattorusso E, Boni L, *et al.* Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae*. 2007;(6): p. 707-717.
- 73 Siu G, Young M, Chan D. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia*. 1997;(352): p. 117-140.
- 74 Shi Y, Hu H, Cong W. Positive effects of continuous low nitrate levels on growth and photosynthesis of *Alexandrium tamarens* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycological Research*. 2005;(53): p. 43-48.
- 75 Gallardo-Rodríguez JJ, Sánchez-Mirón A, Cerón-García MdC, Belarbi EH, García-Camacho F, Chisti Y, *et al.* Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae*. 2009;: p. 239-246.
- 76 Van-de-Waal DB, Smith VH, Declerck SAJ, Stam ECM, Elser JJ. Stoichiometric regulation of phytoplankton toxins. *Ecology Letters*. 2014; 17(6): p. 736-742.
- 77 Licea-Durán S, Moreno JL, Santoyo H, Figueroa G. *Dinoflageladas del Golfo de California La Paz, México: UABCS. SEP-FOMES; 1995. p. 165.*
- 78 Alonso-Rodríguez R, Páez-Osuna F, Gárate-Lizárraga I. *El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo. Primera ed. México: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa; 2004.*
- 79 Maclean C, Cembella AD, Quilliam MA. Effects of Light, Salinity and Inorganic Nitrogen on Cell Growth and Spirolide Production in the Marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech *et Tangen*. *Botanica Marina*. 2003; 46: p. 466-476.

- 80 Blackburn SI, Bolch CJS, Haskard KA, Hallegraeff GM. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 2001;(40): p. 78-87.
- 81 Throndsen J. Chapter 4. Preservation and storage. En Sournia A. *Phytoplankton manual UNESCO Monogr. Oceanogr. Method.*: UNESCO; 1978. p. 69-74.
- 82 LeGresley M, McDermott G. Chapter 4 Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis-haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. En Karlson B, Cusack C, Bresnan E, editores. *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 2010. p. 25-27.
- 83 Guillard R.L. Division rates. En Stein JR, editor. *Handbook of Phycological Methods.*: Cambridge University Press; 1973. p. 289-312.
- 84 Koroleff F. Determination of phosphorus. En Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K. *Methods of Seawater Analysis*. Alemania: Verlag chemie; 1983. p. 125-131.
- 85 Strickland JDH, Parsons TR. Determination of Ammonia. En Strickland JDH, Parsons TR. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada; 1972. p. 87-89.
- 86 Koroleff F. Determination of ammonia. En Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K. *Methods of Seawater Analysis*. Alemania: Verlag Chemie; 1983. p. 154.
- 87 Grasshoff K. Determination of nitrite. En Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K. *Methods of Seawater Analysis*. Alemania: Verlag Chemie; 1983. p. 139-142.
- 88 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 4500-NO<sub>3</sub>-Nitrogen (Nitrate)\*. En Baird RB, Eaton AD, Rice EW&BLL, editores; 2017. p. 4-126, 4-127.
- 89 AOAC. Official method 2005.06, Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. Prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. First action 2005, in: W. Horwitz & GW. Latimer (Editors), AOAC Office *Methods of Analysis of AOAC International*, Gaithersburg, MD, USA, 2005, p. 83.
- 90 Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Rojas-de-Astudillo L, Biré R, Burdaspal PA, *et al.* Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC International (Food Chemical Contaminants)*. 2005; 88(6).
- 91 Oshima Y. Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons. En Hallegraeff G, Anderson D, Cembella AD, editores. *Manual on harmful marine*

microalgae. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1995. p. 191-209.

- 92 Oshima Y. Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. *Journal of AOAC International*. 1995; 78(2): p. 528-532.
- 93 Chen T, Liu Y, Song S, Li C, Tang YZ, Yu Z. The effects of major environmental factors and nutrient limitation on growth and encystment of planktonic dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Harmful Algae*. 2015; 46: p. 62-70.
- 94 Kokinos JP, Anderson DM. Morphological development of resting cysts in cultures of marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (= *L. machaerophorum*). *Palynology*. 1995; 19: p. 143-166.
- 95 Guillard RL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En Smith PB, editor. *Culture of Marine Invertebrates*. New York: Plenum Press; 1975. p. 29-60.

## 11. ANEXOS

**Anexo A.** Formato de cesión de uso de la cepa AYVP-1.

**Anexo B.** Preparación del medio de cultivo GSe (80).

**Anexo C.** Modificaciones propuestas al medio de cultivo GSe (80).

**Anexo D.** Determinación de ortofosfatos en el medio de cultivo (84).

**Anexo E.** Determinación de amonio en el medio de cultivo (85).

**Anexo F.** Determinación de nitritos en el medio de cultivo (87).

**Anexo G.** Determinación de nitratos en el medio de cultivo (88).

## Anexo A. Formato de cesión de uso de la cepa AYVP-1.



## FORMATO DE ENTREGA DE CEPAS

No. Control:	01/0319b
Fecha:	26/03/2019

DATOS DEL SOLICITANTE	
Nombre:	Dr. Rosalba Alonso Rodríguez
Institución:	Laboratorio de Biotoxinas Marinas   Unidad Académica Mazatlán   Instituto de Ciencias del Mar y Limnología   Universidad Nacional Autónoma de México
Domicilio:	Av. Joel Montes Camarena s/n, Col. Playa Sur, Mazatlán, Sin., C.P. 82040
Teléfono:	52 669 9852845 al 48, Laboratorio Ext. 225; Servicios Académicos Ext. 240
e-mail:	rosalba@ola.icmyl.unam.mx

INFORMACIÓN SOBRE LA(S) CEPA(S) QUE SE ENTREGAN		
Especie: <i>Alexandrium tamiyavanichii</i>		
Axénica: <b>NO</b>	Clonal: <b>NO</b>	Unialgal: <b>SI</b>
Clave(s):	<b>AYPV-1</b>	
Tipo aislamiento:	Célula vegetativa	
Localidad de aislamiento:	<b>Bahía de La Paz, B.C.S., México</b>	
Coordenadas geográficas:	24°17'12.66"N, 110°20'31.92"W	
Fecha de aislamiento:	<b>abril de 2003</b>	
Persona que realizó la colecta:	José Bustillos Guzmán	
Persona que realizó la identificación taxonómica:	Lourdes Morquecho Escamilla	
Persona que realizó el aislamiento:	Diana Góngora González	
Medio de cultivo utilizado:	<b>GSe</b>	
Condiciones de cultivo		
Temperatura (°C)	Ciclo de Luz-oscuridad (h)	Periodicidad de su mantenimiento (días)
<b>20° ± 2</b>	<b>12:12</b>	<b>28</b>
Observaciones: <b>Le pedimos tomar en cuenta el procedimiento de distribución, depósito y resguardo de cepas, particularmente los numerales 8, 9 y 10 (ver al reverso)</b>		

	Dra. Rosalba Alonso Rodríguez
Dra. Lourdes Morquecho E. Curadora	Nombre y firma en el entendido de que recibió inóculos vivos de las cepas solicitadas

## PROCEDIMIENTO DE DISTRIBUCIÓN DE CEPAS

Se pretende que la CODIMAR sea reconocida como una colección de referencia a nivel nacional e internacional para el estudio de los dinoflagelados nocivos. La colección no tiene fines de lucro, pero requerirá de la entrada permanente de recursos económicos para su mantenimiento y crecimiento. Por esto, se da un valor económico a las cepas.

También nos reservamos el derecho de restringir la distribución de cepas que estén siendo sujetas a investigaciones propias del CIBNOR, en el entendido de que estarán disponibles una vez que los trabajos de investigación hayan concluido y publicado los resultados. La información de restricción de las cepas que se encuentren bajo esta modalidad estará indicada en el listado de cepas.

### Las solicitudes de material biológico se sujetaran, sin distinción alguna, a las siguientes reglas:

1. Los interesados en material biológico de la CODIMAR deberán dirigirse al curador responsable de la CODIMAR (Dra. Lourdes Morquecho Escamilla).
2. Los formatos de solicitud de cepas se recibirán por correo electrónico (lamorquecho@cibnor.mx).
3. Las cepas se ponen a disposición del sector académico nacional y latinoamericano a un costo de \$100 dólares + gastos de envío. Para otras instituciones extranjeras las cepas tendrán un costo de \$110 dólares + gastos de envío.
4. Si la solicitud está integrada por cepas con cualidades tóxicas, deberá integrarse un documento avalado por la institución solicitante que certifique que únicamente serán utilizadas para fines de investigación y con todas las medidas de seguridad y ética científica.
5. Las instrucciones para llevar a cabo el pago de las cepas se enviará por correo electrónico al solicitante una vez que se reciba y evalúe la solicitud. Si el solicitante requiere una cotización, ésta le será enviada por correo electrónico.
6. Una vez cubierto el costo de las cepas solicitadas y enviado el comprobante de depósito, se requerirán de 10-20 días hábiles para mandar por paquetería y/o entregar personalmente las cepas, esto de acuerdo a lo especificado en el formato de solicitud.
7. Todas las cepas se mantienen en medio líquido, por lo que se enviarán por triplicado en recipientes de plástico con tapón de rosca y empaquetadas en contenedores térmicos para minimizar cambios bruscos de temperatura. También se anexará un formato de entrega que incluirá los datos generales de la cepa y condiciones en que fue crecida. Es difícil garantizar la supervivencia de las cepas durante el traslado (particularmente las que tienen un crecimiento inestable). Sugerimos por tanto el uso del servicio de carga aérea o establecer contacto con colegas o amigos que viajen a La Paz y puedan trasladar de forma rápida las cepas a su regreso. En este último caso, no se incluirían gastos de envío, pero se deberá dar a conocer con anticipación el nombre de la persona y el día que recogerá las cepas. Las cepas se le entregarán siempre y cuando se identifique y muestre copia del comprobante de depósito.
8. **Queda estrictamente prohibido revender, redistribuir o donar a terceros las cepas adquiridas de la CODIMAR.**
9. **De los productos que se generen con el uso de las cepas, se deberá indicar la procedencia e información general de la cepa (incluyendo clave y persona que la aisló), dando créditos a la CODIMAR del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.**
10. **La creación de patentes con las cepas de la CODIMAR quedan estrictamente prohibidas.**

## **Anexo B.** Preparación del medio de cultivo GSe (80).

Para la preparación del medio de cultivo GSe se requieren 2 soluciones: solución de nutrientes y extracto de suelo.

La solución de nutrientes, es una mezcla de 5 soluciones (soluciones de nitratos, fosfatos, selenio, metales traza y vitaminas), es decir, los nutrientes necesarios para que la microalga pueda crecer. Por otra parte el extracto de suelo funciona para adicionar algunos compuestos secundarios para facilitar el crecimiento.

La preparación de cada solución se realiza con agua desionizada, esterilizada en autoclave a 121°C por 15 minutos y son válidas por un periodo de 1 año, a menos de que se especifique otro método y/o tiempo de almacenamiento.

### **1. Solución stock de macronutrientes para el medio de cultivo**

**Tabla V.** Soluciones stock de macronutrientes.

<b>Número de solución</b>	<b>Solución stock</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>1</b>	Nitratos	10 g de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	100
<b>2</b>	Fosfatos	3.48 g de fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	100
<b>3</b>	Selenio	0.00129 g de ácido selenioso ( $\text{H}_2\text{SeO}_3$ )	1,000

### **2. Solución stock PII de metales traza**

La mezcla de metales PII se realiza disolviendo los siguientes compuestos en 1 L de agua desionizada conforme a la Tabla VI.

**Tabla VI.** Preparación de la solución stock de metales traza.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Na <sub>2</sub> -EDTA 2H <sub>2</sub> O	6.00
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.29
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.85
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.86
ZnCl <sub>2</sub>	0.06
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.26

### 3. Solución stock de vitaminas

Para preparar la solución stock de vitaminas, primeramente se preparan las siguientes soluciones con agua desionizada conforme a la Tabla VII.

**Tabla VII.** Preparación de soluciones individuales de vitaminas.

<b>Número de solución</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Volumen (mL)</b>
1	Vitamina B12	0.0001	100
2	Biotina	0.0002	100
3	Tiamina-HCl	0.1000	100

Estas disoluciones se esterilizan por filtración, en vez de autoclave y se mantiene en frasco ámbar en refrigeración. La estabilidad de las soluciones de vitaminas es únicamente de 3 meses. Una vez realizadas las soluciones individuales de vitaminas, la solución stock de vitaminas se prepara conforme a la Tabla VIII.

**Tabla VIII.** Preparación de solución stock de vitaminas.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Solución de vitamina B12	0.5
Solución de biotina	1.0
Solución de tiamina-HCl	50

La solución stock de vitaminas se esteriliza por filtración con membrana de 0.22 µm y se mantiene en frasco ámbar en refrigeración. Se puede almacenar por un periodo de 3 meses.

#### 4. Extracto de suelo

Para la preparación del extracto de suelo, se obtiene tierra negra preferentemente de vivero. La tierra no deberá comercial, ya que en la mayoría de los casos dicha tierra contiene fertilizantes y/o insecticidas que podrían afectar el cultivo.

El extracto de suelo se prepara de la siguiente manera:

1. Se pesan 500 g de tierra negra (libre de pesticidas) en un matraz.
2. Se mezcla en 1 L de agua desionizada.
3. Se esteriliza la mezcla en un recipiente que del doble de la capacidad que la mezcla. La esterilización se realiza por autoclave a 121°C y 15 lb pulg<sup>-2</sup> de presión durante 60 minutos.
4. Se deja enfriar el resultado de la esterilización por una noche.
5. Se filtra la mezcla con ayuda de una gasa, algodón y otra gasa. Se exprime el algodón al finalizar la filtración. Evitar resuspender el suelo.
6. El filtrado se centrifuga a 5,000 rpm por 20 minutos y se recupera el sobrenadante.
7. El sobrenadante se lleva a esterilización en autoclave a 121°C y 15 lb pulg<sup>-2</sup> de presión durante 15 minutos.
8. El resultado de la esterilización se mantiene en oscuridad protegiendo la botella con aluminio. La solución es vigente durante 1 año.

#### 5. Solución de nutrientes

La solución stock de nutrientes se prepara conforme la Tabla IX.

**Tabla IX.** Preparación de la solución de nutrientes del medio GSe.

<b>Solución stock</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Nitratos	20
Fosfatos	10
Vitaminas	10
Metales	50
Selenio	10
Agua desionizada	100

La solución de nutrientes se esteriliza por filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se mantiene en frasco ámbar en refrigeración. Se puede almacenar por máximo 1 año.

## 6. Preparación del medio GSe

La preparación del medio de cultivo GSe se desglosa en la Tabla X.

**Tabla X.** Preparación del medio GSe.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
Agua de mar estéril	800
Agua desionizada estéril	200
Solución de nutrientes	20
Extracto de suelo	5

El agua de mar (filtrada previamente con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ ) y el agua desionizada, deberán ser esterilizadas por 15 minutos a 121°C a 15 lb pulg<sup>-2</sup> de presión. La adición de la solución de nutrientes y la solución de extracto de suelo, se realizará a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , una vez que el agua se haya enfriado al paso del tiempo.

El medio de cultivo podrá ser utilizado al momento de prepararse o podrá refrigerarse a 4°C por un periodo máximo de 1 año.

### Anexo C. Modificaciones propuestas al medio de cultivo GSe (80).

Siguiendo la metodología descrita por Blackburn *et al.* (80) la cantidad de nitrato a agregar al medio de cultivo es de 100 g de  $\text{KNO}_3$  por litro de solución stock de nitrato. La fórmula para calcular la molaridad de una sustancia está dada por (ecuación 3)

$$M = \frac{\text{masa}}{\text{peso molecular}} \quad (3)$$

K = 39.098

N = 14.067

O =  $15.999 \times 3 = 47.997$

Es decir, 101.1623 U

Si sustituimos la ecuación anterior,  $M = \frac{100}{101.1623} = 0.9885 \text{ mol L}^{-1}$  para la solución stock, si de esta solución se toman 2 mL y se disuelven en 1 L, entonces se tendrá una molaridad final en el medio de cultivo de 1977  $\mu\text{M}$ .

De igual forma, la concentración de ortofosfato presente en el medio de cultivo se calcula agregando 34.8 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 1 L de agua destilada. Una vez disuelta se toman 2 mL de dicha disolución y se llevan a 1 L de medio de cultivo, finalmente la concentración de fosfatos disueltos es de 399  $\mu\text{M}$  en el medio.

K =  $39.983 \times 2 = 78.197$

H = 1.008

P = 30.974

O =  $15.999 \times 4 = 63.996$

Es decir, 174.174 U

De esta forma, se contó con una relación óptima entre nitrógeno y fósforo presente en el medio de cultivo de manera que el dinoflagelado disponga de los nutrientes necesarios para su crecimiento (1977  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$ : 399  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4$ , o bien, 5 N: 1 P).

Para el experimento de exceso de nitrógeno se duplicó la concentración de nitrógeno presente en el medio de cultivo, con una concentración final de nitratos de 3954  $\mu\text{M}$ . De esta forma se obtuvo una relación de 3954  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$ : 399  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4$ , o bien,  $\approx 10$  N: 1 P).

Esto se logró preparando la solución stock por separado, sin mezclar las soluciones como lo menciona el autor, de lo contrario la concentración de nitrógeno y fósforo podría crecer o decrecer de manera equitativa.

Por último, para el experimento de limitación de fósforo no se adicionó fósforo al medio de cultivo, es decir la concentración final de ortofosfatos en el medio de cultivo consistió del ortofosfato disponible en el agua de mar utilizada, mientras que la concentración de nitrógeno se mantuvo como lo indica el medio comercial (1977  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3$ ) para obtener la limitación de fósforo (relación 10 N: 0 P).

En la Tabla XI, se desglosa la preparación de las soluciones de nutrientes de cada medio de cultivo (control, limitado y enriquecido). La cantidad de solución de nutrientes a agregar a cada medio de cultivo continuó siendo 20 mL en cada medio (Tabla X, anexo 2).

**Tabla XI.** Medio GSe y modificaciones al medio de cultivo propuestas.

Solución stock	Medio GSe	Medio GSe limitado en fósforo	Medio GSe enriquecido en nitrato
	Cantidad (mL)		
Nitratos	20	20	40
Fosfatos	10	0	10
Vitaminas	10	10	10
Metales	50	50	50
Selenio	10	10	10
Agua desionizada	100	100	100

#### **Anexo D.** Determinación de ortofosfatos en el medio de cultivo (84).

La preparación de los reactivos para la determinación de ortofosfatos es la siguiente:

- Solución reductora.

Pesar 10 g de ácido ascórbico y diluir en 50 mL de agua desionizada más 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5 M (12.5 mL de ác. sulfúrico concentrado aforado en 50 mL de agua desionizada). La solución es estable por 1 mes, se recomienda almacenar en recipiente de cristal color ámbar en refrigeración.

- Reactivo de mezcla.

Disolver 2.5 g de molibdato de amonio en 25 mL de agua desionizada. Adicionar 70 mL de ác. sulfúrico 4.5 mol (17.5 mL de ácido concentrado + 52.5 mL de agua desionizada).

Pesar 0.1 g de tartrato de antimonio y potasio, disolver en 4 mL de agua desionizada. Mezclar las dos soluciones anteriores, guardar en cristal a resguardo de la evaporación. La estabilidad de la solución es de 6 meses.

- Estándar de ortofosfatos.

Pesar y secar 0.3 g de fósforo monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 100°C por 1 h. Una vez seco, pesar y disolver 0.136 g del reactivo en 100 mL de agua desionizada con 0.2 mL de ácido sulfúrico 4.5 M. Se almacena en cristal ámbar por 1 año.

$$\text{Estándar} = 10,000 \mu\text{mol L}^{-1} \text{P-PO}_4$$

- Disolución diluida de ortofosfatos.

Tomar 0.1 mL del estándar y llevar a 100 mL con agua desionizada, se debe hacer esta dilución al momento de utilizarla y no dejar pasar más de 1 hora.

$$\text{Estándar diluido} = 10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{P-PO}_4$$

Antes de analizar las muestras es necesario realizar una curva de calibración para conocer que concentraciones serán las permitidas dentro del rango normal. En la Tabla XII se desglosa la construcción de la curva de calibración para ortofosfatos.

**Tabla XII.** Construcción de curva de calibración para ortofosfatos.

<b>DISOLUCIÓN (<math>\mu\text{MOL L}^{-1}</math>)</b>	<b>EST. DILUIDO (ML)</b>	<b>AGUA DESIONIZADA (ML)</b>
<b>BLANCO REACTIVO (BR)</b>	0	10
<b>0.10</b>	100 $\mu\text{l}$	9.9
<b>0.50</b>	500 $\mu\text{l}$	9.5
<b>1.00</b>	1	9
<b>2.00</b>	2	8
<b>4.00</b>	4	6
<b>5.00</b>	5	5
<b>6.00</b>	6	4
<b>8.00</b>	8	2
<b>10.00</b>	10	0

El procedimiento para realizar la medición de ortofosfatos se realiza midiendo 10 mL de muestra en un vial de cristal, al cual se le adicionan 0.2 mL de solución reductora y se agita. Posteriormente se le agregan 0.2 mL de la mezcla de reacción y se agita nuevamente. Para la lectura se deberá reposar la reacción por 30 minutos y se lee la absorbancia a 880 nm contra un blanco de agua desionizada.

**Anexo E. Determinación de amonio en el medio de cultivo (85).**

Para la cuantificación de amonio disuelto en el medio de cultivo se recomienda que la preparación de todos los reactivos, así como el agua que se utilice en la preparación de la curva de amonio sea agua desionizada hervida previamente y enfriada a temperatura ambiente. La preparación de los reactivos para la determinación de amonio es la siguiente:

- Nitroprusiato de sodio al 0.5%.

Pesar 0.5 g de nitroprusiato de sodio y disolver en 100 mL de agua desionizada. Guardarlo en un frasco ámbar por 1 mes.

- Disolución alcohol-fenol.

Disolver 10 g de fenol en 100 mL de alcohol etílico 95%. Se guarda la disolución en polietileno por 1 mes.

- Disolución oxidante.

Pesar 10 g de citrato de sodio y 0.5 g de NaOH en 50 mL de agua desionizada, se agregan 12.5 mL de cloro comercial una vez disueltos los reactivos. Se almacena en polietileno por un máximo de 1 mes. No adicionar el cloro hasta utilizarla por primera vez.

- Disolución estándar de amonio (86).

Secar 1 g de cloruro de amonio a 100°C por una hora y guardarlo en un desecador, entonces pesar 0.535 g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) en 1000 mL de agua desionizada. Agregar 3 gotas de cloroformo como conservador. Guardar en un frasco de vidrio color ámbar por 1 año en refrigeración.

$$\text{Estándar} = 10,000 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de N-NH}_4$$

- Disolución diluida de amonio.

Tomar 1 mL del estándar de amonio y llevar a 100 mL con agua desionizada, se debe hacer esta dilución al momento de utilizarla y no dejar pasar más de 1 hora.

$$10 \text{ mL del estándar diluido} = 100 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ N-NH}_4$$

Antes de analizar las muestras es necesario realizar una curva de calibración para conocer que concentraciones serán las permitidas dentro del rango normal. En la Tabla XIII se desglosa la construcción de la curva de calibración para amonio.

**Tabla XIII.** Construcción de curva de calibración para amonio.

<b>DISOLUCIÓN (<math>\mu\text{MOL L}^{-1}</math>)</b>	<b>EST. DILUIDO (ML)</b>	<b>AGUA DESIONIZADA (ML)</b>
<b>BLANCO REACTIVO (BR)</b>	0	10
<b>1</b>	100 $\mu\text{L}$	9.9
<b>5</b>	500 $\mu\text{L}$	9.5
<b>10</b>	1	9
<b>20</b>	2	8
<b>40</b>	4	6
<b>50</b>	5	5
<b>60</b>	6	4
<b>80</b>	8	2
<b>100</b>	10	0

Bajo la campana de extracción se miden 10 mL de muestra en un vial de cristal. Se adicionan 0.4 mL de la disolución de fenol y se agita. Posteriormente, agregar 0.4 mL de la disolución de nitroprusiato y agitar. Por último agrega 1 mL de la disolución oxidante y se deja reposar por 1 a 2 horas.

Si hay desarrollo de color en los primeros 5 minutos es necesario repetir el análisis. De no ser así, se procede a la lectura de la absorbancia de las muestras contra un blanco de agua destilada a una longitud de onda de 640 nm.

**Anexo F. Determinación de nitritos en el medio de cultivo (87).**

Los reactivos preparados se almacenan a una temperatura de 4°C protegiéndolos de la evaporación.

- Sulfanilamida.

Pesar 1 g de sulfanilamida y disolver en 10 mL de HCl concentrado. Aforar a 100 mL y esperar a enfriar. Se almacena en envase de polietileno por 6 meses.

- N- (1-naftil) – etilendiamina dihidroclorhídrica (NED).

Pesar 0.1 g de NED y disolver en 100 mL de agua desionizada. Se almacena en envase de polietileno por 6 meses.

- Estándar de nitritos.

Pesar y secar 0.2 g de nitrito de sodio a 100°C por 1 h. Una vez seco, pesar y disolver 0.0690 g de nitrito de sodio en 100 mL de agua desionizada. Se almacena en recipiente de cristal color ámbar por 1 año.

$$\text{Estándar} = 10,000 \mu\text{mol L}^{-1} \text{N-NO}_2$$

- Disolución diluida de nitritos.

Tomar 0.1 mL del estándar y llevar a 100 mL con agua desionizada, se debe hacer esta dilución al momento de utilizarla y no dejar pasar más de 1 hora.

$$\text{Estándar diluido} = 10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{N-NO}_2$$

En la Tabla XIV se desglosa la construcción de la curva de calibración para nitritos.

**Tabla XIV.** Construcción de curva de calibración para nitritos.

<b>DISOLUCIÓN (<math>\mu\text{MOL L}^{-1}</math>)</b>	<b>EST. DILUIDO (ML)</b>	<b>AGUA DESIONIZADA (ML)</b>
<b>BLANCO REACTIVO (BR)</b>	0	10
<b>0.10</b>	100 $\mu\text{L}$	9.9
<b>0.50</b>	500 $\mu\text{L}$	9.5
<b>1.00</b>	1	9
<b>2.00</b>	2	8
<b>4.00</b>	4	6
<b>5.00</b>	5	5
<b>6.00</b>	6	4
<b>8.00</b>	8	2
<b>10.00</b>	10	0

Para realizar las determinaciones de nitritos, se miden 10 mL del punto de la curva/ muestra en un vial de cristal de 20 mL. Se agrega 0.2 mL de sulfanilamida y se agita vigorosamente. Se mantiene en reposo 5 minutos, luego se agregan 0.2 mL de NED. Se agita nuevamente y se deja en reposo 10 minutos. Pasados 10 minutos se lee la absorbancia contra un blanco de agua desionizada a 540 nm de longitud de onda.

**Anexo G.** Determinación de nitratos en el medio de cultivo (88).

Los reactivos preparados se almacenaran a una temperatura de 4°C protegiéndolos de la evaporación.

- Ácido Clorhídrico (HCl) 1M.

Disolver 8.3 mL de ácido clorhídrico concentrado en 100 mL de agua desionizada. Se almacena en frasco de polietileno por 6 meses.

- Estándar de nitratos

Pesar y secar 0.2 g de nitrato de potasio a 100°C por 24 h. Una vez seco, pesar y disolver 0.072 g de nitrato de potasio en 1000 mL de agua desionizada. Se almacena en recipiente de cristal color ámbar por 1 año.

$$\text{Estándar} = 10,000 \mu\text{mol L}^{-1} \text{N-NO}_3$$

- Disolución diluida de nitritos.

Tomar 0.1 mL del estándar y llevar a 100 mL con agua desionizada, se debe hacer esta dilución al momento de utilizarla y no dejar pasar más de 1 hora.

$$\text{Estándar diluido} = 10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{N-NO}_3$$

Antes de analizar las muestras es necesario realizar una curva de calibración para conocer que concentraciones estarán dentro de los puntos establecidos en la misma. Si los valores obtenidos en la determinación de la concentración estuvieran por arriba de la concentración más alta de la curva, será necesario diluir la muestra y repetir el procedimiento.

En la Tabla XV se presenta que volumen y en que proporciones será la curva.

**Tabla XV.** Construcción de curva de calibración para nitrato.

<b>DISOLUCIÓN (<math>\mu\text{MOL L}^{-1}</math>)</b>	<b>ESTÁNDAR DILUIDO (ML)</b>	<b>AGUA DESIONIZADA (ML)</b>
<b>BLANCO REACTIVO (BR)</b>	0	10
<b>1</b>	100 $\mu\text{L}$	9.9
<b>5</b>	500 $\mu\text{L}$	9.5
<b>10</b>	1	9
<b>20</b>	2	8
<b>40</b>	4	6
<b>50</b>	5	5
<b>60</b>	6	4
<b>80</b>	8	2
<b>100</b>	10	0

NOTA: Tomando en cuenta que la tabla nos indica una concentración de 10  $\mu\text{mol}$  máximo  $\text{N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ , esta se toma para realizar la disolución estándar diluida, tomando 0.1 mL del estándar concentrado ( $10,000\mu\text{mol L}^{-1}$ ) y aforando a 100 mL.

El procedimiento para analizar las muestras y la curva es el siguiente:

- 1) Medir 10 mL en un vial (muestra/curva).
- 2) Agregar 0.2 mL de HCl 1M
- 3) Esperar 5 minutos.
- 4) Medir la absorbancia a 220 nm, con un blanco de agua desionizada.
- 5) Medir la absorbancia a 275 nm para determinar interferencias

Para el cálculo de concentración se deberá restar la absorbancia obtenida a 275 nm a la absorbancia obtenida a 220 nm para obtener la absorbancia libre de contaminantes orgánicos.