



PROYECTO FIP N° 2007-20
INFORME FINAL

PROSPECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE MICROALGAS NOCIVAS
PARA LA ACTIVIDAD DE CULTIVO DE PECTINIDOS EN LAS
REGIONES DE ANTOFAGASTA, ATACAMA Y COQUIMBO

COQUIMBO, SEPTIEMBRE DE 2010



REQUIRENTE



FONDO DE INVESTIGACIÓN PESQUERA

EJECUTOR

UNIVERSIDAD CATOLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA

CENTRO DE INVESTIGACIONES MARINAS
XUNTA DE GALICIA - ESPAÑA

LABORATORIO DEL AMBIENTE
SEREMI DE SALUD – REGION DE COQUIMBO

COQUIMBO, NOVIEMBRE DE 2010



EQUIPO DE INVESTIGADORES

Jefe de proyecto: Dr. Eduardo Uribe T.

Investigadores: Dr Gonzalo Alvarez V.
Dr. Juan Blanco P.
Bioq. Fransico Gonzalez N.
M.Sc. Sergio Rosales G.
Ing. Pamela Ramírez E.
Ing. Rosario Díaz C.
Biol. Carolina Castillo B.
Bioq. Teresa Gajardo R.

INSTITUCIONES PARTICIPANTES

Centro de Investigaciones Marinas
Xunta de Galicia- España

Laboratorio del Ambiente
SEREMI Salud – Región de Coquimbo

Instituto de Bio-Organica
Universidad de la Laguna - España



RESUMEN EJECUTIVO

La zona norte de Chile, en relación a la acuicultura, es considerada como el segundo polo productivo más importante en el país. Esta actividad, está centrada principalmente en el cultivo del ostión de norte (*Argopecten purpuratus*) y el desarrollo incipiente del cultivo del abalón californiano y japonés (*Haliotis rufescens* y *Haliotis discus hannai*). Para cumplir con las normativas para la exportación de moluscos establecidas por la Agencia de Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) y la Comunidad Europea. Desde 1989 el Servicio Nacional de Pesca ha desarrollado el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) que consiste básicamente en la clasificación y monitoreo de las zonas de producción de los moluscos y otros recursos susceptibles a ser afectados por toxinas.

En la zona Norte de nuestro país, la primera detección de toxinas amnésicas fue en el año 1999 en muestras de ostiones obtenidos de centros de cultivo de la Región de Coquimbo, siendo asociada a la presencia de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis*. En general, la presencia temporal de ácido domoico en las tres bahías del estudio fue poco frecuente, siendo los periodos de primavera y verano los que concentraron la mayor cantidad de registros de esta toxina. En Bahía Inglesa, la mayor concentración de ácido domoico en glándula digestiva correspondió a $33 \mu\text{g g}^{-1}$. Este registró, coincidió con la prohibición de cosecha de este molusco dictaminada por SERNAPESCA al detectar durante el PSMB niveles cercanos al límite regulatorio en los tejidos comestibles. En las Bahías de la Región de Coquimbo, la presencia de esta toxina fue más frecuente en Bahía Tongoy, con un valor mínimo registrado en glándula digestiva de $<1 \mu\text{g g}^{-1}$ y un máximo de $16 \mu\text{g g}^{-1}$. En el caso de Bahía Guanaqueros, se puede destacar que la presencia de esta toxina fue menor, así como también las concentraciones de ácido domoico no sobrepasaron los $5 \mu\text{g g}^{-1}$. En todos los casos, la presencia de ácido domoico está relacionada con la presencia de diatomeas del género



Pseudo-nitzschia. El desarrollo de los estudios de taxonomía confirmaron por una parte la presencia de *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, las que ya habían sido descritas en esta zona geográfica y también se demostró la presencia de *Pseudo-nitzschia calliantha* y *Pseudo-nitzschia subfraudulenta*, especies que hasta la fecha estaban siendo identificadas por microscopía convencional como *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia delicatissima*. Los análisis toxicológicos realizados a los cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia calliantha* demostraron que ambas especies tienen la capacidad de producir ácido domoico, siendo la primera la principal productora en las aguas costeras del Norte de Chile. Por otra parte, permitió descartar que *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* tenga la capacidad de generar este tipo de toxinas. En Bahía Inglesa, en comparación a las bahías de la Región de Coquimbo, existe una mayor frecuencia e intensidad de los eventos de surgencia, en los cuales emergen aguas frías que fertilizan las aguas superficiales. Durante estos eventos, las especies *Pseudo-nitzschia australis*, *P. calliantha*, *P. pseudodelicatissima* y *P. subfraudulenta* generalmente cohabitan en la columna de agua presentando su máxima tasa de crecimiento en aguas frías que van de los 12 a los 15 °C.

En relación a las toxinas paralizantes, durante el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos se ha detectado la presencia de este tipo de toxicidad con niveles sub-tóxicos de manera esporádica en muestras de *Argopecten purpuratus* y el gasterópodo *Conchlepas concholepas*, sin provocar cierres cautelares. En el año 2006, nuestro equipo de trabajo realizó los primeros estudios tendientes a identificar el perfil toxicológico y los resultados en *A. purpuratus* provenientes de Bahía Mejillones y extraídas durante una floración de *Alexandrium tamarense* se encuentran dominados por C2, GTX2, GTX3 y dcGTX2 y la ausencia de STX. En tanto, las muestras provenientes de Bahía Guanaqueros presentaron una alta proporción de STX y la presencia de GTX2, GTX3, dcGTX2, C1 y C2. Durante el



desarrollo de este proyecto, los análisis realizados por bioensayo en ratones, revelaron que este tipo de toxicidad se encuentra frecuentemente durante todo el año en las glándulas digestivas de *A. purpuratus*. En Bahía Inglesa, los resultados positivos de los análisis de las glándulas digestivas mediante bioensayo se encontraron con toxicidades entre 31 y 69 μg equivalentes de STX g^{-1} . Los perfiles de toxinas observados en estas muestras fueron frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estastoxinas más dcGTX2, dcGTX3, dcSTX, C1 y GTX1. En Bahía Guanaqueros, la toxicidad de las muestras se encontraron entre 31 y 56 μg equivalentes de STX g^{-1} . Los perfiles de toxinas observados en estas muestras fueron frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estas toxinas más dcGTX2, dcGTX3, C1, dcSTX y GTX1. En Bahía Tongoy, la toxicidad se encontró entre 31 y 71 μg equivalentes de STX g^{-1} , valores muy similares a los obtenidos en las otras bahías. Los perfiles de toxinas observados en las muestras analizadas fueron frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estas toxinas más dcGTX2, dcGTX3 y GTX. La coincidencia de cinco de estas toxinas, sugiere que estas fueron producidas por el mismo organismo fitoplanctónico, generándose una nueva intoxicación de los bivalvos cada vez que se incrementó la proporción de GTX5 (probablemente proveniente del fitoplancton). Considerando estos perfiles, podríamos establecer que este bivalvo tendría la capacidad de biotransformar algunas toxinas paralizantes. Entre estas se encuentra la epimerización de C2 en C1, la transformación mediante enzimas de C1 en dcGTX2 y C2 en dcGTX3 y la epimerización de esta última en dcGTX2 y la capacidad de transformar GTX1 en GTX2 por reducción. Los perfiles obtenidos en *A. purpuratus*, no existen en la literatura, salvo la descripción de un perfil similar en la almeja *Megapitaria squalida* durante un episodio de *Gymnodinium catenatum* y el perfil de toxinas de la cianobacteria *Anabaena circinalis*. Sin embargo, la presencia de STX, GTX2 y



GTX3 en altas proporciones y como constituyentes principales del perfil, ha sido asociada a diferentes especies de *Alexandrium* como *A. minutum* y *A. tamarense*.

En relación a la presencia de toxinas lipofílicas, se demostró que estas se encuentran frecuentemente presentes en las tres principales bahía en las que se desarrolla el cultivo de *Argopecten purpuratus*. Este tipo de toxicidad, no presenta un patrón de distribución temporal en ninguna de las bahías estudiadas y es producida por tres tipos de toxinas. Entre estas, la yesotoxina es la principal toxina detectada en esta amplia zona geográfica, con concentraciones entre 0,01 y 1,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, lo que explica la mortalidad de los ratones en la mayoría de los bioensayos, debido a que la LD50 (dosis mortal 50%) por inyección intraperitoneal corresponde a 0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$. Al igual que en otros lugares del mundo, las toxinas detectadas en este bivalvo son producidas principalmente por el dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera*. En el caso de las pectenotoxinas, el perfil detectado estuvo dominado por PTX2 con una concentración entre 0,01 y 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ y su ácido secoico PTX2sa, y no se detectó las toxinas diarreogénicas, ácido okadaico (AO) o dinofisistoxinas (DTX). Estas toxinas son producidas por *Dinophysis acuminata*, el que contendría una concentración de 180 pg de PTX2 por célula, siendo esta la concentración de este tipo de toxinas más alta reportada para este género. La coincidencia de este perfil toxicológico en los moluscos de áreas distantes como Bahía Inglesa y Bahía Tongoy, sugieren que *D. acuminata* se encuentra distribuida en toda la costa del norte de Chile, lo que queda corroborado por la reciente detección de PTX2 en la Bahía de Arica por Krock *et al.* (2009a). La última toxina lipofílica detectada durante el desarrollo del proyecto son los azaspirácidos. Entre estas toxinas, la más frecuente en las glándulas digestivas del ostión es el azaspirácido 2 (AZA2), el que se encontró en concentraciones entre el límite de detección y el de cuantificación que corresponden a 0,01 y 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Cabe destacar que nuestro equipo de trabajo encontró la presencia de azaspirácido 1, en muestras de macha



(*Mesodesma donacium*) y almeja (*Mulinia edulis*) obtenidas desde Bahía Coquimbo, siendo esta la primera detección en nuestro país y en el Hemisferio Sur. En relación al agente causal de la toxina, recientemente investigadores alemanes detectaron la presencia de AZA-1 y AZA-2 en muestras de fitoplancton obtenidas en nuestro país, sugiriendo la presencia del dinoflagelado *Azadinium spinosum*. Finalmente, la presencia de espirolidos en muestras de macha y almeja obtenidas de Bahía Coquimbo, por nuestro equipo de trabajo, puede ser considerada como una amenaza potencial para el desarrollo de la pectinicultura

En relación a la presencia del sabor amargo, se determinó que las alteraciones organolépticas en el ostión se encuentran asociadas a la diatomea *Rhizosolenia imbricata*. Adicionalmente, se ha logrado un importante avance en el proceso de purificación del compuesto, pero lamentablemente hasta la fecha no ha podido ser caracterizado.



INDICE

A. Objetivo general	18
B. Objetivos específicos	18
1. Antecedentes	19
1.1 Principales problemas asociados a la presencia de eventos tóxicos y nocivos detectados durante el desarrollo del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en el norte de Chile.	19
1.2 Principales toxinas producidas por algas fitoplanctónicas.	22
1.3 Toxinas Lipofílicas	25
1.3.1 Toxinas diarreogénicas	25
1.3.1.1 Acido okadaico y derivados	25
1.3.1.2 Azaspirácidos	27
1.3.2 Toxinas no diarreogénicas	30
1.3.2.1 Pectenotoxinas	30
1.3.2.2 Yesotoxinas	32
1.3.2.3 Espirólidos	34
1.4 Toxinas hidrofílicas	37
1.4.1 Saxitoxina y análogos	37
1.4.2 Ácido domoico	41
1.5 Episodios nocivos producidos por organismos fitoplanctónicos que afectan las características organolépticas de los bivalvos	44
2. Metodología	47
2.1 Análisis semanales de biotoxinas marinas e identificación de perfiles tóxicos en Argopecten purpuratus extraídos de cada una de las bahías contempladas en el estudio, mediante HPLC y HPLC-MS.	47
2.1.1 Muestreo de <i>Argopecten purpuratus</i> para análisis de toxinas marinas	47
2.1.2 Análisis de toxinas marinas	48
2.1.2.1 Determinación de toxina amnésica de moluscos bivalvos (VAM). Método HPLC-UV	48
2.1.2.1.1 Preparación de la muestra	48
2.1.2.1.2 Análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV)	49
2.1.2.1.3 Expresión de los resultados	49
2.1.2.1.4 Cultivo de <i>Pseudo-nitzschia</i> , preparación de muestras y análisis de toxinas por cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta y espectrometría de masas	49
2.1.2.2 Determinación de toxina paralizante de moluscos bivalvos (VPM). Método biológico.	51
2.1.2.2.1 Bioensayo	52
2.1.2.2.2 Expresión de los resultados	52



2.1.2.2.3	Determinación de los perfiles tóxicos para toxinas paralizantes en muestras de bivalvos y fitoplancton, mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa con detección fluorimétrica (HPLC –FD).	52
2.1.2.3	Determinación de toxinas lipofílicas (Veneno diarrogénico de los moluscos). Método biológico.	55
2.1.2.3.1	Preparación de la muestra	55
2.1.2.3.2	Bioensayo	56
2.1.2.3.3	Expresión de resultados	56
2.1.2.3.4	Análisis de toxinas lipofílicas en muestras de glándulas digestivas por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	56
2.1.2.3.5	Confirmación de perfiles toxicológicos de muestras de fitoplancton para toxinas lipofílicas, mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa acoplada a espectrometría de masas (HPLC –MS).	58
2.1.2.3.5.1	Detección de pectenotoxinas en <i>Dinophysis acuminata</i>	58
2.1.2.3.5.2	Detección de yesotoxinas en muestras de fitoplancton.	59
2.2	Monitoreo cuantitativo y cualitativo de fitoplancton de cada una de las bahías contempladas en el estudio.	61
2.2.1	Muestreo y análisis cualitativo de fitoplancton	64
2.2.2	Muestreo y análisis cuantitativo de fitoplancton	65
2.3	Identificación taxonómica del fitoplancton toxico o nocivo encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio	66
2.3.1	Especies productoras de toxinas amnésicas.	66
2.3.2	Especies productoras de toxinas paralizantes	66
2.3.3	Especies productoras de toxinas lipofílicas	66
2.3.3.1	<i>Dinophysis acuminata</i>	66
2.3.3.2	<i>Protoceratium reticulatum</i>	67
2.4	Evaluación sensorial para determinar la distribución anatómica del sabor amargo en <i>Argopecten purpuratus</i>	68
2.5	Progreso en la purificación e identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos	69
2.5.1	Obtención de la muestra y caracterización preliminar.	69
2.5.2	Determinación del tamaño molecular aproximado del compuesto amargo	71
2.5.3	Determinación de la carga del compuesto amargo	71
2.5.4	Determinación de las características de retención en fase reversa y normal	71
2.5.5	Ensayo de digestión con tripsina para comprobar la posible naturaleza proteica del compuesto	72
2.5.6	Extracción del compuesto amargo para su purificación	72
2.5.7	Purificación del compuesto utilizando Sephadex LH-20	73
2.5.8	Evaluación de la posibilidad de purificación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, fase normal e interacción hidrofílica	75
2.5.9	Purificación por extracción en fase solida (SPE)	76
2.5.10	Purificación del compuesto amargo mediante la utilización de resinas de adsorción	77
2.5.11	Análisis de los extractos a espectrometría de masas	78
2.5.12	Resonancia magnética nuclear	79
2.6	Identificación de quistes obtenidos de las bahías incorporadas en el estudio	80
2.6.1	Procesamiento de las muestras de sedimentos	81
2.6.2	Análisis de muestras	81



2.7 Monitoreo de variables oceanográficas y meteorológicas de las principales bahías en las que se desarrollara el estudio.	82
2.7.1 Temperatura del mar	82
2.7.2 Variables meteorológicas	82
2.8 Impactos económicos generados por la aparición de floraciones algales nocivas en la industria pectinicultura en el norte de Chile.	83
2.8.1 Período de los eventos	85
2.8.2 Catastro de empresas exportadoras y su peso relativo en la producción total.	85
2.8.3 Recopilación de información primaria.	85
2.8.4 Extrapolación y determinación del impacto	86
3. Resultados	87
3.1 Análisis semanales de biotoxinas marinas e identificación de perfiles tóxicos en <i>Argopecten purpuratus</i> extraídos de cada una de las bahías contempladas en el estudio, mediante HPLC y HPLC-MS.	87
3.1.1 Bahía Inglesa	87
3.1.1.1 Veneno amnésico de los mariscos	87
3.1.1.2 Veneno paralizante de los mariscos	89
3.1.1.3 Toxinas lipofílicas	94
3.1.2 Bahía Guanaqueros	98
3.1.2.1 Veneno amnésico de los mariscos	98
3.1.2.3 Toxinas lipofílicas	105
3.1.3 Bahía Tongoy	107
3.1.3.1 Veneno amnésico de los mariscos	107
3.1.3.2 Veneno paralizante de los mariscos	109
3.1.3.3 Toxinas lipofílicas	113
3.2 Resultados de identificación taxonómica del fitoplancton tóxico o nocivo encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio	117
3.2.1 Especies productoras de ácido domoico	117
3.2.1.1 <i>Pseudo-nitzschia australis</i> Frenguelli	117
3.2.1.2 <i>Pseudo-nitzschia subfraudulenta</i> (Hasle)	118
3.2.1.3 <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> Lundholm Moestrup et Hasle	119
3.2.1.4 <i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle emend. Lundholm, Hasle & Moestrup	120
3.2.2 Especies productoras de toxinas paralizantes	121
3.2.2.1 <i>Alexandrium tamarense</i> (Lebour) Balech, 1985	121
3.2.2.2 <i>Alexandrium</i> sp	122
3.2.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas	123
3.2.3.1 <i>Dinophysis acuminata</i> Claperède & Lachmann 1895	123
3.2.3.2 <i>Protoceratium reticulatum</i> (Claparede et Lachmann) Butschli 1885	124
3.2.3.3 <i>Gonyaulax spinifera</i> (Claparede et Lachmann) Diesing	125
3.2.3.4 <i>Azadinium spinosum</i> Elbrächter & Tillmann, 2009	126
3.2.4 Especies nocivas para la acuicultura	127
3.2.4.1 <i>Rhizosolenia imbricata</i> Brightwell 1858	127
3.2.4.2 <i>Guinardia striata</i> (Stoltherfoth) Hasle	128
3.3 Resultados de los perfiles toxicológicos del fitoplancton tóxico encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio.	129
3.3.1 Especies productoras de ácido domoico	129
3.3.2 Especies productoras de toxinas paralizantes	131
3.3.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas	133
3.3.3.1 <i>Dinophysis acuminata</i>	133



3.3.3.2	<i>Protoceratium reticulatum</i>	135
3.3.3.3	<i>Gonyaulax cf. spinifera</i>	136
3.4	Resultados de la identificación del fitoplancton que genera cambios en las características organolépticas y coloración gonadal de <i>Argopecten purpuratus</i>.	137
3.4.1	Evaluación sensorial para determinar la distribución anatómica del sabor amargo en <i>Argopecten purpuratus</i>	137
3.4.2	Progreso en la purificación e identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos	138
3.4.2.1	Caracterización preliminar	138
3.4.2.2	Purificación con Sephadex LH-20	139
3.4.2.2.1	Primera purificación	139
3.4.2.2.2	Segunda purificación	141
3.4.2.2.3	Tercera purificación	142
3.4.2.3	Purificación utilizando extracción en fase sólida	143
3.4.2.4	Purificación con resinas de adsorción	144
3.4.2.5	Nueva purificación con Sephadex LH20	145
3.4.2.6	Purificación con resina de adsorción DIAION HP20SS	146
3.4.2.7	Perfil obtenido por espectrometría de masas	147
3.5	Resultados de la identificación de quistes obtenidos de las bahías incorporadas en el estudio.	149
3.6	Resultados del monitoreo de variables oceanográficas y meteorológicas de las principales bahías en las que se desarrollara el estudio.	155
3.6.1	Temperatura del mar	155
3.6.2	Variables meteorológicas	157
3.7	Información geográfica sobre la distribución espacio temporal de las principales especies causantes de floraciones algales nocivas identificadas en cada una de las bahías contempladas en el estudio.	166
3.7.1	Fitoplancton Bahía Inglesa	166
3.7.1.1	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	167
3.7.1.2	<i>Pseudo-nitzschia calliantha (P. pseudodelicatissima)</i>	168
3.7.1.3	<i>Dinophysis acuminata</i>	169
3.7.1.4	<i>Rhizosolenia imbricata</i>	170
3.7.1.5	<i>Guinardia striata</i>	171
3.7.2	Fitoplancton Bahía Guanaqueros	173
3.7.2.1	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	173
3.7.2.2	<i>Pseudo-nitzschia calliantha (P. pseudodelicatissima)</i>	174
3.7.2.3	<i>Dinophysis acuminata</i>	175
3.7.2.4	<i>Rhizosolenia imbricata</i>	176
3.7.2.5	<i>Guinardia striata</i>	176
3.7.3	Fitoplancton Bahía Tongoy	177
3.7.3.1	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	178
3.7.3.2	<i>Pseudo-nitzschia calliantha (P. pseudodelicatissima)</i>	179
3.7.3.3	<i>Dinophysis acuminata</i>	179
3.7.3.4	<i>Rhizosolenia imbricata</i>	180
3.7.3.5	<i>Guinardia striata</i>	181
3.8	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (abundancia y frecuencia) en relación a variables ambientales (temperatura superficial del mar, índice de surgencia e índice de turbulencia).	181
3.8.1	Bahía Inglesa	181



3.8.1.1	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación a la temperatura superficial del mar (TSM), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.	181
3.8.1.2	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.	183
3.8.1.3	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.	184
3.8.2	Bahía Guanaqueros	185
3.8.2.1	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros	185
3.8.2.2	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros	186
3.8.2.3	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros.	187
3.8.3	Bahía Tongoy	188
3.8.3.1	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación a la temperatura superficial del mar (TSM), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.	188
3.8.3.2	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.	189
3.8.3.3	Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.	190
3.9	<i>Determinación de los géneros o especies fitoplanctónicas que pueden ser considerados como plagas hidrobiológicas.</i>	191
3.9.1	Especies productoras de ácido domoico	191
3.9.2	Especies productoras de toxinas paralizantes	191
3.9.3	Especies productoras de toxinas lipofílicas	192
3.9.3.1	Especies productoras de toxinas diarreogénicas	192
3.9.3.2	Especies productoras de toxinas no diarreogénicas	193
3.10	<i>Impactos económicos generados por la aparición de floraciones algales nocivas en la industria pectinicultura en el norte de Chile.</i>	196
4.	Discusión	198
4.1	<i>Toxinas amnésicas en el norte de Chile</i>	198
4.2	<i>Toxinas paralizantes en el norte de Chile</i>	205
4.3	<i>Toxinas lipofílicas</i>	210
4.4	<i>Rhizosolenia imbricata: distribución, taxonomía y relación con los episodios nocivos en el norte de Chile</i>	217
4.5	<i>Distribución anatómica del sabor amargo en Argopecten purpuratus</i>	219
4.6	<i>Identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos</i>	220



5. Conclusiones	222
6. Referencias	224



INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura de transmisión de las toxinas fitoplanctónicas a través de la trama alimenticia mediante diferentes organismos transvectores. (Fuente: adaptado de Ulrike, 2002) 23
- Figura 2. Estructura química del ácido okadaico (AO), dinofisistoxinas 1 (DTX1), dinofisistoxinas 2 (DTX2) y derivados acilados "DTX3" (Fuente: adaptado de EFSA, 2008b). 25
- Figura 3. Estructura química de los azaspirácidos (1-5) (Fuente: adaptado de EFSA, 2008a). 28
- Figura 4. Estructura química de las pectenotoxinas (PTX) y sus ácidos secoicos (PTXsa) (Fuente: adaptado de Blanco *et al.*, 2005) 31
- Figura 5. Estructura química de algunas de la yesotoxina y algunos de sus análogos (YTX) (Fuente: adaptado de Blanco *et al.*, 2005). 33
- Figura 6. Estructura química de los principales espirólidos (Fuente: adaptado de Touzet *et al.*, 2008). 36
- Figura 7. Estructura química de las principales toxinas asociadas con la intoxicación paralizante por moluscos (Fuente: adaptado de Vale *et al.*, 2009). 38
- Figura 8. Distribución de episodios tóxicos por toxinas paralizantes en las costas del Océano Pacífico en el continente Americano (●) y Bahías en las que se detectó la presencia de toxinas paralizantes durante el desarrollo de esta investigación (→) (Fuente: adaptado de Álvarez, 2009). 40
- Figura 9. Estructura química del ácido kainico y compuestos relacionados con el ácido domoico (Fuente: adaptado de Clayden *et al.*, 2005). 42
- Figura 10. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Inglesa (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●). (Fuente: elaboración propia). 62
- Figura 11. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Guanaqueros (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●). (Fuente: elaboración propia). 63
- Figura 12. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Tongoy (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●) (Fuente: elaboración propia). 64
- Figura 13. Principales órganos y tejidos en *Argopecten purpuratus*. (Fuente: elaboración propia) 68
- Figura 14. Proceso de extracción del compuesto amargo desde las gónadas liofilizadas de *Argopecten purpuratus*. (Fuente: elaboración propia). 72
- Figura 15. Purificación del compuesto amargo extraído de gónadas de *Argopecten purpuratus*, utilizando cromatografía SEC con fase estacionaria Sephadex LH-20. (A) carga del extracto (B) primera purificación (C) segunda purificación. (Desarrollado en las instalaciones del Instituto de Bio-Orgánica de la Universidad de La Laguna). (Fuente: elaboración propia). 74



-
- Figura 16. Purificación del compuesto amargo utilizando cromatografía SEC con fase estacionaria Sephadex LH-20 en columna cerrada. (Fuente: elaboración propia). 75
- Figura 17. Resumen de las diferentes técnicas utilizadas durante el desarrollo de experimentos que permitieron purificar el compuesto amargo que da sabor a los bivalvos. (Fuente: elaboración propia). 78
- Figura 18. Extractos amargos semi-purificados de gónadas de *Argopecten purpuratus* (izquierda). Espectrómetro Bruker AMX 500 (derecha) perteneciente al Instituto de Bio-orgánica de la Universidad de La Laguna, Tenerife. (Fuente: Elaboración propia). 79
- Figura 19. Ubicación de estaciones de muestreo de sedimento en Bahía Mejillones. (Fuente: elaboración propia). 81
- Figura 20. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 87
- Figura 21. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 90
- Figura 22. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 92
- Figura 23. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 94
- Figura 24. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 9 de febrero de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de PTX2 (A) transición 876/823 (B) transición 876/805 y PTX2sa (C) transición 875/179 y (D) transición 875/137. (Fuente: elaboración propia). 95
- Figura 25. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 98
- Figura 26. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 100
- Figura 27. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 103
- Figura 28. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 105



-
- Figura 29. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 107
- Figura 30. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 109
- Figura 31. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 111
- Figura 32. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia). 113
- Figura 33. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 27 de julio de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de YTX (A) ion molecular 1141 m/z (B) transición 570/467 y (C) transición 570/396 (Fuente: elaboración propia). 114
- Figura 34. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 28 de mayo de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de AZA2 (A) ion molecular 856 m/z (B) transición 856/672. (Fuente: elaboración propia). 115
- Figura 35. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia australis* (PA4). Escala: A (3 μm); B (20 μm). (Fuente: elaboración propia). 118
- Figura 36. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (PSF2). Escala: A (20 μm); B (5 μm). (Fuente: elaboración propia). 118
- Figura 37. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia calliantha* (PCA2). Escala: (1 μm). (Fuente: elaboración propia). 119
- Figura 38. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (en muestras de fitoplancton). Escala: A (30 μm), B (20 μm). (Fuente: elaboración propia). 120
- Figura 39. (A) Célula de *Alexandrium* sp, presente en las muestras de fitoplancton obtenidas de Bahía Mejillones. (B) Vista de la placa 1', que se encuentra unida directamente a la placa del poro (Po). (C) Vista de las placas 1' y Sulcal (Sa). Escala: 10 μm . (Fuente: elaboración propia). 121
- Figura 40. (A) Célula individual de *Alexandrium* sp. (B) Cadena de células de *Alexandrium* sp. presente en las muestras de fitoplancton de Bahía Guanaqueros. Escala: 10 μm (Fuente: elaboración propia). 122
- Figura 41. Célula individual de *Dinophysis acuminata*. (Fuente: elaboración propia). 123
- Figura 42. Células de *Protoceratium reticulatum* obtenidas en muestras de fitoplancton de Bahía Mejillones. (A) Vista dorsal (escala: 5 μm). (B) Vista ventral y antapical (escala: 10 μm). (Fuente: elaboración propia). 124
-



- Figura 43. (A) *Gonyaulax spinifera*. (B) *Gonyaulax monacantha* Pavillard (Fuente: elaboración propia). 125
- Figura 44. Posible *Azadinium sp.*, registrado en Bahía Guanaqueros el 21 de julio de 2009, con una longitud de 8,35 μm y ancho 5,45 μm . (Fuente: elaboración propia). 126
- Figura 45. (A) Muestra obtenida durante la floración de *Rhizosolenia imbricata* (B) Cromatóforos (C) Bandas transversales en las pleuras del frústulo (D) Proceso con forma de espina insertada en una pequeña otaria. Escala: (A) 100 μm , (B) 20 μm , (C) 50 μm y (D) 10 μm . (Fuente: Elaboración propia). 127
- Figura 46. Célula individual de *Guinardia striata*. (Fuente: elaboración propia). 128
- Figura 47. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente al ácido domoico presente en los cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* (PA4) aislados de Bahía Inglesa (Fuente: elaboración propia). 130
- Figura 48. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente al ácido domoico presente en los cultivos de *Pseudo-nitzschia calliantha* (PCA2) aislados de Bahía Tongoy (Fuente: elaboración propia). 130
- Figura 49. Toxinas paralizantes en *Semimytilus algosus* y *Argopecten purpuratus* extraídos durante una floración de *Alexandrium tamarense* en Bahía Mejillones. (A) Patrón del grupo de STX. (B) Extracto de *Semimytilus algosus*. (C) Extracto de *Argopecten purpuratus*. (D) Patrón del grupo de GTX. (E) Extracto de *S. algosus* con GTX2 y GTX3. (F) Extracto de *A. purpuratus* con GTX2, GTX3 y dcGTX2. (G) Patrón del grupo C. (H) Extracto de *S. algosus* con trazas de C2. (I) Extracto de *A. purpuratus* con trazas de C2. (Fuente: elaboración propia). 132
- Figura 50. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente a la PTX2 presente en las células aisladas de *Dinophysis acuminata* aisladas de Bahía Tongoy (Fuente: elaboración propia). 133
- Figura 51. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente a una muestra concentrada de fitoplancton extraída desde Bahía Tongoy en la que se detectó un compuesto de masa similar a la PTX1 o la PTX11 (897 m/z) (Fuente: elaboración propia). 134
- Figura 52. Cromatograma y espectros de fragmentación (MS^2 y MS^3) correspondiente a la YTX presente en muestras de fitoplancton obtenidas en Bahía Mejillones (Fuente: elaboración propia). 135
- Figura 53. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra de plancton concentrada durante una floración de *Gonyaulax cf spinifera*, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de YTX (A) ion molecular 1141 m/z (B) transición 570/467 y (C) transición 570/396 (Fuente: elaboración propia). 136
- Figura 54. (A) Purificación del extracto amargo utilizando Sephadex LH-20 y posición de la banda que corresponde al grupo A1. (B) Perfil TLC correspondiente al grupo A1 (fracciones 4-9). (Fuente: elaboración propia). 140
- Figura 55. (A) Purificación del grupo A1 utilizando Sephadex LH-20 y posición de la banda que corresponde al grupo A1C. (B) Perfil TLC correspondiente a los tres grupos amargos A1C, A1D y A1E. (Fuente: elaboración propia). 141



-
- Figura 56. (A) Purificación del grupo A1C utilizando Sephadex LH-20 y la banda que corresponde al grupo F4. (B) Perfil TLC correspondiente a todas las fracciones obtenidas, destacando la fracción 17 incluida en el grupo F4. (Fuente: elaboración propia). 142
- Figura 57. Perfil TLC correspondiente a todas las fracciones obtenidas durante la purificación con SPE aminopropil. Las bandas 1 y 2 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia). 143
- Figura 58. Perfil TLC de las fracciones obtenidas de la purificación realizada con DIAION HP20. Las bandas 11 y 12 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia). 144
- Figura 59. Perfil TLC de las fracciones obtenidas de la cuarta purificación realizada con Sephadex LH20. (Fuente: elaboración propia). 145
- Figura 60. Perfil TLC de las fracciones obtenidas del último proceso de purificación utilizando DIAION HP20SS. Las bandas 16, 17 y 18 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia). 146
- Figura 61. Espectro de fragmentación de las fracciones amargas. (A) Fracción 17 y (B) fracción 18. (Fuente: elaboración propia). 147
- Figura 62. Distribución isotópica de obtenida mediante ZoomScan. (Fuente: elaboración propia). 148
- Figura 63. Quistes morfológicamente similares a *Trinovantedinium* que corresponderían a dinoflagelados del género *Protoberidinium*. (Fuente: elaboración propia). 150
- Figura 64. Quistes morfológicamente similares a *Spiniferites* que corresponderían a dinoflagelados del género *Gonyaulax*. (Fuente: elaboración propia). 150
- Figura 65. Quistes morfológicamente similares a *Operculodinium centrocarpum* que corresponderían al dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*. (Fuente: elaboración propia). 151
- Figura 66. Quiste morfológicamente similar a *Scripsiella* que correspondería al dinoflagelado *Scripsiella trochoidea*. (Fuente: elaboración propia). 152
- Figura 67. Quiste morfológicamente similar a *Brigantodinium* que correspondería a dinoflagelados del género *Protoberidinium*. (Fuente: elaboración propia). 152
- Figura 68. Quistes morfológicamente similares a *Brigantodinium* que corresponderían al dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*. (Fuente: elaboración propia). 153
- Figura 69. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Alexandrium*. (Fuente: elaboración propia). 153
- Figura 70. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Polykrikos* (Fuente: elaboración propia). 154
- Figura 71. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Pyrodinium* (Fuente: elaboración propia). 154



Figura 72. Variación de la temperatura (°C) del mar en profundidad y tiempo de las bahías Inglesa y Tongoy. (Fuente: elaboración propia).	156
Figura 73. Rosa de los viento registrado en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).	157
Figura 74. Serie de tiempo del viento registrado en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).	158
Figura 75. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).	159
Figura 76. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).	159
Figura 77. Rosa de los vientos registrado en Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).	160
Figura 78. Serie de tiempo del viento registrado en Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).	161
Figura 79. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).	161
Figura 80. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).	162
Figura 81. Series de tiempo de presión atmosférica, radiación incidente acumulada, temperatura del aire y humedad relativa en la estación meteorológica de Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).	164
Figura 82. Series de tiempo de presión atmosférica, radiación incidente acumulada, temperatura del aire y humedad relativa en la estación meteorológica de Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).	165
Figura 83. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).	166
Figura 84. Distribución espacio temporal de <i>Pseudonitzschia australis</i> en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).	168
Figura 85. Distribución espacio temporal de <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> (<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>) en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).	169
Figura 86. Distribución espacio temporal de <i>Dinophysis acuminata</i> en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Fuente: elaboración propia).	170
Figura 87. Distribución espacio temporal de <i>Rhizosolenia imbricata</i> en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Fuente: elaboración propia).	171
Figura 88. Cambio de coloración de la gónada femenina de <i>Argopecten purpuratus</i> durante una floración de la diatomea <i>Guinardia striata</i> . (Fuente: elaboración propia)	172



-
- Figura 89. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Elaboración propia). 172
- Figura 90. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 173
- Figura 91. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia australis* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 174
- Figura 92. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*) en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 175
- Figura 93. Distribución espacio temporal de *Dinophysis acuminata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 175
- Figura 94. Distribución espacio temporal de *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 176
- Figura 95. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 177
- Figura 96. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 177
- Figura 97. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia australis* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 178
- Figura 98. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*) en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 179
- Figura 99. Distribución espacio temporal de *Dinophysis acuminata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 180
- Figura 100. Distribución espacio temporal de *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Elaboración propia). 180
- Figura 101. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia). 181
- Figura 102. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia). 182
- Figura 103. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia). 183
- Figura 104. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia). 184



Figura 105. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia). 185

Figura 106. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia). 186

Figura 107. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia). 187

Figura 108. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia). 188

Figura 109. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia). 189

Figura 110. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia). 190



INDICE DE TABLAS

Tabla I. Principales toxinas producidas por algas fitoplanctónicas, límites regulatorios y sus efectos principales en el hombre.	24
Tabla II. Límite de detección para toxinas paralizantes analizadas cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa con detección fluorimétrica y oxidación post-columna (HPLC-FD).	55
Tabla III. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Inglesa.	61
Tabla IV. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Guanaqueros.	62
Tabla V. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Tongoy.	63
Tabla VI. Índice de abundancia relativa del fitoplancton analizado en muestras cualitativas.	65
Tabla VII. Clasificación numérica para la intensidad del amargo en tejidos de <i>Argopecten purpuratus</i> .	69
Tabla VIII. Clasificación numérica para determinar la intensidad del sabor amargo en extractos obtenidos de gónadas de <i>Argopecten purpuratus</i> .	70
Tabla IX. Escala simbólica para describir el grado de coloración de los extractos obtenidos de gónadas de <i>Argopecten purpuratus</i> .	70
Tabla X. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. <LOD: menor al límite de detección.	88
Tabla XI. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. ND: no detectado.	93
Tabla XII. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. ND: no detectado; > LOD: Mayor al límite de detección.	96
Tabla XIII. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 y diciembre de 2009. <LOD: menor al límite de detección.	99
Tabla XIV. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 a noviembre de 2009. ND: no detectado.	104
Tabla XV. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 y noviembre de 2010. ND: no detectado; >LOD: mayor al límite de detección.	106



Tabla XVI. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 y diciembre de 2009. <LOD: menor al límite de detección	108
Tabla XVII. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 a diciembre de 2009. ND: no detectado.	112
Tabla XVIII. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 y diciembre de 2010. ND: no detectado; > LOD: mayor al límite de detección.	116
Tabla XIX. Concentración de ácido domoico en los cultivos de <i>Pseudo-nitzschia</i> obtenidas en las bahías del Norte de Chile. < LOD: Menor al límite de detección (< 0,5 ng mL ⁻¹).	131
Tabla XX. Evaluación sensorial de los diferentes tejidos de <i>Argopecten purpuratus</i> obtenidos durante la primera floración de <i>Rhizosolenia imbricata</i> detectada en Bahía Inglesa durante el verano de 2008 (n=50).	137
Tabla XXI. Evaluación sensorial de cada fracción obtenida durante la extracción del compuesto amargo en gónadas de <i>A. purpuratus</i> .	139
Tabla XXII. Evaluación sensorial de cada fracción obtenida durante la primera purificación del compuesto amargo en gónadas de <i>A. purpuratus</i> . Fracciones del grupo A1: 4 – 9 y grupo A2: 12 – 14.	140
Tabla XXIII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la segunda purificación con Sephadex LH-20.	141
Tabla XXIV. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la tercera purificación con Sephadex LH-20.	142
Tabla XXV. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con extracción en fase sólida en cartucho aminopropil (NH ₂).	143
Tabla XXVI. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con DIAION HP20.	144
Tabla XXVII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con Sephadex LH20	145
Tabla XXVIII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con DIAION HP20SS.	146
Tabla XXIX. Valores mínimos y máximos de la temperatura a las distintas profundidades en las bahías Inglesa y Tongoy.	156
Tabla XXX. Principales toxinas marinas y especies fitoplanctónicas detectadas en la zona norte de Chile	195
Tabla XXXI. Exportación de Ostiones (US\$) entre los años 2007 y 2009.	196





A. Objetivo general

Identificar y evaluar el impacto de plagas de microalgas nocivas sobre la actividad de pectinicultura que se realiza, en la zona norte de Chile.

B. Objetivos específicos

Medir las variaciones cuantitativas temporales de los venenos paralizante, amnésico y diarreico (biotoxinas lipofílicas) de los mariscos en especies transvectoras selectas, en una malla de estaciones que cubran las principales bahías en las que se desarrolla la pectinicultura en las Regiones de Antofagasta, Atacama y Coquimbo.

Identificar las especies fitoplanctónica productoras de Floraciones Algales Nocivas (FAN) de habitual ocurrencia en las aguas marinas del norte de Chile, que afectan negativamente el cultivo de *Argopecten purpuratus* por acumulación de biotoxinas, alteración de características organolépticas y cambios anatómicos en esta especie de pectínido.

Determinar los géneros o especies fitoplanctónicas que pueden ser considerados como plagas para aislar su presencia, evitar su propagación y propender su erradicación.

Levantar y analizar información sobre variables oceanográficas y meteorológicas asociadas a los eventos FANs, en el litoral de la II, III y IV Región.

Evaluar el impacto de los eventos tóxicos y nocivos, en las actividades productivas y económicas de la pectinicultura, en las regiones de Antofagasta, Atacama y Coquimbo.



1. Antecedentes

1.1 Principales problemas asociados a la presencia de eventos tóxicos y nocivos detectados durante el desarrollo del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en el norte de Chile.

En nuestro país, durante los últimos años el desarrollo del cultivo de ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) ha demostrado un notable crecimiento en sus exportaciones, posicionando a Chile como el tercer productor de ostiones a nivel mundial. Durante el año 2007, se exportaron cerca de 2.150 toneladas de ostión con un retorno cercano a los 20 millones de dólares, siendo Francia, el principal destino de exportación (Servicio Nacional de Pesca, 2007).

Desde 1989, el Servicio Nacional de Pesca ha desarrollado el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB), implementado para cumplir con las exigencias establecidas por la Agencia de Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) y la Comunidad Europea para permitir la exportación de moluscos.

El Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos, consiste básicamente en la clasificación y monitoreo de las zonas de producción de los moluscos y otros recursos susceptibles a ser afectados por toxinas. Durante su desarrollo, en el norte de Chile se han producido cierres cautelares por la detección de toxinas diarreicas por bioensayo en ratones y la presencia del dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, provocando durante los años 2005-2007, numerosos cierres que prohibieron la cosecha del ostión en las principales bahías en las que se desarrolla esta actividad (Servicio Nacional de Pesca, 2009).

Investigaciones realizadas por Blanco *et al.* (2007), determinaron el perfil de toxinas de este dinoflagelado y de diversos moluscos extraídos durante su presencia en la columna de agua, evidenciando solamente la presencia



pectenotoxinas y la ausencia de ácido okadaico, dinofisistoxinas o sus derivados. Los resultados obtenidos, permitieron la reanudación de la cosecha y evitaron los cierres cautelares que se decretaban solo por la presencia de *D. acuminata*. Este trabajo, puede ser considerado como la primera aproximación de la presencia de toxinas lipofílicas en el norte de Chile, poniendo de manifiesto la necesidad verificar la presencia de otro tipo de toxinas lipofílicas en la macro zona norte de nuestro país y por consiguiente la identificación de los agentes fitoplanctónicos causales.

En este mismo contexto, durante el desarrollo del PSMB, se ha detectado la presencia de la toxina amnésica (ácido domoico). Esta toxina, ha afectado principalmente al desarrollo de las actividades productivas del cultivo de ostión, provocando cierres cautelares principalmente en las Regiones de Atacama y de Coquimbo (Servicio Nacional de Pesca, 2009).

Actualmente, todos estos eventos, han sido asociados a la presencia de la diatomea planctónica *Pseudo-nitzschia australis* (Suárez-Isla *et al.*, 2002). Sin embargo, se desconoce si esta diatomea es la única especie productora de este tipo de toxinas en el norte de Chile, fundamentalmente, por la mayoría de las especies productoras son cosmopolitas (Hasle, 2002).

Por otra parte, las toxinas paralizantes son las menos frecuentes en la zona, presentándose episodios esporádicos de carácter sub-tóxico en ostiones de cultivo y el gasterópodo *Concholepas concholepas*, en los cuales no ha podido ser identificado el agente causal de las toxinas.

Adicionalmente a los problemas generados por la acumulación de toxinas en los bivalvos. En esta amplia zona geográfica se han registrado episodios nocivos producidos por la diatomea *Rhizosolenia imbricata*, durante los cuales, el ostión



del norte adquiere un fuerte sabor amargo, especialmente en los tejidos gonadales, que los hace inviables para el consumo.

Este panorama, sugiere el desarrollo de investigaciones que permitan determinar cuáles son las principales toxinas presentes en el norte de Chile, cuáles son las especies fitoplanctónicas capaces de producir floraciones algales tóxicas o nocivas y determinar cuál es el compuesto químico que da sabor amargo a los bivalvos.

Los resultados obtenidos en estas investigaciones permitirán fortalecer los programas de vigilancia desarrollados por el Ministerio de Salud del Gobierno de Chile y el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos con el propósito de proteger la salud de la población y optimizar la explotación de los recursos haciendo más ágil la toma de decisiones para decretar la apertura y cierre de extracción de los moluscos afectados por toxinas.



1.2 Principales toxinas producidas por algas fitoplanctónicas.

Las toxinas producidas por algas fitoplanctónicas, son un amplio grupo de compuestos que poseen estructuras moleculares, mecanismos de acción y actividad biológica muy diversa. Entre estos, existen una serie de compuestos que poseen actividad hemolítica causando importantes mortalidades de larvas, juveniles y adultos de peces y diversos invertebrados marinos. Estas toxinas son producidas por diferentes clases del fitoplancton, entre las que destacan, las Rafidofíceas *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica*, *Haramonas dimorpha* (Hallegraeff y Hara, 2003), especies del género *Chatonella* (Hallegraeff y Hara, 2003), las Primnesiofíceas del género *Chrysocromulina*, *Primnesium*, *Phaeocystis* (Moestrup y Thomsen, 2003) y los dinoflagelados *Karlodinium veneficum* (Deeds *et al.*, 2002), *Takayama cladochroma* (Steidinger *et al.*, 1998), *Amphidinium carterae*, *Amphidinium operculatum* (Yasumoto *et al.*, 1987) y algunas especies del género *Karenia* entre las que destaca *Karenia brevis* (Gentien y Arzul, 1990).

Sin embargo, el grupo de toxinas más importante es el que puede ser transferido a través de la trama alimenticia a organismos superiores como aves, mamíferos marinos y el hombre (Fig.1). Estas, han sido clasificadas en relación a la sintomatología que producen durante la intoxicación. De acuerdo a esta clasificación, existen 6 tipos de síndromes:

- Intoxicación Paralizante por Moluscos (Veneno Paralizante de los Mariscos)
- Intoxicación Amnésica por Moluscos (Veneno Amnésico de los Mariscos)
- Intoxicación Diarreogénica por Moluscos (Veneno Diarreico de los Mariscos)
- Intoxicación Neurotóxica por Moluscos
- Intoxicación por Azapirácidos
- Intoxicación Ciguatérica

Esta última se diferencia de los anteriores principalmente por que los organismos transvectores de las toxinas son peces y no moluscos (Cruz-Rivera y Villareal, 2006).

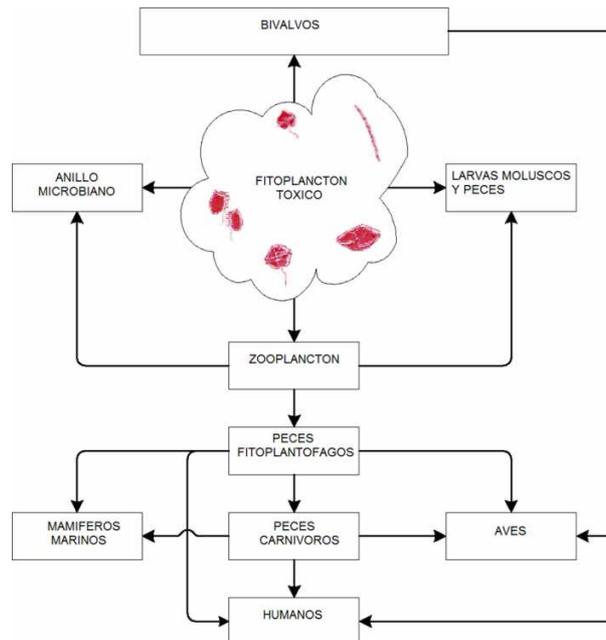


Figura 1. Estructura de transmisión de las toxinas fitoplanctónicas a través de la trama alimenticia mediante diferentes organismos transvectores. (Fuente: adaptado de Ulrike, 2002)

Las toxinas productoras de estos síndromes, son frecuentemente denominadas con el nombre del síndrome que causan, existiendo, por tanto, toxinas paralizantes, amnésicas, diarreicas y neurotóxicas. También pueden ser clasificadas por sus propiedades de solubilidad en: toxinas hidrofílicas (paralizantes y amnésicas) y lipofílicas (diarreicas, neurotóxicas, azaspirácidos, espirólidos, ciguatoxinas y palitoxinas) (Paz, 2007) o de acuerdo a de acuerdo a su estructura química en: azaspirácidos, brevetoxinas, iminas cíclicas, pectenotoxinas, yesotoxinas, ácido okadaico y sus análogos, ácido domoico y sus análogos y saxitoxina y sus análogos (Toyofuku, 2006).



Tabla I. Principales toxinas producidas por algas fitoplanctónicas, límites regulatorios y sus efectos principales en el hombre.

Grupo de Toxinas	Límite regulatorio	Efectos en el Hombre	Síndrome asociado
Acido okadaico y análogos	160 μg AO eq kg^{-1}	Nauseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal. En algunos casos dolor de cabeza y escalofríos.	Intoxicación diarreogénica
Azaspirácidos	160 μg AZA eq kg^{-1}	Nauseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal.	Intoxicación diarreogénica
Pectenotoxinas	160 μg AO eq kg^{-1}	No producen diarreas. Son hepatóxicas para el ratón.	
Yesotoxinas	1 mg YTX eq kg^{-1}	No producen diarreas. Son Cardiotóxicas para el ratón.	
Brevetoxinas	Sin regulación	Sin información	
Espirólidos	Sin regulación	Sin información	
Gymnodiminas	Sin regulación	Sin información	
Saxitoxina y análogos	800 μg STX eq kg^{-1}	Síntomas Leves: sensación de hormigueo o entumecimiento alrededor de los, cara y cuello. Sensación punzante en la punta de los dedos, dolor de cabeza, mareos y náuseas. Síntomas Graves: escozor en las extremidades, la rigidez y la falta de coordinación de las extremidades, debilidad general, dificultad respiratoria leve y aumento del pulso cardíaco. Síntomas Muy Graves: parálisis muscular, dificultad respiratoria pronunciada, sensación de asfixia y la muerte.	Intoxicación paralizante
Acido domoico	20 mg AD kg^{-1}	Vómitos, diarreas y dolor abdominal. Confusión, pérdida de la memoria y muerte principalmente en personas de la tercera edad.	Intoxicación amnésica

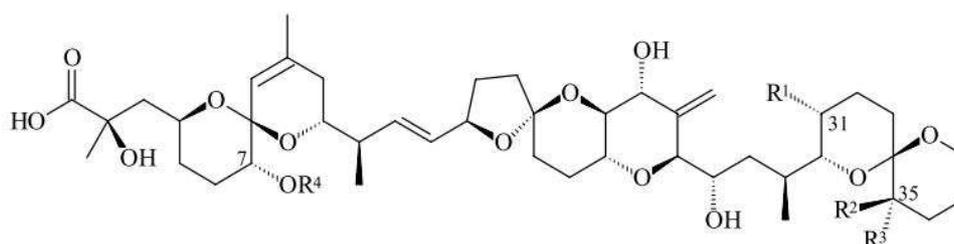
Fuente: EFSA (2009c)

1.3 Toxinas Lipofílicas

1.3.1 Toxinas diarreogénicas

1.3.1.1 Ácido okadaico y derivados

La intoxicación diarreogénica por moluscos es un síndrome causado por el consumo de moluscos contaminados con ácido okadaico (AO), dinofisistoxinas (DTX1, DTX2), los diol-ésteres (del OA y las DTX) y sus derivados acilados “DTX3” (Fig.2). Las toxinas principales de este grupo, son compuestos polietéreos constituidas por una cadena carbonada lineal con un grupo carboxílico libre y que difieren entre sí por la presencia de grupos metilos en los carbonos C31 y C35 (Fernández, 2007).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
AO	CH ₃	H	H	H
DTX1	CH ₃	CH ₃	H	H
DTX2	H	H	CH ₃	H
DTX3 (formas aciladas de AO, DTX1 y DTX2)	H/CH ₃	H/CH ₃	H/CH ₃	Ácidos grasos

Figura 2. Estructura química del ácido okadaico (AO), dinofisistoxinas 1 (DTX1), dinofisistoxinas 2 (DTX2) y derivados acilados “DTX3” (Fuente: adaptado de EFSA, 2008b).

El primer episodio descrito de este tipo de intoxicación ocurrió en 1961 en Holanda (Korringa y Roskam, 1961), evento en el cuál no pudo ser identificado el microorganismo productor de las toxinas encontradas en los bivalvos. En este país, este tipo de intoxicación se repitió posteriormente durante los años 1970 y



1976, siendo atribuida erróneamente al dinoflagelado *Prorocentrum micans* (Kat, 1979). Durante este mismo periodo de tiempo, Guzmán y Campodónico (1975), describieron las primeras intoxicaciones diarreogénicas en los fiordos australes de nuestro país ocurridas en los años 1970 y 1971 por el consumo de cholgas (*Aulacomya ater*), relacionándolas con la presencia de un dinoflagelado del género *Dinophysis*, resultados que fueron muy criticados por la comunidad científica internacional. Posteriormente, fueron detectadas en Japón entre los años 1976 y 1977 (Yasumoto *et al.*, 1979).

En el año 1980, Yasumoto *et al.* (1980) identificaron a *Dinophysis fortii* como el primer organismo fitoplanctónico productor de este tipo de compuestos. Posteriormente, diferentes especies del género *Dinophysis* y *Prorocentrum* han sido identificadas como productoras de estas toxinas. Entre estas destacan *Prorocentrum lima*, *P. maculosum*, *P. hoffmanianum*, *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. norvergica* (Murakami *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1985; Yasumoto *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1989; Blanco *et al.*, 2005).

Actualmente, AO, DTX1, DTX2 y los acil-ésteres, son consideradas como las toxinas más relevantes con capacidad de producir intoxicaciones diarreogénicas (Yasumoto *et al.*, 1980; Murata *et al.*, 1982; Hu *et al.*, 1995b). Estas toxinas, actúan sobre sus receptores farmacológicos, las fosfatasa PP1 y PP2A (Bialojan y Takai, 1988), produciendo la inflamación del tracto intestinal, diarreas y el efecto promotor de tumores (Hamano *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1990). El límite regulatorio establecido para este tipo de toxicidad corresponde a 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de equivalentes de AO (EFSA, 2009c).

Tras el informe de Guzmán en año 1979, se registró una nueva intoxicación, que fue asociada nuevamente a dinoflagelados del género *Dinophysis* (Lembeye y Campodónico, 1984) y en el año 1991, se registró un nuevo episodio en el cual



120 personas se intoxicaron por el consumo de “choritos” (*Mytilus chilensis*) (Villarroel y Muñoz, 1991). Durante este episodio Lembeye *et al.* (2003), confirmaron que el agente responsable fue el dinoflagelado *Dinophysis acuta* y que su perfil toxicológico estuvo dominado por AO y DTX1.

En Chile, se ha identificado a *Dinophysis acuta* como la principal especie responsable en las regiones australes (Muñoz *et al.*, 1992; Lembeye, 1994). Sin embargo, en 1991, se identificó la presencia *Dinophysis acuminata* y la detección de AO y DTX1 en muestras de bivalvos frescos y choritos enlatados (Aune y Yndestad, 1993). Diez años más tarde, Uribe *et al.* (2001) detectaron la presencia de este tipo de toxinas en choritos extraídos en la Región de Magallanes durante una floración del dinoflagelado *Dinophysis acuminata*. Estudios posteriores, demostraron que las principales toxinas presentes en moluscos extraídos desde el sur de Chile son la DTX1 y los derivados acilados “DTX3” y el AO (Zhao *et al.*, 1993; García *et al.*, 2006).

1.3.1.2 Azaspirácidos

La intoxicación por azaspirácidos en moluscos, se descubrió en el año 1995 durante una intoxicación ocurrida en los Países Bajos, en la cual al menos 8 personas consumieron mejillones (*Mytilus edulis*) provenientes de Killary Harbour, Irlanda (McMahon y Silke, 1996). Las personas intoxicadas, evidenciaron síntomas similares a los producidos por el AO y las DTXs. Sin embargo, los análisis registraron que los niveles de estas toxinas se encontraban por debajo del límite regulatorio (Twiner *et al.*, 2008). Posteriormente, se comprobó que la intoxicación fue provocada por solo un tipo de compuesto tóxico preliminarmente denominado “Killary toxina” o KT-3 (Satake *et al.*, 1998). Actualmente, estos compuestos son conocidos como azaspirácidos.

Los azaspirácidos (AZAs) (Fig.3), son un grupo de toxinas que comprende al menos 21 análogos (Satake et al., 1998; Ofuji *et al.*, 1999; James *et al.*, 2003b; Rehmann *et al.*, 2008). Estos compuestos, se caracterizan por tener una amina cíclica (Grupo aza), un anillo de unión azaspiro y un ácido carboxílico (Satake et al., 1998). Entre los azaspirácidos, se ha comprobado que el AZA-1 es el más tóxico y el principal responsable de las intoxicaciones (Ito *et al.*, 2006), seguido por los AZA-2 y AZA-3 (Ito *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2000).

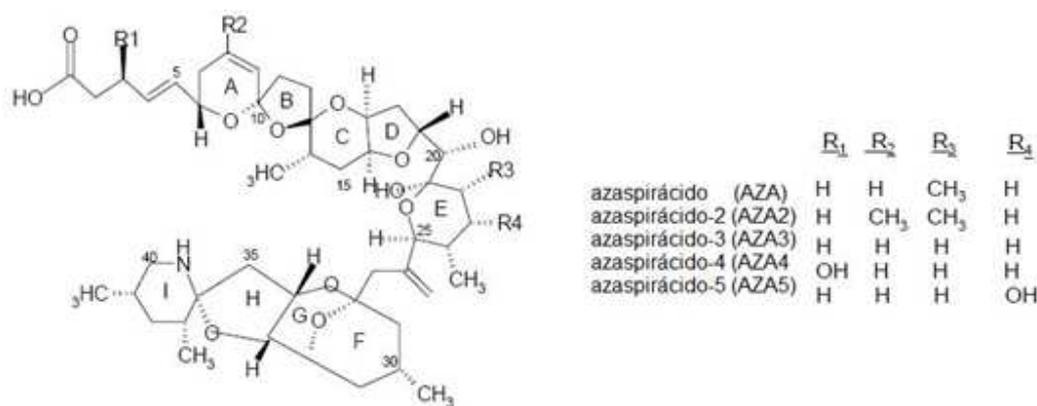


Figura 3. Estructura química de los azaspirácidos (1-5) (Fuente: adaptado de EFSA, 2008a).

El mecanismo de acción de los azaspirácidos no está del todo elucidado. Inicialmente, se creía que este tendría los mismos mecanismos de acción que el ácido okadaico, inhibiendo las fosfatasa (PP1 y PP2A) (Flanagan *et al.*, 1999). Sin embargo, estudios de inhibición de fosfatasa realizados con extractos de mejillones con azaspirácidos (Flanagan *et al.*, 2001) y con AZA-1 purificado (Twiner *et al.*, 2005), no produjeron la inhibición de estas enzimas. Actualmente, se están desarrollando numerosas investigaciones para comprender sus mecanismos de acción (Twiner et al., 2008). En humanos, los síntomas de la intoxicación incluyen náuseas, vómitos, diarrea y fuertes dolores abdominales



(McMahon y Silke, 1996). El límite regulatorio establecido para este tipo de toxicidad corresponde a 160 µg de AZA kg⁻¹.

Desde el episodio tóxico ocurrido en Irlanda, esta toxina ha sido detectada sólo en el hemisferio norte, en países europeos como Dinamarca, España, Francia, Inglaterra, Noruega y Portugal (Twiner et al., 2008). Además, ha sido detectada en Marruecos (Taleb *et al.*, 2006) y Canadá (Twiner et al., 2008). Hasta hace algunos meses, la producción de AZAs estaba asociada al dinoflagelado *Protoperdinium crassipes* (James *et al.*, 2003a), dinoflagelado detectado ocasionalmente en las aguas del norte de Chile (Uribe datos no publicados). Recientemente Krock *et al.* (2009c), han demostrado que los AZAs son producidos por una nueva especie de dinoflagelado morfológicamente muy pequeño (10 µm de longitud) el que ha sido denominado como *Azadinium spinosum* (Tillmann *et al.*, 2009) Por lo que, estos autores sugieren que *P. crassipes* es solo un organismo transvector de la toxina al incorporarla por su comportamiento heterótrofo mediante la ingestión de *A. spinosum*.

En nuestro país, durante el año 2008 se detectó por primera vez la presencia de este tipo de toxinas en la macha (*Mesodesma donacium*) y la almeja (*Mulinia edulis*), dos bivalvos de importancia comercial para la pesca artesanal en la Región de Coquimbo (Álvarez, 2009). Este registro, corresponde a la primera cita que hace referencia a la presencia de este tipo de toxina en el Hemisferio Sur y fue confirmado por Krock *et al.* (2009b) quienes detectaron la presencia de AZA-1, AZA-2 y un nuevo azaspirácido provisoriamente denominado AZA-X en muestras de fitoplancton de las costas de nuestro país, sugiriendo además la presencia de *Azadinium spinosum*. Recientemente, López-Rivera *et al.* (2009) reportaron la presencia de este tipo de toxinas en el ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) en las principales bahías en las que se desarrolla el cultivo de este bivalvo.



1.3.2 Toxinas no diarreogénicas

1.3.2.1 Pectenotoxinas

Las pectenotoxinas (PTX) son un grupo de toxinas lipofílicas aisladas originalmente de glándulas digestivas del pectínido *Patinopecten yessoensis* (Yasumoto et al., 1985). Estos compuestos (Fig.4), son un grupo de lactonas polietéreas que difieren entre ellos principalmente por: a) el nivel de oxidación del carbono 18 (grupo metilo o ácido carboxílico); b) la configuración o la epimerización del anillo espiro y c) la configuración abierta del anillo de lactona en los carbonos 1-33 (Burgess, 2003; Blanco et al., 2005).

Algunas pectenotoxinas son producidas por biosíntesis en dinoflagelados del género *Dinophysis*. Entre estas toxinas se encuentran: PTX2, PTX-11, PTX-12, PTX-13 y PTX14 (Suzuki et al., 2003; Miles et al., 2004b; Miles et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos son producidos por transformaciones metabólicas en los moluscos (Yasumoto y Murata, 1993; Blanco et al., 2005; EFSA, 2009b). De este modo, compuestos como PTX1, PTX3 y PTX6 serían producidos por la oxidación de PTX2. Además, la hidrólisis enzimática de PTX2 da origen a la PTX2 seco ácido (PTX2sa) y su epímero 7-epi-PTX2 seco ácido (7-epi-PTX2sa) (Draisci et al., 1996; Yasumoto et al., 2001), siendo estos últimos metabolizados para formar ésteres con ácidos grasos de distinta longitud (Wilkins et al., 2006). Por otra parte, PTX4 y PTX7 son epímeros de PTX1 y PTX6, respectivamente y PTX9 y PTX8 (no encontradas en moluscos) son formadas como artefactos en condiciones ácidas por el par de epímeros mencionados anteriormente (Sasaki et al., 1997).

En relación a sus efectos tóxicos, las PTXs presentan una ligera toxicidad al ser administradas oralmente en ratones (Miles et al., 2004a), no inhiben las fosfatasa, pero tienen un fuerte efecto hepatotóxico (Terao et al., 1986), siendo las más tóxicas por vía intraperitoneal en ratones de laboratorio las PTX2 y PTX11

(Miles et al., 2004a). El límite regulatorio establecido para este tipo de toxicidad corresponde a $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ de equivalentes de ácido okadaico (EFSA, 2009c).

Desde su descubrimiento en Japón por Lee *et al.* (1989) en *Dinophysis fortii*, estas toxinas han sido detectadas en *D. acuta* (Suzuki *et al.*, 1998; James *et al.*, 1999; Aune *et al.*, 2002; Pavela-Vrancic *et al.*, 2002; MacKenzie *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Fernández Puente *et al.*, 2004; Miles et al., 2004a), *D. acuminata* (MacKenzie *et al.*, 2002; Quilliam, 2003; Miles et al., 2004a), *D. norvergica*, *D. rotundata* (Miles et al., 2004a) y *D. caudata* (Fernández et al., 2003; Fernández *et al.*, 2006).

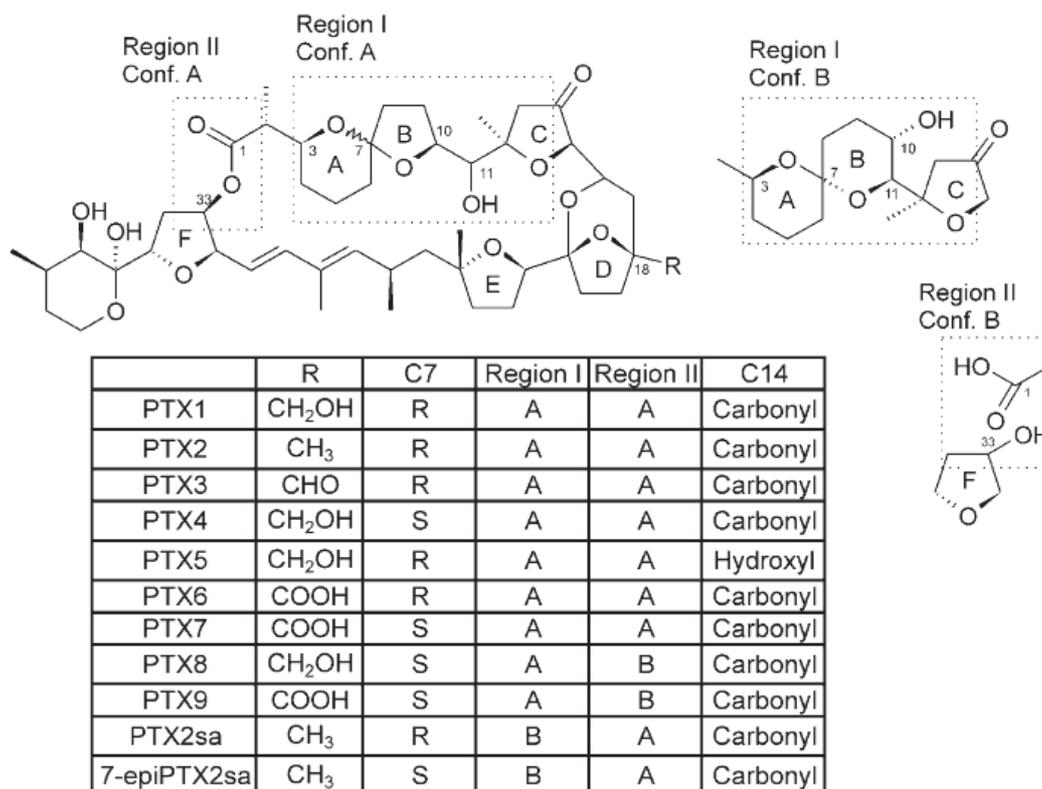


Figura 4. Estructura química de las pectenotoxinas (PTX) y sus ácidos secoicos (PTXsa) (Fuente: adaptado de Blanco *et al.*, 2005)



En nuestro país, estas toxinas han sido detectadas por Goto *et al.* (2000) en la zona sur y por Blanco *et al.* (2007) en la zona norte. Esta última investigación, revela la presencia de PTX2 en células de *D. acuminata* y de esta toxina y su ácido secoico (PTX2sa) en bivalvos como ostión (*Argopecten purpuratus*), almeja (*Mulinia edulis*), macha (*Mesodesma donacium*), chorito (*Semimytilus algosus*) y el tunicado *Pyura chilensis*.

1.3.2.2 Yesotoxinas

Las yesotoxinas (YTX) son un grupo de toxinas que fueron descubiertas durante la realización de bioensayos para extractos lipofílicos de moluscos en ratones. Estas toxinas fueron identificadas por primera vez en el bivalvo *Patinopecten yessoensis* (Murata *et al.*, 1987), identificando al dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997) como el microorganismo productor de la toxina.

La yesotoxina, es un poliéter disulfatado de elevado peso molecular, que se caracteriza por tener un esqueleto de 47 carbonos en forma de escalera, formada por 11 anillos éteres contiguos, una cadena lateral terminal insaturada de 9 carbonos y 2 ésteres de sulfato (Fig. 5) (Murata *et al.*, 1987; Satake *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1996). Este compuesto, es de naturaleza liposoluble, pero la presencia de los grupos sulfatos le proporcionan propiedades hidrosolubles (sustancia anfótera), por lo que fácilmente puede ser extraída en metanol acuoso (Yasumoto y Takizawa, 1997b).

La mayoría de estas toxinas, han sido descubiertas en el dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*, siendo el primer análogo detectado la 45,46,47-trinorYTX (Satake *et al.*, 1999). En los años posteriores, se han detectado alrededor de 16 análogos producidos por oxidación de la molécula de YTX entre los que destacan homo-YTX, noroxo-YTX. Otros 5 análogos encontrados en dinoflagelados son aquellos producidos por la glicosilación de la cadena lateral de

la 1a-homo-YTX y YTX entre los que destacan las protoceratinas (revisado por Domínguez *et al.* 2010). En el caso de los moluscos, el primer análogo descubierto fue la 45-hidroxi-YTX en *Patinopecten yessoensis* (Yasumoto *et al.*, 1989), seguido por la 45,46,47-trinor-YTX (Satake *et al.*, 1996). En los años posteriores, se han descrito más de 15 compuestos, siendo los más abundantes en los moluscos la 45-hidroxi-YTX y la carboxi-YTX (revisado por Domínguez *et al.* 2010).

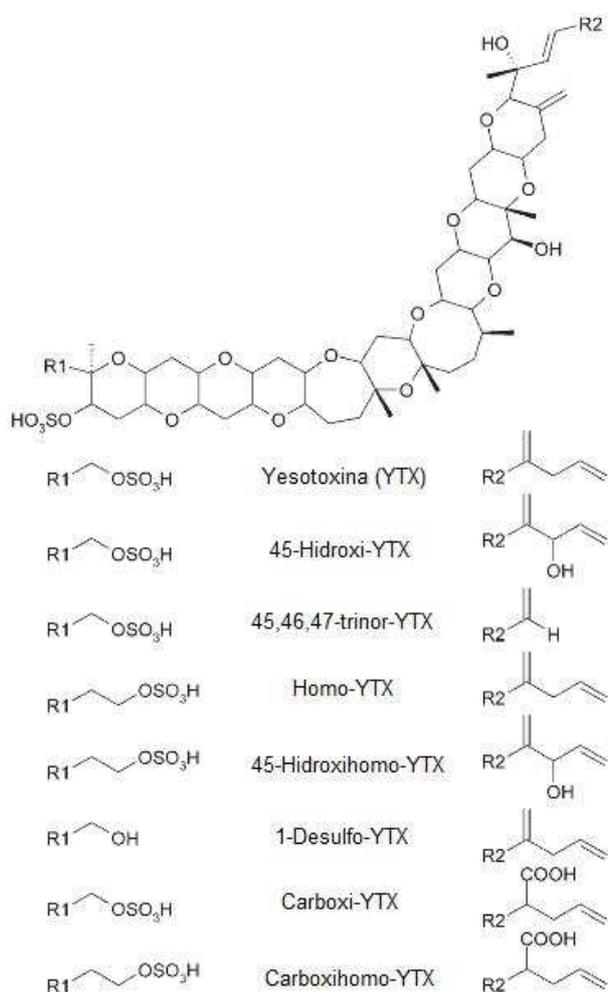


Figura 5. Estructura química de algunas de la yesotoxina y algunos de sus análogos (YTX) (Fuente: adaptado de Blanco *et al.*, 2005).



Estas toxinas no son tóxicas al ser administradas por vía oral (Aune et al., 2002). Sin embargo, estas toxinas son cardiotoxicas en ratones de laboratorio mediante administración intraperitoneal, siendo su potencia superior a la del AO y sus derivados, produciendo síntomas similares a los de las neurotoxinas (Draisci et al., 2000).

El agente tóxico de este compuesto es el dinoflagelado cosmopolita *Protoceratium reticulatum*, siendo asociado a la producción de toxinas en Nueva Zelandia (MacKenzie et al., 1998), Japón (Satake et al., 1999), Mar Adriático (Boni et al., 2001), Noruega (Miles et al., 2002), Canadá (Stobo et al., 2003) y España (Paz et al., 2007). Actualmente, se ha encontrado que los dinoflagelados *Lingulodinium polyedrum* (Draisci et al., 1999; Paz et al., 2007; Armstrong y Kudela, 2006) y *Gonyaulax spinifera* (Rhodes et al., 2006; Riccardi et al., 2009), también tienen la capacidad de generar este tipo de compuestos. Otra especie que ha sido sugerida como productora de YTX es el dinoflagelado bentónico *Coolia monotis* (Holmes et al., 1995).

En nuestro país, estas toxinas han sido detectadas en *Mytilus chilensis* en el sur de Chile por Yasumoto y Takizawa (1997a). Recientemente, Krock et al. (2009a) detectaron la presencia de yesotoxinas en muestras de fitoplancton obtenidas en la Bahía de Arica, asociando la identificación de esta toxina con la presencia de quistes similares a los de *Protoceratium reticulatum*. Sin embargo, la detección de otras especies como *Gonyaulax spinifera* (Claramunt, 2006), requiere la confirmación de si esta especie también tiene la capacidad de producir estos compuestos.

1.3.2.3 Espirólidos

Finalmente, el último grupo de toxinas lipofílicas; que difieren fundamentalmente por los síntomas clínicos y en animales de laboratorio; son las espiroiminas



macrocíclicas. Este grupo incluye toxinas como las gymnodiminas, proroentrólidos, pinatoxinas, pteriatoxinas y los espirólidos (Boyer, 2009).

En 1991, en Nueva Escocia, Canadá, se detectó la presencia de una nueva toxina en un extracto lipofílico de mejillones y pectínidos procedentes de zonas de cultivo. Los estudios para caracterizar el compuesto permitieron identificar un grupo de iminas cíclicas que fueron denominadas espirólidos (SPX) (Hu *et al.*, 1995a). Posteriormente, se determinó que los organismos causantes de esta toxinas son los dinoflagelados *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella *et al.*, 1999) y *Alexandrium peruvianum* (Touzet *et al.*, 2008).

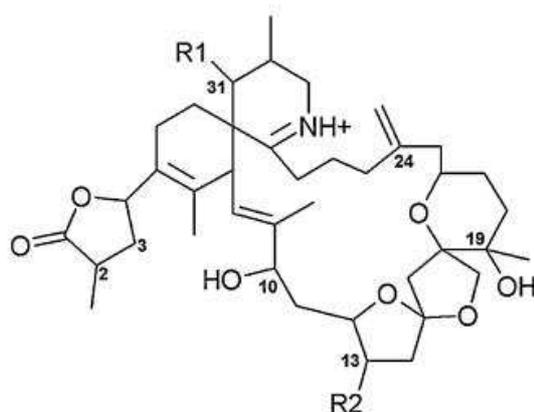
Estructuralmente, los espirólidos (Fig.6) se caracterizan por poseer una molécula poco común formada por una iminas cíclica (Hu *et al.*, 1995a; Hu *et al.*, 2001). Hasta la fecha, se han descrito ocho espirólidos A, B, C, D, E, F, 13-desmetil C (SPX-1) y 13-desmetil D (Ciminiello *et al.*, 2006). Entre estos, los espirólidos A-D son los más tóxicos, causando la muerte fulminante del ratón cuando estos son inyectados intraperitonealmente (Christian *et al.*, 2008).

El mecanismo de acción de estas toxinas, no se encuentra totalmente elucidado. (Gill *et al.*, 2003), sugieren que los espirólidos podrían actuar sobre receptores de la acetilcolina. En sus estudios en ratas y ratones, los únicos tejidos dañados por estas toxinas fueron los del cerebro.

Los síntomas de estas toxinas, solo han sido descritos en ratones, debido a que se desconoce algún tipo de antecedentes de intoxicación en humanos. Estos síntomas incluyen piloerección, espasmos musculares abdominales, hiperextensión del lomo y arqueado de la cola (Richard *et al.*, 2001).

Desde su detección en Canadá, esta toxina ha sido registrada en el Hemisferio Norte en países como Dinamarca (MacKinnon *et al.*, 2004), España (González *et al.*, 2006), Francia (Amzil *et al.*, 2007), Italia (Ciminiello *et al.*, 2006), Irlanda (Touzet *et al.*, 2008) y Noruega (Aasen *et al.*, 2005).

En nuestro país, la presencia de esta toxina fue recientemente registrada por Álvarez *et al.* (2010) en muestras de macha (*Mesodesma donacium*) y almeja (*Mulinia edulis*) obtenidas desde Bahía Coquimbo. Estos resultados, sugieren que este tipo de toxinas puede ser un peligro potencial para la industria de la pectinicultura.



Espirolidos	R ₁	R ₂	$\Delta^{2,3}$	m/z
A	H	CH ₃	$\Delta^{2,3}$	692.5
B	H	CH ₃		694.5
C	CH ₃	CH ₃	$\Delta^{2,3}$	706.5
D	CH ₃	CH ₃		708.5
13-desmetil C	CH ₃	H	$\Delta^{2,3}$	692.5
13-desmetil D	CH ₃	H		694.5

Figura 6. Estructura química de los principales espirolidos (Fuente: adaptado de Touzet *et al.*, 2008).



1.4 Toxinas hidrofílicas

1.4.1 Saxitoxina y análogos

La intoxicación paralizante por moluscos es un síndrome causado por el consumo de moluscos contaminados con saxitoxina y/o sus análogos (Sommer y Meyer, 1937). Las toxinas responsables de este tipo de intoxicación son un conjunto de compuestos estructuralmente relacionados con la saxitoxina, que tienen distinta toxicidad dependiendo de su estructura química. Estos compuestos pueden ser clasificados en cinco grupos (Fig.7). El grupo más tóxico, corresponde a las toxinas carbamato, que incluye: Saxitoxina (SXT), Neosaxitoxina (NeoSTX) y las Gonyautoxinas (GTX1-4). Las toxinas decarbamoiladas (dcGTX1-4, dcSTX, dcNeo) y deoxi-decarbamoiladas (doSTX, doGTX2-3) poseen una toxicidad intermedia. Finalmente, las toxinas con grupos N-sulfocarbamato (GTX5-6, C1-4) (Oshima *et al.*, 1990; Oshima, 1993) y benzoato (GC1-3) (Negri *et al.*, 2003b) son las menos tóxicas.

El mecanismo de acción de la saxitoxina está bien descrito. Su receptor farmacológico es la proteína intrínseca de membrana conocida como el canal de sodio dependiente de voltaje, cuyo bloqueo por este tipo de toxinas inicia la despolarización neuronal en mamíferos (Powell y Doucette, 1999). Esta despolarización produce la interrupción de la transmisión neuromuscular causando parálisis respiratoria (Long *et al.*, 1990). El límite legal permisible corresponde a 800 µg de equivalentes de STX kg⁻¹.

Estas toxinas son producidas por diversos dinoflagelados del género *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense* (Moestrup *et al.*, 2008) y la cianobacterias *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei* (Onodera *et al.*, 1997) y *Planktothrix* sp (Neilan *et al.*, 2008). Además, algunos autores han sugerido que estas toxinas podrían ser producidas por bacterias aisladas de cultivo de

dinoflagelados (Silva, 1990) o que bacterias endosimbiontes de células de estos dinoflagelados podrían participar en la producción de este tipo de toxinas (Kodama *et al.*, 1990; Doucette *et al.*, 1998; Uribe y Espejo, 2003).

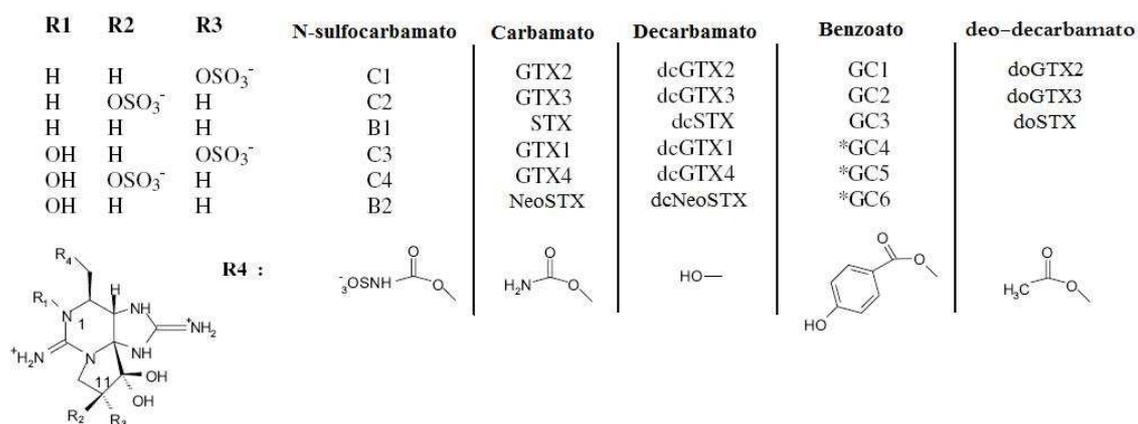


Figura 7. Estructura química de las principales toxinas asociadas con la intoxicación paralizante por moluscos (Fuente: adaptado de Vale *et al.*, 2009).

Las toxinas paralizantes están ampliamente distribuidas a nivel mundial (EFSA, 2009a). El primer registro de estas toxinas en las costas del Océano Pacífico en los Estados Unidos corresponde a (Sommer y Meyer, 1937). Desde entonces, estos episodios tóxicos han sido detectados en diversos lugares a lo largo de la costa del Océano Pacífico en el continente Americano (Fig.8). En Norte América, han sido detectados en Canadá (Quayle, 1969; Prakash *et al.*, 1971; Chiang, 1988; Todd *et al.*, 1993), Estados Unidos (Sommer y Meyer, 1937; Nishitani y Chew, 1988; Beitler, 1991; Price *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1996; RaLonde, 1996; Tibbetts, 1998; Trainer, 2002) y México (Sierra-Beltrán *et al.*, 1996; Garate-Lizarraga *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Gárate-Lizarraga *et al.*, 2006). En América Central han sido reportados en Guatemala (Rodríguez *et al.*, 1990), El Salvador (Barraza *et al.*, 2004), Nicaragua (Meléndez, 2006) y Costa Rica (Mata *et al.*, 1990). A diferencia de la amplia distribución de estas toxinas en Norte y Centro América, en Sudamérica, sólo han sido detectadas en la Bahía de Paracas, Perú



(zona tropical) (Antinori *et al.*, 2002) y en la zona sur de Chile (zona de transición subpolar).

En Chile, los primeros casos de intoxicación paralizante por moluscos acontecieron en 1970 y 1972 asociados con la presencia de *Alexandrium catenella* en la Región de Magallanes (Guzmán y Campodónico, 1975; Guzmán y Campodónico, 1978; Avaria, 1979). Desde esa fecha, los episodios tóxicos de esta especie se han desplazado hacia el norte afectando la Región de Aysén (Muñoz *et al.*, 1992; Guzmán *et al.*, 2002) y más recientemente a la Región de los Lagos (Lembeye, 1998; Guzmán *et al.*, 2002)., provocando la intoxicación de más de 400 personas y más de 28 muertos (Guzmán *et al.*, 2002; Villarroel, 2005; Villarroel, 2008).

Lagos *et al.* (1996); Krock *et al.* (2007), estudiaron el perfil de toxinas de *Alexandrium catenella* demostrando que éste, se encuentra dominado por los epímeros C1/C2, GTX1/4, GTX2/3 y por GTX5. En cambio, los bivalvos que ingieren estos dinoflagelados presentaron mayoritariamente GTX2, GTX1 seguidas por GTX3, GTX4, GTX5 y pequeñas concentraciones de neoSTX, STX, dcSTX y toxinas C (Compagnon *et al.*, 1998).

En el norte de Chile, desde el inicio del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) dirigido por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) se han detectado episodios subtóxicos esporádicos en Bahía Tongoy y Bahía Guanaqueros, sin haber sido posible la identificación el agente fitoplanctónico asociado. Por lo que la comprobación de la toxicidad de los moluscos y las especies de dinoflagelados sospechosos redundaría en una mejora sustancial de la seguridad de los alimentos producidos en el área, tanto para consumo local como para la exportación.

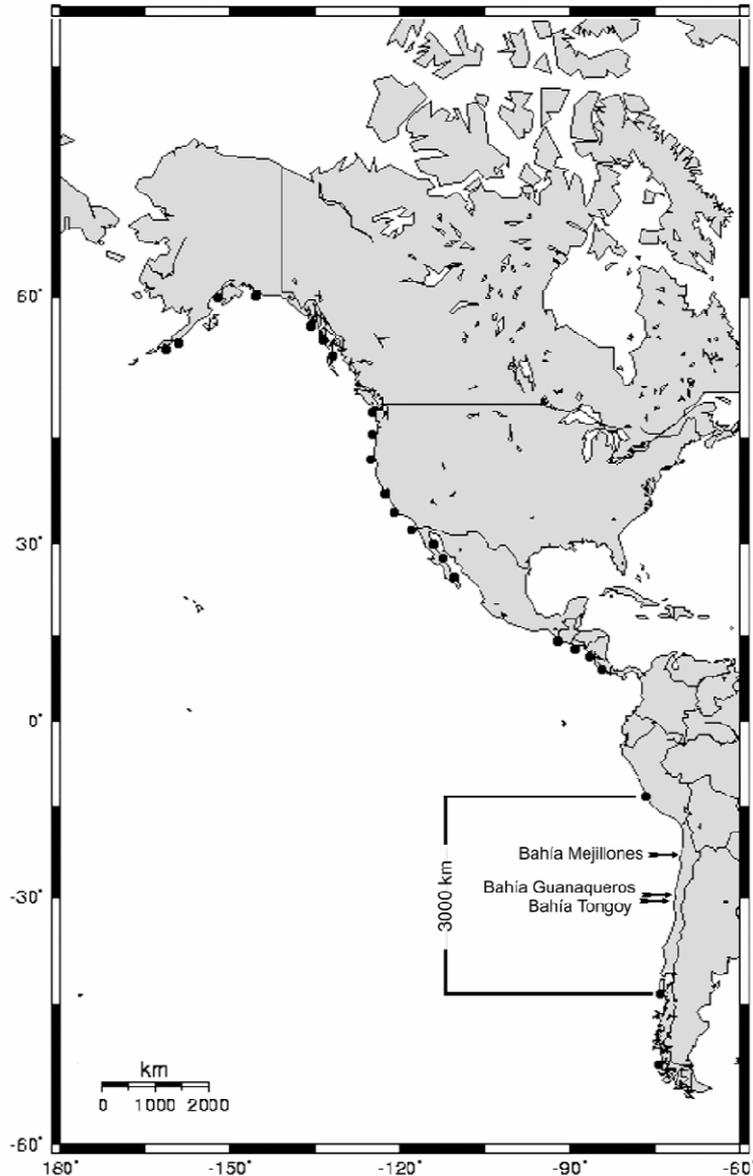


Figura 8. Distribución de episodios tóxicos por toxinas paralizantes en las costas del Océano Pacífico en el continente Americano (●) y Bahías en las que se detectó la presencia de toxinas paralizantes durante el desarrollo de esta investigación (→) (Fuente: adaptado de Álvarez, 2009).



1.4.2 Ácido domoico

En el año 1987, en Isla Príncipe Eduardo, Canadá, ocurrió un grave evento tóxico provocado por el consumo de mejillones (*Mytilus edulis*) (Bates *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989). La toxina responsable de esta intoxicación fue el ácido domoico y la fuente causal de la toxina se identificó posteriormente como la diatomea *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989).

El ácido domoico es un aminoácido tricarboxílico de bajo peso molecular originalmente aislado de la macroalga *Chondria armata* (Takemoto y Daigo, 1958). Este compuesto es estructural y funcionalmente similar al ácido kainico, aunque éste último es dicarboxílico. Actualmente, se han descrito otros compuestos relacionados con el ácido domoico (Fig.9), aunque de menor o incluso nula toxicidad, entre los que destacan los ácidos isodomoicos (Clayden *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción del ácido domoico sobre el hombre está basado en su similitud con el ácido glutámico, compitiendo con este por tres receptores distintos ubicados en neuronas del sistema nervioso central (Stewart *et al.*, 1990). Este proceso, genera la despolarización de las neuronas, incrementando la concentración de Ca^{++} a nivel intracelular, causando la muerte de las neuronas del hipocampo en el cerebro (Todd, 1990; Ravn, 1995).

Los síntomas de la intoxicación amnésica por mariscos incluyen trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarreas, y, en casos más graves, efectos neurológicos que incluyen mareos, confusión, debilitamiento, letargia, somnolencia, dolor de cabeza o incluso coma. Los efectos más severos incluyen secreción bronquial, dificultad respiratoria, alucinaciones y pérdida de memoria a corto plazo y en casos extremos la muerte (Perl *et al.*, 1990; Teitelbaum *et al.*,

1990). El límite máximo permisible establecido para este tipo de toxicidad, en la mayor parte de los países del mundo es de 20 mg kg^{-1} .

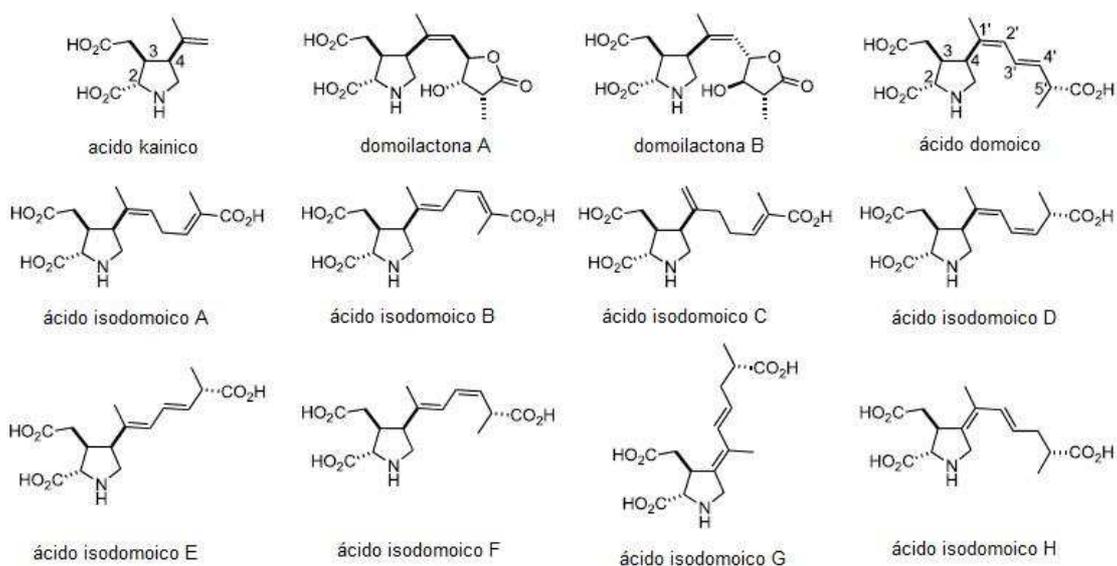


Figura 9. Estructura química del ácido kainico y compuestos relacionados con el ácido domoico (Fuente: adaptado de Clayden et al., 2005).

Desde el episodio ocurrido en Canadá, causado por *Pseudo-nitzschia multiseriata*, este compuesto ha sido detectado en 12 especies: *P. australis* (Fritz et al., 1992), *P. calliantha*, *P. cuspidata* (Lundholm et al., 2003), *P. delicatissima* (Smith et al., 1990), *P. fraudulenta* (Rhodes et al., 1998), *P. galaxiae* (Cerino et al., 2005), *P. multistriata* (Sarno y Dahlmann, 2000), *P. pungens* (Rhodes et al., 1996), *P. pseudodelicatissima* (Lundholm et al., 1997), *P. seriata* (Lundholm et al., 1994) y *P. turgidula* (Rhodes et al., 1998). Además, ha sido detectado en la diatomeas *Nitzschia navis-varingica* (Kotaki et al., 2000) y *Amphora coffaeiformis* (Maranda et al., 1990), aunque existen discrepancias sobre si esta última especie tiene la capacidad de sintetizar esta toxina.



En el sur de Chile, en el marco del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB), el ácido domoico ha sido detectado en diferentes moluscos provenientes de bancos naturales y áreas de cultivo de mejillón en la Isla de Chiloé (Región de los Lagos) (Suárez-Isla et al., 2002). En la zona Norte, esta toxina ha sido detectada en las principales bahías en las que se desarrolla el cultivo de ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*). Entre estas se encuentran Bahía Inglesa (Región de Atacama), Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy (Región de Coquimbo) (Suárez-Isla et al., 2002). Adicionalmente, esta toxina ha sido detectada en el tunicado *Pyura chilensis* (López-Rivera et al., 2009). En ambas áreas, el ácido domoico ha sido registrado en concentraciones superiores al límite regulatorio provocando cierres en la extracción de los moluscos afectados por esta toxina.

Todos estos episodios han sido asociados con la presencia de *P. australis*. Sin embargo, no se ha comprobado que esta especie sea la única fuente de toxicidad para los moluscos. Esto se debe fundamentalmente, a que las especies del género *Pseudo-nitzschia* son componentes frecuentes del fitoplancton en zonas costeras (Lundholm et al., 2002a) y a que varias especies pueden coexistir durante sus floraciones (Trainer et al., 1998; Cho et al., 2002; Trainer et al., 2002).

Por otra parte, estas especies se distinguen por caracteres taxonómicos de difícil identificación con microscopía óptica (Quijano-Scheggia et al., 2008b). Por este motivo para una correcta identificación taxonómica a nivel de especie es necesaria la utilización de microscopía electrónica (Hasle, 1995; Orsini et al., 2002; Priisholm et al., 2002; Lundholm et al., 2003; Quijano-Scheggia et al., 2008b) o la utilización de métodos moleculares (Miller y Scholin, 1996; Parsons et al., 1999; Lundholm et al., 2002b; Evans et al., 2004; Orsini et al., 2004; Bornet et al., 2005).

En Chile, existe escasa información relacionada con el género *Pseudo-nitzschia*. Los principales estudios fueron realizados por Avaria (1962); Hasle (1972) y



Rivera (1985). Estos investigadores, registraron la presencia de 5 especies que han sido asociadas a la producción de ácido domoico en otros lugares del mundo. Estas especies son *P. australis* (Frenguelli) (Garrison *et al.*, 1992), *P. fraudulenta* (P.T. Cleve) Hasle (Rhodes *et al.*, 1996), *P. delicatissima* (P.T. Cleve) Heiden en Heiden & Kolbe (Smith *et al.*, 1990), *P. pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle (Lundholm *et al.*, 1997) y *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle (Rhodes *et al.*, 1996). Además, identificaron la especie no tóxica *Pseudo-nitzschia subpacificica* (Hasle) (Lundholm *et al.*, 2002a) y la presencia de *P. seriata* que probablemente fue confundida con *P. australis* (Hasle, 2002).

1.5 Episodios nocivos producidos por organismos fitoplanctónicos que afectan las características organolépticas de los bivalvos

Además de los episodios tóxicos generados el fitoplancton, existe algunas de especies no tóxicas que contienen sustancias que al ser acumuladas por los bivalvos alteran su aspecto o sabor y por consiguiente disminuyen su valor comercial, generando pérdidas económicas a cultivadores o mariscadores (Blanco, 2001).

En la actualidad, los antecedentes relacionados con estos tipos de episodios son escasos. Entre estos, se encuentran los cambios de coloración de la glándula digestiva de los bivalvos *Placopecten magellanicus* y *Ostrea edulis* (Kat, 1984; Carver *et al.*, 1996) durante floraciones del ciliado *Mesodinium rubrum* (= *Myrionecta rubra*) y el desarrollo de sabor amargo en varias especies de bivalvos en Australia. En este país, en el año 1987, se registró una floración de la diatomea *Rhizosolenia chunii*, la que estuvo asociada a la presencia de un intenso sabor amargo en la glándula digestiva de los bivalvos *Mytilus edulis*, *Pecten alba* y *Ostrea angasi* (Parry *et al.*, 1989). Desde esa fecha, este tipo de episodios han ocurrido frecuentemente y siempre están asociados con presencia de esta diatomea (Department of Primary Industries, 2005), por lo que las



autoridades de este país han incluido la identificación y cuantificación de esta microalga en las muestras de fitoplancton que son analizadas en su plan de control de biotoxinas marinas (Walker, 2009).

Este mismo tipo de eventos nocivos se registró en el año 1990 la Bahía de Gamak, Corea del Sur. Durante este episodio, se detectó un fuerte sabor amargo en las glándulas digestivas de ostras (*Crassostrea gigas*) que habían sido utilizadas para la elaboración de conservas. Los compuestos implicados fueron estudiados por Lee (1995), que encontró que al menos cinco compuestos de origen peptídico probablemente provenientes del fitoplancton fueron los responsables.

En nuestro país, este tipo de episodios, han afectado principalmente al ostión del norte (*Argopecten purpuratus*). El primero estos se ha registrado con baja frecuencia y está asociado a la presencia de la diatomea *Guinardia striata*, cuya ingestión por el ostión altera su aspecto al producir un cambio en la coloración de la parte femenina de la gónada sin generar mortalidad en los individuos que recuperan su aspecto normal alrededor de un mes después de ocurrido el incidente (Uribe datos no publicados).

El otro tipo de episodios, en el cual nos centraremos, está asociado a floraciones de la diatomea *Rhizosolenia imbricata* durante los cuales se generan cambios en las características organolépticas de los bivalvo, los cuales adquieren un fuerte sabor amargo, especialmente en los tejidos gonadales (Uribe, 2003). Este tipo de episodios fue registrado por primera vez en el año 1994, repitiéndose en el año 1999 y posteriormente incrementando su frecuencia, con al menos un episodio anual entre los años 2000 y 2007 (Uribe, 2009). De este modo, la presencia de floraciones algales nocivas de la diatomea *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Inglesa durante los últimos periodos estivales, hace necesario determinar los



efectos nocivos asociados a la presencia de esta microalga sobre el desarrollo de la pectinicultura, en una de las bahías más importantes para el desarrollo acuícola de este país.



2. Metodología

2.1 Análisis semanales de biotoxinas marinas e identificación de perfiles tóxicos en *Argopecten purpuratus* extraídos de cada una de las bahías contempladas en el estudio, mediante HPLC y HPLC-MS.

2.1.1 Muestreo de *Argopecten purpuratus* para análisis de toxinas marinas

Para determinar la presencia de toxinas marinas en el ostión, se consideró la utilización de la glándula digestiva debido a que es el órgano en el cual se acumulan en mayor proporción las toxinas en la mayoría de los moluscos de importancia comercial.

Para obtener muestras de glándulas digestivas de ostión, se realizó un muestreo en las plantas de este molusco en la planta de proceso de las empresas Compañía Pesquera Camanchaca SA e Invertec Ostimar. Las glándulas fueron extraídas desde organismos provenientes de Bahía Inglesa (Región de Atacama), Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy (Región de Coquimbo).

La toma de muestras fue realizada por el personal de las empresas ubicadas en el área de estudio de manera periódica (una vez por semana o cada quince días), con la asistencia de personal del Laboratorio de Producción Primaria durante los muestreos intensivos. Cada muestra de glándulas digestivas fue de 200 g, que corresponde entre 70 a 100 ejemplares talla comercial. El muestreo se realizó siguiendo el protocolo establecido por el Laboratorio del Ambiente del Servicio de Salud Coquimbo, el que consistió en:

- Almacenar las muestras en recipientes limpios, resistentes a agua y rupturas
- Las muestras fueron apropiadamente etiquetadas con el nombre del recurso, nombre del recolector, el área de cosecha, la fecha y la hora de recolección.



-
- Inmediatamente después de la recolección, las muestras fueron transportadas entre 0 y 10 °C al laboratorio y se mantuvieron congeladas (< 20 °C) hasta su análisis.

2.1.2 Análisis de toxinas marinas

Los análisis de las toxinas se realizaron semanalmente en el Laboratorio del Ambiente dependiente de la Secretaria Regional Ministerial de Salud, Región de Coquimbo. El ácido domoico (toxina amnésica) fue analizado mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV) y las toxinas paralizantes y lipofílicas mediante bioensayo en ratones. Todas las muestras positivas, exceptuando las del ácido domoico, fueron liofilizadas y enviadas al Grupo de Episodios Tóxicos del Centro de Investigaciones Marinas dependiente de la Conselleria de Pesca y Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia, España.

Para la confirmación y determinación de perfiles tóxicos de toxinas se utilizaron diferentes técnicas cromatográficas. Para las toxinas paralizantes se utilizó Cromatografía Líquida de alto rendimiento de fase reversa con apareamiento iónico y detección fluorimétrica (HPLC-RP-FD), mientras que para las toxinas lipofílicas se utilizó Cromatografía Líquida de alto rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).

2.1.2.1 Determinación de toxina amnésica de moluscos bivalvos (VAM). Método HPLC-UV

2.1.2.1.1 Preparación de la muestra



Para realizar los análisis de las toxinas amnésicas, se utilizaron entre 20 y 50 g de tejidos provenientes de la glándula digestiva. Estos tejidos fueron homogenizados mecánicamente utilizando un Ultraturrax y 4 g de estos tejidos fueron mezclados con una solución de metanol acuoso (50%) para la extracción de las toxinas. Los extractos obtenidos fueron centrifugados durante 10 minutos a 20.000 g y el sobrenadante obtenido fue inyectado directamente al HPLC.

2.1.2.1.2 Análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV)

Los análisis fueron realizados en un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución con detector de longitud de onda variable (Agilent 1100). La separación cromatográfica se realizó mediante el método descrito por Quilliam *et al.* (1989), utilizando una columna Luna C18 (150 x 2; 3 µm) protegida con una pre-columna C18 (4 mm x 2 mm, 3 µm) (Phenomenex).

2.1.2.1.3 Expresión de los resultados

$$\text{Acido domoico } (\mu\text{g g}^{-1}) = (A / A') \times (C / M) \times V$$

Donde:

A: área de la muestra

A': área del estándar

M: peso de la muestra extraída, en gramos.

C: concentración del estándar inyectado, en µg mL⁻¹

V: volumen de dilución final de la muestra (20 mL)

2.1.2.1.4 Cultivo de *Pseudo-nitzschia*, preparación de muestras y análisis de toxinas por cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta y espectrometría de masas



Para el establecimiento de cultivos de *Pseudo-nitzschia*, se obtuvieron muestras mediante arrastres verticales con red de fitoplancton de 23 μm desde 15m a superficie. Posteriormente, se procedió a observar las especies in vivo en búsqueda de especies de este género. Al corroborar su presencia, se filtró toda la muestra a través de un tamiz de 220 μm para eliminar impurezas y el microzooplancton. Para la aclimatación del fitoplancton al medio de cultivo, las muestras filtradas se pusieron en matraces con 400 mL de agua de mar filtrada (0,45 μm) enriquecida con medio de cultivo F/2 (Guillard, 1975), incubándolas a 14 °C, irradiación entre 40 y 35 $\mu\text{mol de cuantos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad.

Una vez aclimatado el fitoplancton se procedió a su separación mediante la técnica de aislamiento con micropipetas descrita por Stein (1973). Las células obtenidas se ubicaron en pocillos de placas de cultivo celular con medio de cultivo y se realizó un seguimiento diario de la evolución de cada uno de ellos. Una vez obtenidos los cultivos iniciales, estos fueron escalados a 200 mL y mantenidos a 14 °C, irradiación entre 100 - 140 $\mu\text{mol de cuantos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad.

Para la extracción de toxinas de los cultivos de *Pseudo-nitzschia australis*, *P. calliantha* y *P. subfraudulenta*, se utilizaron 100 mL de cultivo que se encontraban en fase estacionaria de su curva de crecimiento. Adicionalmente, se tomaron 2 mL de cada cultivo para determinar la concentración celular (células mL^{-1}).

Las muestras fueron filtradas utilizando un filtro Nuclepore (12 μm) y luego lavadas con 1 mL de formiato de amonio (0,6 M). El ácido domoico fue extraído de los filtros con metanol acuoso (50% v/v) mediante aplicación de ultrasonidos. Los extractos obtenidos, fueron centrifugados (20,000 x g; 20 min) y posteriormente filtrados utilizando filtros de jeringa (0, 45 μm) (Teknokroma). Una alícuota de cada extracto purificado, fue concentrada (10 veces) utilizando un evaporador centrifugo



Speed Vac (Thermo Fisher Scientific), para posteriormente ser suspendida en agua ultrapura (MilliQ Gradient, Millipore).

Los análisis de toxinas amnésicas se llevaron a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección Ultravioleta (HPLC-UV) y Espectrometría de Masas (HPLC-MS), utilizando un sistema cromatográfico Surveyor MS con detector de diodos y acoplado a espectrómetro de masas de trampa iónica Deca XP plus con interface electro-spray (Thermo Fisher Scientific).

La separación cromatográfica, fue realizada utilizando una columna BDS Hypersil (Thermo Scientific) mediante el método descrito por Quilliam et al. (1989). El espectrómetro de masas fue operado en modo positivo, con un voltaje de spray de 4,5 kV, temperatura del capilar de 200 °C y operado en modos SIM y MS², controlando el ion [M+H]⁺ (*m/z* 312). La confirmación y cuantificación del ácido domoico, se realizó mediante la comparación con los cromatogramas del material de referencia (DACS – 1C) obtenidos de IMB-NRC, Canadá. El límite de detección de la técnica fue de 0,5 ng mL⁻¹.

2.1.2.2 Determinación de toxina paralizante de moluscos bivalvos (VPM). Método biológico.

Para realizar los análisis de las toxinas paralizantes, se utilizaron entre 100 y 150 g de tejidos provenientes de la glándula digestiva. Estos tejidos fueron homogenizados mecánicamente utilizando un blender y 100 g de estos tejidos fueron mezclados con 100 mL de HCl 0,1 N para la extracción de las toxinas. El pH de la mezcla fue ajustado entre 2 y 4 (con NaOH 0,1 N o HCl 5 N), en los casos en los que fue necesario. Posteriormente, la muestra fue calentada (100 °C) durante 5 minutos bajo campana de extracción. Una vez realizada la extracción, la muestra fue transferida a una probeta y el volumen fue ajustado a 200 mL con HCl 0.003 N, para finalmente centrifugar o filtrar antes de la inyección intraperitoneal en los ratones.



2.1.2.2.1 Bioensayo

Para la realización del bioensayo, se inyectó 1 mL del extracto ácido intraperitonealmente a 3 ratones (entre 19 y 21 g) (no mayor de 23 g). En cada caso, se registró el tiempo de muerte (considerando la última respiración del ratón). En los casos en los que el tiempo de muerte fue menor a 5 minutos las muestras fueron diluidas con HCl 0,003 N para obtener tiempos de muerte entre 5 y 7 min.

2.1.2.2.2 Expresión de los resultados

Para determinar la mediana de muerte de los ratones, se convirtieron los tiempos de muerte a Unidades Ratón (UR) utilizando la tabla de Sommer y Meyer (1937), corrigiendo el peso de cada ratón y por la UR correspondiente para obtener la unidad ratón corregida (URC). La concentración de toxina se determinó por la fórmula:

$$\mu\text{g STXeq } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de carne} = \text{URC} \times \text{CF} \times \text{Factor de dilución} \times 200$$

2.1.2.2.3 Determinación de los perfiles tóxicos para toxinas paralizantes en muestras de bivalvos y fitoplancton, mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa con detección fluorimétrica (HPLC –FD).

Para la extracción de toxinas en fitoplancton y cultivos de *Alexandrium* sp, se utilizaron 30 mL de muestras previamente concentradas. Las muestras fueron filtradas utilizando un filtro Nuclepore (12 μm) y luego extraídas siguiendo el método de Franco y Fernández-Vila (1993).



Para la extracción de toxinas en las glándulas digestivas, se homogenizaron todos sus tejidos. A continuación, se extrajeron las toxinas contenidas en 100 g con 100 mL de HCl 0,1 N mediante homogenización mecánica (Ultraturrax). La mezcla obtenida se centrifugó (10.000 x g, 8 min) recuperando el sobrenadante. Una alícuota de cada extracto, fue purificada utilizando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) C18 Bond Elut (3 mL, 500 mg) (Varian) siguiendo el método de (Oshima, 1993), utilizando una estación de extracción en fase sólida automatizada Rapid trace SPE Workstation (Caliper LifeScience). Para verificar la presencia de toxinas del grupo sulfocarbamato, 50 μ L de las muestras concentradas fueron hidrolizadas (HCl 0,1 N, 100°C, 15 min) con el propósito de transformar estas toxinas a sus equivalentes en toxinas carbamato. Una vez hidrolizada las muestras, fueron filtradas por filtros de jeringa (0,45 μ m) (Teknokroma).

Los análisis de toxinas paralizantes se llevaron a cabo por dos métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento. La detección de NeoSTX, dcSTX y STX se realizó siguiendo el método descrito por (Oshima, 1995), utilizando una columna cromatográfica Prodigy C8 (250 x 4,6 5 μ m) (Phenomenex). La detección de GTX 1-6 y dcGTX 1-4 se realizó siguiendo el método de Franco y Fernández-Vila (1993), utilizando una columna cromatográfica Ascentis RP-Amide (150 x 4,6mm 3 μ m) (Supelco, Sigma-Aldrich). En el caso que las toxinas GTX1 y GTX4 fueran enmascaradas en los cromatogramas por la presencia de interferentes que no pudieron ser eliminados por SPE, las muestras fueron analizadas con la misma técnica pero modificando el pH de la fase móvil a 6,7. La detección de toxinas C se realizó siguiendo el método de Oshima (1995), utilizando una columna cromatográfica Prodigy C8 (250 x 4.6 5 μ m) (Phenomenex). Finalmente, la detección de toxinas GC se realizó siguiendo el método de Negri et al. (2003b), utilizando una columna cromatográfica Luna C18 (150 x 4,6mm 3 μ m) (Phenomenex). La cuantificación de las toxinas se realizó utilizando las técnicas de Franco y Fernández-Vila (1993) (GTX1-4) y Oshima (1995) (STX, neoSTX y



dcSTX). En el caso de las toxinas sulfocarbamato, estas fueron cuantificadas en base al incremento de en la concentración de sus correspondientes toxinas carbamato en las muestras hidrolizadas. Todos los análisis de HPLC-FD, se realizaron utilizando un sistema cromatográfico Beckman System Gold/Nouveau equipado con un sistema de reacción post-columna. Este sistema estuvo compuesto por dos bombas Jasco (PU1580 y PU2080) y 10 m de tubo de teflón (0,5 mm diámetro interno) inmerso en un baño de agua (65 °C). La detección fue realizada mediante un detector de fluorescencia Jasco (señal/ruido >350).

La asignación de los picos cromatográficos a las toxinas, se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención, con los obtenidos de los análisis de material de referencia (IMB-NRC, Canadá) y por medio de la eliminación de la señal fluorescente al cambiar el oxidante del sistema de reacción post-columna por agua. Los límites de detección de la técnica fueron estimados considerando una relación señal/ruido de 3 (Tabla II).

Adicionalmente, la presencia de STX en algunas muestras fue confirmada mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas HPLC-MS/MS, utilizando un sistema cromatográfico Surveyor acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Deca XP plus con una interface electro-espray (Thermo Fisher Scientific). En este caso, la separación cromatográfica, fue realizada por Cromatografía de Interacción Hidrofílica (HILIC) mediante el método descrito por Dell'aversano *et al.* (2005). El espectrómetro de masas fue operado en modo positivo, con un voltaje de espray de 4,5 kV y con adquisición de datos en modo SIM y MS² controlando el ion [M+H]⁺ (*m/z* 299).



Tabla II. Límite de detección para toxinas paralizantes analizadas cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa con detección fluorimétrica y oxidación post-columna (HPLC-FD).

Toxina	pmol	($\mu\text{g STX-eq kg}^{-1}$)
Gonyautoxina-1 (GTX1)	0,4	12
Gonyautoxina-2 (GTX2)	0,15	1,6
Gonyautoxina -3 (GTX3)	0,05	1
Gonyautoxina-4 (GTX4)	0,35	7,6
Gonyautoxina-5 (GTX5)	0,28	0,5
Decarbamoilgonyautoxina-2 (dcGTX2)	0,06	0,3
Decarbamoilgonyautoxina-3 (dcGTX3)	0,03	0,3
Saxitoxina (STX)	0,15	4,6
Decarbamoilsaxitoxina (dcSTX)	0,19	3
Neosaxitoxina (neoSTX)	0,16	4,4
N-sulfocarbamoilgonyautoxina-2 (C1)	0,08	0,01
N-sulfocarbamoilgonyautoxina-3 (C2)	0,05	0,1

(Fuente: elaboración propia)

2.1.2.3 Determinación de toxinas lipofílicas (Veneno diarreogénico de los moluscos). Método biológico.

El método está basado en la extracción de las toxinas lipofílicas con acetona seguido por una partición con un solvente orgánico como éter etílico o diclorometano y agua. Este método, permite detectar la presencia de alguna de estas toxinas, sin embargo, no es específico por lo que requiere de una segunda técnica confirmatoria.

2.1.2.3.1 Preparación de la muestra



Para realizar los análisis de las toxinas lipofílicas, se utilizaron entre 100 y 150 g de tejidos provenientes de la glándula digestiva. Estos tejidos fueron mezclados con 300 mL de acetona y homogenizados mecánicamente utilizando un blender. Los extractos obtenidos fueron filtrados a presión reducida, conservando el filtrado y los residuos. Los residuos obtenidos, fueron extraídos nuevamente con 200 mL de acetona, mediante el mismo proceso descrito anteriormente. Posteriormente, los extractos acetónicos fueron combinados y evaporados en rotovapor (sin exceder los $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Una vez evaporados, el extracto fue suspendido con 100 mL de agua destilada en una probeta y separados por partición líquido-líquido con un volumen equivalente de diclorometano en un embudo de decantación, conservando la fase orgánica. Este proceso se realizó al menos tres veces, combinando la fase orgánica restante y lavando por última vez con 20 mL de agua. Los extractos fueron evaporados a sequedad y suspendidos con un volumen final de 4 mL de Tween 60 al 1 %.

2.1.2.3.2 Bioensayo

Para la realización del bioensayo, se inyectó 1 mL del extracto en Tween 60 por vía intraperitoneal a cada uno de tres ratones de 19 - 20 g de peso. Verificando la muerte de alguno de estos luego de 24 horas.

2.1.2.3.3 Expresión de resultados

Los resultados se consideraron como positivos para la presencia de toxinas lipofílicas si se detectaba la muerte de 2 de 3 ratones en 24 horas.

2.1.2.3.4 Análisis de toxinas lipofílicas en muestras de glándulas digestivas por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)



Para la extracción de toxinas, las muestras liofilizadas fueron homogenizadas utilizando un molino. Una porción de 0,6 g (equivalente a 3 g en peso húmedo), fue extraída dos veces con metanol (100%) en una proporción aproximada 1:4 (peso húmedo/volumen), mediante homogenización mecánica (Ultraturrax). Los extractos obtenidos fueron centrifugados ($10.000 \times g$, 10 min) recuperando el sobrenadante y posteriormente se filtrados utilizando filtros de jeringa (0, 45 μm) (Teknokroma).

Los análisis de toxinas lipofílicas se llevaron a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS), utilizando un sistema cromatográfico Accela MS, acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica TSQ Quantum Access Max, con interface electro-spray (HESI)(Thermo Fisher Scientific). El análisis de las muestras se realizó de acuerdo al método descrito por Gerssen *et al.* (2009) con algunas modificaciones (Blanco en preparación). El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo para detectar: ácido okadaico (AO), dinofisitoxinas (DTX1 y DTX2), yesotoxina (YTX) y algunos de sus análogos (Homo-YTX, 45-OH-YTX, 45-OH-Homo-YTX, COOH-YTX, COOH-Homo-YTX, Trinor YTX, COOH-45-OH-YTX) y el ácido secoico de la pectenotoxina 2 (PTXsa) y operado en modo positivo para detectar: ésteres del ácido okadaico (16:0 y 22:0), azaspirácidos (AZA 1-6), pectenotoxinas (PTX2, PTX11, PTX12) espirólidos (SPX) (SPX1, 20-Me G) y las gymnodiminas A y B.

En ambos todos los casos, las toxinas fueron detectadas en modo SRM (Selected Reaction Monitoring) siguiendo las transiciones descritas por Gerssen *et al.* (2009). Las toxinas fueron confirmadas por sus tiempos de retención y espectros de fragmentación con el material de referencia obtenido del IMB-NRC, Canadá. Los límites de detección de la técnica fueron: $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para el ácido okadaico, $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$ para las yesotoxinas, 1 ng mL^{-1} para los espirólidos $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para la pectenotoxina-2 y $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para los azaspirácidos.



2.1.2.3.5 Confirmación de perfiles toxicológicos de muestras de fitoplancton para toxinas lipofílicas, mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa acoplada a espectrometría de masas (HPLC –MS).

2.1.2.3.5.1 Detección de pectenotoxinas en *Dinophysis acuminata*

Para la extracción de toxinas en muestras de fitoplancton se utilizaron 30 mL de muestras de fitoplancton concentradas utilizando un filtro Nuclepore (12 µm). Las toxinas lipofílicas fueron extraídas desde los filtros utilizando metanol acuoso (80%). Adicionalmente, se realizaron análisis de 100 células de *Dinophysis acuminata*, previamente puestas en 1 mL de metanol (100%). En ambos casos, las muestras tratadas con ultrasonidos utilizando un sonicador Branson Sonic Power 250, con el propósito de liberar las toxinas de las células. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 8 minutos a 10.000 g y filtradas utilizando un filtro de nylon (0,22 µm). Finalmente, los extractos obtenidos fueron sometidos a una doble partición líquido: líquido, realizada con diclorometano. Las fracciones orgánicas obtenidas, fueron evaporadas a sequedad y suspendidas en 100 µL de metanol acuoso (80 %).

Los análisis de toxinas lipofílicas se llevaron a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS), utilizando un sistema cromatográfico con Surveyor MS, acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Deca XP plus, con interface electro-spray (Thermo Fisher Scientific).

La separación cromatográfica, fue realizada utilizando los métodos descritos por Quilliam (2003) y Suzuki *et al.* (2006), utilizando una columna cromatográfica C8 BDS Hypersil (50 mm × 2 mm, 3 µm) (Thermo Scientific) con una pre-columna C8 (4 mm × 2 mm, 3 µm) (Phenomenex). El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo para detectar ácido okadaico (AO), dinophysistoxina 2 (DTX2) y



dinophysistoxina 1 (DTX1), usando un voltaje de spray de 4 kV y una temperatura del capilar de 250 °C. Para el análisis de las pectenotoxinas, el espectrómetro fue operado en modo positivo con un voltaje de spray de 5 kV. En ambos casos, las toxinas fueron detectadas mediante SIM (Selected Ion Monitoring) y su confirmación mediante el espectro de masas de sus fragmentos obtenidos por CID (Collision Induced Dissociation) (MS/MS) mediante el modo “dependent scan” y por sus tiempos de retención y espectros de fragmentación con el material de referencia obtenido del IMB-NRC, Canadá. Para confirmar la presencia de formas esterificadas del ácido okadaico o las dinophysistoxinas, se realizó una hidrólisis alcalina siguiendo el procedimiento descrito por (Vale y Sampayo, 2002b) con pequeñas modificaciones que incluyeron un incremento en la temperatura y la omisión del lavado con hexano (Suzuki et al., 2006).

2.1.2.3.5.2 Detección de yesotoxinas en muestras de fitoplancton.

Para la extracción de yesotoxinas en muestras de fitoplancton se utilizaron 0,5 mL de muestras de fitoplancton previamente concentradas mediante arrastres verticales de una red de fitoplancton. Las muestras, fueron mezcladas con 1,5 mL de metanol (100%) y las yesotoxinas extraídas utilizando ultrasonidos mediante un sonicador Branson Sonic Power 250. Posteriormente, los extractos fueron centrifugados durante 20 minutos a 20.000 g y filtrados utilizando un filtro de nylon (0,22 µm).

La purificación de los extractos tóxicos, se realizó siguiendo el método descrito por Paz *et al.* (2006). Una alícuota de 0,5 mL de extracto fue mezclada con 1 mL de acetato de amonio (0,5 M) a pH 5,8 y cargada en un cartucho de extracción en fase sólida Bond Elut C18 (Varian) previamente acondicionado con metanol y acetato de amonio (pH 5.8) (0,5 M) (1:1) y la elución de las yesotoxinas con



metanol acuoso (80%). Finalmente, los extractos fueron concentrados utilizando un evaporador centrífugo Speed Vac (Thermo Fisher Scientific), para posteriormente ser suspendidos en 0.5 mL de metanol.

La presencia de yesotoxinas en los extractos fue confirmada mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS), utilizando un sistema cromatográfico con Surveyor MS, acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Deca XP plus, con interface electro-spray (Thermo Fisher Scientific) utilizando el método de Stobo *et al.* (2005). La separación cromatográfica, fue realizada utilizando una columna cromatográfica C8 BDS Hypersil (50 mm x 2 mm, 3 μ m) (Thermo Scientific) con una pre-columna C8 (4 mm x 2 mm, 3 μ m) (Phenomenex). El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo para detectar usando un voltaje de spray de 4000 V y una temperatura del capilar de 200 °C. Las yesotoxinas fueron monitorizadas mediante un escaneo completo (full scan) desde 950 a 1300 m/z y su confirmación mediante el espectro de masas de sus fragmentos obtenidos por CID (Collision Induced Dissociation) (MS/MS) mediante el modo "dependent scan" para iones seleccionados correspondientes a la yesotoxina (m/z 1141) y los principales análogos detectados normalmente en el plancton que corresponden a trinoxYTX (m/z 1047), noroxoYTX (m/z 1047), glycosilYTX, (m/z 1273), homoYTX (m/z 1155), 45-OHYTX (m/z 1157), 45-OHhomoYTX (m/z 1171), carboxyYTX, (m/z 1173), carboxyhomoYTX (m/z 1187) y 45-OHcarboxyYTX (m/z 1189).

Para confirmar la presencia de yesotoxina, el espectrómetro de masas fue operado en modo SIM (Selected Ion Monitoring) para controlando el ion $[M+H]^+$ (m/z 1141) y obteniendo su espectro de fragmentación en MS^2 y MS^3 , aplicando una energía de colisión suplementaria de 45%, para finalmente ser comparados con los tiempos de retención y espectros de fragmentación del material de referencia obtenido del IMB-NRC, Canadá. Adicionalmente, se realizaron los



análisis cromatográficos para la yesotoxina en muestras de fitoplancton utilizando la técnica descrita en el punto 2.1.2.3.4

2.2 Monitoreo cuantitativo y cualitativo de fitoplancton de cada una de las bahías contempladas en el estudio.

Para el monitoreo espacio-temporal de fitoplancton cualitativo y cuantitativo, se efectuó muestreos semanales en dos de las estaciones establecidas por PSMB en Bahía Inglesa (27° 07' L.S y 70° 52' L.O) (Fig. 10, Tabla III), Región de Atacama, Bahía Guanaqueros (30° 10' L.S. y 71° 24' L.O) (Fig.11, Tabla IV) y Bahía Tongoy (30° 16' L.S. y 71° 33' L.O) (Fig.12, Tabla V), Región de Coquimbo. Para el monitoreo semanal de las bahías se consideró los datos provenientes del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) realizado quincenalmente y un muestreo adicional en las semanas no contempladas en el programa en dos de las estaciones establecidas por PSMB. El muestreo semanal en Bahía Guanaqueros y Tongoy fue implementado en octubre de 2008. En Bahía Inglesa los muestreos semanales se iniciaron en diciembre de 2008, razón por la cual solo se tienen los resultados de PSMB para los meses de octubre y noviembre de 2008.

Tabla III. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Inglesa.

Estación	Frecuencia	Ubicación	
BI-01	7 días	S 27°06'27,0''	W 70°51'43,0''
BI-03	15 días	S 27°06'05,0''	W 70°51'49,0''
BI-05	7 días	S 27°07'17,0''	W 70°52'04,0''
BI-10	15 días	S 27°07'30,0''	W 70°54'25,0''

(Fuente: elaboración propia)

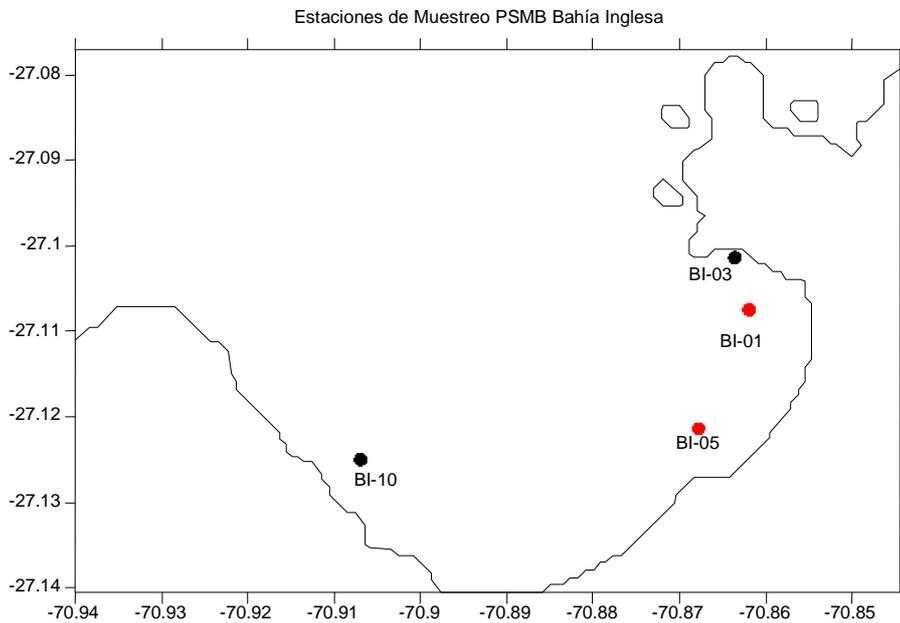


Figura 10. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Inglesa (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●). (Fuente: elaboración propia).

Tabla IV. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Guanaqueros.

Estación	Frecuencia	Ubicación	
G2	7 días	S 30°11'08,0"	W 71°25'39,0"
G3	15 días	S 30°11'00,0"	W 71°24'57,0"
G7	7 días	S 30°11'25,0"	W 71°25'33,0"
GCentinela	15 días	S 30°10'23,0"	W 71°24'53,0"

(Fuente: elaboración propia)

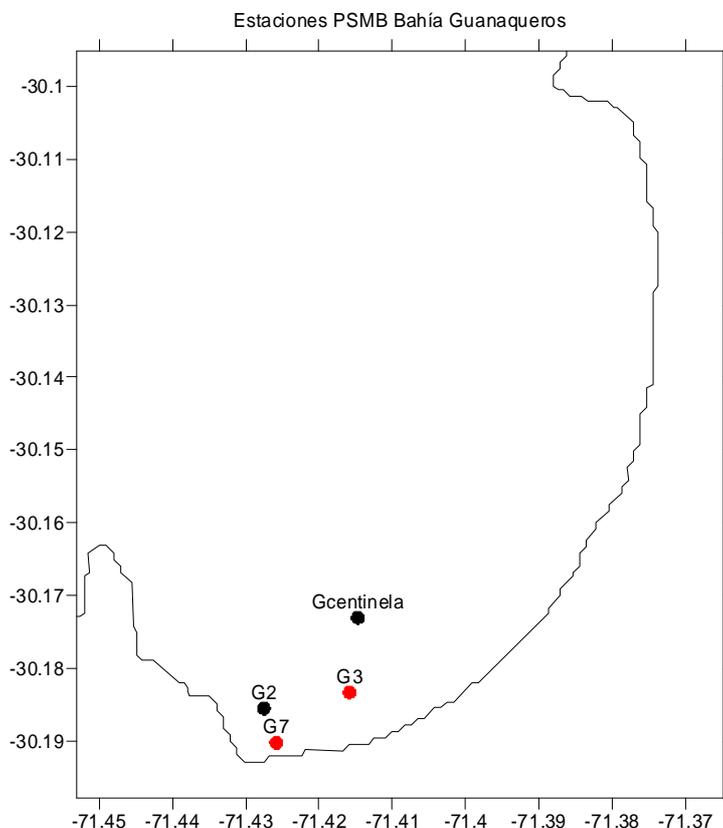


Figura 11. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Guanaqueros (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●). (Fuente: elaboración propia).

Tabla V. Estaciones y frecuencia de muestreo en Bahía Tongoy.

Estación	Frecuencia	Ubicación	
T3	15 días	S 30°15'43,0''	W 71°30'35,0''
T4	7 días	S 30°16'30,0''	W 71°32'07,0''
T5	7 días	S 30°16'26,0''	W 71°33'59,0''
T11	15 días	S 30°15'29,0	W 71°29'52,0''
Tvigia	15 días	S 30°14'48,0''	W 71°31'12,0''

(Fuente: elaboración propia)

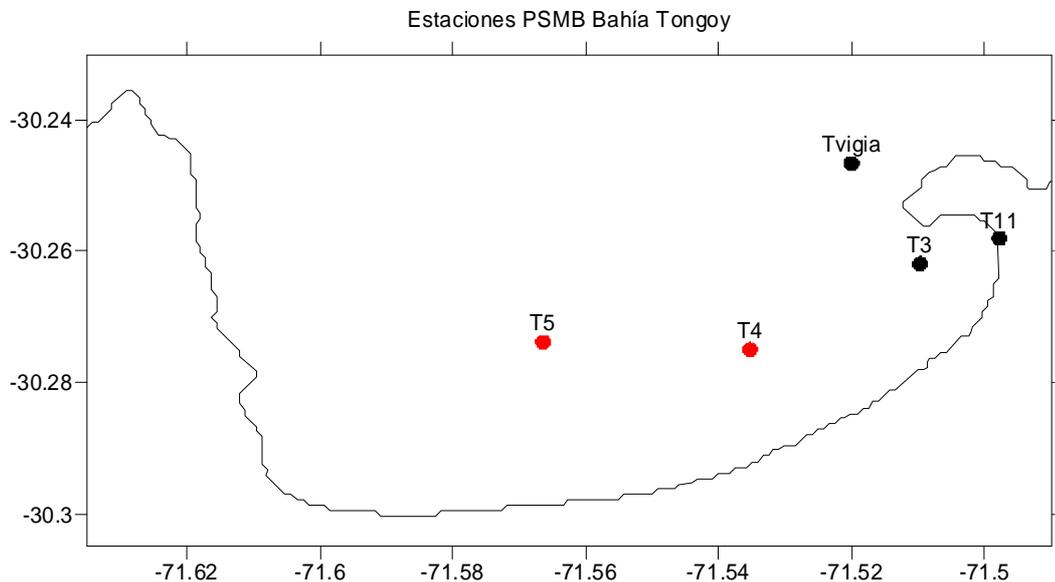


Figura 12. Ubicación de estaciones de muestreo de Fitoplancton establecidas por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos en Bahía Tongoy (●) y las estaciones seleccionadas durante este estudio (●)(Fuente: elaboración propia).

2.2.1 Muestreo y análisis cualitativo de fitoplancton

Las muestras para el análisis cualitativo del fitoplancton, se tomaron con una red cónica estándar con una malla de 23 μm de apertura de poro, realizando 3 arrastres verticales desde los 15m de profundidad a superficie por estación de muestreo, para conformar una sola muestra de 130 mL, la cuales fueron almacenada en botellas plásticas de 150 mL y fijadas con formaldehído al 5 %.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio invertido con contraste de fase Olympus modelo *CKX41* y fotografiadas utilizando una cámara fotográfica digital Olympus. Las fotografías de las especies fitoplanctónicas tóxicas o nocivas fueron analizadas utilizando el programa Image-Pro Plus 4.5, que fue previamente calibrado utilizando un ocular micrométrico Zeiss (0,8 μm de precisión).



La abundancia de cada una de las especies fitoplanctónicas presentes en las muestras de red, se clasificaron utilizando un índice de abundancia relativa (Tabla VI).

Tabla VI. Índice de abundancia relativa del fitoplancton analizado en muestras cualitativas.

Escala	Nivel	Células
Raro	1	1 – 10
Escaso	2	11 – 30
Abundante	3	31 – 100
Muy Abundante	4	> 100

(Fuente: SERNAPESCA)

2.2.2 Muestreo y análisis cuantitativo de fitoplancton

Las muestras volumétricas para el análisis cuantitativo de fitoplancton, se tomaron con una manguera según de 15 m de longitud y 1” de diámetro (Lindahl, 1986), que se encuentra estandarizada para los análisis de PSMB. Las muestras fueron almacenadas en botellas plásticas 150 mL y fijadas con 2 gotas de una solución concentrada de lugol, permaneciendo en oscuridad hasta el momento de análisis. Además, de esta muestra se almacenaron 5 L agua sin fijar, la que posteriormente se filtró con una malla de 10 μm para concentrar los nanoflagelados.

Los análisis cuantitativos fueron realizados siguiendo el método de Utermöhl (1958), utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41. En cada análisis, se contabilizó la cantidad de microalgas sedimentadas en el fondo de una cámara de 10 mL siguiendo las recomendaciones descritas por Hasle (1978), expresando los resultados en células L^{-1} .



2.3 Identificación taxonómica del fitoplancton toxico o nocivo encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio.

2.3.1 Especies productoras de toxinas amnésicas.

Los análisis cualitativos se realizaron utilizando un microscopio fotónico Olympus modelo *IX71* con contraste de fases. En tanto, los análisis cuantitativos se realizaron con la técnica de Utermöhl (Hasle, 1978), utilizando un microscopio invertido Olympus modelo *CKX41*.

Los análisis taxonómicos de las muestras de fitoplancton y de las células obtenidas en cultivo, fueron realizados mediante la utilización de microscopia electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron preparadas siguiendo la metodología descrita por Lundholm et al. (2002b) y fueron analizadas por el Centro Mediterráneo de Investigaciones Marinas y Ambientales perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España, utilizando un microscopio electrónico Hitachi S-3500N.

2.3.2 Especies productoras de toxinas paralizantes

Los análisis cualitativos se realizaron utilizando un microscopio fotónico invertido Olympus modelo *IX71* utilizando técnicas fluorimétricas. Adicionalmente, para lograr una mejor identificación de células del género *Alexandrium*, se procedió a disgregar las placas de la teca con hipoclorito de sodio. En tanto, los análisis cuantitativos se realizaron con la técnica de Utermöhl (Hasle, 1978), utilizando un microscopio invertido Olympus modelo *CKX41*.

2.3.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas

2.3.3.1 *Dinophysis acuminata*



Los análisis cualitativos se realizaron utilizando un microscopio fotónico Olympus modelo *IX71* con contraste de fases. En tanto, los análisis cuantitativos se realizaron con la técnica de Utermöhl (Hasle, 1978), utilizando un microscopio invertido Olympus modelo *CKX41*, debido a la baja densidad que presenta esta especie se realizó un recuento de la cámara completa de 10 mL.

2.3.3.2 *Protoceratium reticulatum*

Los análisis cualitativos se realizaron utilizando un microscopio fotónico Olympus modelo *IX71* con contraste de fases. En tanto, los análisis cuantitativos se realizaron con la técnica de Utermöhl (Hasle, 1978), utilizando un microscopio invertido Olympus modelo *CKX41*, debido a la baja densidad que presenta esta especie se realizó un recuento de la cámara completa de 10 mL.

Para preparar las muestras de fitoplancton que contienen dinoflagelados tecados para en el microscopio electrónico de barrido. Se dispuso de muestras de fitoplancton obtenidas desde Bahía Mejillones. Estas muestras, fueron lavadas 3 veces utilizando tampón cacodilato (0,1 M; pH 7,2) durante una hora cada vez. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en OsO_4 , lavando nuevamente con el tampón de cacodilato. Luego, se realizó la deshidratación de la muestra durante 15 minutos en una escala de etanol creciente desde 10% hasta 100%, realizando el proceso 2 veces para este último solvente orgánico. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento pero cambiando la solución por una de amilacetato en proporciones de (25:75, 50:50, 75:25 y 2 x 100%). Finalmente, las muestras fueron deshidratadas mediante la técnica de punto crítico y cubierta con oro paladio. Los análisis fueron realizados utilizando un microscopio electrónico de barrido ESEM FEI Quanta 200 en el Servicio de Microscopia Electrónica perteneciente al CACTI de la Universidad de Vigo.

2.4 Evaluación sensorial para determinar la distribución anatómica del sabor amargo en *Argopecten purpuratus*

Para determinar cómo se distribuye la intensidad del sabor amargo en los principales órganos o tejidos de la vieira, se obtuvieron 50 individuos que adquirieron el sabor amargo de forma natural durante floraciones de la diatomea *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Inglesa el verano de 2008.

Los bivalvos fueron transportados inmediatamente al laboratorio donde se procedió a lavarlos. Una vez lavados fueron separados aleatoriamente en cinco grupos de diez vieiras cada uno. Cada individuo fue desconchado, lavado y diseccionado en glándula digestiva, manto, branquias, gónada y musculo aductor (Fig.13).

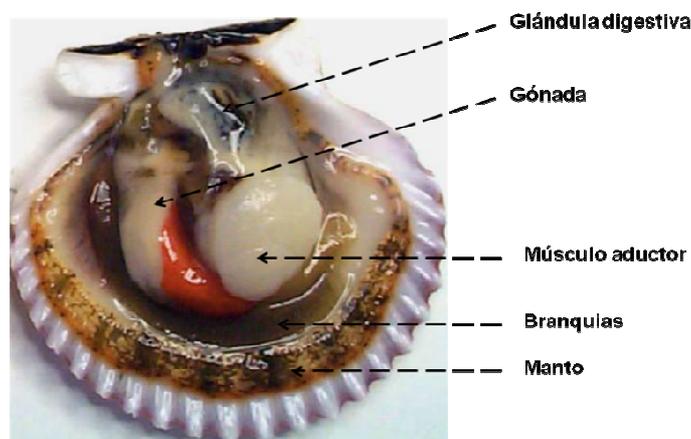


Figura 13. Principales órganos y tejidos en *Argopecten purpuratus*. (Fuente: elaboración propia)

Los diferentes órganos y tejidos obtenidos de cada grupo de vieiras fueron sometidas a una evaluación sensorial para determinar la intensidad del sabor amargo en cada uno de ellos. El panel de evaluadores estuvo constituido por voluntarios pertenecientes al Laboratorio de Producción Primaria y Fitoplancton de



la Universidad Católica del Norte, quienes clasificaron el sabor amargo utilizando la clasificación establecida por Parry et al. (1989) (Tabla VII).

Tabla VII. Clasificación numérica para la intensidad del amargo en tejidos de *Argopecten purpuratus*.

Sabor	Escala
No Amargo	0
Débilmente amargo	0+
Amargo	1
Amargo, pero que puede ser ingerido	2
Amargo, que no permite ser ingerido	3
Extremadamente amargo	4
Extraordinariamente amargo	5

(Fuente: adaptado de Parry et al. 1989)

2.5 Progreso en la purificación e identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos.

2.5.1 Obtención de la muestra y caracterización preliminar.

Para iniciar los estudios de purificación, se obtuvieron 2 kg de gónadas de vieira (*Argopecten purpuratus*) extraídas durante el verano de 2008 de Bahía Inglesa. Las gónadas obtenidas fueron liofilizadas y sometidas a un proceso de evaluación sensorial para verificar que el sabor amargo persiste en estos tejidos.

Una sub-muestra de 50 g (de gónada rehidratada) fue utilizada para determinar el procedimiento óptimo de extracción del compuesto amargo. Para esto, el proceso de extracción se realizó utilizando en primer lugar agua Milli-Q gradient en una proporción 1 g y 4 mL y homogenizando mecánicamente utilizando un Utraturrax (IKA). Los extractos obtenidos fueron centrifugados durante 20 minutos a 3.000 g y el sobrenadante almacenado y mantenido a -20°C. El material decantado por centrifugación fue extraído nuevamente utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente pero utilizando como solvente metanol acuoso en concentración



creciente desde 30 a 100%, para finalizar con una extracción con acetona. Una vez obtenidos los extractos, una alícuota de 10 mL de cada uno de ellos fue evaporada y concentrada utilizando un evaporador SpeedVac (Thermo Scientific) para posteriormente ser suspendidas en etanol acuoso (50%) y ser sometidas a una evaluación sensorial. La evaluación sensorial fue realizada por un panel de voluntarios del Centro de Investigaciones Mariñas utilizando una escala numérica para describir el sabor y el color de los extractos.

Para expresar la intensidad del sabor amargo presente en cada extracto, se utilizó una modificación de la clasificación utilizada por Parry et al. (1989) (Tabla VIII). En relación al color, se utilizó una escala simbólica que permita comprender el grado de coloración de la muestra (Tabla IX).

Tabla VIII. Clasificación numérica para determinar la intensidad del sabor amargo en extractos obtenidos de gónadas de *Argopecten purpuratus*.

Sabor	Escala
No Amargo	0
Débilmente Amargo	0+
Amargo	1
Muy Amargo	2
Extremadamente amargo	3
Extraordinariamente amargo	4

(Fuente: adaptado de Parry et al. 1989)

Tabla IX. Escala simbólica para describir el grado de coloración de los extractos obtenidos de gónadas de *Argopecten purpuratus*.

Color	Escala
Sin color	–
Débil	+
Intenso	++
Muy Intenso	+++

(Fuente: elaboración propia)



2.5.2 Determinación del tamaño molecular aproximado del compuesto amargo

Para determinar el tamaño molecular aproximado del compuesto amargo, se realizó un fraccionamiento mediante ultrafiltración. Para esto, una alícuota de 400 μ L del extracto amargo en etanol 100% fue sometida a ultrafiltración utilizando ultrafiltros de 10 y 3 kDa (Pall Corporation NanoSEP OMEGA). Cada filtro que contenía la muestra fue centrifugado a 48000 g y la fracción del extracto que atravesó las membranas sometidas a evaluación sensorial para determinar la presencia del compuesto amargo.

2.5.3 Determinación de la carga del compuesto amargo

Para determinar el tipo de carga que posee el compuesto amargo, se utilizaron dos cartuchos cromatográficos de intercambio iónico, uno de intercambio aniónico débil Strata-X AW (60 mg) (Phenomenex) y de intercambio catiónico débil Strata-X CW (60 mg) (Phenomenex).

2.5.4 Determinación de las características de retención en fase reversa y normal

Para determinar la retención en fase reversa del compuesto amargo, se utilizaron diferentes tipos de columnas cromatográficas con fases de distinta naturaleza química. Para esto, se utilizaron columnas dos columnas cromatográficas de fase reversa que fueron Prodigy C8 (250 x 4.6 mm; 5 μ m) (Phenomenex), Luna C18 (250 x 10 mm; 5 μ m) (Phenomenex) y tres cartuchos de extracción en fase sólida, el primero de ellos de fase reversa Strata – X (60 mg) (Phenomenex) y dos de fase normal: sílice (500 mg)(Waters) y aminopropil (500 mg) (Waters).

2.5.5 Ensayo de digestión con tripsina para comprobar la posible naturaleza proteica del compuesto

Para comprobar si el compuesto amargo es de naturaleza proteica, una alícuota del extracto amargo en agua fue sometida a una digestión con tripsina (1 mg mL^{-1}) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en buffer fosfato (10 mM) y salino (0.15 M) a pH 7.3 durante 24 horas.

2.5.6 Extracción del compuesto amargo para su purificación

Para la realización del grueso del estudio se utilizaron 6 kg de gónadas de vieira (*Argopecten purpuratus*) obtuvieron de Bahía Inglesa. Estas fueron donadas por la Compañía Pesquera Camanchaca que se encontraba elaborando productos congelados en formato “roe off” para el mercado Norteamericano, en el cual sólo se utiliza el músculo aductor.



Figura 14. Proceso de extracción del compuesto amargo desde las gónadas liofilizadas de *Argopecten purpuratus*. (Fuente: elaboración propia).

Se realizó la extracción de las gónadas liofilizadas (6 kg húmedos, 1.5 kg liofilizados) utilizando una mezcla de acetona y metanol (2:3 v:v) con una proporción de 1 g de gónada liofilizada por cada mL de solvente, y homogenizando mecánicamente utilizando un procesador de alimentos (Fig. 14).



Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante evaporado utilizando rotavapor.

2.5.7 Purificación del compuesto utilizando Sephadex LH-20

Para realizar la purificación del compuesto amargo en los extractos obtenidos, la separación cromatográfica fue realizada utilizando cromatografía de exclusión molecular (SEC) con Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Sciences) como fase estacionaria y una columna cromatográfica abierta de 80 cm de longitud y 20 cm de diámetro rellena con 1.5 kg de fase estacionaria y un volumen de carga de 50 mL (Fig.15A). La primera purificación se realizó utilizando metanol 100% como fase móvil (Fig. 15B), mientras que la segunda purificación se realizó utilizando una mezcla de metanol, cloroformo y n-hexano en proporción 1:1:1 (Fig.15C).

En ambos casos, para comprobar el contenido de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna, estas fueron estudiadas utilizando cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas cromatográficas de Silica gel 60 F (Merck), las que fueron eluidas con una mezcla de benceno: acetona : metanol y ácido acético (6 N) en proporción 150:80:19:1, respectivamente. El revelado de las placas se llevó a cabo por visualización bajo luz UV (254 nm y 310 nm) y por revelado con ácido molibdofosfórico. Las fracciones que presentaban el mismo perfil cromatográfico obtenido por TLC, fueron mezcladas para posteriormente ser evaporadas y luego suspendidas en etanol 50% para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.

La fracción amarga obtenida en la etapa anterior, fue purificada nuevamente mediante Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Sciences). En este caso, se utilizó una columna de vidrio cerrada de 25 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud (Omnifit Diba Industries) que se relleno con 25 g de fase estacionaria lo que corresponde a 200 mm de lecho (Fig.16). En cada inyección, se utilizó 1 mL

de extracto con una concentración de 200 mg mL^{-1} . La elución se realizó en modo isocrático con metanol, cloroformo y n-hexano en proporción 1:1:1 como fase móvil a un flujo de 1.2 mL min^{-1} , colectando fracciones cada 3.6 minutos con un colector de fracciones Gilson 203B hasta completar un volumen y medio de la columna. Tal como se realizó en las etapas anteriores, el contenido de cada una de ellas se comprobó mediante cromatografía en capa fina utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente. Las fracciones que presentaban el mismo perfil cromatográfico obtenido por TLC, fueron mezcladas para posteriormente ser evaporadas y luego suspendidas en etanol para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.

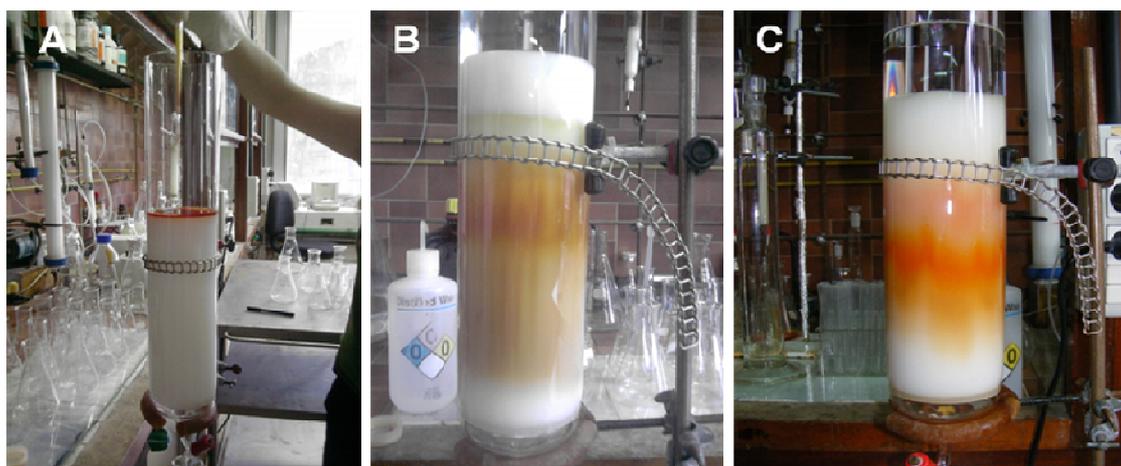


Figura 15. Purificación del compuesto amargo extraído de gónadas de *Argopecten purpuratus*, utilizando cromatografía SEC con fase estacionaria Sephadex LH-20. (A) carga del extracto (B) primera purificación (C) segunda purificación. (Desarrollado en las instalaciones del Instituto de Bio-Orgánica de la Universidad de La Laguna). (Fuente: elaboración propia).

En las fases finales se utilizaron columnas empaquetadas con la misma fase estacionaria pero de menor diámetro para mejorar la separación cromatográfica. Se utilizó una columna de vidrio cerrada (Omnifit Diba Industries) de 10 mm de

diámetro interno y 250 mm de longitud utilizando como fase móvil la mezcla de metanol, cloroformo y n-hexano en proporción 1:1:1 a un flujo de 0.2 mL min^{-1} .



Figura 16. Purificación del compuesto amargo utilizando cromatografía SEC con fase estacionaria Sephadex LH-20 en columna cerrada. (Fuente: elaboración propia).

2.5.8 Evaluación de la posibilidad de purificación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, fase normal e interacción hidrofílica.

Para continuar con el proceso de purificación del compuesto amargo, se realizaron pruebas para verificar si este podía ser separado de sus compuestos acompañantes mediante la aplicación de diferentes modos de separación cromatográficos. Estos fueron evaluados dependiendo de la naturaleza química del relleno de la columna en:

- Fase reversa mediante columnas: Luna C18 (250 x 10 mm; 5 μm) (Phenomenex) y una POPLC C30 (80 x 3 mm; 5 μm)(Bischoff Scientific).



-
- Fase normal mediante columnas: POPLC Cianopropil (80 x 3 mm; 5 μ m) y POPLC Fenil (80 x 3 mm; 5 μ m) (Bischoff Scientific).
 - Interacción hidrofílica utilizando una columna Kinetex HILIC (50 x 2.1 mm; 2.6 μ m) (Phenomenex).

Todos las técnicas se realizaron utilizando un sistema cromatográfico equipado con una bomba Surveyor LC Pump (Thermo Scientific), un autosampler 717 plus (Waters) y un detector de diodos PDA Plus detector (Thermo Scientific), monitorizando una longitud de onda entre 190 y 360 nm. En todos los casos, se colectaron fracciones cada minuto utilizando un colector Gilson 203B.

Finalmente, todas las fracciones fueron evaporadas y luego suspendidas en etanol para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.

2.5.9 Purificación por extracción en fase solida (SPE)

Debido a la gran cantidad de compuestos detectados por TLC en las fracciones donde se encuentra el sabor amargo resulta de interés, si es posible, encontrar estrategias que permitan retener estos interferentes o retener el compuesto que da sabor amargo a los bivalvos. Para esto, se evaluaron diferentes estrategias de purificación del extracto amargo utilizando extracción en fase solida (SPE) en fase normal. Las fases cromatográficas utilizadas fueron: sílice (500 mg) (Waters), Florisil (500 mg) (Waters) y Aminopropil (NH₂) (500 mg) (Waters). Finalmente, todas las fracciones fueron cromatografiadas por TLC evaporadas y luego disueltas en etanol para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.



2.5.10 Purificación del compuesto amargo mediante la utilización de resinas de adsorción

Otra de las metodologías utilizadas para purificar el extracto que contiene el compuesto químico que da sabor amargo a los bivalvos fue la utilización de resinas de adsorción. Para esto se escogió DIAION HP20 (Mitsubishi Chemicals Co), que se había comprobado previamente que era capaz de retener el compuesto amargo en metanol 80%, y que fue empaquetado en una columna de vidrio cerrada de 25 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud (Omnifit Diba Industries) hasta formar un lecho de 200 mm de longitud. En cada inyección, se utilizó 1 mL de extracto con una concentración de 200 mg mL⁻¹. La elución se realizó en modo isocrático con metanol 100% a un flujo de 1 mL min⁻¹, colectando fracciones cada 5 minutos con un colector de fracciones Gilson 203B hasta completar un volumen y medio de la columna. Tal como se realizó en las etapas anteriores, el contenido de cada una de ellas se comprobó mediante cromatografía en capa fina utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente. Las fracciones que presentaban el mismo perfil cromatográfico obtenido por TLC, fueron mezcladas para posteriormente ser evaporadas y luego suspendidas en etanol para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.

Finalmente, se utilizó una columna de vidrio cerrada (Omnifit Diba Industries) de 10 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud con DIAION HP20SS (Mitsubishi Chemicals Co) que se eluyó con metanol 100 % como fase móvil, a un flujo de 0.1 mL min⁻¹. Las fracciones que presentaban el mismo perfil cromatográfico obtenido por TLC, fueron mezcladas para posteriormente ser evaporadas y luego suspendidas en etanol para ser sometidas a una evaluación sensorial y determinar cual o cuales eran amargas.

2.5.11 Análisis de los extractos a espectrometría de masas

Los análisis de los extractos obtenidos de la última purificación del compuesto amargo realizada con Sephadex LH20, se llevaron a cabo mediante Espectrometría de Masas utilizando un sistema cromatográfico un espectrómetro de masas de trampa iónica Deca XP plus, con interface Nano-spray (Thermo Fisher Scientific).

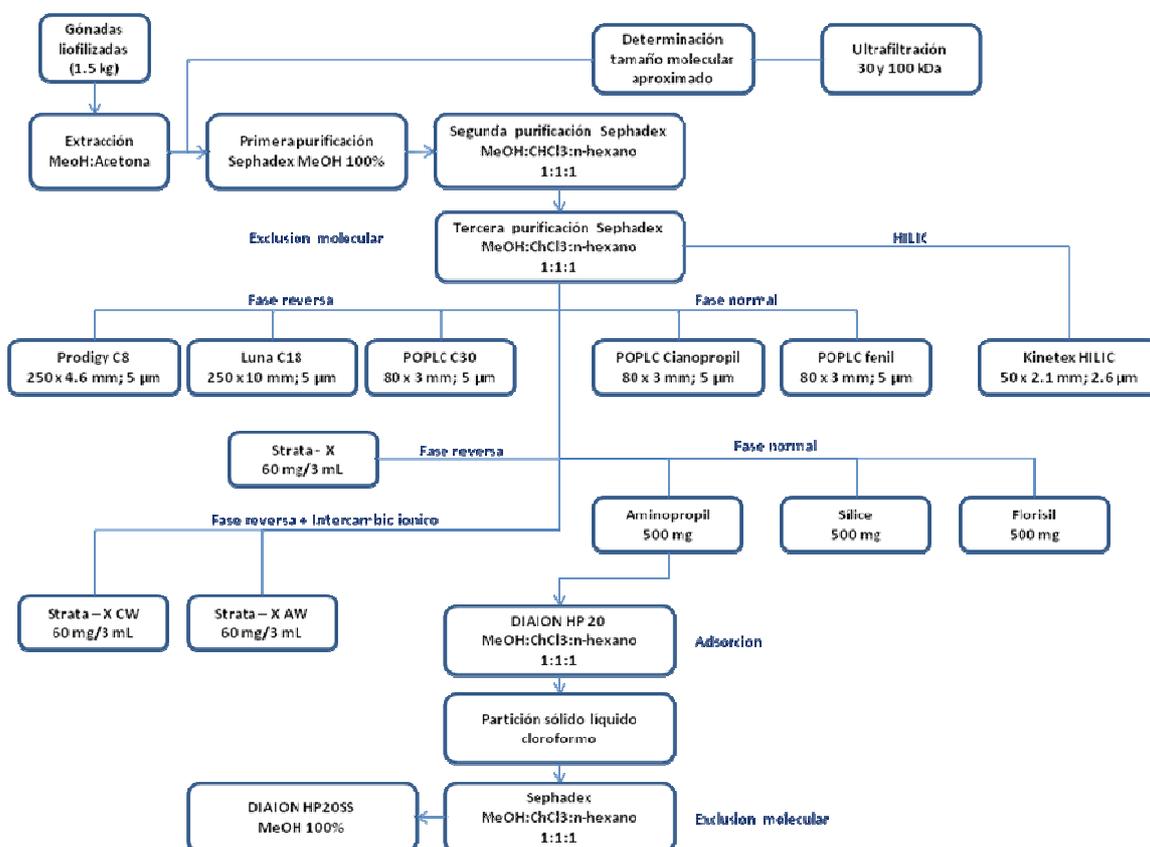


Figura 17. Resumen de las diferentes técnicas utilizadas durante el desarrollo de experimentos que permitieron purificar el compuesto amargo que da sabor a los bivalvos. (Fuente: elaboración propia).



Los análisis fueron desarrollados utilizando una sonda Nano-spray en modo estático. Para los análisis, una alícuota de 5 μL de cada extracto fue cargada en un capilar de vidrio con revestimiento metálico (PicoTip Emitter) (5.2 mm x 2 ± 0.5 μm). El espectrómetro de masas fue operado en modos Full scan, Zoom Scan, MS2 y MS3, en positivo, con un voltaje de spray de 1 kV, realizando un MSn a los iones moleculares más abundantes, y en full scan en modo negativo, con un voltaje de spray de 2kV.

2.5.12 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en un espectrómetro Bruker AMX 500 (Fig. 18), operando a 300.12 y 75.42 MHz para los núcleos de ^1H y ^{13}C respectivamente, y usando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3).

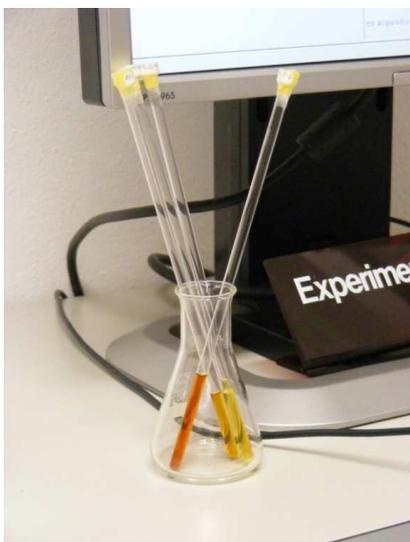


Figura 18. Extractos amargos semi-purificados de gónadas de *Argopecten purpuratus* (izquierda). Espectrómetro Bruker AMX 500 (derecha) perteneciente al Instituto de Bio-orgánica de la Universidad de La Laguna, Tenerife. (Fuente: Elaboración propia).



2.6 Identificación de quistes obtenidos de las bahías incorporadas en el estudio

Para el estudio de la identificación de quistes, se obtuvieron muestras de sedimentos en Bahía Mejillones (Región de Antofagasta), Bahía Inglesa (Región de Atacama), Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy (Región de Coquimbo).

Los muestreos en Bahía Mejillones y Bahía Inglesa, se realizaron manualmente mediante buceo, arrastrando por la superficie un recipiente plástico de boca ancha (250 mL), de manera de recoger los primeros 2-3 cm superficiales en fondos preferentemente limoso-arcilloso en sectores someros de la bahía. En las Bahías Guanaqueros y Tongoy se realizó un muestreo mediante draga, debido a que el sedimento limo-arcilloso se encuentra bajo los 40 m de profundidad (Berrios y Olivares, 1996). Las muestras se tomaron por triplicado y mantuvieron refrigeradas a 4 °C y en oscuridad hasta el momento de su procesamiento en laboratorio.

En Bahía Mejillones, con fecha 29 de marzo, se realizó un muestreo de sedimentos en el cual se consideraron seis estaciones (Fig. 19) escogidas por los estudios de granulometría existentes en la Bahía (Valdés *et al.*, 2005). Cuatro de ellas se ubicaron en el sector de La Rinconada, donde se encontraba el centro de cultivo de la empresa Grimar Norte Ltda y dos estaciones en el sector del muelle del puerto Mejillones.

Debido al cierre de la totalidad de las empresas de cultivos de ostiones en la Región de Antofagasta como es el caso de Bahía Mejillones, con posterioridad a la presentación del proyecto, no permitió realizar un muestreo periódico de parámetros ambientales, fitoplancton y toxinas a los ostiones de cultivo, por lo que solamente se realizó un estudio de quistes de dinoflagelados en sedimentos. Sin embargo, nuestro equipo de trabajo, había realizado estudios previos en la zona en conjunto con la empresa que desarrollaba el cultivo de este bivalvo en esta zona geográfica. De este modo, se presentan los resultados de tres floraciones algales producidos por dinoflagelados potencialmente tóxicos.

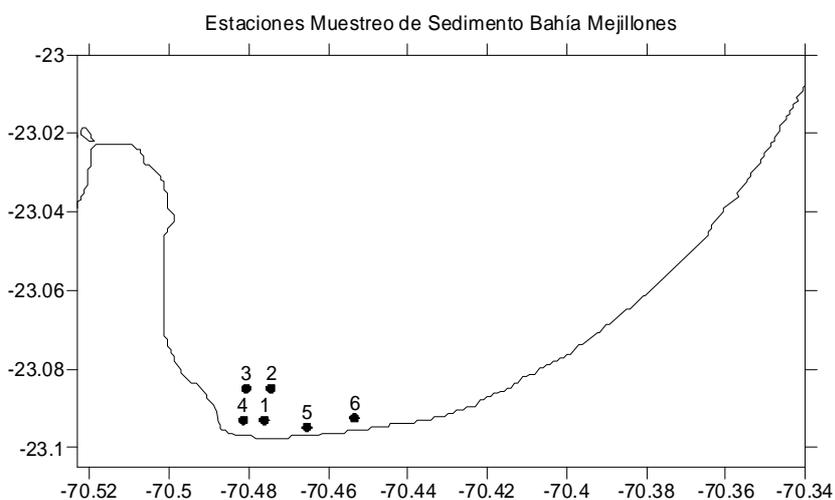


Figura 19. Ubicación de estaciones de muestreo de sedimento en Bahía Mejillones. (Fuente: elaboración propia).

2.6.1 Procesamiento de las muestras de sedimentos

Las muestras fueron procesadas según metodología descrita por (Matsuoka y Fukuyo, 2000), que consiste en la limpieza de los quistes para eliminar arena y detritus utilizando ultrasonidos, seguido por lavados sucesivos y el filtrado a través de tamices de 80, 35, 20 μm . La muestra final fue transferida a un volumen de 3 mL de agua de mar microfiltrada 0,45 μm .

2.6.2 Análisis de muestras

Los quistes fueron identificados utilizando un microscopio invertido Olympus Modelo IX71 con contraste de fase y fluorescencia. Estos fueron digitalizados, utilizando una cámara fotográfica Jenoptix ProgRes C3 cool. Las fotografías obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ProgRes Capture Pro 2.5, que fue previamente calibrado utilizando un ocular micrométrico Zeiss (0,8 μm de



precisión). Para la identificación de los quistes, se consultó la bibliografía de Evitt, (1985); Blanco (1989a); Blanco (1989b); Blanco (1989); Matsuoka y Fukuyo (2000); Lembeye (2004).

2.7 Monitoreo de variables oceanográficas y meteorológicas de las principales bahías en las que se desarrollara el estudio.

2.7.1 Temperatura del mar

Se instaló una cadena de termistores (Stowaway TidbiT Temp) a 5, 10, 15 y 20 m programados para registrar la temperatura (°C) cada 5 minutos en bahía Inglesa y bahía Tongoy. La cadena de termistores de Tongoy fue instalada por primera vez en septiembre del 2008 y mantenida hasta el 18 de diciembre de 2008, se volvió a fondear el 15 de enero de 2009, mientras que los termistores de Bahía Inglesa se fondearon el 5 de diciembre. Ambas cadenas han sido mantenidas hasta la fecha.

2.7.2 Variables meteorológicas

Se instalaron dos estaciones meteorológicas HOBO Weather Station Starter System (H21-SYS-A), una en bahía de Coquimbo, el día 25 de noviembre del 2008 y la otra en Bahía Inglesa el día 5 de diciembre de 2008. Cada estación fue programada para registrar la presión atmosférica (mBar), viento (magnitud ($m s^{-1}$) y dirección (grados), temperatura del aire (°C), humedad relativa (%) y la radiación incidente (μE) cada 10 minutos. Esta última, se determinó como radiación acumulada y sus unidades en mE.

Con la información de viento se calcularon los índices de surgencia (IS) (Bakun, 1973; Bakun, 1975 ; Bakun, 1987) y de turbulencia (IT) (Bakun y Parrish, 1982) que corresponde al cubo de la magnitud del viento. El índice de surgencia se calculó por medio de la ecuación:



$$IS = \frac{\tau_y}{f}$$

donde τ_y es el esfuerzo tangencial del viento sobre la superficie en la dirección norte-sur; $f = 2\omega \sin \lambda$ es el Coriolis, siendo λ la latitud.

El esfuerzo tangencial se calculó por medio de la expresión:

$$\tau_y = \rho_a c_d v |w|$$

Siendo ρ_a la densidad del aire (1.25 kg/m^3); c_d el coeficiente de arrastre (el que puede ser constante o variar con la intensidad del viento); v es la componente norte-sur del viento y $|w|$ es la magnitud del viento.

2.8 Impactos económicos generados por la aparición de floraciones algales nocivas en la industria pectinicultora en el norte de Chile.

El impacto económico producido por los cierres cautelares decretados por el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB), para las bahías Mejillones, Inglesa, Guanaqueros y Tongoy, donde se cultivaba más del 95% de los ostiones, dependería de la época del año.

En estas bahías, la cosecha de ostiones se realiza de manera fraccionada durante ciertas épocas del año. Durante el año 2007, cuando la industria pectinicultora estaba en plena actividad, el principal destino de las exportaciones fue Francia (77%) y el principal formato de exportación fue IQF con un valor aproximado de 1.653,8 ton. Para lograr esta producción, las empresas cosechaban el 30% de producción antes del 30 de octubre con el objetivo de llegar antes de navidad para obtener un mejor precio. Posteriormente desde fines de octubre a principios de febrero las empresas cosechan aproximadamente el 55%, y el 15% durante el



resto del año. Por esta razón, los cierres cautelares por FANs no provocarían el mismo impacto económico a lo largo del año, siendo más fuerte en la época primavera-verano.

También es importante señalar que en algunas ocasiones, las empresas detienen la cosecha debido a desoves naturales de los ostiones con periodos que van desde los 30 días en otoño-invierno y alrededor de 5 días en primavera-verano a la espera que estos maduren y aumentar el rendimiento. El tiempo más corto de recuperación del índice gonado-somático del ostión en primavera-verano, se debe a que hay más alimento fitoplanctónico en el agua. Los tiempos de no cosecha por desoves, es muy similar a los tiempos de cierres cautelares por FANs, como es por VAM (*Pseudo-nitzschia australis*) y por VPM o VDM, que hasta el momento han sido de corta duración (10 a 15 días), lo que significa que no es un gran impacto económico para las empresas por estos tipos de FANs. No ocurre lo mismo con el amargo de los moluscos (*Rhizosolenia imbricata*), evento que puede durar hasta dos meses.

Dado que la mayor cantidad de eventos de floraciones de algas nocivas y cierres cautelares se dio en Bahía Inglesa, se escogió a Compañía Pesquera Camanchaca S. A. como sujeto de estudio debido a sus volúmenes de producción (636.7 ton IQF, 2007), con buen registro de información (tasa de crecimiento y mortalidad de los ostiones) y exporta el total de su producción. El costo de producción de Camanchaca asciende a los aproximadamente a los US\$ 13 el kilo, siendo el rango de costos de las restantes empresas entre US\$ 9 y US\$ 13 el kilo para el año 2010. Cabe señalar que las empresas de la II Región dieron término a esta actividad entre el 2007 y 2008, posteriormente lo hicieron empresas de la III y IV Región, entre el 2008 y 2009 por el bajo valor que fue cotizado este producto en el mercado internacional.



2.8.1 Período de los eventos

Durante la ejecución del estudio se presentaron dos eventos de floraciones algales nocivas en que se decretaron cierres, uno que comprendió desde el 30 de enero de 2008 al 26 de marzo de 2008 y un segundo evento que comprendió desde el 03 de diciembre de 2008 al 04 de febrero de 2009.

2.8.2 Catastro de empresas exportadoras y su peso relativo en la producción total.

La determinación del número de empresas exportadoras que participaban del mercado para los periodos analizados se realizó consultando las bases de datos de ProChile. En base a las exportaciones valorizadas en dólares se calculó su peso relativo sobre el total exportado por el país para los años 2007, 2008 y 2009.

2.8.3 Recopilación de información primaria.

Se diseñó un cuestionario para recopilar la siguiente información relevante para la determinación del impacto de los cierres en las empresas cultivadoras, incluyendo antecedentes como:

- Costo total de operación durante el período sin realizar cosechas
- Número de ostiones no cosechados en los periodos
- Costo total por ostiones muertos en los periodos
- Número de trabajadores desvinculados durante el periodo o no contratados
- Salario promedio pagado por trabajador desvinculado
- Valor de los embarques comprometidos y no realizados a causa de los eventos
- Costo total por periodo adicional en muestreo y análisis de laboratorio.



La información fue solicitada a la empresa Camanchaca como representativa del sector. Con esto fue posible obtener los montos que la empresa dejó de percibir y los costos adicionales en los que se tuvo que incurrir debido a los cierres.

2.8.4 Extrapolación y determinación del impacto

Una vez sistematizados los datos recopilados se extrapoló el impacto a la totalidad del sector, en las 3 regiones en estudio, para un año calendario, en base al peso relativo de cada empresa que informó exportaciones en ProChile para el periodo bajo análisis. Con esto el impacto económico mostrado por Camanchaca es el equivalente al 37% promedio del impacto total en la industria, siendo 6 empresas las principales productoras y exportadoras para el periodo en estudio.

3. Resultados

3.1 Análisis semanales de biotoxinas marinas e identificación de perfiles tóxicos en *Argopecten purpuratus* extraídos de cada una de las bahías contempladas en el estudio, mediante HPLC y HPLC-MS.

3.1.1 Bahía Inglesa

3.1.1.1 Veneno amnésico de los mariscos

Durante el periodo de estudio, la primera detección del ácido domoico en las glándulas digestivas fue a comienzos de diciembre de 2008 con una concentración de $1,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Fig. 20). Siete días más tarde, la concentración de la toxina se incremento rápidamente hasta $33 \mu\text{g g}^{-1}$, siendo este el nivel más alto detectado en glándula digestiva. Esta detección, coincidió con el único periodo de cierre cautelar establecido por el PSMB, debido a que la concentración de toxinas en los tejidos comestibles se encontraron entre 5 y $19 \mu\text{g g}^{-1}$.

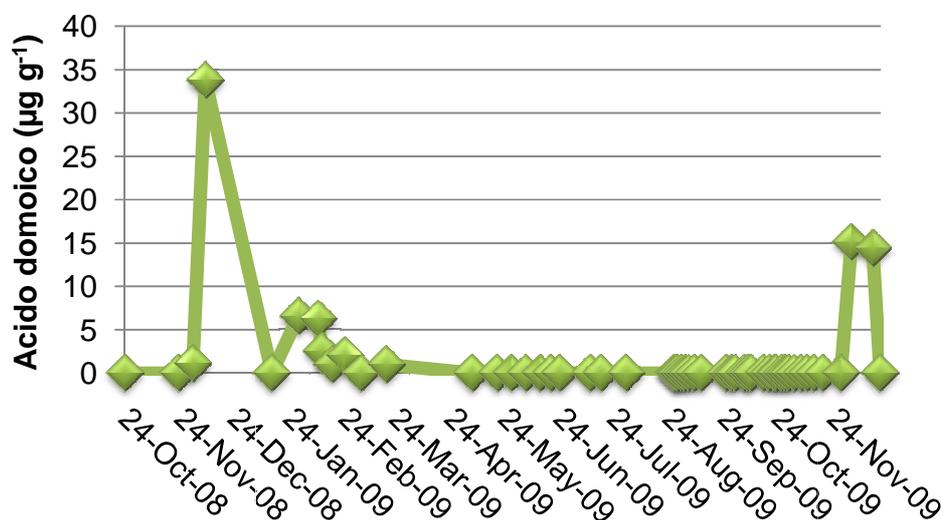


Figura 20. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Tabla X. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. <LOD: menor al límite de detección.

Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)
24-10-08	<LOD	04-09-09	<LOD
23-11-08	<LOD	07-09-09	<LOD
01-12-08	1,1	11-09-09	<LOD
08-12-08	33,78	25-09-09	<LOD
29-01-09	6,59	28-09-09	<LOD
09-02-09	6,24	30-09-09	<LOD
11-02-09	2,54	05-10-09	<LOD
17-02-09	1	07-10-09	<LOD
24-02-09	2,02	09-10-09	<LOD
05-03-09	<LOD	16-10-09	<LOD
19-03-09	1	19-10-09	<LOD
06-05-09	<LOD	22-10-09	<LOD
20-05-09	<LOD	23-10-09	<LOD
28-05-09	<LOD	26-10-09	<LOD
05-06-09	<LOD	28-10-09	<LOD
13-06-09	<LOD	30-10-09	<LOD
19-06-09	<LOD	02-11-09	<LOD
24-06-09	<LOD	06-11-09	<LOD
11-07-09	<LOD	09-11-09	<LOD
17-07-09	<LOD	28-11-09	<LOD
31-07-09	<LOD	13-11-09	<LOD
27-08-09	<LOD	18-11-09	<LOD
28-08-09	<LOD	04-12-09	15,11
29-08-09	<LOD	16-12-09	14,4
31-08-09	<LOD	20-12-09	<LOD
02-09-09	<LOD	14-01-10	<LOD

(Fuente: elaboración propia)



En enero de 2009, se detectó nuevamente la presencia de ácido domoico en las glándulas digestivas con una concentración de $6,59 \mu\text{g g}^{-1}$. Esta concentración, se mantuvo hasta la primera semana de febrero, para posteriormente disminuir a valores cercanos a los $2 \mu\text{g g}^{-1}$ y desaparecer a mediados de marzo de este año. En diciembre de 2009, se detectó nuevamente la presencia de esta toxina durante la primera quincena de este mes con concentraciones que estuvieron entre 15,11 y $14,4 \mu\text{g g}^{-1}$, para posteriormente desaparecer a principios de enero de 2010.

3.1.1.2 Veneno paralizante de los mariscos

Durante el periodo de estudio, se detectaron diversos eventos de toxicidad paralizante (Fig. 21). La primera detección se registro el día 24 de octubre de 2008 con valores cercanos a los $33 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxinas estuvo dominado por la GTX2 (47%), seguidos de GTX3 (18%) y STX (16%) y en menor proporción C2 (6%), dcGTX2 (6%) y cantidades trazas de dcGTX3 y GTX5.

La segunda detección corresponde al 23 de noviembre, con valores de toxicidad de $43 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} y un perfil dominado por GTX2 (40%), STX (23%), GTX3 (19%) y C2 (13%). El siguiente análisis, evidencio una disminución de las toxinas GTX2 (34%) y C2 y el incremento de las toxinas decarbamoiladas dcGTX3 (12%) y dcGTX2 (1%), manteniéndose estables las toxinas STX y GTX3. Las últimas muestras obtenidas el año 2008, evidenciaron un incremento en la toxina C2 (28%) y la disminución del resto de las toxinas a excepción de la STX que se mantuvo estable. Lamentablemente, no se dispuso de más muestras hasta el inicio de 2009.

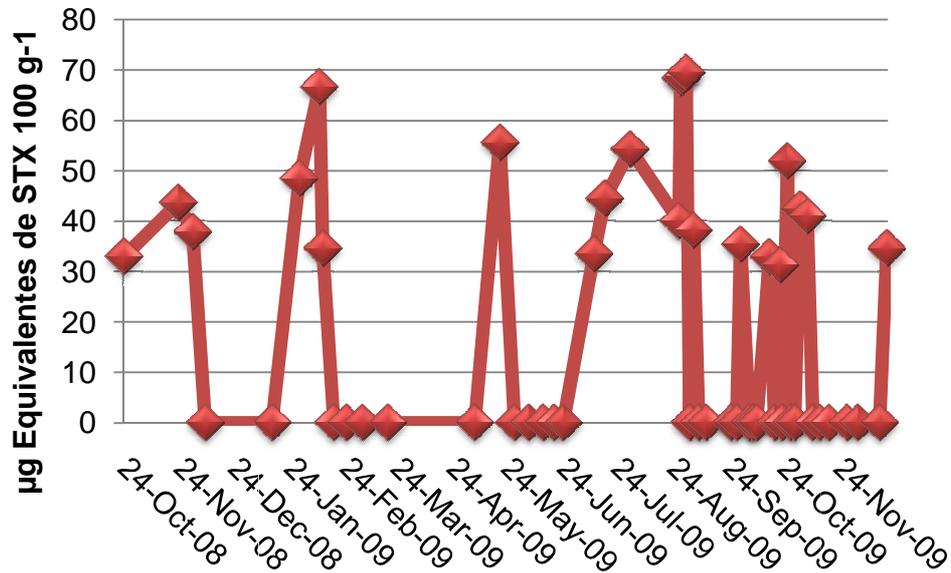


Figura 21. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).

La primera detección para el año 2009, se registró el 29 de enero de 2009 con una toxicidad de $48\text{ }\mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxinas estuvo dominado por GTX2 (43%) y GTX3 (36%) seguidos de STX y C2 (6%). Al inicio de febrero de 2009, se detectó una nueva intoxicación, debido a que el perfil tóxico de estas muestras estuvo dominado por GTX5 (49%), seguido por las toxinas GTX2 y GTX3 con valores entre 21 y 16%, respectivamente. En el siguiente muestreo, este perfil mantuvo sus proporciones a excepción del incremento de la STX (15%).

En mayo de 2009, se registro un episodio aislado con una toxicidad cercana a $55\text{ }\mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxinas estuvo dominado por los epímeros GTX2 y GTX3 con un 40 y un 23%, respectivamente. En este episodio, se detecta por primera vez la presencia de dcSTX (16%).



En el invierno de 2009, las glándulas digestivas de los ostiones se mantuvieron tóxicas por un prolongado periodo de tiempo entre el 11 de julio y el 4 de septiembre. Durante este periodo, los ostiones probablemente se intoxicaron continuamente debido a la alta proporción de GTX5 que en algunas ocasiones supero el 50%. El valor más alto de toxicidad fue registrado el día 27 de agosto ($68 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} , debido a la alta proporción de STX). Esta toxicidad comenzó a disminuir la segunda semana de septiembre para alcanzar valores cercanos a $38 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} .

A fines de Septiembre de 2009, se registró un nuevo episodio con una toxicidad cercana a $35 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxinas estuvo dominado por GTX5 (43%), seguido de STX (21%), GTX2 (10%) y dcSTX (9%). Posteriormente, se detectó un aumento de la toxicidad con valores cercanos a $50 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} .

El último episodio se detecto entre el 26 octubre y el 2 de noviembre de 2009 con valores de toxicidad cercanos a los $31 \mu\text{g}$ de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxinas fue muy similar y estuvo dominado por GTX2, GTX3, STX y dcGTX3. Finalmente, la última intoxicación de los moluscos ocurrió el 2 de noviembre de 2009, destacando la primera detección de GTX1, la que dómino el perfil de toxinas con más de un 50%.

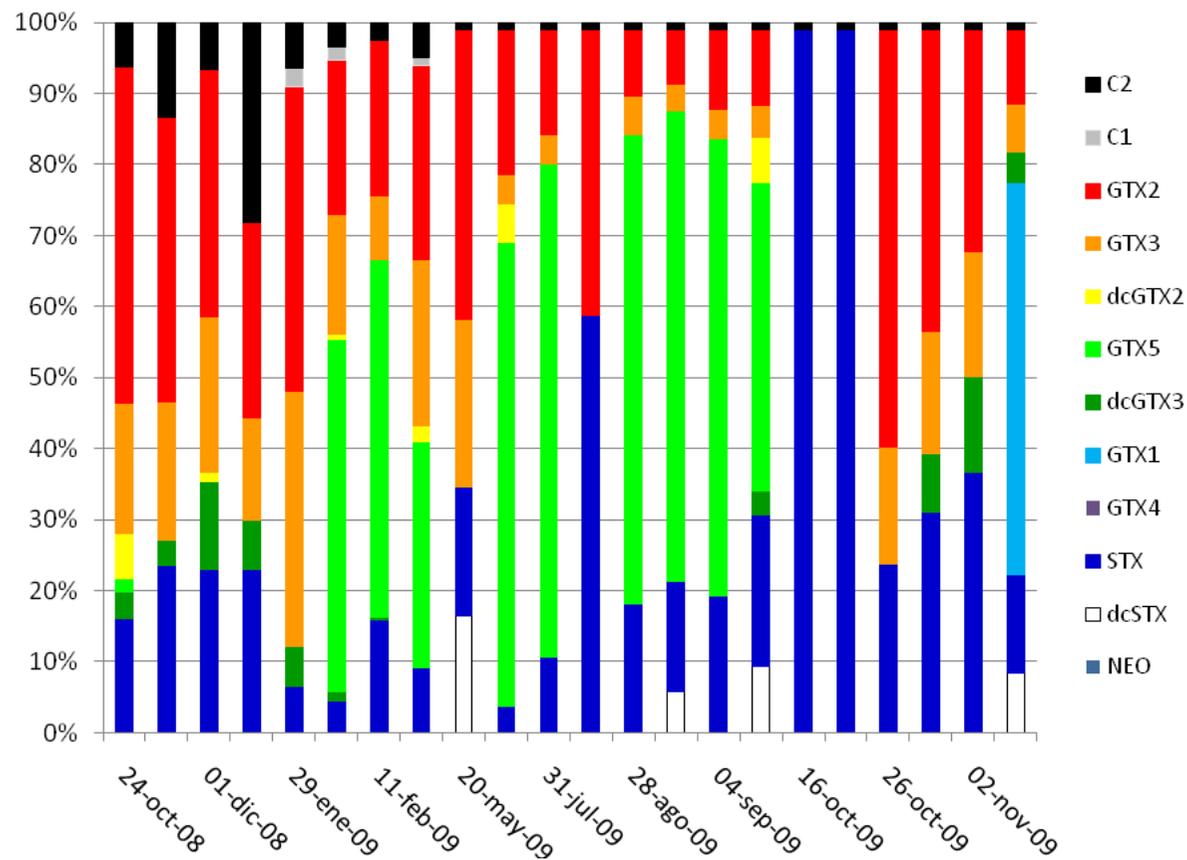


Figura 22. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Tabla XI. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. ND: no detectado.

Fecha cosecha	µg de equiv. de STX 100 g ⁻¹	Fecha cosecha	µg de equiv. de STX 100 g ⁻¹
24-10-08	32,96	04-09-09	38,16
23-11-08	43,62	07-09-09	ND
01-12-08	37,84	11-09-09	ND
08-12-08	ND	25-09-09	ND
29-01-09	48,46	28-09-09	ND
09-02-09	66,57	30-09-09	35,39
11-02-09	34,54	05-10-09	ND
17-02-09	ND	07-10-09	ND
24-02-09	ND	09-10-09	ND
05-03-09	ND	16-10-09	32,86
19-03-09	ND	19-10-09	ND
06-05-09	ND	22-10-09	31,26
20-05-09	55,51	23-10-09	ND
28-05-09	ND	26-10-09	51,87
05-06-09	ND	28-10-09	ND
13-06-09	ND	30-10-09	37,98
19-06-09	ND	02-11-09	42,32
24-06-09	ND	06-11-09	41
11-07-09	33,43	09-11-09	ND
17-07-09	44,46	28-11-09	ND
31-07-09	54,24	13-11-09	ND
27-08-09	40	18-11-09	ND
28-08-09	68,37	04-12-09	ND
29-08-09	68,6	16-12-09	ND
31-08-09	69,44	20-12-09	34,6
02-09-09	ND	14-01-09	ND

(Fuente: elaboración propia).



3.1.1.3 Toxinas lipofílicas

Los bioensayos para detectar toxicidad de tipo lipofílica en las glándulas digestivas del ostión determinaron una alta frecuencia temporal de la toxina, sin observar un patrón de frecuencia estacional, estando presente durante todo el periodo de muestreo (Fig. 23).

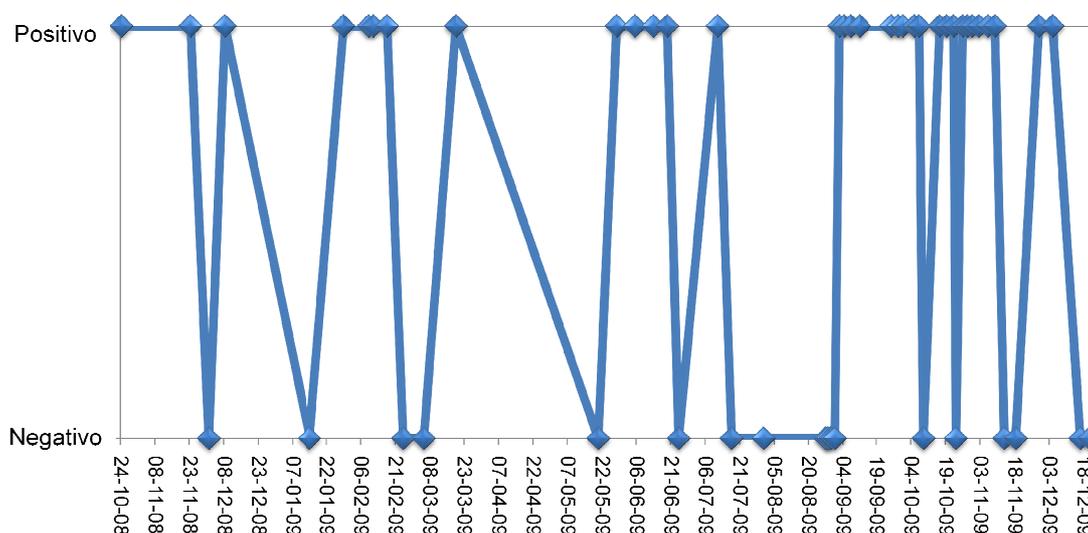


Figura 23. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Inglesa durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).

Al realizar los análisis confirmatorios por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS), se determinó que la toxicidad de las glándulas digestivas, se debe fundamentalmente a la presencia de cuatro tipos de toxinas que son en orden de importancia: yesotoxina (YTX), azaspiracido-2 (AZA2), pectenotoxina 2 (PTX2) y su ácido secoico (PTX2sa) (Fig.24). Entre estas, la YTX es la más importante debido a que fue la única toxina que pudo ser cuantificada encontrándose con un rango entre 0,01 y 1,24 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla XII).



En la figura 24A y 24B, se muestran los cromatogramas correspondientes a los análisis para la detección de pectenotoxinas, en los cuales se confirma la presencia de PTX2, con un tiempo de retención de 5,84 minutos, mediante la monitorización del ión molecular (876 m/z) y dos de sus transiciones correspondientes a los fragmentos 823 y 805 m/z . Este mismo tipo de análisis confirmó la presencia de su ácido secoico (PTX2sa), con un tiempo de retención de 2,82 minutos, a través de la monitorización del ión molecular (875 m/z) y dos de sus transiciones correspondientes a los fragmentos 179 y 137 m/z .

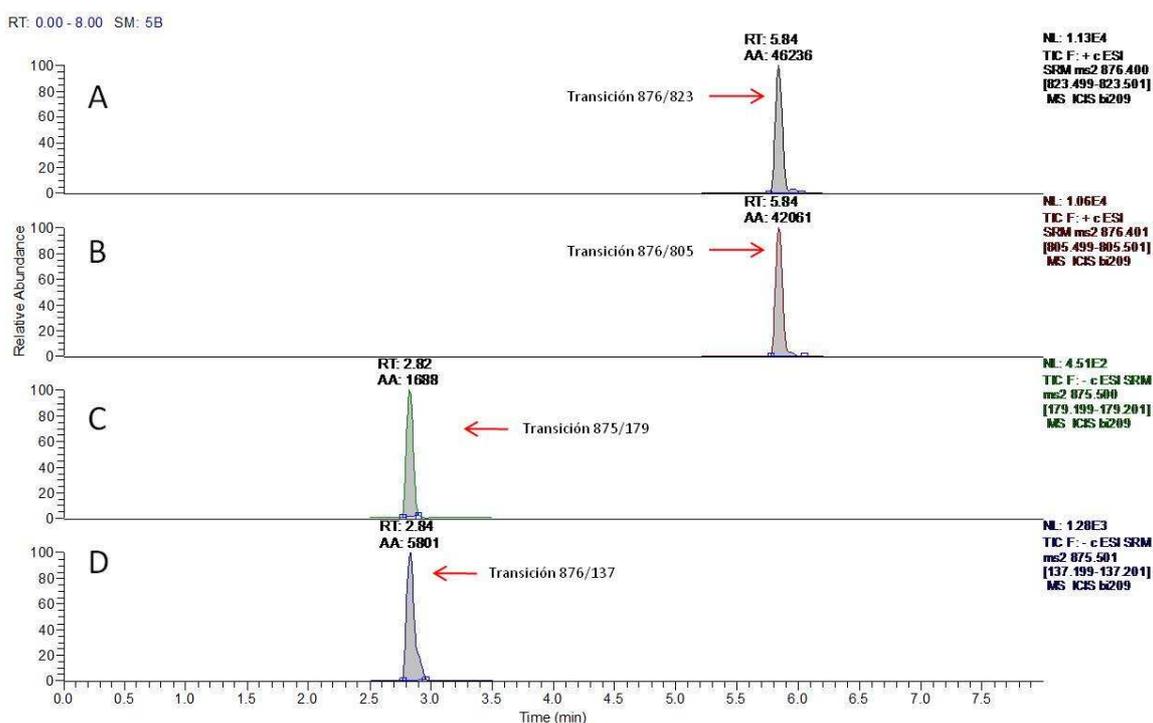


Figura 24. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 9 de febrero de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de PTX2 (A) transición 876/823 (B) transición 876/805 y PTX2sa (C) transición 875/179 y (D) transición 875/137. (Fuente: elaboración propia).



Tabla XII. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Inglesa entre octubre de 2008 y enero de 2010. ND: no detectado; > LOD: Mayor al límite de detección.

Fecha Cosecha	Bioensayo	YTX ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2sa	AZA2
24-10-08	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
23-11-08	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
01-12-08	ND	ND	ND	ND	> LOD
08-12-08	Positivo	ND	ND	ND	> LOD
29-01-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
09-02-09	Positivo	> LOD	> LOD	> LOD	> LOD
11-02-09	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
17-02-09	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
05-03-09	ND	ND	ND	ND	ND
24-02-09	ND	ND	ND	ND	ND
19-03-09	Positivo	1,24	> LOD	> LOD	> LOD
20-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
28-05-09	Positivo	ND	> LOD	> LOD	ND
24-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
05-06-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
13-06-09	Positivo	ND	> LOD	ND	> LOD
19-06-09	Positivo	ND	> LOD	> LOD	> LOD
11-07-09	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
17-07-09	ND	ND	ND	ND	ND
31-07-09	ND	ND	ND	ND	ND
27-08-09	ND	ND	ND	ND	ND
28-08-09	ND	ND	ND	ND	ND
29-08-09	ND	ND	ND	ND	ND
31-08-09	ND	ND	ND	ND	ND
02-09-09	Positivo	> LOD	> LOD	ND	ND
04-09-09	Positivo	ND	ND	> LOD	> LOD
07-09-09	Positivo	ND	ND	ND	> LOD
11-09-09	Positivo	ND	ND	ND	> LOD
25-09-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
28-09-09	Positivo	ND	ND	ND	> LOD
30-09-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
05-10-09	Positivo	0,18	ND	ND	> LOD



07-10-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
09-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
16-10-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
19-10-09	Positivo	ND	ND	> LOD	ND
22-10-09	Positivo	ND	ND	ND	> LOD
23-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
26-10-09	Positivo	0,13	> LOD	ND	ND
28-10-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
30-10-09	Positivo	0,16	ND	ND	ND
02-11-09	Positivo	ND	> LOD	ND	> LOD
06-11-09	Positivo	ND	ND	> LOD	ND
09-11-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
28-11-09	Positivo	ND	> LOD	ND	ND
13-11-09	ND	ND	ND	ND	ND
18-11-09	ND	ND	ND	ND	ND
04-12-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
16-12-09	ND	ND	ND	ND	ND
20-12-09	ND	ND	ND	ND	ND
14-01-10	ND	ND	ND	ND	ND

(Continuación tabla anterior, Fuente: elaboración propia).



3.1.2 Bahía Guanaqueros

3.1.2.1 Veneno amnésico de los mariscos

La primera detección de ácido domoico en esta bahía corresponde al 1 de diciembre de 2008, que alcanzó una concentración de $4,86 \mu\text{g g}^{-1}$.

Posteriormente, se detectó nuevamente en febrero del año 2009 con concentraciones cercanas al límite de detección de la detección de la técnica cromatográfica ($1 \mu\text{g g}^{-1}$).

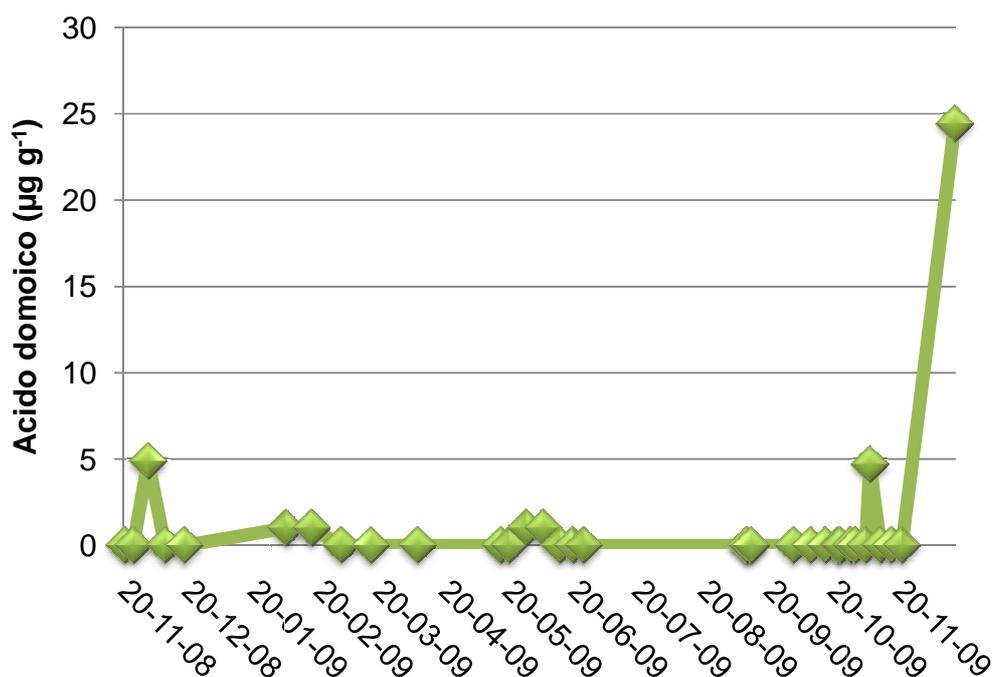


Figura 25. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



La tercera detección de esta toxina ocurrió entre el 5 y el 13 de junio de 2009 y al igual que en el caso anterior, las concentraciones de ácido domoico se encontraron cercanas al límite de detección.

A finales de 2009, se detectó nuevamente la presencia de esta toxina con una concentración de $4,68 \mu\text{g g}^{-1}$ en el mes noviembre y a mediados de diciembre se registra la mayor concentración de ácido domoico en las glándulas digestivas de este bivalvo con una concentración cercana a los $25 \mu\text{g g}^{-1}$

Tabla XIII. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 y diciembre de 2009. <LOD: menor al límite de detección.

Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)
20-11-08	<LOD	09-09-09	<LOD
24-11-08	<LOD	11-09-09	<LOD
01-12-08	4,86	01-10-09	<LOD
09-12-08	<LOD	09-10-09	<LOD
18-12-08	<LOD	16-10-09	<LOD
04-02-09	1	22-10-09	<LOD
16-02-09	1	09-09-09	<LOD
02-03-09	<LOD	23-10-09	<LOD
16-03-09	<LOD	28-10-09	<LOD
07-04-09	<LOD	30-10-09	<LOD
20-05-09	<LOD	04-11-09	<LOD
16-05-09	<LOD	06-11-09	4,68
28-05-09	1	11-11-09	<LOD
05-06-09	1	16-11-09	<LOD
13-06-09	<LOD	21-11-09	<LOD
19-06-09	<LOD	16-12-09	24,41
24-06-09	<LOD		

(Fuente: elaboración propia).



3.1.2.2 Veneno paralizante de los mariscos

Durante el periodo de estudio, se detectó en diferentes ocasiones la presencia de toxicidad paralizante en las muestras de glándulas digestivas (Fig. 26). El primer episodio tóxico fue detectado el 20 de noviembre de 2008 con una toxicidad cercana a los 48 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , la que fue disminuyendo durante las semanas posteriores a niveles cercanos a 38 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , incrementándose nuevamente durante la segunda semana de diciembre de 2008 con valores cercanos a los 56 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , que corresponden a la toxicidad más alta encontrada durante el periodo de muestreo.

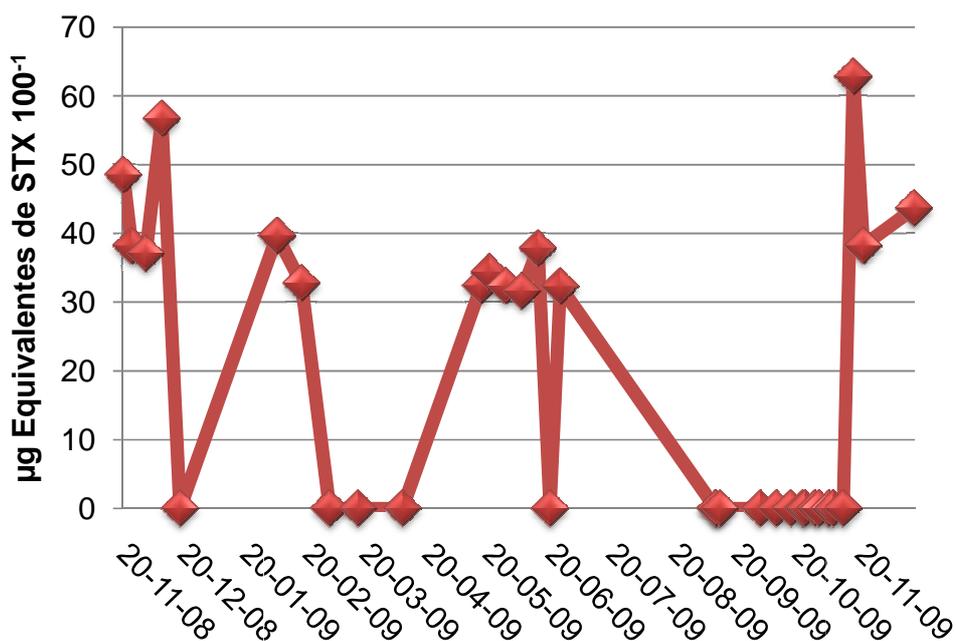


Figura 26. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Al comienzo del episodio, el perfil de toxinas (Fig. 27) de estas muestras estuvo dominado por GTX5 (35%) y STX (29%), seguido por GTX2 y C2 con valores cercanos al 13%. En el siguiente muestreo, el perfil cambia sin detectar la presencia de GTX5, siendo conformado por solo cuatro toxinas: STX, GTX2 y GTX3. A comienzos de Diciembre, se detectó la presencia de GTX5, que nuevamente domina el perfil con un 49%, seguida por los epímeros GTX2 y GTX3 y en menor proporción STX, C2 y trazas de C1 y dcGTX2. En las siguientes muestras, las proporciones varían nuevamente y la toxina dominante corresponde a GTX2 (Fig. 31).

Durante el periodo comprendido entre el 4 y el 16 de Febrero de 2009, los valores de toxicidad se encontraron entre 39 y 32 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil tóxico en los bivalvos, estuvo dominado por GTX3 (26%), GTX5 (26%), GTX2 (25%), seguidas de STX (13%). En el siguiente análisis, se destaca la ausencia de GTX5 y el incremento de STX y GTX2, además de la detección de dcGTX3, mientras que el resto de las toxinas se mantuvieron estables.

El episodio más prolongado correspondió al periodo entre el 16 de mayo al 19 de junio de 2009. En este episodio, la toxicidad se mantuvo relativamente estable con valores en torno a 32 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El máximo registro de toxicidad correspondió a 37 μg de equivalentes STX 100 g^{-1} para el día 19 de junio de 2009. A comienzos de este episodio, el perfil de toxinas estuvo dominado por GTX5 (60%) seguido por GTX2 (15%), GTX3 (7%) y STX (5%). Este perfil se mantuvo durante prácticamente todo el evento, destacando la presencia de dcSTX (6%) en la muestra correspondiente al 20 de mayo de 2009. La presencia continua de GTX5, sugiere que los bivalvos pudieron intoxicarse continuamente debido a que probablemente estuvieron expuestos constantemente a la presencia de una especie fitoplanctónica capaz de producir este tipo de toxinas.



El siguiente episodio se detectó durante la segunda semana de septiembre de 2009 con una toxicidad cercana a 35 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} . El perfil de toxina, es idéntico al registrado para el episodio anterior y estuvo dominado por GTX5 (69%) seguido por GTX2 (15%), GTX3 (9%) y STX (5%).

Finalmente, el último episodio se detectó en noviembre de 2009, alcanzando la máxima toxicidad en las glándulas digestivas con una toxicidad de 62,79 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} . Este episodio, debió ser producido probablemente por otra especie o raza de fitoplancton tóxico, debido a que no se detectó la presencia de GTX5. En esta ocasión, el perfil estuvo dominado por GTX2 (37%), STX (33%), GTX3 (21%), detectando por primera vez la presencia de GTX1 (7%). En el siguiente muestreo, el perfil cambia nuevamente, manteniéndose estables los epímeros GTX2 y GTX3, y detectando dcGTX2 proveniente probablemente por la biotransformación de la GTX2. Además, desaparece la GTX1, probablemente epimerizada a STX, la que fue disminuyendo por el proceso de depuración del molusco.

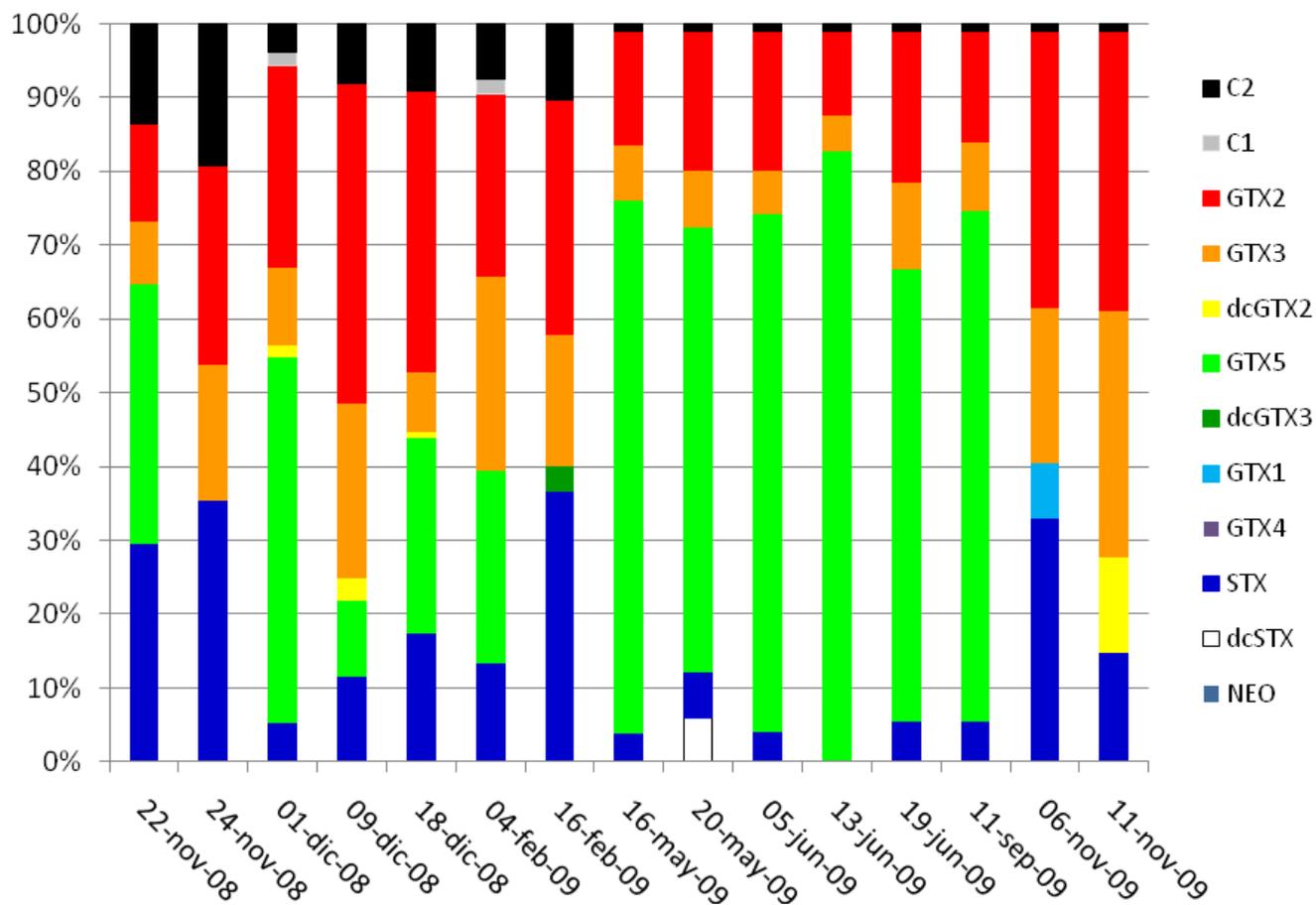


Figura 27. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Tabla XIV. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 a noviembre de 2009. ND: no detectado.

Fecha	μg de Equiv. de STX 100 g^{-1}
20-11-08	48,5
24-11-08	38,18
01-12-08	37,07
09-12-08	56,68
18-12-08	ND
04-02-09	39,65
16-02-09	32,73
02-03-09	ND
16-03-09	ND
07-04-09	ND
20-05-09	34,33
16-05-09	32,42
28-05-09	32,36
05-06-09	31,59
13-06-09	37,78
19-06-09	ND
09-09-09	ND
11-09-09	32,27
01-10-09	ND
09-10-09	ND
16-10-09	ND
22-10-09	ND
09-09-09	ND
23-10-09	ND
28-10-09	ND
30-10-09	ND
04-11-09	ND
06-11-09	62,79
11-11-09	38,2

(Fuente: elaboración propia)

3.1.2.3 Toxinas lipofílicas

Los bioensayos para detectar toxicidad de tipo lipofílica en las glándulas digestivas obtenidas en Bahía Guanaqueros, muestran que la mayor cantidad de resultados positivos se encontraron en los periodos de primavera y verano (Fig. 28).

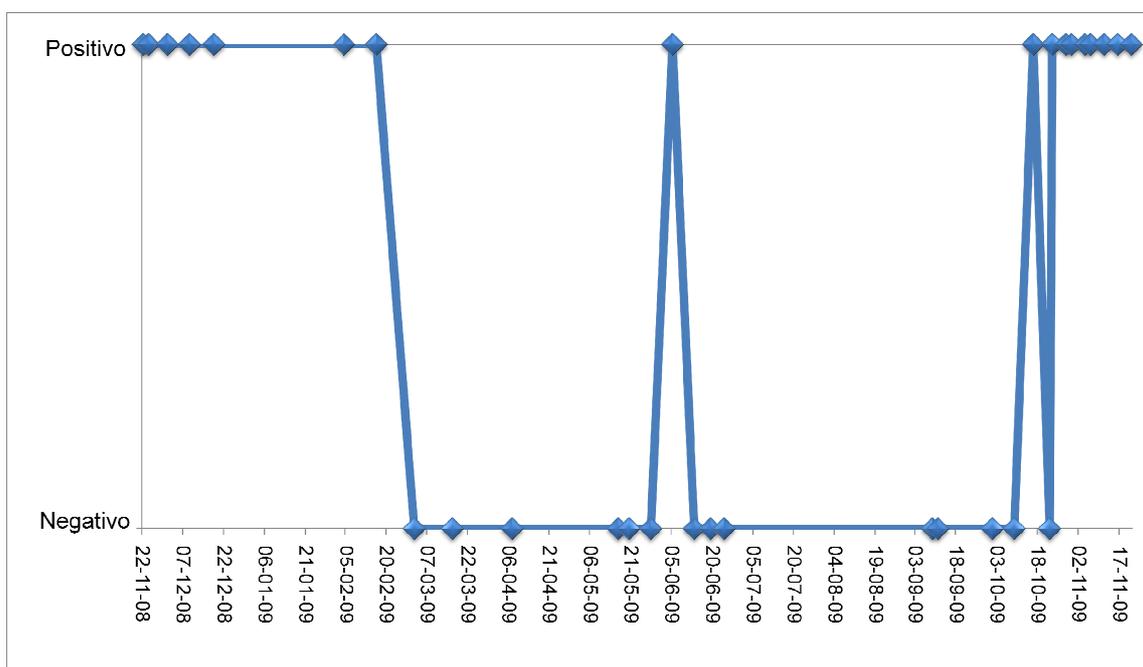


Figura 28. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Guanaqueros durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).

Los análisis confirmatorios por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS), determinaron que la toxicidad de las glándulas digestivas se encuentra asociada a la presencia de cuatro toxinas lipofílicas que son en orden de importancia: yesotoxina (YTX), azaspiracido-2 (AZA2), pectenotoxina 2 (PTX2) y su ácido secoico (PTX2sa). Entre estas, la YTX es la más importante debido a que fue la única toxina que pudo ser cuantificada encontrándose con un rango entre 0,01 y 1,24 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabla XV).



Tabla XV. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Guanaqueros entre octubre de 2008 y noviembre de 2010. ND: no detectado; >LOD: mayor al límite de detección.

Cosecha	Bioensayo	YTX ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2sa	AZA2
22-11-08	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
24-11-08	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
01-12-08	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
09-12-08	Positivo	> LOD	> LOD	> LOD	ND
18-12-08	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
04-02-09	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
16-02-09	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
02-03-09	ND	ND	ND	ND	ND
16-03-09	ND	ND	ND	ND	ND
07-04-09	ND	ND	ND	ND	ND
16-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
20-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
05-06-09	Positivo	1,62	ND	ND	ND
13-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
19-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
24-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
28-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
11-09-09	ND	ND	ND	ND	ND
01-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
09-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
16-10-09	Positivo	1,13	ND	ND	ND
22-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
09-09-09	ND	ND	ND	ND	ND
23-10-09	Positivo	0,37	ND	ND	ND
28-10-09	Positivo	0,59	ND	ND	ND
30-10-09	Positivo	0,61	ND	> LOD	> LOD
04-11-09	Positivo	0,82	ND	ND	> LOD
06-11-09	Positivo	SM	ND	ND	ND
11-11-09	Positivo	SM	ND	ND	ND
16-11-09	Positivo	SM	ND	ND	ND
21-11-09	Positivo	0,25	ND	ND	> LOD

(Fuente: elaboración propia)

3.1.3 Bahía Tongoy

3.1.3.1 Veneno amnésico de los mariscos

En Bahía Tongoy, la primera detección corresponde al inicio del muestreo en noviembre de 2008 con una concentración de ácido domoico cercana a los $12 \mu\text{g g}^{-1}$ que disminuyó rápidamente, debido a que en las muestras obtenidas una semana después no se detectó la presencia de esta toxina (Fig. 29).

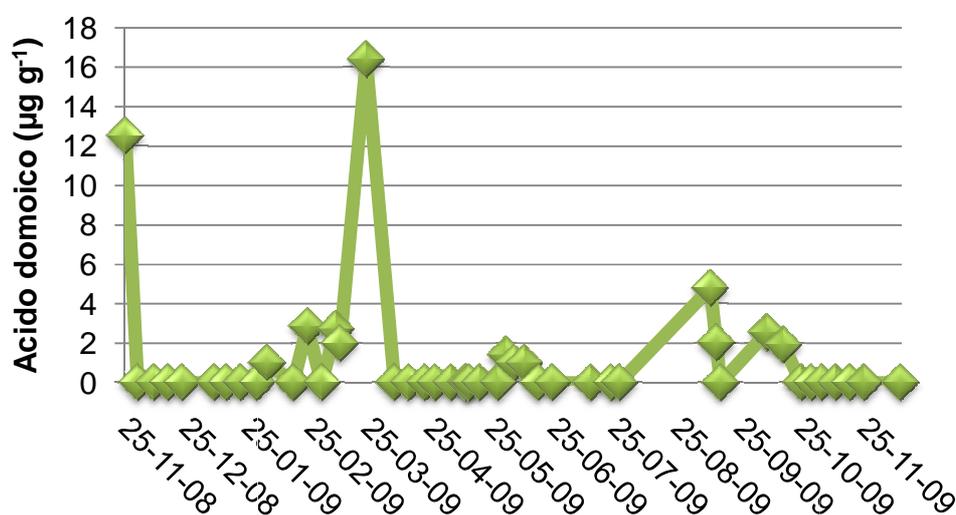


Figura 29. Distribución temporal del ácido domoico en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a noviembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).

El segundo registro corresponde a principios de febrero de 2009 con una concentración cercana al límite de detección de la técnica cromatográfica. A finales de este mes, se detectó el episodio más prolongado de ácido domoico que comenzó el día 23 de febrero y se prolongó hasta finales de marzo de 2009. Los valores fluctuaron alrededor de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ en la mayoría de las muestras analizadas, alcanzando la máxima concentración el 24 de marzo, día a partir del cual la concentración disminuyó rápidamente para no ser detectada en el siguiente muestreo realizado la primera semana de abril de 2009. El siguiente registro



corresponde a la primera quincena del mes de junio de 2009 con valores que se encontraron cercanos al límite de detección. Finalmente, el último episodio fue detectado entre los meses de septiembre y octubre de 2009, con una concentración máxima de $4 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabla XVI. Resultados de los análisis de ácido domoico en extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 y diciembre de 2009. <LOD: menor al límite de detección

Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fecha cosecha	ácido domoico ($\mu\text{g g}^{-1}$)
25-11-08	12,52	14-05-09	<LOD
01-12-08	<LOD	19-05-09	<LOD
09-12-08	<LOD	28-05-09	<LOD
16-12-08	<LOD	01-06-09	1,41
23-12-08	<LOD	05-06-09	1
08-01-09	<LOD	10-06-09	1
14-01-09	<LOD	17-06-09	<LOD
21-01-09	<LOD	24-06-09	<LOD
29-01-09	<LOD	13-07-09	<LOD
03-02-09	1	23-07-09	<LOD
16-02-09	<LOD	27-07-09	<LOD
23-02-09	2,85	10-09-09	4,79
02-03-09	<LOD	13-09-09	2,03
09-03-09	2,72	15-09-09	<LOD
11-03-09	1,99	08-10-09	2,55
24-03-09	16,4	16-10-09	1,92
07-04-09	<LOD	25-10-09	<LOD
14-04-09	<LOD	30-10-09	<LOD
22-04-09	<LOD	04-11-09	<LOD
27-04-09	<LOD	11-11-09	<LOD
05-05-09	<LOD	18-11-09	<LOD
12-05-09	<LOD	25-11-09	<LOD
13-05-09	<LOD	13-12-09	<LOD

(Fuente: elaboración propia)

3.1.3.2 Veneno paralizante de los mariscos

En Bahía Tongoy, la presencia de toxicidad paralizante se encontró entre el inicio del verano y el término del otoño (Fig. 30). Durante este periodo, las glándulas digestivas estuvieron frecuentemente contaminadas con una toxicidad paralizante con valores relativamente estables que se mantuvieron en torno a 35 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} . A comienzos de marzo, los niveles de toxicidad se incrementaron alcanzando valores cercanos a 55 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , para posteriormente disminuir a mediados de este mes y volver a recuperar la toxicidad con un máximo de 74 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} el día 24 de marzo de 2009.

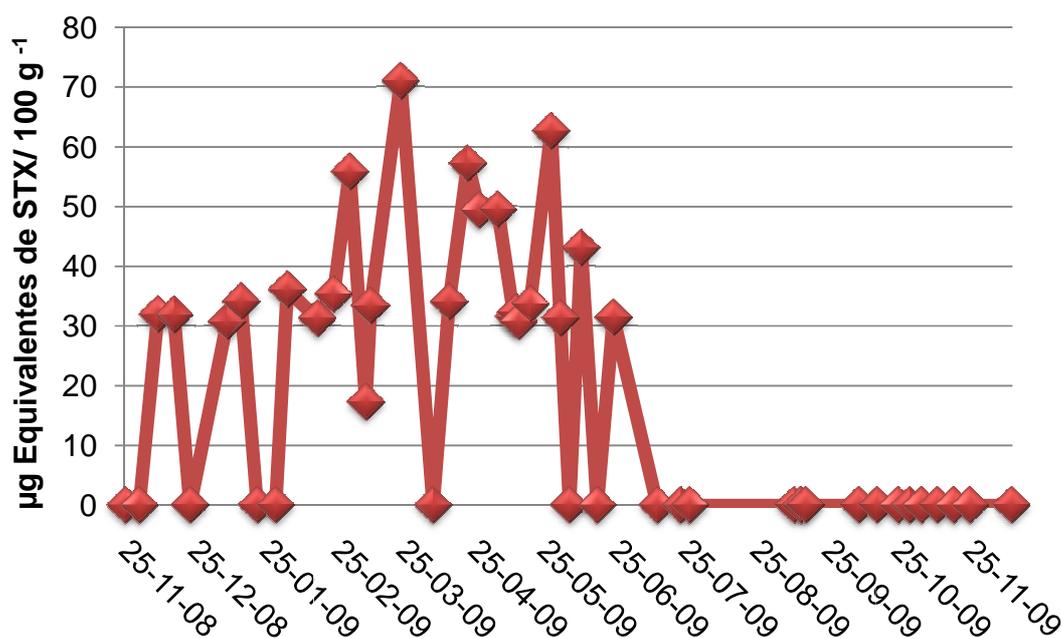


Figura 30. Distribución temporal de la toxicidad (μg Equivalentes de STX 100 g^{-1}) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Al comienzo del episodio en diciembre de 2008, el perfil de toxinas de las muestras estuvo dominado por cuatro toxinas, GTX2 (47,1%), GTX3 (26%), STX (17,9%) y C2 (9,7%) (Fig.31). Dos días más tarde, este perfil cambia, debido a la presencia de las toxinas GTX1 y GTX5 (probablemente provenientes del fitoplancton) lo que sugiere una nueva intoxicación. A mediados de este mes, el perfil es similar al obtenido al comienzo de la toma de muestras, aunque con una mayor proporción de GTX2 (58%). El último análisis realizado para el año 2008, se encuentra dominado por el par de epímeros GTX2 (49%) y GTX3 (19%) y en menor proporción STX y C2. Lamentablemente, no se dispuso de muestras hasta la segunda semana de enero. Las muestras analizadas para la primera quincena de febrero de 2009, presentaron un perfil de toxinas muy similar, dominado por GTX2 y STX, pero diferenciados por la presencia de dcGTX3. La última muestra analizada en este mes, refleja una disminución de la GTX2 y un incremento en la STX y la aparición de dcGTX2. Finalmente, en marzo de 2009, la toxina C2 desaparece y se incrementa las toxinas GTX2 (37%), STX (24%) y GTX3 (18%). En el mes de Abril, la toxicidad se mantuvo con valores entre 34 y 57 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , disminuyendo a valores cercanos a 30 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} durante todo el mes de mayo. A finales de este mes, se volvió a detectar un incremento en la toxicidad encontrando valores en torno a 62 μg de equivalentes de STX 100 g^{-1} , los que disminuyeron rápidamente alrededor de un 50% en las semanas posteriores. Durante este periodo, el perfil de toxinas estuvo dominado por la presencia de GTX2 (53%), GTX3 (20%), STX (13%), destacando además la primera detección de dcSTX (Fig. 31). Una semana más tarde, este perfil cambio y fue dominado por GTX5 (41%), GTX2 (21%), GTX3 (17%) y STX (7%), por lo que la alta proporción de GTX5, sugiere nuevamente un proceso de intoxicación. Este mismo perfil se mantuvo en el resto de las muestras positivas, lo que indica que la especie productora de las toxinas se encontró de manera frecuente en el fitoplancton.

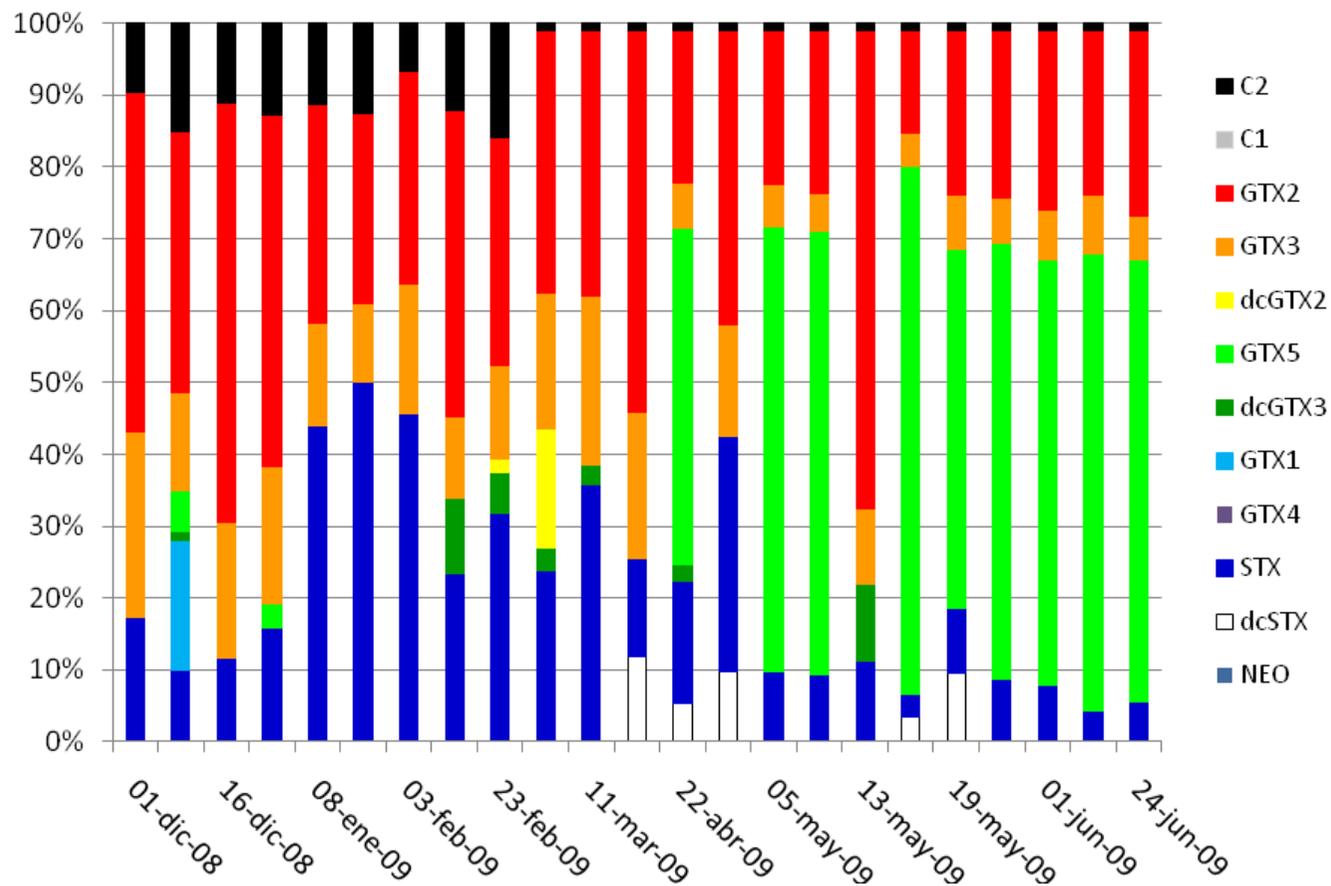


Figura 31. Distribución temporal de los perfiles tóxicos (% molar) de las toxinas paralizantes en glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).



Tabla XVII. Resultados de los análisis de toxicidad paralizante mediante bioensayo en ratones de extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 a diciembre de 2009. ND: no detectado.

Fecha cosecha	μg de Equiv. de STX 100 g^{-1}	Fecha cosecha	μg de Equiv. de STX 100 g^{-1}
25-11-08	ND	14-05-09	30,76
01-12-08	ND	19-05-09	33,67
09-12-08	31,95	28-05-09	62,61
16-12-08	31,86	01-06-09	31,3
23-12-08	ND	05-06-09	ND
08-01-09	30,71	10-06-09	43,09
14-01-09	34,1	17-06-09	ND
21-01-09	ND	24-06-09	31,36
29-01-09	ND	13-07-09	ND
03-02-09	36,07	23-07-09	ND
16-02-09	31,2	27-07-09	ND
23-02-09	35,27	10-09-09	ND
02-03-09	55,8	13-09-09	ND
09-03-09	17,25	15-09-09	ND
11-03-09	33,37	08-10-09	ND
24-03-09	70,99	16-10-09	ND
07-04-09	ND	25-10-09	ND
14-04-09	34,03	30-10-09	ND
22-04-09	57,18	04-11-09	ND
27-04-09	49,36	11-11-09	ND
05-05-09	49,48	18-11-09	ND
12-05-09	31,5	25-11-09	ND
13-05-09	32,26	13-12-09	ND

(Fuente: elaboración propia)

3.1.3.3 Toxinas lipofílicas

Los bioensayos para detectar toxicidad de tipo lipofílica en las glándulas digestivas obtenidas en Bahía Guanaqueros, muestran que a diferencia de las otras Bahías, no se observa un patrón de frecuencia estacional, estando presente durante todo el periodo de muestreo (Fig. 32).

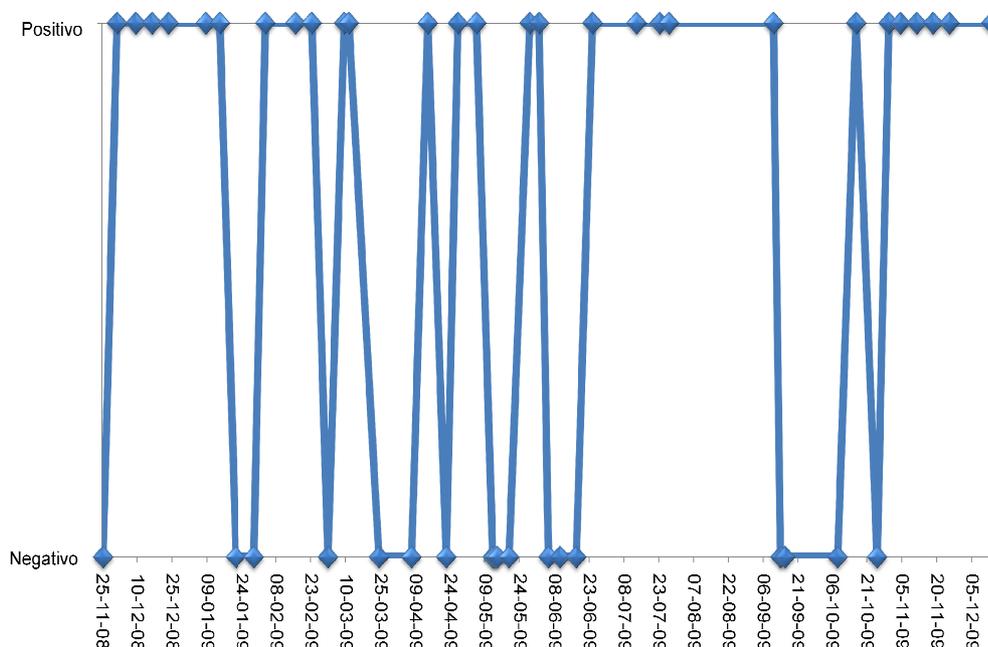


Figura 32. Distribución temporal de toxinas lipofílicas detectadas mediante bioensayo en ratones durante el análisis de glándulas digestivas de ostión del norte, obtenidas en Bahía Tongoy durante el periodo octubre de 2008 a diciembre de 2009. (Fuente: elaboración propia).

Al realizar los análisis confirmatorios por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS), se determinó que la toxicidad de las glándulas digestivas, se debe fundamentalmente a la presencia de cuatro tipos de toxinas que son en orden de importancia: yesotoxina (YTX), azaspiracido-2 (AZA2), pectenotoxina 2 (PTX2) y su ácido secoico (PTX2sa).



Entre estas, la PTX2 y la YTX (Fig.33) son las más importantes debido a su frecuencia temporal, encontrándose con un rango entre 0,01 y 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0,01 y 1,78 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Tabla XVIII).

En la figura 33, se muestran los cromatogramas correspondientes a la yesotoxina, con un tiempo de retención de 3 minutos, en los cuales se confirma la presencia de esta toxina mediante la monitorización de los iones moleculares 1141 m/z (Fig. 33A) y 570 m/z (correspondiente a esta toxina en condiciones alcalinas) y dos de sus transiciones correspondientes a los fragmentos 467 y 396 m/z (Fig.33B y C).

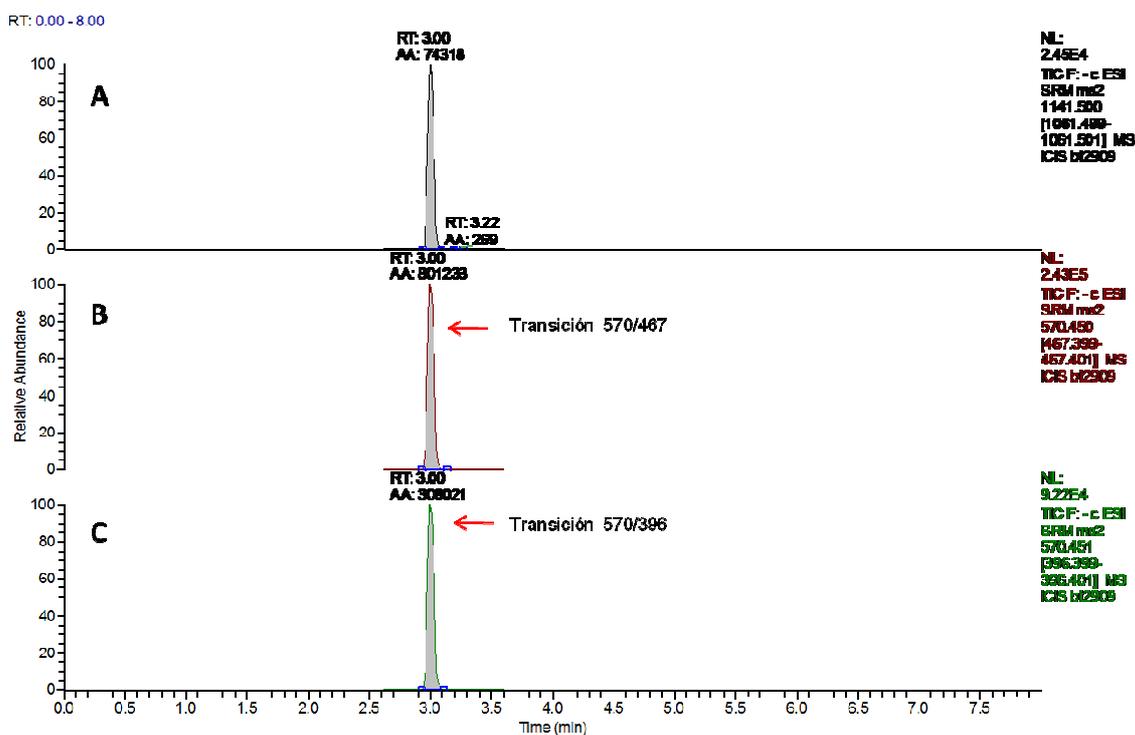


Figura 33. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 27 de julio de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de YTX (A) ion molecular 1141 m/z (B) transición 570/467 y (C) transición 570/396 (Fuente: elaboración propia).



En la figura 34, se muestran los cromatogramas correspondientes al azaspirácido 2 (AZA2), con un tiempo de retención de 4,18 minutos, en los cuales se confirma la presencia de esta toxina mediante la monitorización del ión molecular 856 m/z (Fig. 34A) una de sus transiciones correspondiente a su fragmento 672 m/z (Fig.34B).

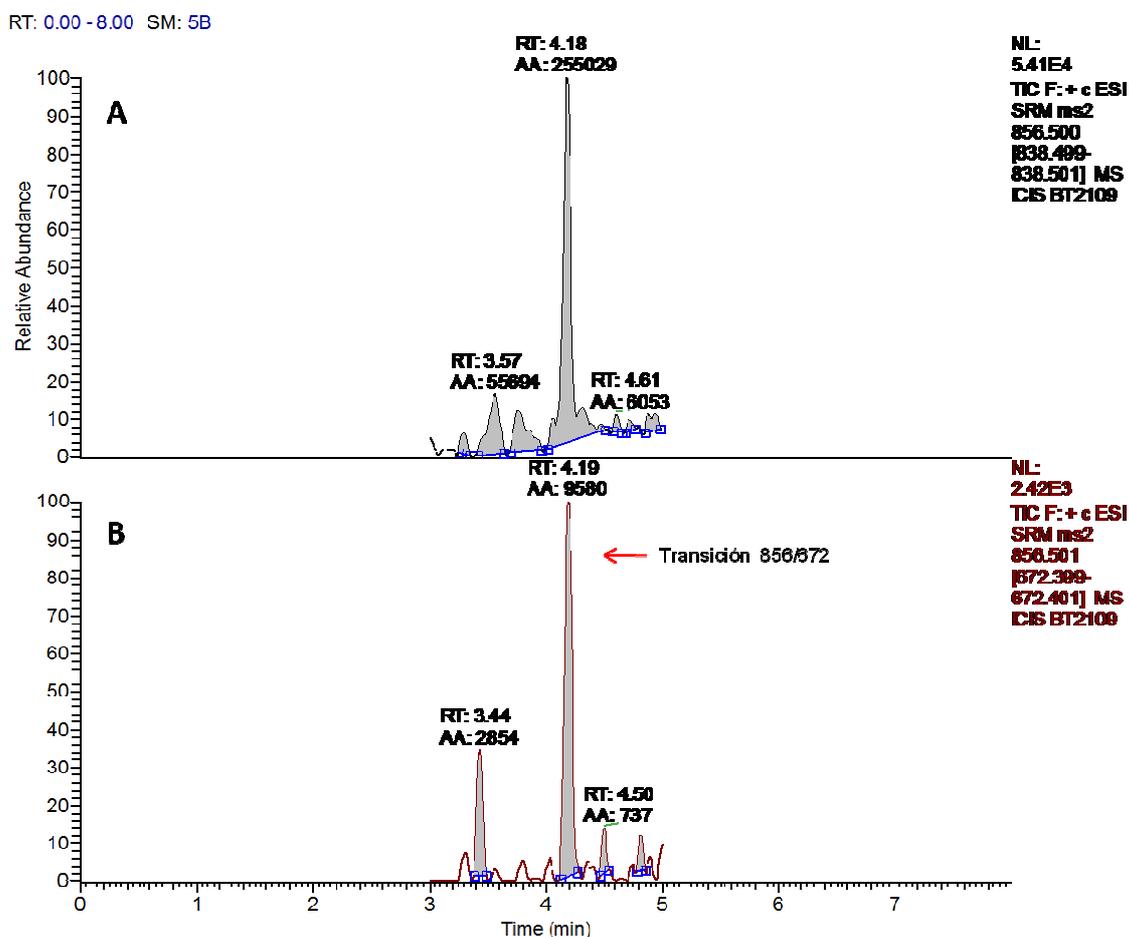


Figura 34. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra obtenida el 28 de mayo de 2009, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de AZA2 (A) ion molecular 856 m/z (B) transición 856/672. (Fuente: elaboración propia).



Tabla XVIII. Resultados de los análisis de toxicidad lipofílica mediante bioensayo en ratones e identificación y cuantificación de toxinas mediante LC-MS de los extractos de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* obtenidos de Bahía Tongoy entre octubre de 2008 y diciembre de 2010. ND: no detectado; > LOD: mayor al límite de detección.

Fecha cosecha	Bioensayo	Yesotoxina ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PTX2sa	AZA2
25-11-08	ND	ND	ND	ND	ND
01-12-08	Positivo	> LOD	ND	ND	> LOD
09-12-08	Positivo	> LOD	0,4	> LOD	ND
16-12-08	Positivo	ND	ND	ND	ND
23-12-08	Positivo	ND	ND	ND	ND
08-01-09	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
14-01-09	Positivo	> LOD	ND	> LOD	> LOD
21-01-09	ND	ND	ND	ND	ND
29-01-09	ND	ND	ND	ND	ND
03-02-09	Positivo	ND	ND	> LOD	ND
16-02-09	Positivo	ND	ND	ND	ND
23-02-09	Positivo	0,15	> LOD	ND	ND
02-03-09	ND	ND	ND	ND	ND
09-03-09	Positivo	> LOD	ND	> LOD	ND
11-03-09	Positivo	> LOD	ND	ND	ND
24-03-09	ND	ND	ND	ND	ND
07-04-09	ND	ND	ND	ND	ND
14-04-09	Positivo	0,35	> LOD	ND	ND
22-04-09	ND	ND	ND	ND	ND
27-04-09	Positivo	0,74	ND	ND	ND
05-05-09	Positivo	0,79	ND	ND	ND
12-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
13-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
14-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
19-05-09	ND	ND	ND	ND	ND
28-05-09	Positivo	0,58	ND	ND	> LOD
01-06-09	Positivo	0,42	ND	ND	ND
05-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
10-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
17-06-09	ND	ND	ND	ND	ND
24-06-09	Positivo	0,86	ND	ND	ND
13-07-09	Positivo	1,76	ND	ND	> LOD



23-07-09	Positivo	1,13	ND	ND	> LOD
27-07-09	Positivo	1,78	ND	ND	> LOD
10-09-09	Positivo	0,6	ND	ND	ND
13-09-09	ND	ND	ND	ND	ND
15-09-09	ND	ND	ND	ND	ND
08-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
16-10-09	Positivo	0,29	ND	ND	ND
25-10-09	ND	ND	ND	ND	ND
30-10-09	Positivo	0,7	ND	ND	> LOD
04-11-09	Positivo	0,2	ND	ND	ND
11-11-09	Positivo	> LOD	> LOD	> LOD	> LOD
18-11-09	Positivo	0,22	ND	ND	> LOD
25-11-09	Positivo	0,34	ND	ND	ND
13-12-09	Positivo	0,25	ND	ND	> LOD

(Continuación tabla anterior, Fuente: elaboración propia)

3.2 Resultados de identificación taxonómica del fitoplancton tóxico o nocivo encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio

3.2.1 Especies productoras de ácido domoico

3.2.1.1 *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli

Los análisis taxonómicos de los 5 cultivos previamente clasificados como *Pseudo-nitzschia australis*, permitieron realizar que efectivamente se trataba de esta especie. Las células observadas en vista valvar, tenían un frústulo muy silificado, con forma linear-lanceolada y con ápices rostrados (Fig.35A). Las medidas del eje apical estaban entre 66,3 – 101,7 μm y las del eje transapical entre 6,2 – 8 μm . La superficie valvar posee estrías e interestrías y no presenta nódulo central (Fig.35B). Las estrías (18 – 19 en 10 μm), estaban formadas por dos hileras de poroides redondos (5 en 1 μm) separados por un espacio liso.

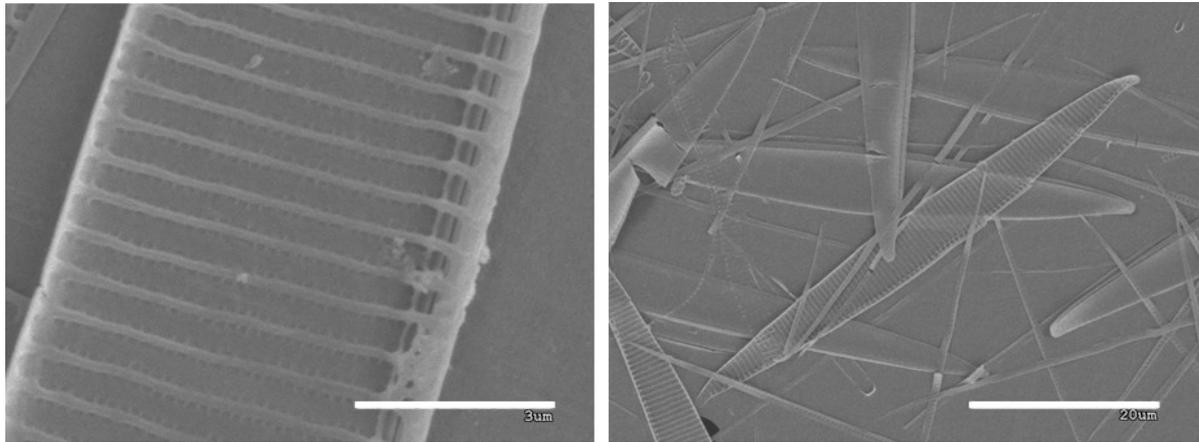


Figura 35. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia australis* (PA4). Escala: A (3 µm); B (20 µm). (Fuente: elaboración propia).

3.2.1.2 *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (Hasle)

En relación a los cultivos obtenidos de *P. subfraudulenta*. Las células observadas en vista valvar, tenían forma linear en la parte media de las valvas (Fig. 36A). Las medidas del eje apical estaban entre 66 – 111 µm y las del eje transapical entre 3,5 – 7 µm.

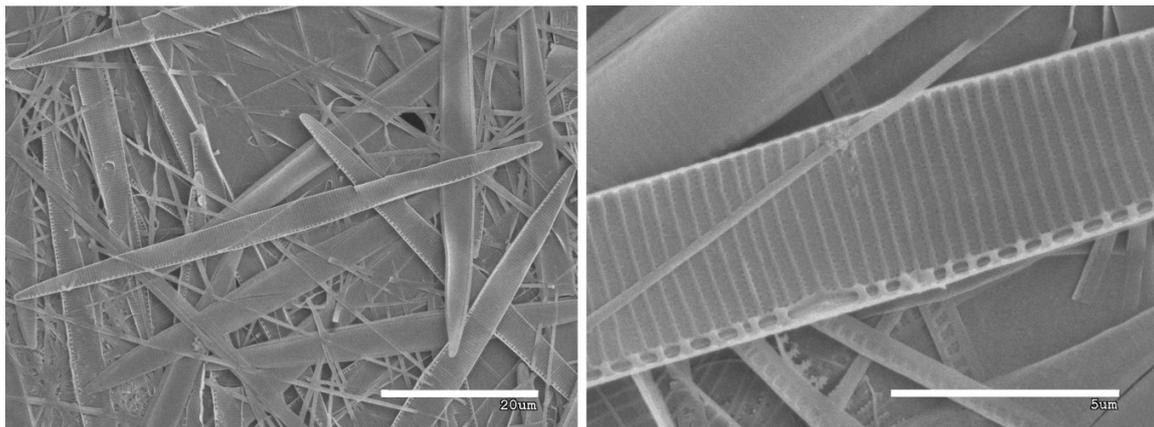


Figura 36. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (PSF2). Escala: A (20 µm); B (5 µm). (Fuente: elaboración propia).

La superficie valvar (Fig.36B), se caracterizó por presentar más de una estría por fíbula y tener nódulo central. El número de fíbulas y estrías en 10 μm fue de 17 – 18 y 23 – 24, respectivamente. Las estrías, estaban formadas por dos hileras de poroides redondos (5 en 1 μm) separados por un espacio liso.

3.2.1.3 *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm Moestrup et Hasle

Las células de los cultivos de *P. calliantha*, se caracterizaron por tener forma linear en la parte media las valvas. Las medidas del eje apical estaban entre 41 – 98 μm y las del eje transapical entre 1,3 – 1,8 μm .

La superficie valvar (Fig. 37), se caracterizó por presentar estrías e interestrías y por tener nódulo central. El número de fíbulas y estrías en 10 μm fue de 15 – 22 y 34 – 39, respectivamente. Las estrías, estaban formadas por una hilera de poroides cuadrados con sus esquinas curvadas (4 – 8 en 1 μm).

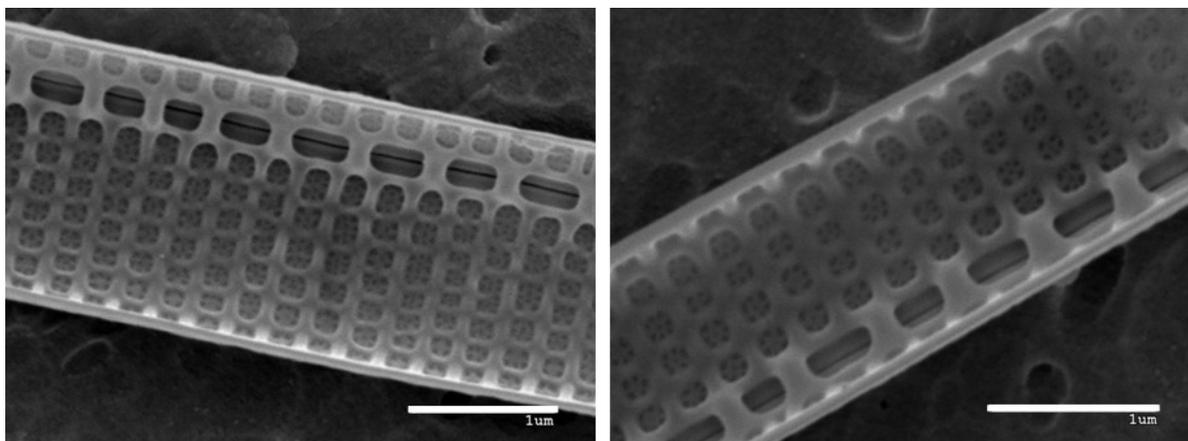


Figura 37. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia calliantha* (PCA2). Escala: (1 μm). (Fuente: elaboración propia).



3.2.1.4 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle emend. Lundholm, Hasle & Moestrup

Observaciones realizadas de muestras de fitoplancton tomadas en Bahía Inglesa durante octubre de 2004, revelaron la presencia de *P. pseudodelicatissima*.

Las células se caracterizaron por tener forma linear en la parte media las valvas (Fig.38). Las medidas del eje apical estaban alrededor de 88 μm y las del eje transapical alrededor de 2,4 μm . La superficie valvar (Fig. 40B), se caracterizó por presentar estrías e interestrías y por tener nódulo central. El número de fíbulas estuvo alrededor de 20 en 10 μm y el de estrías entre 30 en 10 μm . Las estrías, estaban formadas por una hilera de poroides ovalados (4 en 1 μm).

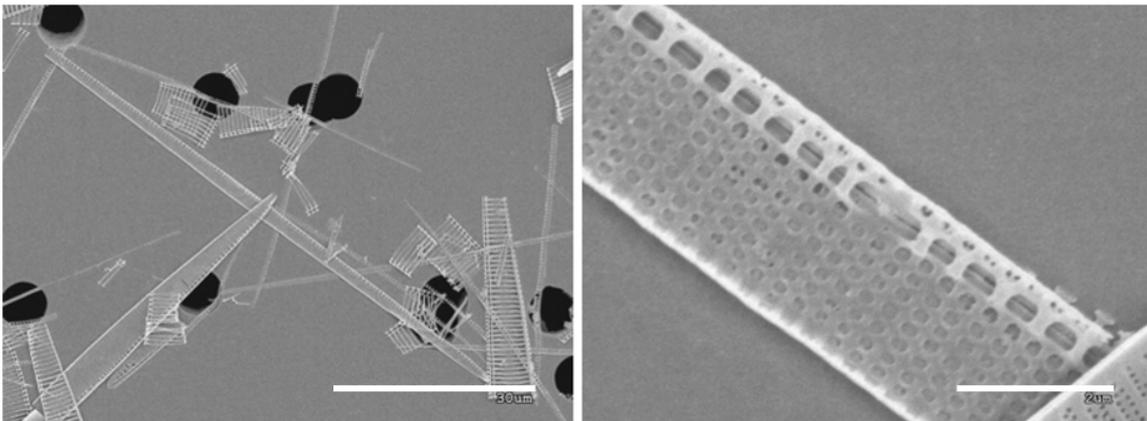


Figura 38. Vista valvar de *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (en muestras de fitoplancton). Escala: A (30 μm), B (20 μm). (Fuente: elaboración propia).

3.2.2 Especies productoras de toxinas paralizantes

3.2.2.1 *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, 1985

El Laboratorio de Producción Primaria y Fitoplancton de la Universidad Católica del Norte, participa del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos desde el año 2003. Durante Mayo de 2006, en el marco de este programa se detectó una proliferación de *Alexandrium* sp, de la cual se obtuvo un cultivo el que es mantenido en el laboratorio. Las células observadas (Fig. 39A) se caracterizaron tener una longitud entre 35 y 37 μm y un ancho entre 36 y 38 μm , siendo frecuentemente más anchas que largas. Las observaciones realizadas a las placas de la epitoca (Fig. 39B), indicaron la presencia de un pequeño poro ventral (pv) en el margen derecho de la primera placa apical (1'). Esta placa (1'), se encuentra unida directamente a la placa del poro (Po), la cual, en su centro, presenta una pequeña excavación en forma de coma. En relación a la placa sulcal (Sa) (Fig. 39C), esta se caracterizó por ser más larga que ancha. Estas observaciones se ajustan a las descripciones correspondientes a *Alexandrium tamarense*.

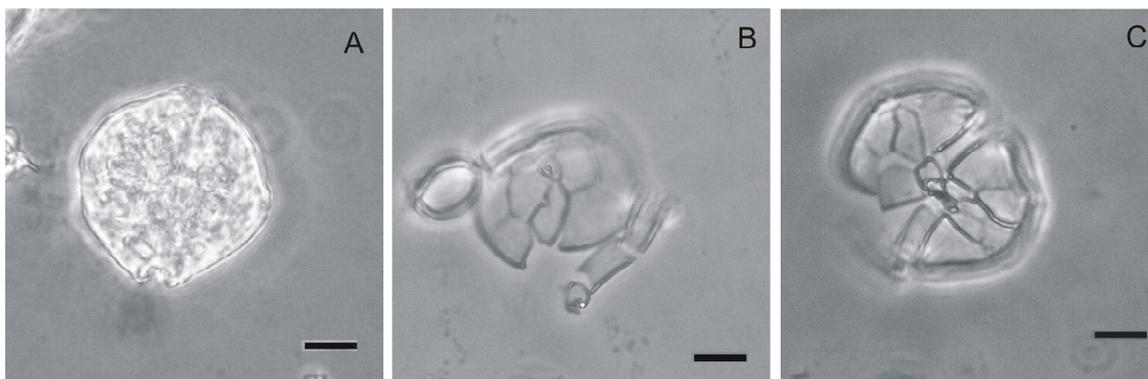


Figura 39. (A) Célula de *Alexandrium* sp, presente en las muestras de fitoplancton obtenidas de Bahía Mejillones. (B) Vista de la placa 1', que se encuentra unida directamente a la placa del poro (Po). (C) Vista de las placas 1' y Sulcal (Sa). Escala: 10 μm . (Fuente: elaboración propia).



3.2.2.2 *Alexandrium* sp

Durante Mayo de 2006, en el marco del programa de sanidad de moluscos bivalvos, se detectó la presencia de dos tipos de células de *Alexandrium* sp. La primera de ellas y más abundante, se caracterizó por no formar cadenas (Fig.40A).

Este tipo de células, se caracterizó por formar cadenas cortas (2-4 células) (Fig.40B). Su longitud fue de $30,71 \pm 0,48 \mu\text{m}$ y su ancho de $35,52 \pm 0,29 \mu\text{m}$. Lamentablemente, no se dispuso de material suficiente para hacer estudios taxonómicos más detallados que permitieran identificar de manera inequívoca a que especie pertenecían.

Figura 40. (A) Célula individual de *Alexandrium* sp. (B) Cadena de células de *Alexandrium* sp. presente en las muestras de fitoplancton de Bahía Guanaqueros. Escala: $10 \mu\text{m}$ (Fuente: elaboración propia).

3.2.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas

3.2.3.1 *Dinophysis acuminata* Claperède & Lachmann 1895

Célula bastante pequeña (38 μm), con forma elíptica y alargada antero-posteriormente en vista lateral, pero con una relación L/H bastante variable. Epiteca pequeña, levemente convexa a aplastada. Cingulum muy cóncavo dorsalmente. Aleta singular anterior bastante desarrollada, sin costillas pero a veces irregularmente esculpida. Sulcal izquierda bastante más corta que la hipoteca, de borde libre irregular, con frecuencia fuertemente doblado hacia la derecha entre R_1 y R_2 ; R_2 más cerca de R_1 que de R_3 . A nivel de R_2 la aleta presenta casi siempre un ángulo más o menos marcado (Fig. 41).



Figura 41. Célula individual de *Dinophysis acuminata*. (Fuente: elaboración propia).

3.2.3.2 *Protoceratium reticulatum* (Claparede et Lachmann) Butschli 1885

Durante Febrero de 2007, en el marco del programa de sanidad de moluscos bivalvos, se detectó en Bahía Mejillones una floración de un dinoflagelado identificado preliminarmente como *Proto-peridinium* sp.

Los análisis taxonómicos de los especímenes estudiados confirmaron que la especie causal de este episodio corresponde al dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*. Las células observadas (Fig. 42) son de forma poliédrica y se caracterizaron tener una longitud entre 26 y 49 μm y un ancho entre 18 y 40 μm , siendo frecuentemente más largas que anchas. Las tecas, están formadas por numerosas placas reticuladas, destacando la presencia de un marcado cingulum, unido de manera perpendicular al sulcus.

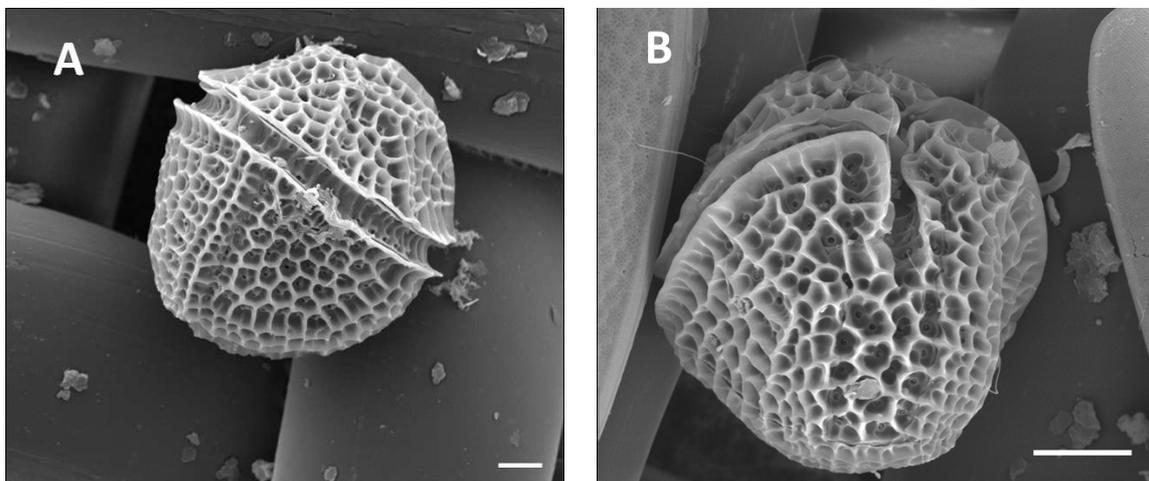


Figura 42. Células de *Protoceratium reticulatum* obtenidas en muestras de fitoplancton de Bahía Mejillones. (A) Vista dorsal (escala: 5 μm). (B) Vista ventral y antapical (escala: 10 μm). (Fuente: elaboración propia).

3.2.3.3 *Gonyaulax spinifera* (Claparede et Lachmann) Diesing

Especie relativamente pequeña, cuello y “hombros” bien marcados. Se entiende por hombros una inflexión bastante marcada de los flancos de la epiteca, hacia la mitad o algo por delante. Presenta dos espinas antiapicales bien desarrolladas, con membranas laterales. El cingulum está fuertemente excavado, descendente (2.5 – 3 veces su altura) y de estre cruzamiento pronunciado de manera que la recta que une los dos extremos del cingulum forma con el eje longitudinal un ángulo de 20 – 25°; el entrecruzamiento es de aproximadamente 2 a 3 alturas de cingulum (Balech, 1988). Esta especie en se ha encontrado como una especie secundaria durante una floración de *Gonyaulax monacantha* en el verano de 2008 en Bahía Mejillones.

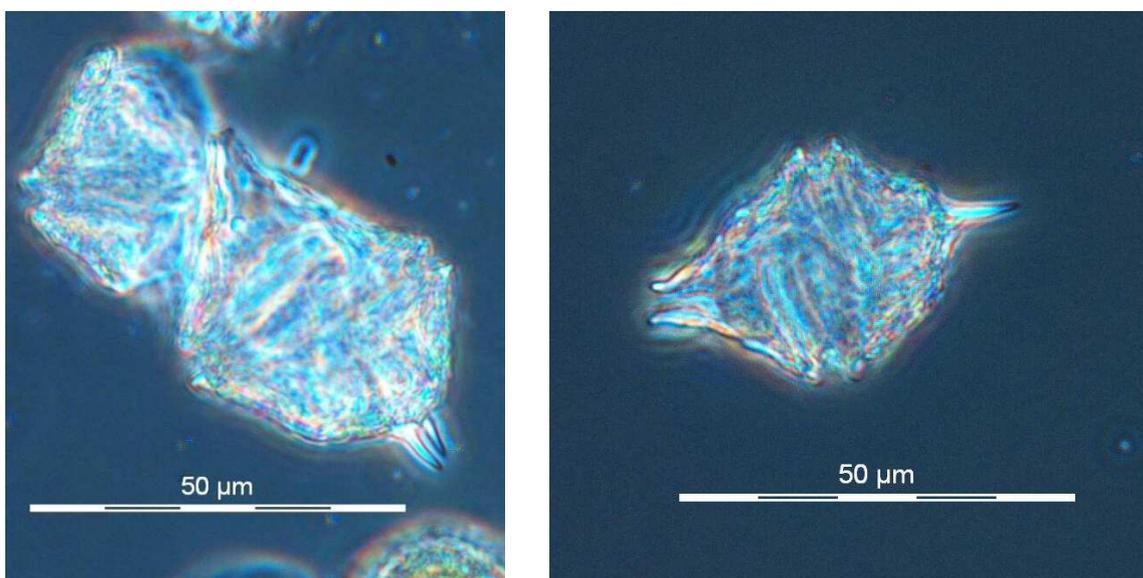


Figura 43. (A) *Gonyaulax spinifera*. (B) *Gonyaulax monacantha* Pavillard (Fuente: elaboración propia).



3.2.3.4 *Azadinium spinosum* Elbrächter & Tillmann, 2009

Durante el desarrollo del proyecto, se detectó la presencia de un pequeño dinoflagelado similar a *Azadinium spinosum* en muestras obtenidas con manguera. Cabe señalar que siempre ha sido un ejemplar accidental.

Lamentablemente por su tamaño no es posible capturarlo con una red de fitoplancton con abertura de malla de 20 μm , lo que dificulta la detección de su presencia en las muestras cualitativas. Además, es poco probable que este organismo sea posible colectarlo con una malla de 10 μm de abertura de poro, lo que ha dificultado su obtención para establecer un cultivo. Por otra parte, para realizar los análisis cuantitativos de fitoplancton, es necesario realizarlo con el objetivo de 40X.

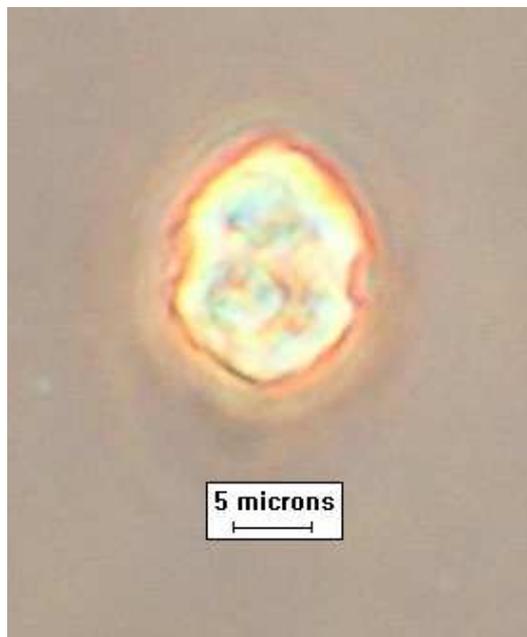


Figura 44. Posible *Azadinium sp.*, registrado en Bahía Guanaqueros el 21 de julio de 2009, con una longitud de 8,35 μm y ancho 5,45 μm . (Fuente: elaboración propia).

3.2.4 Especie nocivas para la acuicultura

3.2.4.1 *Rhizosolenia imbricata* Brightwell 1858

Las células observadas fueron encontradas individualmente o formando cadenas de 2 a 4 individuos. Las células individuales son cilíndricas, alargadas y poseen varios cromatóforos (Fig. 45B). El frústulo, presenta una serie de bandas que se encuentran apiladas en forma de columna. (Fig. 45C). Las valvas tienen una forma ligeramente cónica asimétrica, que terminan en un pequeño proceso con forma de espina con una longitud de $7.1 \pm 1.6 \mu\text{m}$, cuya base se encuentra insertada en una pequeña otaria que ocupa alrededor de un tercio de la espina. (Fig. 45D). Las medidas del eje perivalvar son $121.8 \pm 28.4 \mu\text{m}$ y su eje apical es de $23.4 \pm 4.5 \mu\text{m}$.

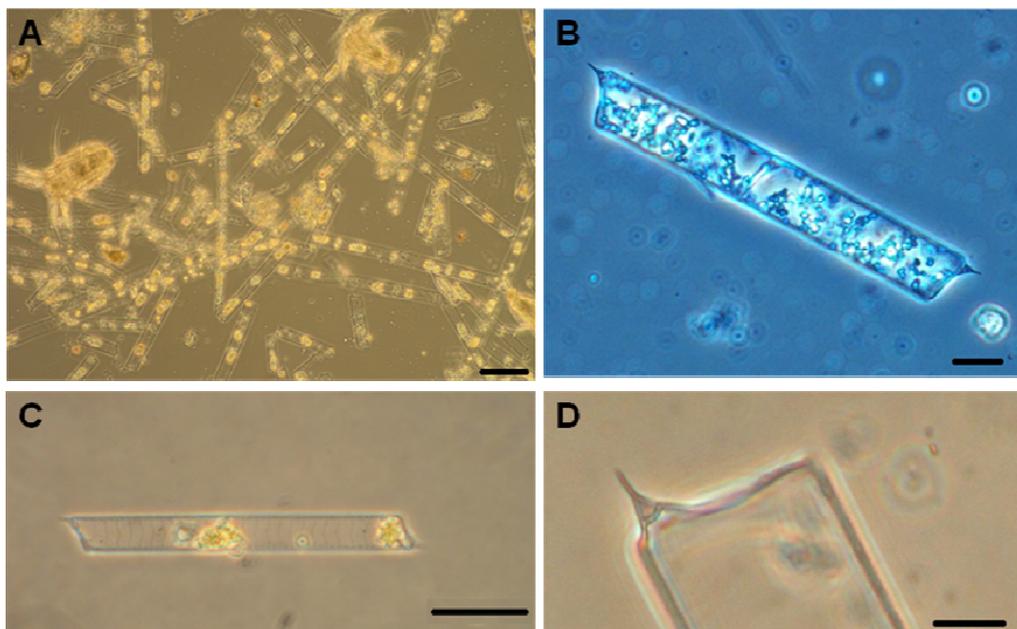


Figura 45. (A) Muestra obtenida durante la floración de *Rhizosolenia imbricata* (B) Cromatóforos (C) Bandas transversales en las pleuras del frústulo (D) Proceso con forma de espina insertada en una pequeña otaria. Escala: (A) 100 μm , (B) 20 μm , (C) 50 μm y (D) 10 μm . (Fuente: Elaboración propia).



3.2.4.2 *Guinardia striata* (Stoltherfoth) Hasle

Células cilíndricas levemente curvadas. Válvas planas con bordes redondeados. El proceso externo es marginal, y se inscribe en una depresión poco profunda en la valva adyacente. La medida del eje pervalvar es de 250 μm y su eje apical es de 6 a 45 μm . Las células forman cadenas que en algunas ocasiones pueden tener forma de espiral. La faja de bandas aparece como collares, pero son difíciles de observar en microscopía convencional. Las células presentan numerosos cloroplastos de pequeño tamaño.

Durante la presencia de esta especie en la comunidad fitoplanctónica, se observa una alteración de las características organolépticas del ostión (*Argopecten purpuratus*). Esta alteración es un cambio de coloración de la gónada desde un tono rojizo a un tono crema, que puede ser debido al consumo de esta especie por este bivalvo. Este cambio de coloración otorga un aspecto similar al que presenta la gónada luego del desove del bivalvo.



Figura 46. Célula individual de *Guinardia striata*. (Fuente: elaboración propia).



3.3 Resultados de los perfiles toxicológicos del fitoplancton tóxico encontrado en cada una de las bahías contempladas en el estudio.

3.3.1 Especies productoras de ácido domoico

Antes del inicio del proyecto, el Laboratorio de Producción Primaria y Fitoplancton de la Universidad Católica del Norte mantenía en cultivo diferentes cepas de *Pseudo-nitzschia*.

Los análisis realizados a los extractos de los cultivos de *P. australis* por HPLC-UV y HPLC-MS, confirman la presencia de ácido domoico en cuatro de los cultivos obtenidos (PA2, PA3, PA4 y PA5) (Tabla XVII). Estos análisis (Fig.47), muestran un pico cromatográfico con una máxima de absorbancia en 242 nm y un tiempo de retención de 11,6 minutos. Adicionalmente, el cromatograma obtenido mediante HPLC-MS, muestra un pico cromatográfico del ion molecular 312 *m/z* en el minuto 11,7. La fragmentación de este ion molecular da como resultado los fragmentos característicos (294, 266, 248 *m/z*) que confirman la presencia de ácido domoico. La concentración de esta toxina en los cultivos se encontró entre 0,04 – 1,74 pg célula⁻¹ (Tabla XIX).

En relación a *P. calliantha*, solo el cultivo obtenido en Bahía Tongoy (PCA2) dio positiva para ácido domoico. Su análisis por HPLC-UV y HPLC-MS (Fig. 48), mostraron un pico cromatográfico con una absorbancia de 242 nm con un tiempo de retención de 11,56 minutos y un pico cromatográfico para el ion molecular 312 *m/z* en el minuto 11,69, respectivamente. Al igual que en el caso de *P. australis*, la fragmentación del ion molecular 312 *m/z* dio como resultado los fragmentos característicos (294, 266, 248 *m/z*) que confirman la presencia de ácido domoico. La concentración de esta toxina en el cultivo fue de 0,01 pg célula⁻¹.

Finalmente, los análisis realizados a los cultivos obtenidos de *P. subfraudulenta*, dieron negativo para la presencia de ácido domoico (Tabla XIX).

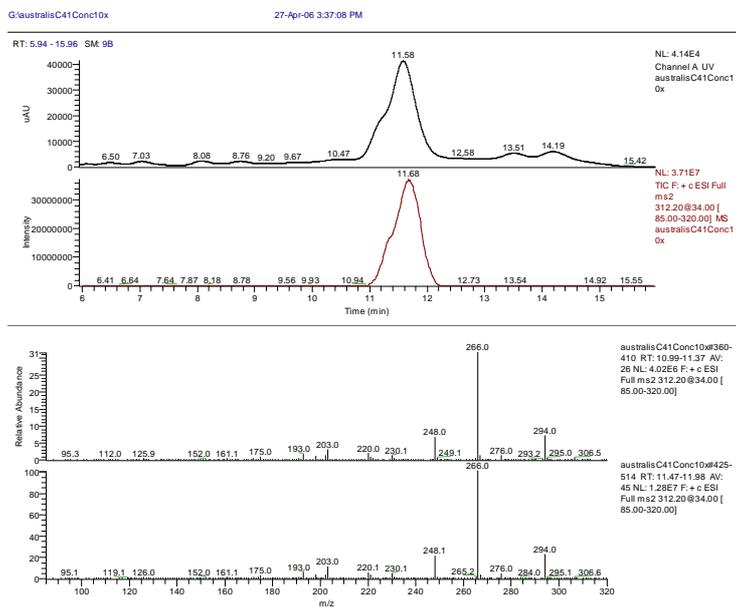


Figura 47. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS²) correspondiente al ácido domoico presente en los cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* (PA4) aislados de Bahía Inglesa (Fuente: elaboración propia).

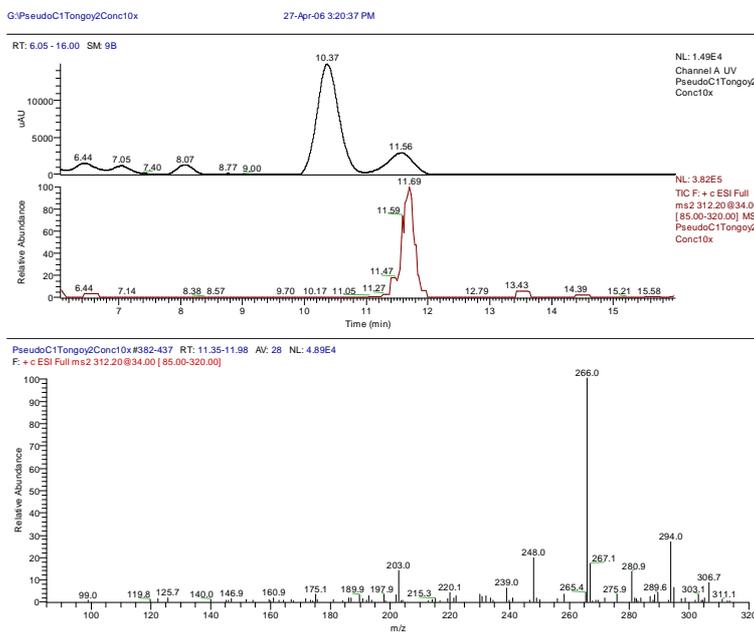


Figura 48. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS²) correspondiente al ácido domoico presente en los cultivos de *Pseudo-nitzschia calliantha* (PCA2) aislados de Bahía Tongoy (Fuente: elaboración propia).



Tabla XIX. Concentración de ácido domoico en los cultivos de *Pseudo-nitzschia* obtenidas en las bahías del Norte de Chile. < LOD: Menor al límite de detección (< 0,5 ng mL⁻¹).

Raza	Especie	Fecha obtención	Bahía	Ácido domoico (ng mL ⁻¹)	Ácido domoico (pg célula ⁻¹)
PA1	<i>P. australis</i>	14/09/03	La Herradura	< LOD	< LOD
PA2	<i>P. australis</i>	06/09/04	La Herradura	5,18	0,04
PA3	<i>P. australis</i>	26/09/04	La Herradura	5,08	0,05
PA4	<i>P. australis</i>	25/10/04	Inglesa	205,20	1,74
PA5	<i>P. australis</i>	11/01/05	La Herradura	87,31	0,59
PCA1	<i>P. calliantha</i>	15/09/03	La Herradura	< LOD	< LOD
PCA2	<i>P. calliantha</i>	23/12/05	Tongoy	1,84	0,01
PSF1	<i>P. subfraudulenta</i>	25/10/04	Inglesa	< LOD	< LOD
PSF2	<i>P. subfraudulenta</i>	14/02/06	Tongoy	< LOD	< LOD

(Fuente: elaboración propia).

3.3.2 Especies productoras de toxinas paralizantes

Los análisis de toxinas realizados mediante HPLC-FD, no detectaron la presencia de estas toxinas paralizantes en las muestras de fitoplancton extraídas desde Bahía Mejillones y en los cultivos de *Alexandrium tamarense* (Fig. 49).

Sin embargo, se detectaron pequeñas cantidades de toxinas paralizantes en muestras de *Semimytilus algosus* y *Argopecten purpuratus* extraídas durante la floración de *A. tamarense*, lo que nos permite tener una aproximación a su perfil toxicológico (Fig. 49).

En ambos moluscos, el perfil de toxinas se caracterizó por la presencia de C2, GTX2 y GTX3 y la presencia de dcGTX2 sólo en *A. purpuratus*. La hidrólisis de las muestras no incremento la concentración de toxinas GTX, STX o neoSTX, por lo que se descarta la presencia de toxinas sulfocarbamato (C1, C3, C4, GTX5-GTX6). Finalmente, no se detectó la presencia de toxinas GC (Fig. 49).

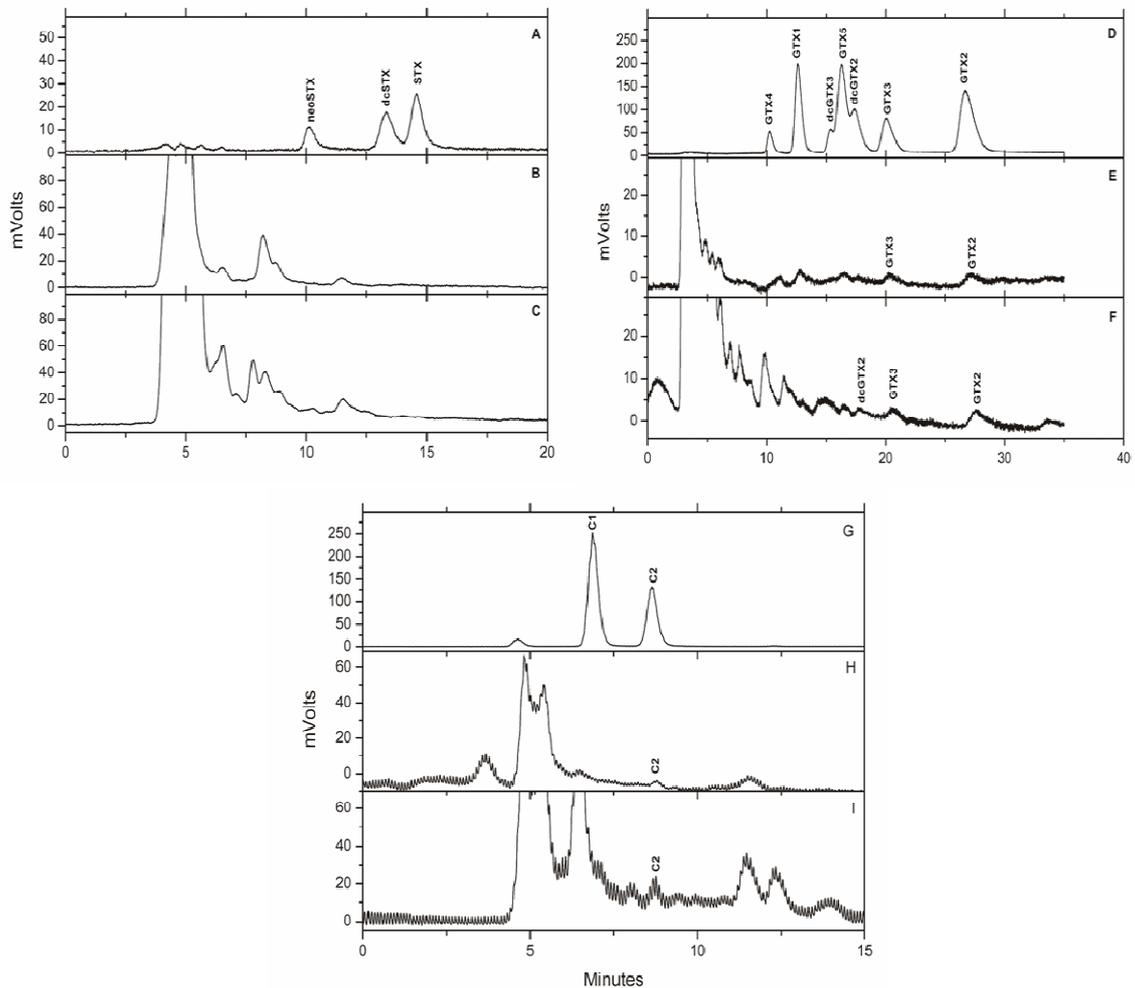


Figura 49. Toxinas paralizantes en *Semimytilus algosus* y *Argopecten purpuratus* extraídos durante una floración de *Alexandrium tamarense* en Bahía Mejillones. (A) Patrón del grupo de STX. (B) Extracto de *Semimytilus algosus*. (C) Extracto de *Argopecten purpuratus*. (D) Patrón del grupo de GTX. (E) Extracto de *S. algosus* con GTX2 y GTX3. (F) Extracto de *A. purpuratus* con GTX2, GTX3 y dcGTX2. (G) Patrón del grupo C. (H) Extracto de *S. algosus* con trazas de C2. (I) Extracto de *A. purpuratus* con trazas de C2. (Fuente: elaboración propia).



3.3.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas

3.3.3.1 *Dinophysis acuminata*

Los análisis realizados a las células aisladas de *Dinophysis acuminata* por HPLC-MS, confirmaron la ausencia de ácido okadaico (AO) y dinophysistoxinas (DTX) 1 y 2. De este modo, el perfil de toxinas de este dinoflagelado en esta zona geográfica solo está compuesto por pectenotoxina 2 (PTX2) y probablemente pequeñas cantidades de PTX11. Los análisis realizados para detectar y cuantificar la PTX2 (Fig.50), muestran un pico cromatográfico para el ion molecular 876 m/z con tiempo de retención de 9,54 minutos. Adicionalmente, el espectro de fragmentación da como resultado los fragmentos característicos 841, 823, 805 y 787 m/z que confirman la presencia de PTX2. La concentración de esta toxina en las células fue de 180 pg célula^{-1}

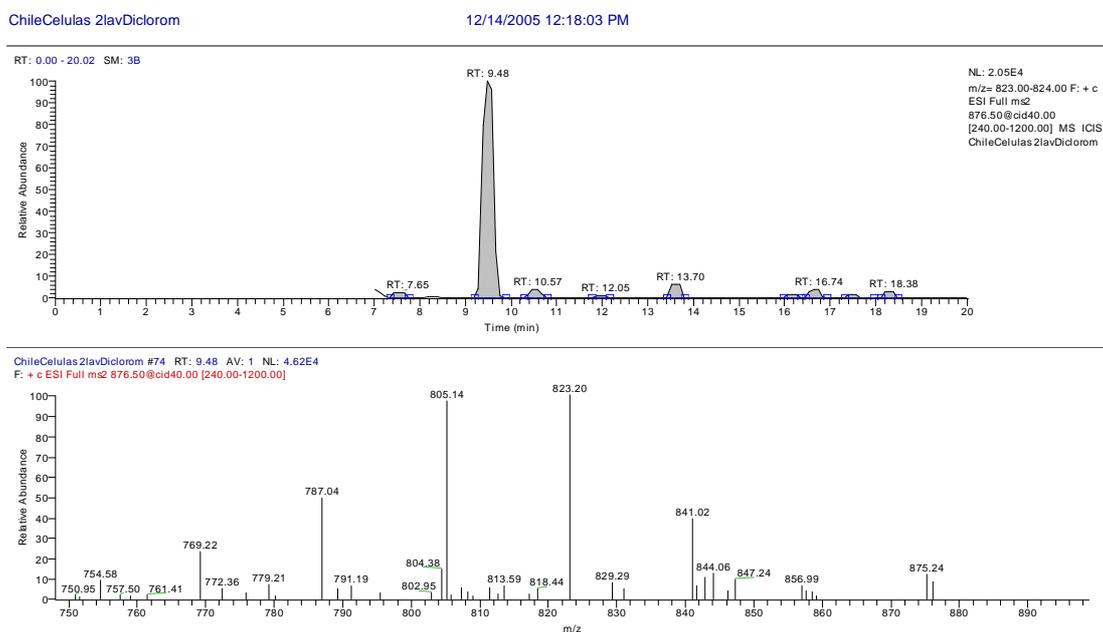


Figura 50. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente a la PTX2 presente en las células aisladas de *Dinophysis acuminata* aisladas de Bahía Tongoy (Fuente: elaboración propia).



Adicionalmente, un compuesto con la misma masa molecular de la PTX1 o PTX11 (897 m/z) fue encontrado en muestras de fitoplancton obtenidas desde Bahía Tongoy. La fragmentación de este ion molecular da como resultado los fragmentos característicos (853, 555 m/z) (Fig.51), lamentablemente, la concentración en el extracto fue muy baja para confirmar con exactitud a cuál de los dos compuestos corresponde este espectro.

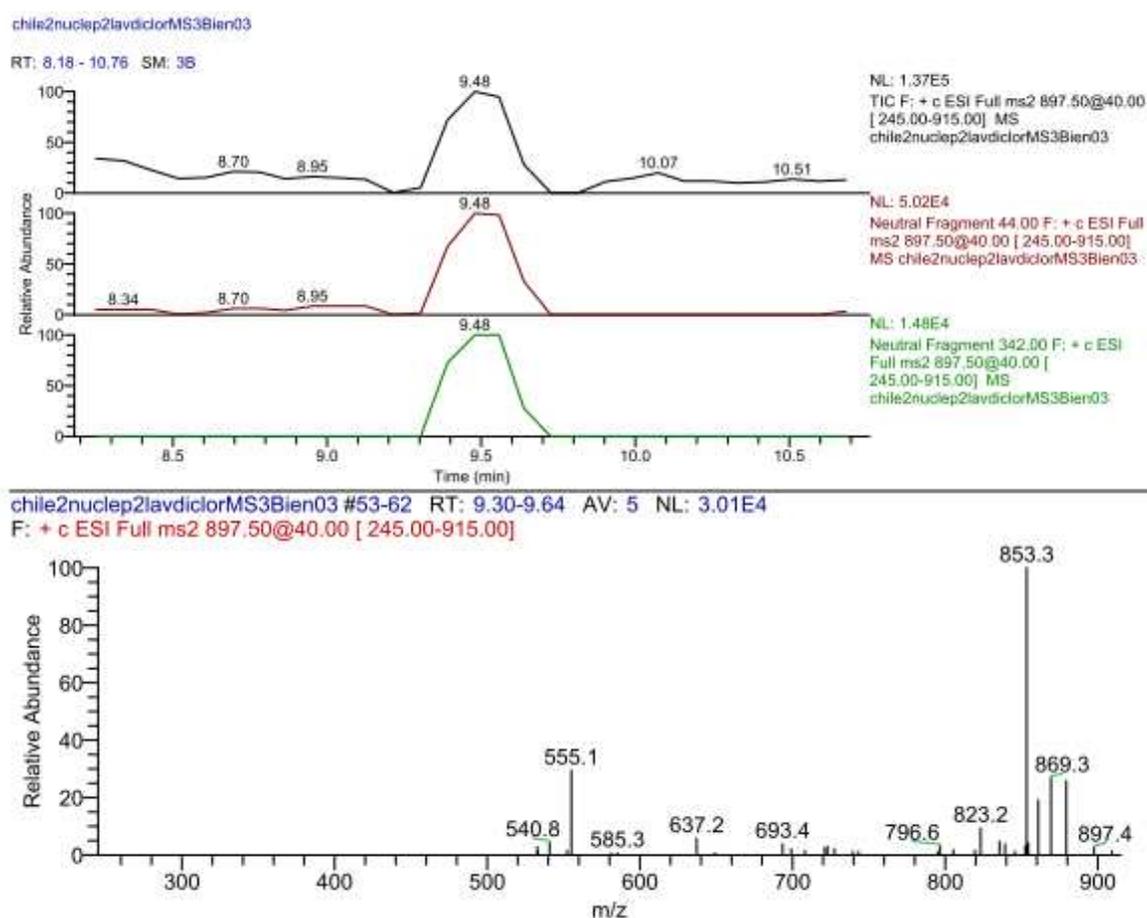


Figura 51. Cromatograma y espectro de fragmentación (MS^2) correspondiente a una muestra concentrada de fitoplancton extraída desde Bahía Tongoy en la que se detectó un compuesto de masa similar a la PTX1 o la PTX11 (897 m/z) (Fuente: elaboración propia).



3.3.3.2 *Protoceratium reticulatum*

Los análisis realizados a las muestras de fitoplancton obtenidas desde Bahía Mejillones en Febrero de 2007, confirmaron la presencia de yesotoxina. Los realizados para detectar y cuantificar la YTX (Fig.52), muestran un pico cromatográfico para el ion molecular 1141 m/z con tiempo de retención de 7,85 minutos. El espectro de fragmentación en ms^2 y ms^3 , dan como resultado los fragmentos característicos 1061 m/z y 924 m/z que confirman la presencia de YTX. La concentración de esta toxina en las células se encontró entre 0,2 y 0,4 pg célula⁻¹. Por otra parte, no se detectó la presencia de ninguna otra toxina relacionada con la yesotoxina.

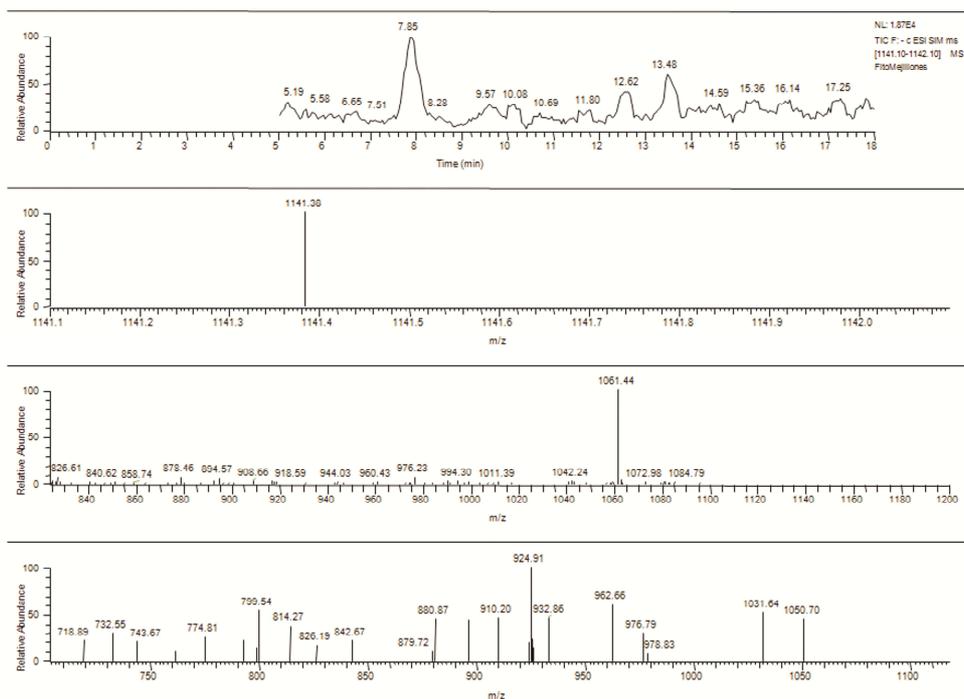


Figura 52. Cromatograma y espectros de fragmentación (MS^2 y MS^3) correspondiente a la YTX presente en muestras de fitoplancton obtenidas en Bahía Mejillones (Fuente: elaboración propia).

3.3.3.3 *Gonyaulax cf. spinifera*

Los análisis realizados a las muestras de fitoplancton obtenidas desde Bahía Mejillones en Febrero de 2008, confirmaron la presencia de yesotoxina. En la figura 53, se muestran los cromatogramas correspondientes a la yesotoxina, con un tiempo de retención de 3 minutos, en los cuales se confirma la presencia de esta toxina mediante la monitorización de los iones moleculares 1141 m/z (Fig. 33.A) y 570 m/z (correspondiente a esta toxina en condiciones alcalinas) y dos de sus transiciones correspondientes a sus fragmentos 467 y 396 m/z (Fig.33B y C). Lamentablemente, el contenido de toxina por célula no pudo ser determinado, debido a que la mayoría de las células se encontraban destruidas por lo que la mayor parte de la toxina se encontraba libre en el medio.

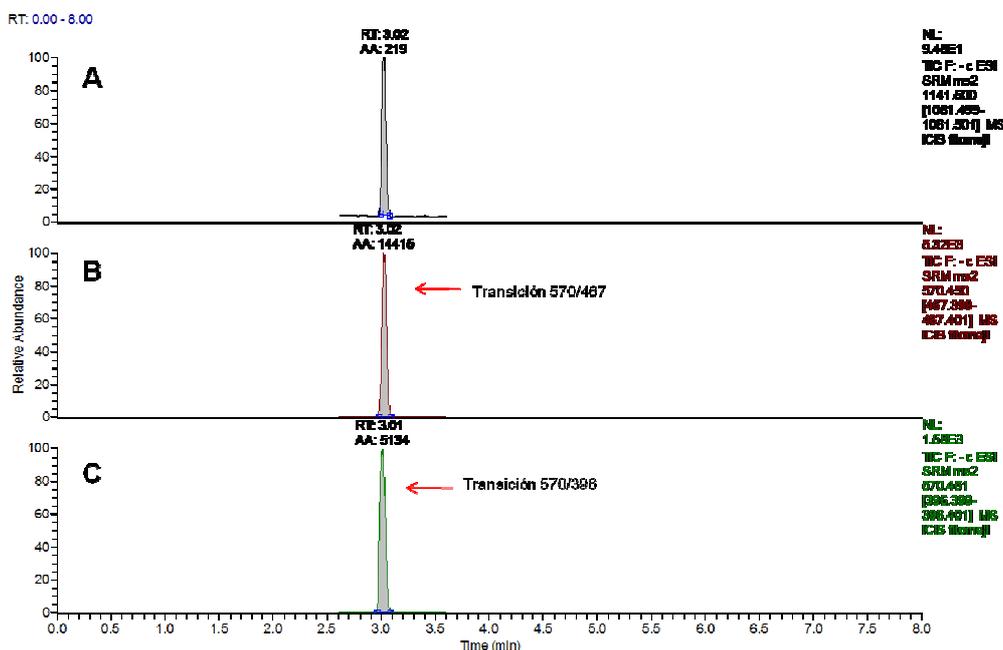


Figura 53. Cromatograma MRM (Multiple Reaction Monitoring) correspondiente a la muestra de plancton concentrada durante una floración de *Gonyaulax cf. spinifera*, en la cual se identificó y cuantificó la presencia de YTX (A) ion molecular 1141 m/z (B) transición 570/467 y (C) transición 570/396 (Fuente: elaboración propia).



3.4 Resultados de la identificación del fitoplancton que genera cambios en las características organolépticas y coloración gonadal de *Argopecten purpuratus*.

3.4.1 Evaluación sensorial para determinar la distribución anatómica del sabor amargo en *Argopecten purpuratus*

Durante la primera floración de *Rhizosolenia imbricata* detectada en el verano de 2008, se realizaron una serie de evaluaciones sensoriales desarrolladas en el terreno por el personal de las empresas cultivadoras de ostiones. La información entregada por los encargados de estas empresas, señala que existió un incremento progresivo en la intensidad del sabor amargo en los bivalvos a medida que se incrementó la concentración de esta diatomea, alcanzando su mayor intensidad días después de detectar la máxima concentración de *R. imbricata*, a finales del mes de enero.

Tabla XX. Evaluación sensorial de los diferentes tejidos de *Argopecten purpuratus* obtenidos durante la primera floración de *Rhizosolenia imbricata* detectada en Bahía Inglesa durante el verano de 2008 (n=50).

	Glándula digestiva	Manto	Branquia	Gónada	Músculo
Evaluador 1	0	0	0	4	0+
Evaluador 2	0	0	0	4	0
Evaluador 3	0	0	0	4	0
Evaluador 4	0	0	0	4	0+
Evaluador 5	0	0	0	5	0+

(Fuente: elaboración propia)

Los resultados de las evaluaciones sensoriales para determinar cuál de los órganos o tejidos tiene el sabor más intenso demostraron claramente que el principal órgano que concentra este sabor es la gónada. Además, permitieron determinar que el músculo aductor también ve afectadas sus características organolépticas presentando un leve sabor amargo que, para algunos evaluadores



resultó casi imperceptible. Finalmente, las pruebas realizadas al resto de los tejidos demostraron que ninguno de ellos se encontraba amargo (Tabla XX).

Finalmente, de acuerdo a las evaluaciones sensoriales realizadas por el personal de las empresas, para ambos episodios se determinó que los bivalvos tardan al menos 100 días en recuperar sus condiciones organolépticas, lo que permite reiniciar el procedimiento habitual de cosecha y elaboración de productos en formato “roe on” (gónada y músculo).

3.4.2 Progreso en la purificación e identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos

3.4.2.1 Caracterización preliminar

Se comprobó que la sustancia amarga no se pierde con el liofilizado (necesario para el transporte de Chile a España, donde se realizó la mayor parte del trabajo). Además, se determinó que el compuesto es insoluble en agua pero soluble en metanol, e incluso en metanol acuoso, siendo percibido desde la extracción realizada con metanol al 60%. La mayor intensidad del sabor amargo fue detectada en las fracciones extraídas a partir de metanol 80% y la última extracción en acetona (Tabla XXI).

Se constató que el principal compuesto causante es una molécula pequeña (<2 kDa), que no se retiene en cartuchos cromatográficos de fase normal y que probablemente se retiene en columnas y cartuchos de fase reversa, pero que sufre alguna alteración que le hace perder su sabor amargo, lo cual limita en buena parte las posibilidades de purificación.



Tabla XXI. Evaluación sensorial de cada fracción obtenida durante la extracción del compuesto amargo en gónadas de *A. purpuratus*.

Fracción	Evaluación sensorial	Color en la muestra
Acuosa	0	++
MeOH 30%	0	++
MeOH 40%	0	++
MeOH 50%	0	++
MeOH 60%	0+	++
MeOH 70%	1	++
MeOH 80%	2	+++
MeOH 90%	4	+++
MeOH 100%	4	+++
Acetona 100%	2	+++

(Fuente: elaboración propia).

El compuesto amargo parece ser electronegativo ya que queda retenido en un cartucho de intercambio aniónico débil. Finalmente, las pruebas realizadas para determinar si este compuesto tiene naturaleza proteica, resultaron negativas ya que el extracto se mantuvo amargo luego de ser sometido a una digestión con tripsina.

3.4.2.2 Purificación con Sephadex LH-20

3.4.2.2.1 Primera purificación

Con la primera purificación realizada con Sephadex LH-20 (Fig.54A), se obtuvieron dos grupos de fracciones amargas. Estos grupos de fracciones fueron clasificadas como, amargo 1 (A1) y amargo 2 (A2) constituyendo la primera más del 90% del amargo, por lo que se decidió continuar la purificación de los compuestos de este grupo, suponiendo que A2 podría probablemente contener metabolitos secundarios o productos de degradación del componente principal. En el grupo A1 se detectaron numerosos compuestos por lo que debió continuarse con el proceso de purificación.

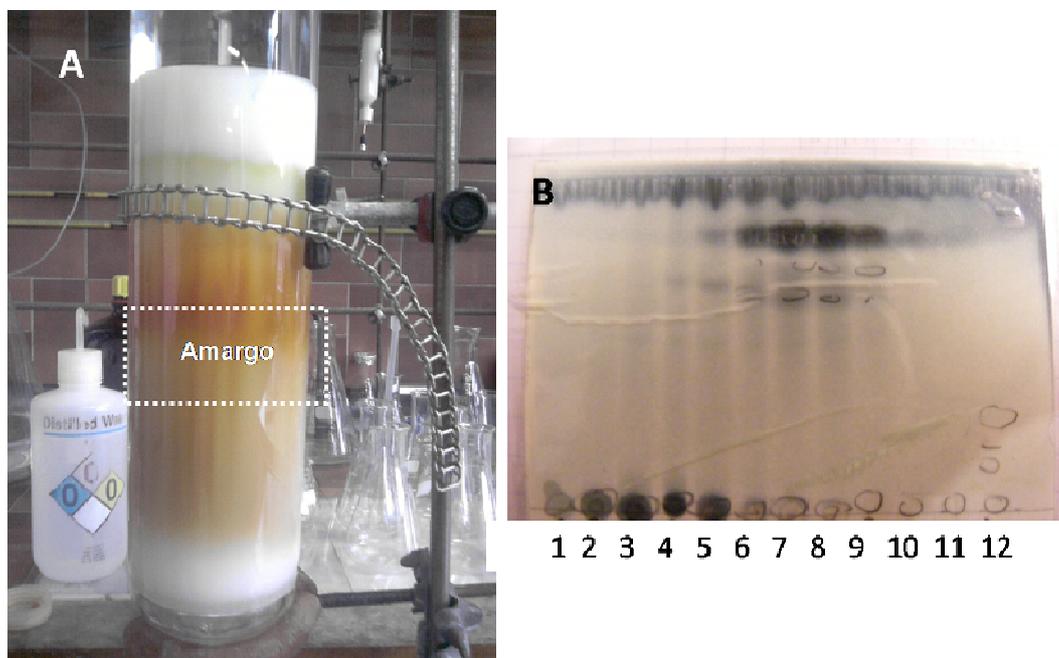


Figura 54. (A) Purificación del extracto amargo utilizando Sephadex LH-20 y posición de la banda que corresponde al grupo A1. (B) Perfil TLC correspondiente al grupo A1 (fracciones 4-9). (Fuente: elaboración propia).

Tabla XXII. Evaluación sensorial de cada fracción obtenida durante la primera purificación del compuesto amargo en gónadas de *A. purpuratus*. Fracciones del grupo A1: 4 – 9 y grupo A2: 12 – 14.

Fracción	Color	Sabor	Fracción	Color	Sabor
1	+++	0	10	+++	0
2	+++	0	11	+++	0
3	+++	0	12	++	0+
4	+++	0+	13	++	1
5	+++	1	14	++	0+
6	+++	3	15	++	0
7	+++	3	16	++	0
8	+++	1	17	++	0
9	+++	0+	18	+	0

(Fuente: elaboración propia)

3.4.2.2 Segunda purificación

Se obtuvieron cuarenta y cinco fracciones amargas que fueron agrupadas en tres grupos (Tabla XXIII), siendo las pertenecientes al grupo A1C las que presentaron el sabor amargo más intenso.

Tabla XXIII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la segunda purificación con Sephadex LH-20.

Fracción	Grupos	Color	Sabor
1 – 4	A1A	++	0
5 – 20	A1B	++	0
21 – 50	A1C	+++	4
51 – 54	A1D	+++	1
55 – 66	A1E	++	0+
67 – 80	A1F	+	0
80 - 120	Residuos	+	0

(Fuente: elaboración propia)

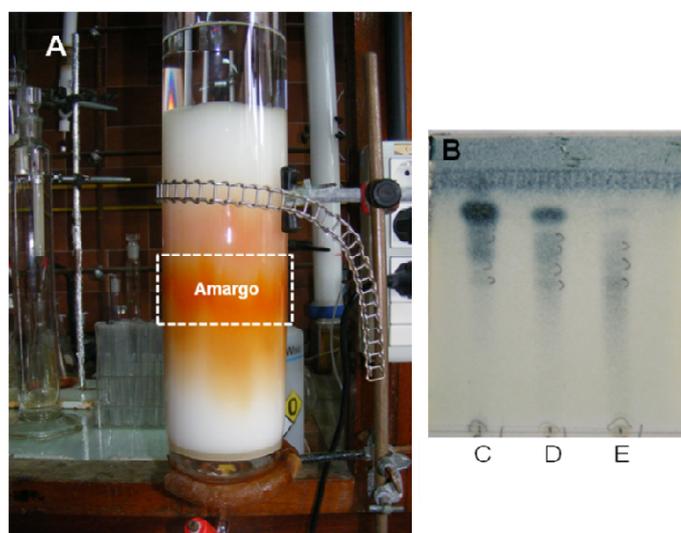


Figura 55. (A) Purificación del grupo A1 utilizando Sephadex LH-20 y posición de la banda que corresponde al grupo A1C. (B) Perfil TLC correspondiente a los tres grupos amargos A1C, A1D y A1E. (Fuente: elaboración propia).

3.4.2.2.3 Tercera purificación

La purificación del grupo A1C (Fig. 56A) permitió disminuir a nueve el número de fracciones amargas que se combinaron en cuatro grupos, siendo el grupo F4 el que tenía el sabor amargo más intenso (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la tercera purificación con Sephadex LH-20.

Fracción	Grupo	Color	Sabor
1 – 5	A	+	0
6 – 7	F1	+++	0
8 – 9	F2	+++	0
10 – 14	F3	++	0+
15 – 18	F4	++	4
19 – 24	Residuos	+	0

(Fuente: elaboración propia)

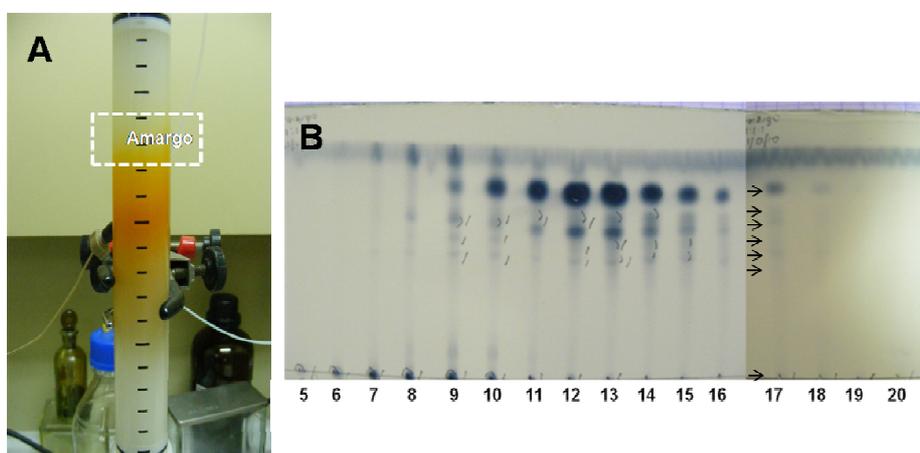


Figura 56. (A) Purificación del grupo A1C utilizando Sephadex LH-20 y la banda que corresponde al grupo F4. (B) Perfil TLC correspondiente a todas las fracciones obtenidas, destacando la fracción 17 incluida en el grupo F4. (Fuente: elaboración propia).

3.4.2.3 Purificación utilizando extracción en fase sólida

La purificación del extracto F4 con fase aminopropil (NH₂), permitió identificar el sabor amargo en las fracciones correspondientes a la etapa de carga y la primera elución realizada con diclorometano (Tabla XXV). La utilización de esta técnica permitió retener una gran cantidad de material entre las fracciones 5 y 10. Entre estos, podrían encontrarse una gran cantidad de compuestos de naturaleza polar que corresponderían a más del 60% del color anaranjado del extracto.

Tabla XXV. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con extracción en fase sólida en cartucho aminopropil (NH₂).

	Fracción	Color	Sabor
Carga	1	+	3
Diclorometano	2	+	3
Diclorometano : acetona	3	-	0
Acetona	4	+	0
Acetona : metanol	5	-	0
Metanol	6	-	0
Metanol 50%	7	-	0
Agua Milli -Q	8	+	0
Metanol 50% pH 4.5	9	++	0
Metanol 50% pH 9	10	++	0

(Fuente: elaboración propia)

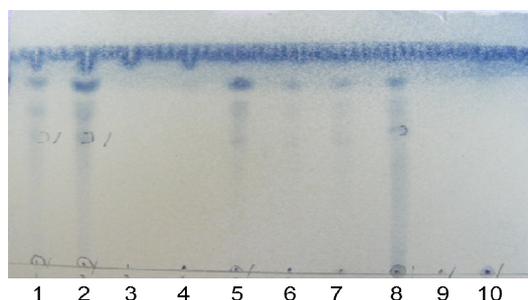


Figura 57. Perfil TLC correspondiente a todas las fracciones obtenidas durante la purificación con SPE aminopropil. Las bandas 1 y 2 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia).

3.4.2.4 Purificación con resinas de adsorción

La purificación con DIAION HP20, de la F4 previamente purificada con SPE aminopropil, realizada, permitió obtener cuatro fracciones amargas. Entre estas las fracciones 11 y 12 (Fig. 58) fueron las que presentaron un sabor más intenso (Tabla XI). Además, esta técnica, permitió eliminar gran parte del color restante en el extracto (Tabla XXVI), por lo que las fracciones amargas quedaron con un leve color las fracciones amarillo pálido.

Tabla XXVI. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con DIAION HP20.

Fracción	Color	Sabor	Fracción	Color	Sabor
1	-	0	10	++	0
2	-	0	11	++	3
3	-	0	12	+	2
4	-	0	13	+	0+
5	-	0	14	+	0
6	-	0	15	+	0
7	+	0	16	+	0
8	+	0	17	-	0
9	++	0	18	-	0

(Fuente: elaboración propia).

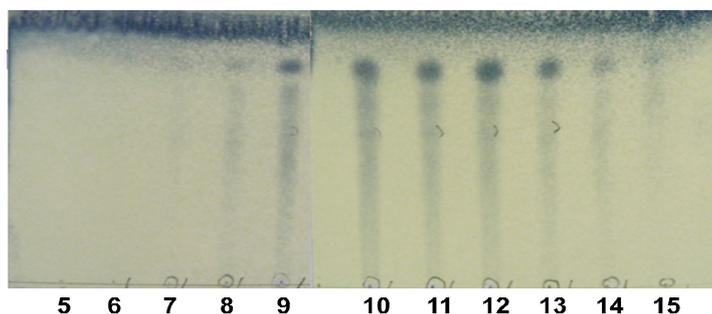


Figura 58. Perfil TLC de las fracciones obtenidas de la purificación realizada con DIAION HP20. Las bandas 11 y 12 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia).



3.4.2.5 Nueva purificación con Sephadex LH20

Una nueva separación con Sephadex LH-20 de las fracciones 11 y 12 de la separación anterior, permitió obtener tres fracciones amargas correspondientes a las fracciones 16, 17 y 18, que prácticamente no presentaban coloración (Tabla XXVII). El perfil de las fracciones amargas demostró que estas contienen compuestos de polaridad intermedia los que podrían estar asociados al sabor amargo (Fig.59). Por otra parte, la utilización de esta técnica permitió eliminar en gran parte de los compuestos que corresponderían a compuestos apolares, los que no tendrían relación con el sabor amargo en los extractos.

Tabla XXVII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con Sephadex LH20

Fracción	Color	Sabor	Fracción	Color	Sabor
1	-	0	10	-	0
2	-	0	11	-	0
3	-	0	12	-	0
4	-	0	13	+	0
5	-	0	14	+	0
6	-	0	15	+	0
7	-	0	16	-	4
8	-	0	17	-	3
9	-	0	18	-	0+

(Fuente: elaboración propia).

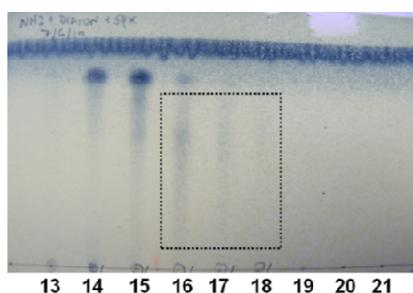


Figura 59. Perfil TLC de las fracciones obtenidas de la cuarta purificación realizada con Sephadex LH20. (Fuente: elaboración propia).

3.4.2.6 Purificación con resina de adsorción DIAION HP20SS

Esta última separación permitió obtener, a partir de las fracciones 16, 17 y 18 de la separación anterior, tres nuevas fracciones amargas (Tabla XIII). El análisis de estas fracciones por TLC, demostró que las bandas de los compuestos obtenidos son casi imperceptibles (Fig. 60). Sin embargo, es posible observar la presencia de compuestos de polaridad intermedia, similar a lo observado en la etapa de purificación previa (Fig. 59).

Tabla XXVIII. Evaluación sensorial de las fracciones obtenidas durante la purificación realizada con DIAION HP20SS.

Fracción	Color	Sabor	Fracción	Color	Sabor
1	-	0	10	-	0
2	-	0	11	-	0
3	-	0	12	-	0
4	-	0	13	-	0
5	-	0	14	-	0
6	-	0	15	-	0
7	-	0	16	-	4
8	-	0	17	-	3
9	-	0	18	-	0+

(Fuente: elaboración propia).

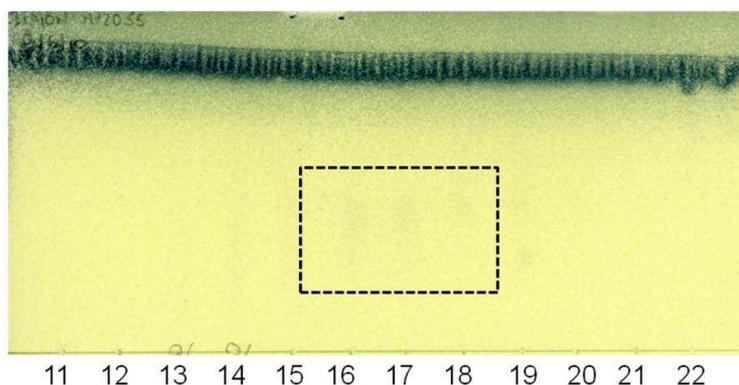


Figura 60. Perfil TLC de las fracciones obtenidas del último proceso de purificación utilizando DIAION HP20SS. Las bandas 16, 17 y 18 corresponden a las fracciones amargas. (Fuente: elaboración propia).

3.4.2.7 Perfil obtenido por espectrometría de masas

Los perfiles obtenidos de las fracciones amargas 17 y 18 (purificadas por Sephadex LH20) en modo positivo, presentaron las señales más intensas en un rango de masas entre 200 y 650 m/z (Fig.61).

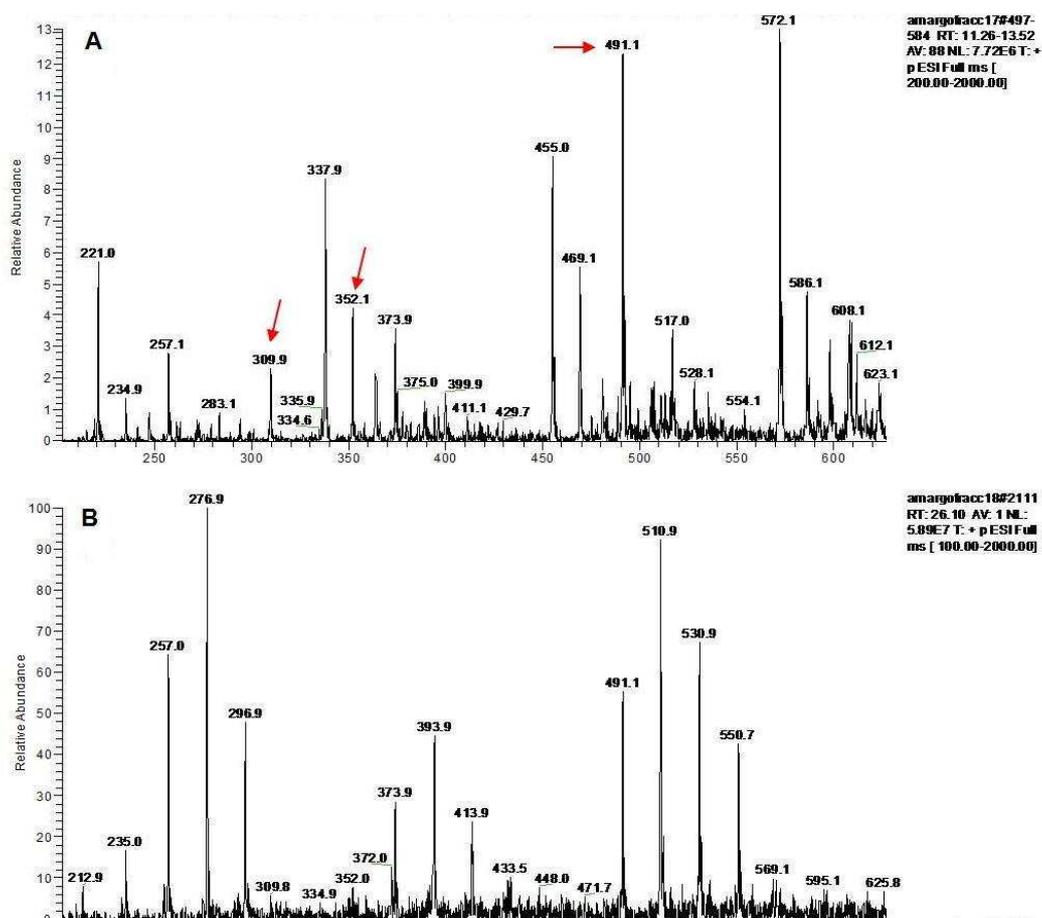


Figura 61. Espectro de fragmentación de las fracciones amargas. (A) Fracción 17 y (B) fracción 18. (Fuente: elaboración propia).

Al comparar los espectros obtenidos en cada fracción, se observa que tres iones moleculares que corresponden a 491.1, 352.1 y 309.9 m/z , se comparten en ambas fracciones, siendo más intensos en la fracción más amarga y siendo 491.1 el que produce más señal. La fragmentación del ión molecular más abundante que



corresponde a 491.1 m/z dio como resultado un fragmento de masa 373.9 m/z , el que al ser fragmentado nuevamente genera los fragmentos 256.9, 177.1 y 160.1 m/z .

En modo negativo no se pudieron obtener diferencias apreciables entre la fracción más y la menos amarga. La distribución isotópica obtenida mediante ZoomScan sugiere que este compuesto tiene aproximadamente 30 átomos de carbono (Fig.62).

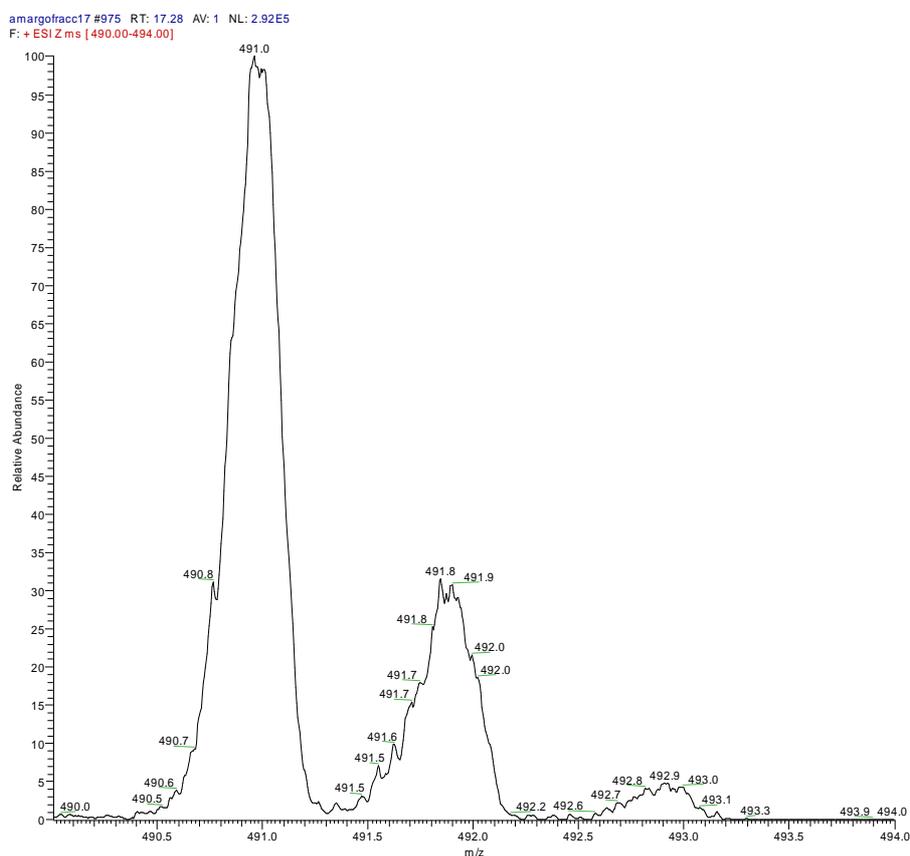


Figura 62. Distribución isotópica de obtenida mediante ZoomScan. (Fuente: elaboración propia).



3.5 Resultados de la identificación de quistes obtenidos de las bahías incorporadas en el estudio.

Los sedimentos analizados de las 6 estaciones de Bahía Mejillones, presentaron una similitud cualitativa de los quistes de resistencia. Esto se debería por una parte a la cercanía de las estaciones y por otra a las características similares de los sedimentos.

En relación a los sedimentos obtenidos de las otras bahías incluidas en el estudio que corresponden a Bahía Inglesa, Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy, los análisis revelaron que la presencia de quistes es muy baja y poco representativa lo que podría ser explicado debido a la ausencia de zonas anóxicas y con alto contenido de materia orgánica en las áreas en las que se desarrollan los cultivos.

Es importante destacar que las técnicas de identificación de quistes actuales fue desarrollada por paleontólogos, quienes trabajaron en el estudio de quistes fósiles provenientes de los sedimentos. De este modo, nos referiremos a los tipos de quistes encontrados por su nombre paleontológico, señalando además cuál es la especie fitoplanctónica a la que se encuentra relacionada.

Durante el desarrollo del proyecto, en Bahía Mejillones comúnmente se encontraron quistes morfológicamente similares a *Trinovantedinium* (Fig. 63), que corresponderían a dinoflagelados del género *Protoperidinium*. Este tipo de quistes estuvo presente en las otras bahías pero con una menor frecuencia.

Entre los quistes más abundantes registrados en Bahía Mejillones, destacan aquellos morfológicamente similares a *Spiniferites*, que corresponderían a dinoflagelados del género *Gonyaulax* (probablemente *Gonyaulax spinifera*) (Fig. 64).

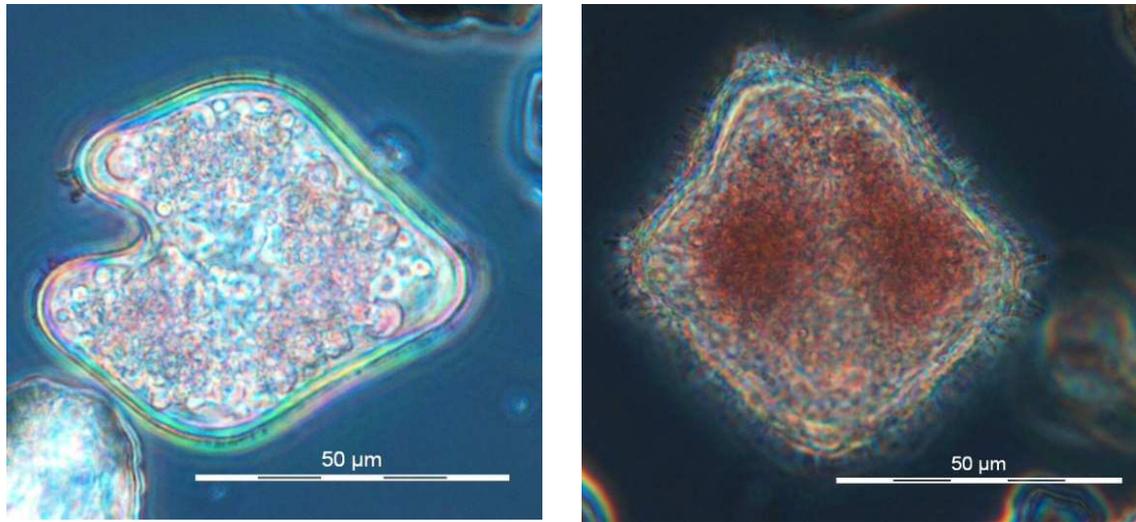


Figura 63. Quistes morfológicamente similares a *Trinovantedinium* que corresponderían a dinoflagelados del género *Protoperidinium*. (Fuente: elaboración propia).

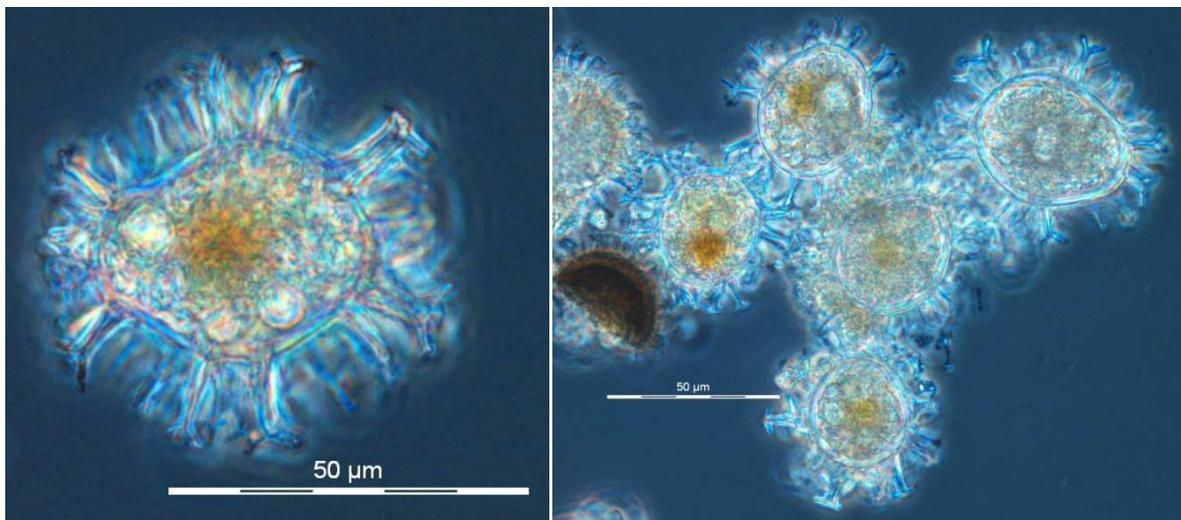


Figura 64. Quistes morfológicamente similares a *Spiniferites* que corresponderían a dinoflagelados del género *Gonyaulax*. (Fuente: elaboración propia).

Otro de los quistes frecuentemente encontrados en Bahía Mejillones, fueron aquellos morfológicamente similares a *Operculodinium centrocarpum*, que corresponderían al dinoflagelado *Protoceratium reticulatum* (Fig. 65). Durante el verano de 2007, se registró una gran cantidad de quistes de *Operculodinium*, durante una floración del dinoflagelado *P. reticulatum*. Estos quistes, también fueron detectados en Bahía Inglesa, Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy.

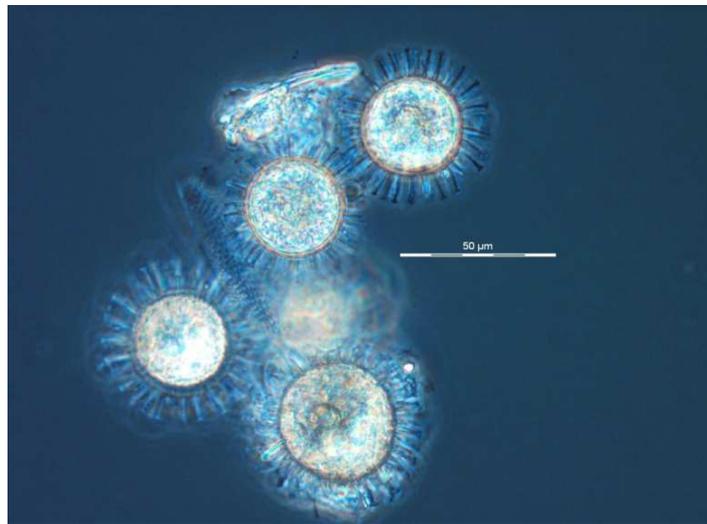


Figura 65. Quistes morfológicamente similares a *Operculodinium centrocarpum* que corresponderían al dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*. (Fuente: elaboración propia).

En todas las bahías estudiadas, se detectaron quistes morfológicamente similares a *Scripsiella*, que corresponderían probablemente al dinoflagelado *Scripsiella trochoidea* (Fig. 66).

Además, se encontró la presencia de quistes morfológicamente similares a *Brigantedinium*, que corresponderían probablemente a dinoflagelados del género *Protoperidinium* (Fig. 67).

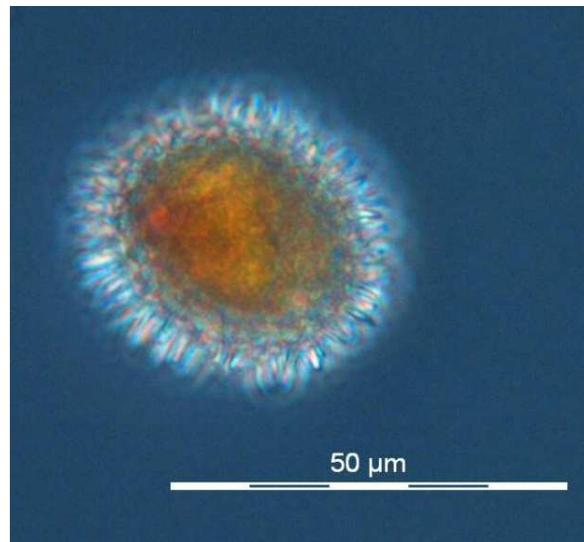


Figura 66. Quiste morfológicamente similar a *Scripsiella* que correspondería al dinoflagelado *Scripsiella trochoidea*. (Fuente: elaboración propia).

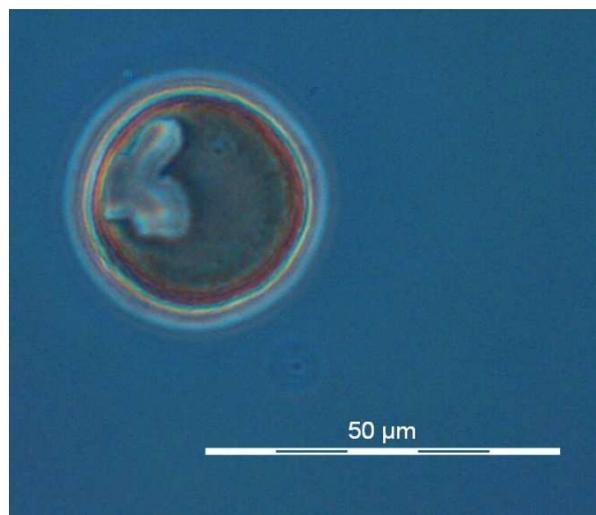


Figura 67. Quiste morfológicamente similar a *Brigantodinium* que correspondería a dinoflagelados del género *Protoperidinium*. (Fuente: elaboración propia).

Otros quistes encontrados en todas las bahías estudiadas, presentaron similitudes morfológicas con *Lingulodinium*, y corresponderían probablemente al dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (Fig. 68).

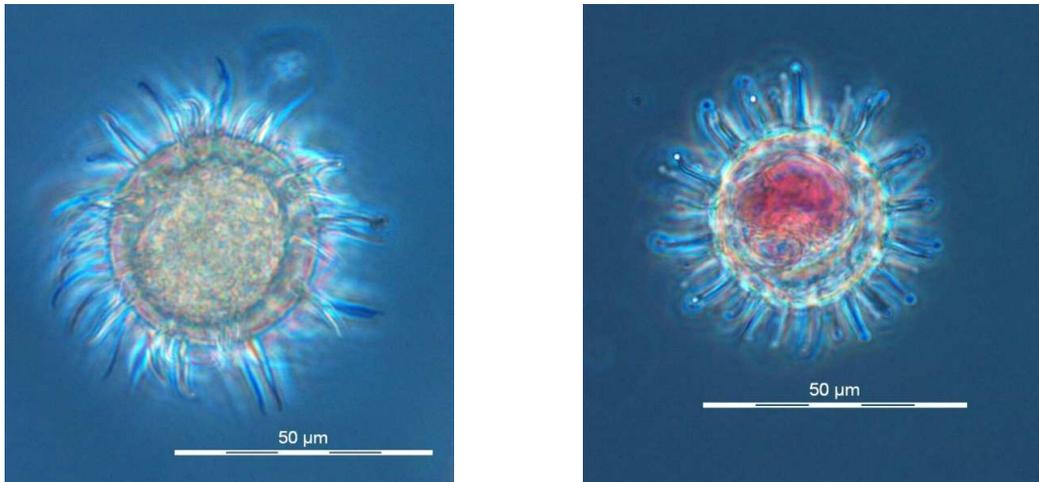


Figura 68. Quistes morfológicamente similares a *Brigantodinium* que corresponderían al dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*. (Fuente: elaboración propia).

Finalmente, en Bahía Mejillones se ha detectado la presencia de quistes similares a los correspondientes a los géneros *Alexandrium* (Fig. 69), *Polykrikos* (Fig.70) y *Pyrodinium* (Fig.71). Sin embargo, no se ha podido establecer a que especie fitoplanctónica se encuentra asociada.

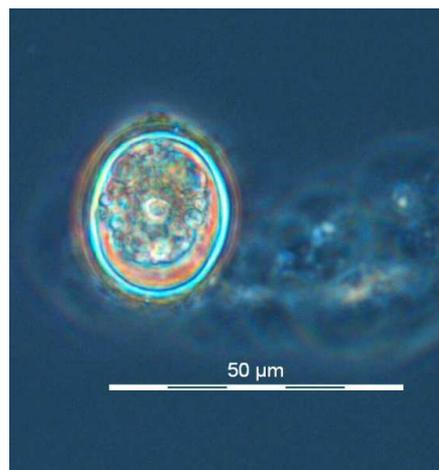


Figura 69. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Alexandrium*. (Fuente: elaboración propia).

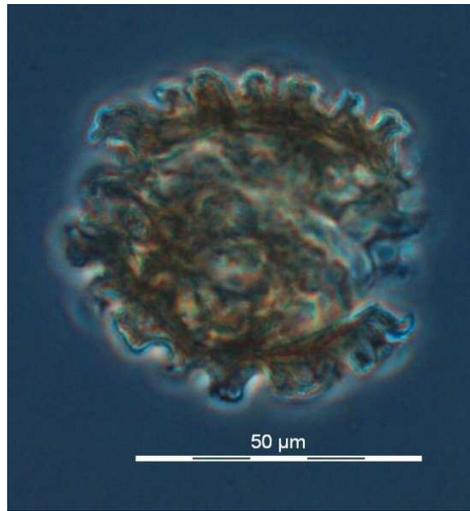


Figura 70. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Polykrikos* (Fuente: elaboración propia).

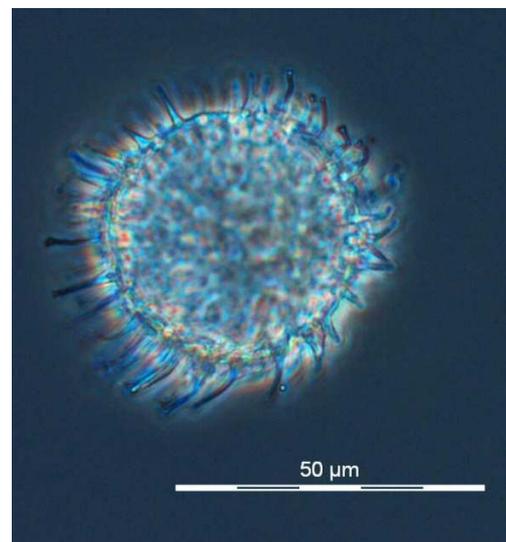
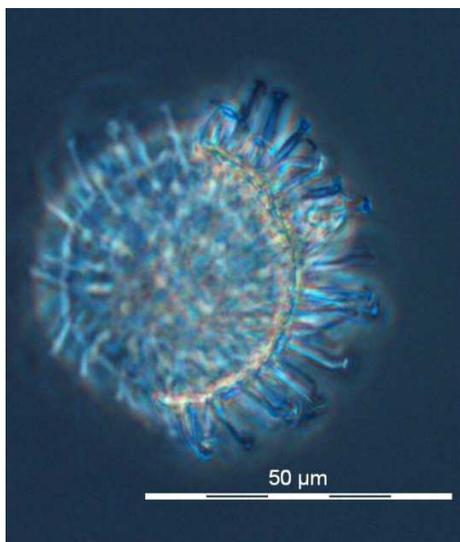


Figura 71. Quiste morfológicamente similar al correspondiente a *Pyrodinum* (Fuente: elaboración propia).



3.6 Resultados del monitoreo de variables oceanográficas y meteorológicas de las principales bahías en las que se desarrollara el estudio.

3.6.1 Temperatura del mar

Las series muestran incrementos de temperatura en la columna de agua desde noviembre en adelante, presentando pulsos de 3 a 5 días, en los cuales la temperatura a 20 m de profundidad incrementa en aproximadamente 2°C (Fig. 72). En el caso de Tongoy durante octubre los incrementos de temperatura por estos pulsos fueron menos débiles y con duraciones de un par de días. Los valores mínimos y máximos muestran que la columna presenta un rango de 7,7°C (Tabla XXIX), observándose en algunos momentos la columna esta homogénea y con temperaturas cercanas sus mínimos valores.

Al comparar las dos bahías se observa que en Tongoy se presenta un mayor calentamiento de la columna de agua, tanto en profundidad como en tiempo, aunque no se alcanzan los valores máximos observados en Bahía Inglesa. Otra diferencia observada es que de junio hasta fines de septiembre la columna de agua en Tongoy es homogénea en forma permanente y más fría que lo observado en bahía Inglesa.

Ambas bahías muestran durante el mes de diciembre de 2009 temperaturas más bajas en comparación con diciembre del 2008, por lo que se puede esperar que las temperatura durante el verano 2009-2010 sean más bajas en comparación con el verano 2008-2009. Esto puede explicarse por el incremento de la surgencia en la primavera del 2009 y comienzos del verano 2009-2010.



Tabla XXIX. Valores mínimos y máximos de la temperatura a las distintas profundidades en las bahías Inglesa y Tongoy.

		Bahía Inglesa		Bahía Tongoy	
		Mín	Máx	Mín	Máx
Prof. (m)	5	12,39	19,97	11,70	18,83
	10	12,37	19,51	11,67	18,14
	15	11,86	19,22	11,64	17,70
	20	12,19	18,86	11,43	17,18

(Elaboración propia)

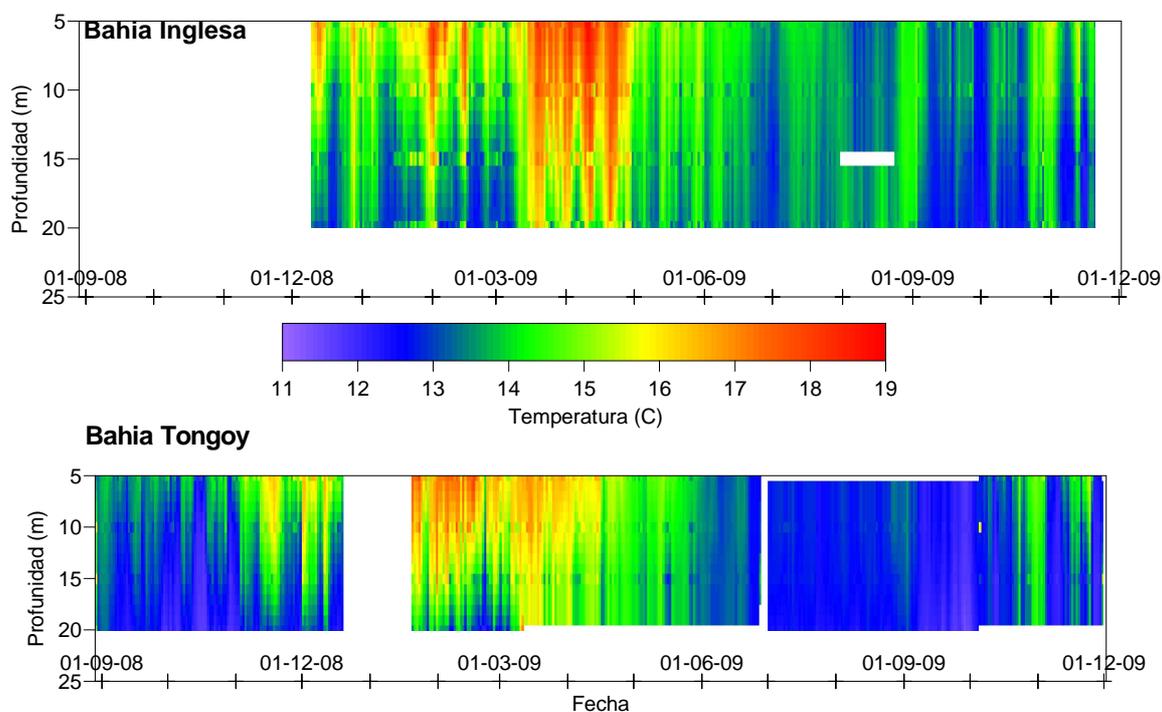


Figura 72. Variación de la temperatura (°C) del mar en profundidad y tiempo de las bahías Inglesa y Tongoy. (Fuente: elaboración propia).



3.6.2 Variables meteorológicas

En Bahía Inglesa la serie de tiempo de viento muestra un predominio de vientos del S y SSW (Fig. 73), presentando las máximas intensidades entre las 12 y 14 horas, y observándose las mínimas después de las 18 horas. Esta variación es producida por las diferencias de calentamiento entre el mar y la tierra, que genera la briza marina, que en este caso se expresa en la disminución de la intensidad del viento, no variando mucho la dirección del viento (Fig. 74). La máxima ráfaga registrada es de 17.44 m s^{-1} , con un promedio de 4.06 m s^{-1} , y el viento promedio registro un máximo de 12.9 m s^{-1} y su valor medio fue de 2.8 m s^{-1} .

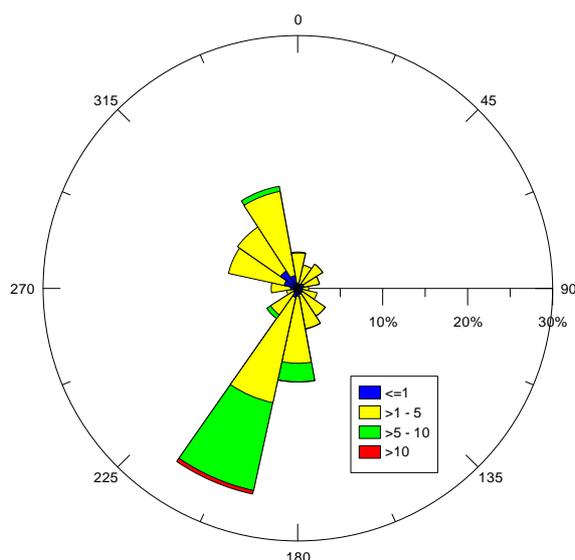


Figura 73. Rosa de los viento registrado en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

La serie de tiempo (Fig. 75) muestra un incremento del viento durante la primavera del 2009, lo que se refleja en un incremento de los índices de surgencia y turbulencia (Fig. 76). El índice de surgencia presenta valores negativos que indican la posibilidad que se produzca hundimiento de agua en la costa, pero dada su duración e intensidad producen la relajación del sistema. La relación de los

índices muestra un predominio de la surgencia, respecto al hundimiento, y que el viento traspasa energía a la superficie del mar de igual por turbulencia como por el transporte fuera de la costa. Bakun y Parrish (1982) mostraron que a lo largo de la costa de Perú y Chile hay zonas donde un proceso predomina sobre el otro, producto de las variaciones en latitud y de la dirección de procedencia del viento.

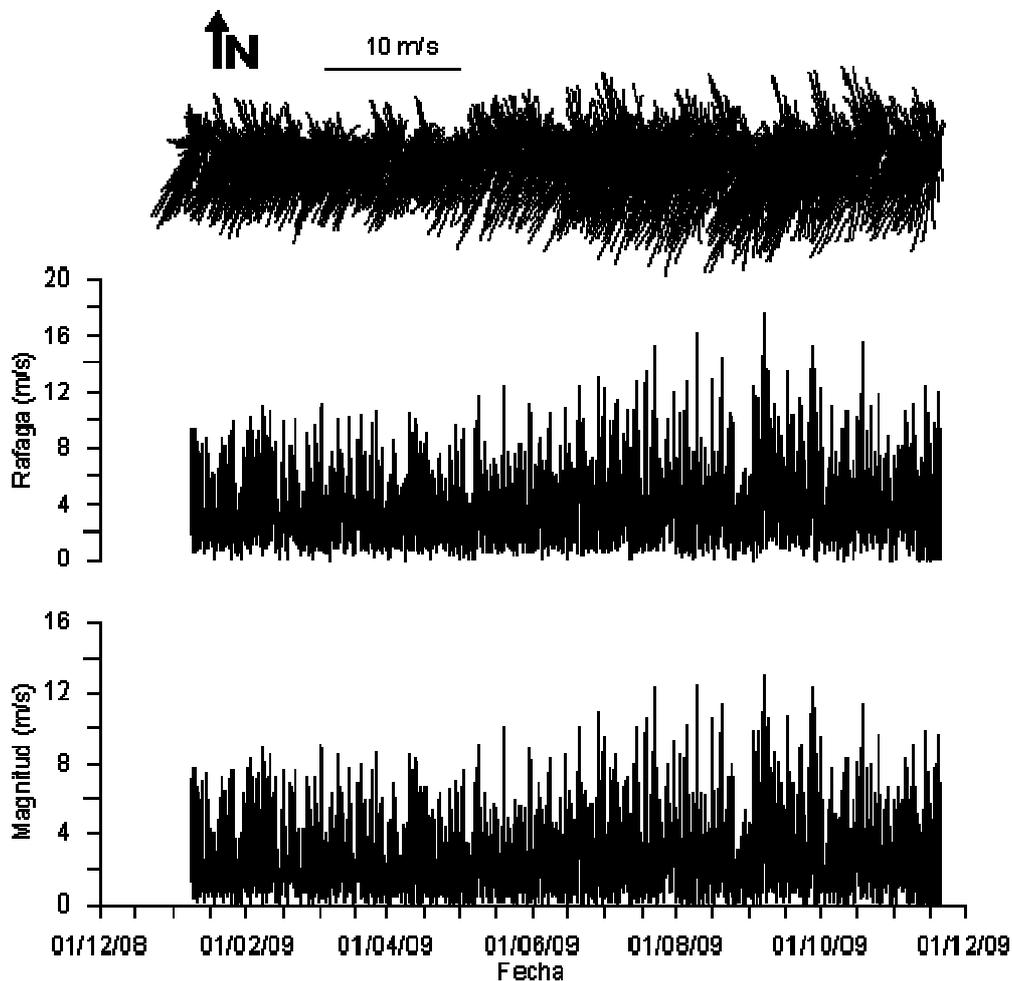


Figura 74. Serie de tiempo del viento registrado en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

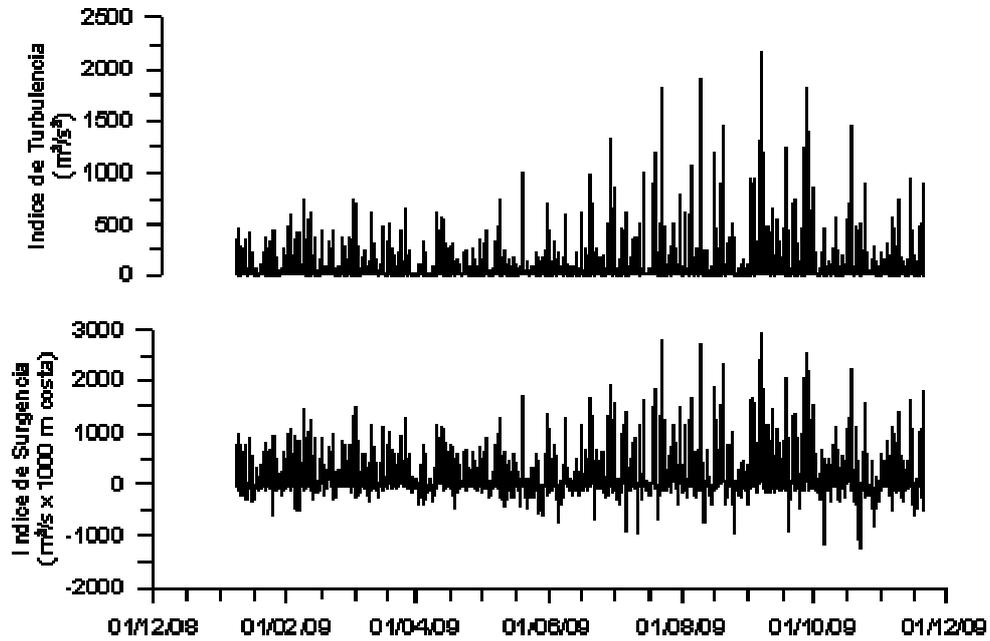


Figura 75. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

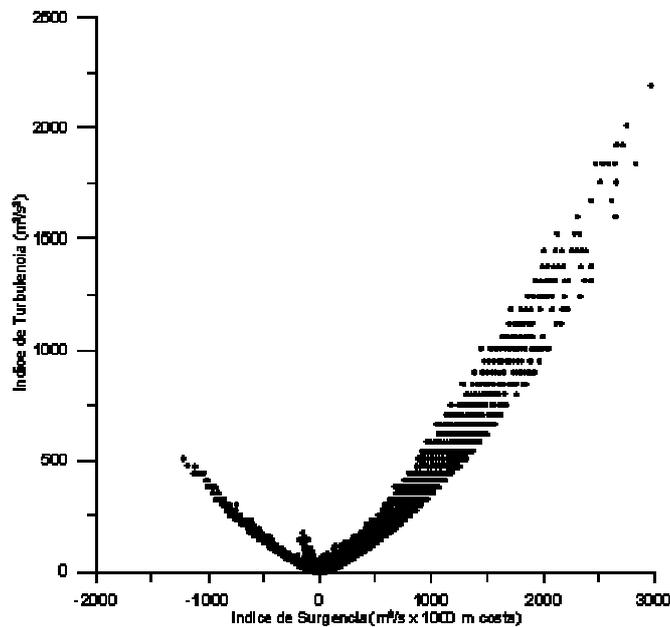


Figura 76. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).



La máxima ráfaga (Fig. 77) registrada en esta la estación meteorológica de bahía Coquimbo fue de 14.29 m s^{-1} , con un promedio de 3.1 m s^{-1} , y el viento promedio registrado presento un máximo de 10.58 m/s con un promedio de 2.1 m s^{-1} , con un predominio de las direcciones del NW. El viento registrado en esta estación, a diferencia del registrado en bahía Inglesa, presenta una variabilidad mayor en la intensidad del viento por efecto de la brisa marina (Fig. 78).

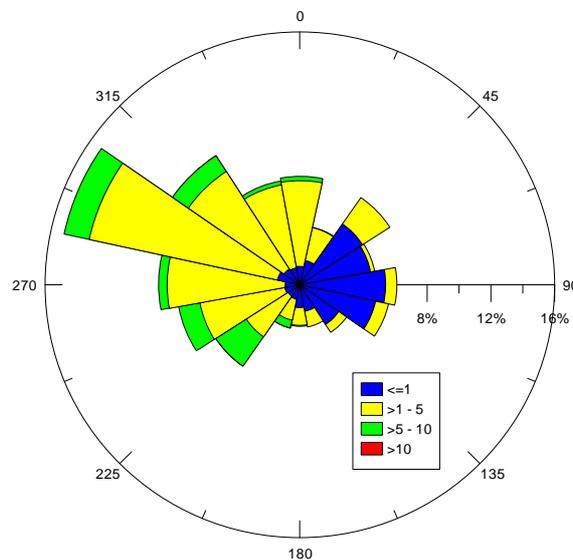


Figura 77. Rosa de los vientos registrado en Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).

El índice de surgencia (Fig. 79) muestra un predominio de la condición de surgencia de relajación con índices negativos que indican la posibilidad que exista una tendencia al hundimiento al interior de la bahía. Lo que se refleja en la relación de ambos índices (Fig. 80) que muestran que los vientos favorables al hundimiento se presentan en igual número de ocasiones generando, y que aportan de igual forma a la turbulencia, lo que no se observó en bahía Inglesa, donde predominan los vientos favorables a la surgencia y los vientos favorables al hundimiento producen menos turbulencia.

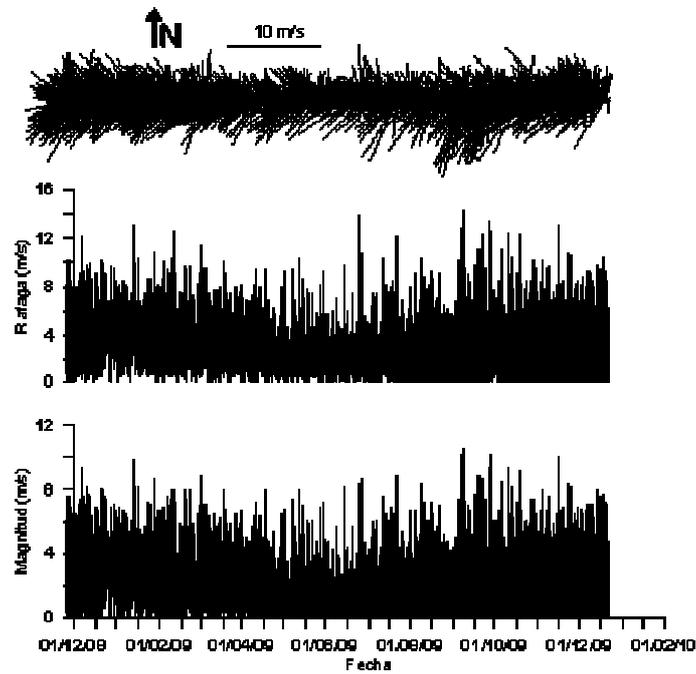


Figura 78. Serie de tiempo del viento registrado en Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).

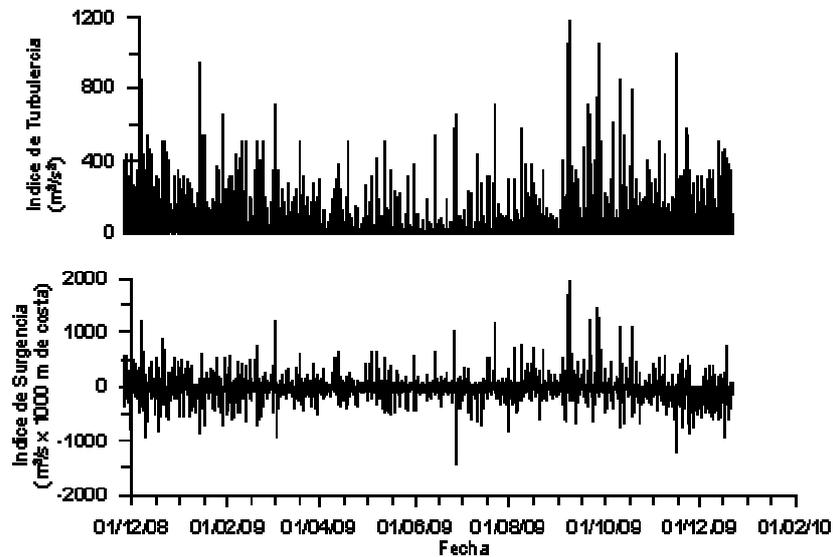


Figura 79. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).

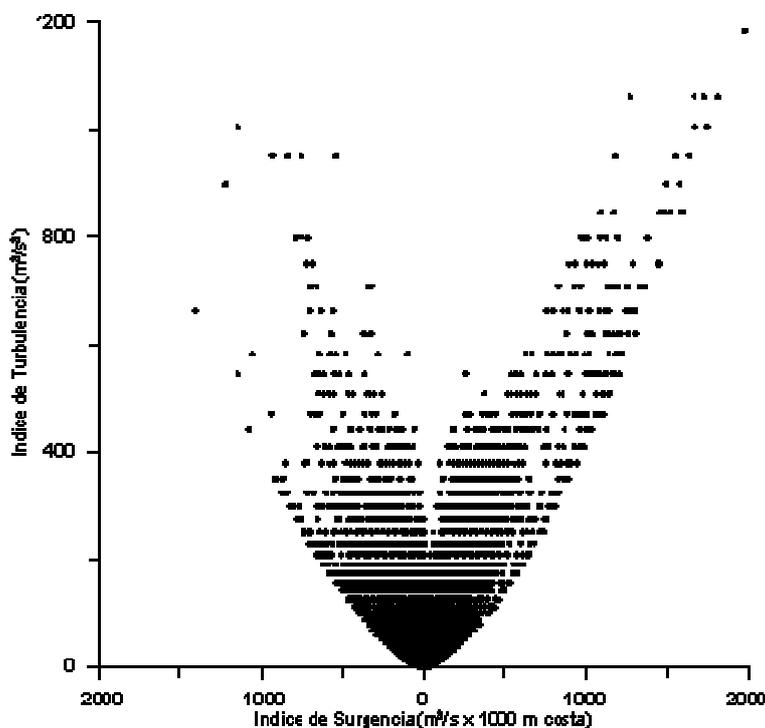


Figura 64. Serie de tiempo de los índices de surgencia y turbulencia en bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).

La presión atmosférica en ambas estaciones presento un comportamiento semejante, con algunas variaciones, lo que era de esperar por la distancia que hay entre ellas (Figs. 81 y 82). Las máximas presiones se registraron en agosto de 2009, siendo en bahía Inglesa la máxima de 1027.25 mBar y en bahía Coquimbo de 1028.95 mBar; en tanto que las mínimas presiones se registraron entre febrero y marzo de 2009, en bahía Inglesa la mínima fue de 1007.95 mBar y en bahía Coquimbo de 1007.85 mBar.

La humedad relativa en la estación de bahía Inglesa muestra mayor fluctuación, con un mínimo de 44,2%, un máximo de 98,3%, y un promedio de 82,35%, mientras que la estación de Coquimbo fluctúa entre 51,7% y 99,6%, y su promedio fue de 87,68%. Las variaciones diarias de la humedad relativa son amplias durante todo el período de mediciones, mientras que en bahía Coquimbo se



reducen notoriamente durante el periodo de invierno, manteniéndose alta la humedad.

La temperatura del aire en bahía Inglesa presentó variaciones diarias de aproximadamente 8°C, en forma más o menos constante, mientras que en Coquimbo algunos días su variación no superó el grado Celsius, pero se registraron variaciones de 10°C. La señal obtenida durante el año de mediciones muestra máximas temperaturas en verano, durante enero y febrero, y las mínimas en invierno, en julio.

Algo similar ocurre con la radiación incidente (PAR) en que los valores acumulados son mínimos en invierno y máximos en verano. La comparación visual de las series de Bahía Inglesa indica que las variaciones de PAR están asociadas a las variaciones de la humedad relativa, presentándose menor valor acumulado de PAR en los períodos de mayor humedad relativa.

En Coquimbo, junto con presentarse este efecto de la cantidad de humedad en el aire, se observa además una relación con las variaciones de la presión atmosférica, encontrándose que disminuciones de presión están asociados con incrementos de la humedad relativa y la reducción del PAR, mientras que estas variaciones de presión en Bahía Inglesa no tienen asociado un incremento de la humedad relativa ni una reducción del PAR en forma simultánea, sino que son observado desfasados por par de días, diferencia que puede estar relacionados con la topografía local.

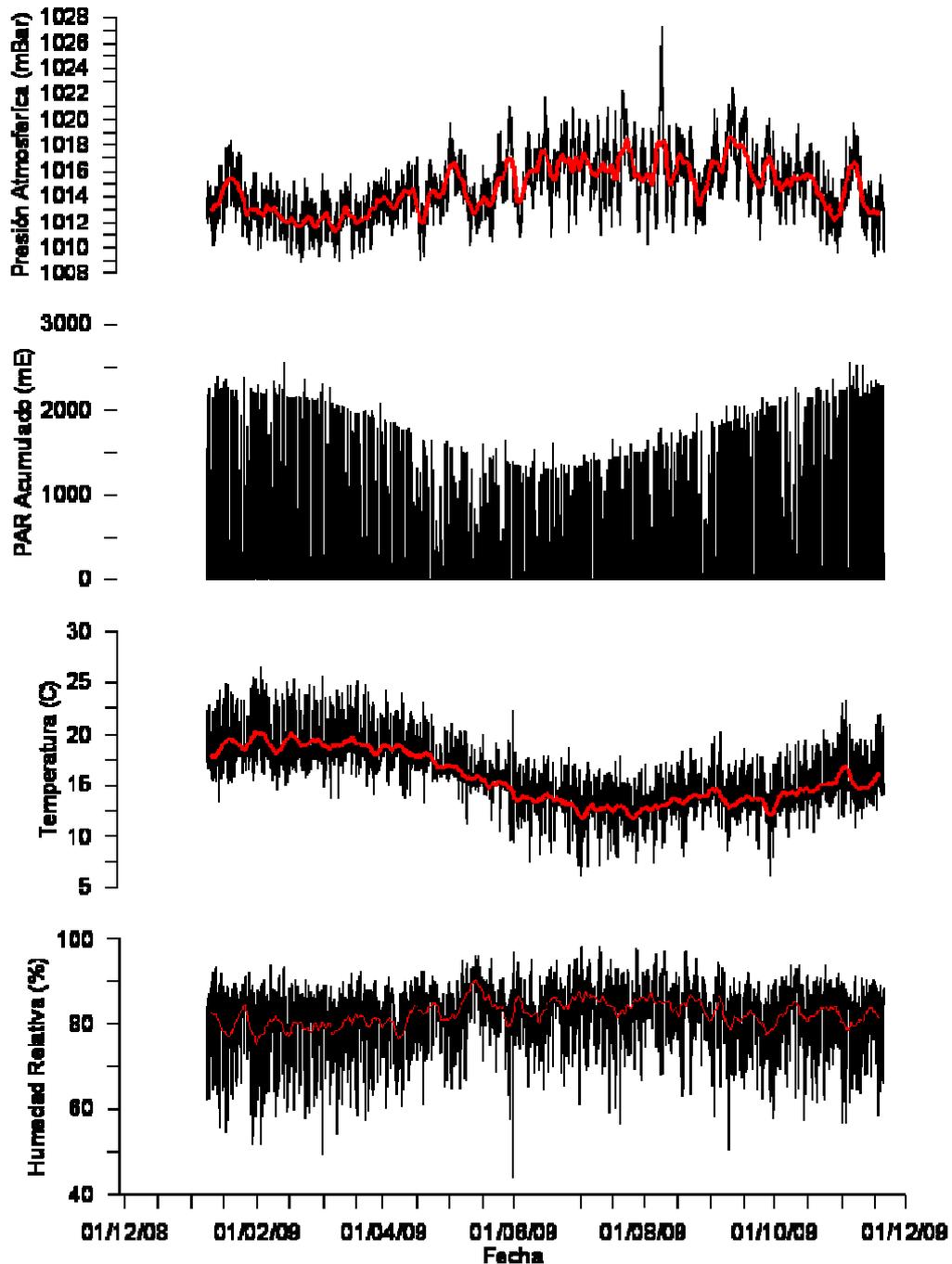


Figura 81. Series de tiempo de presión atmosférica, radiación incidente acumulada, temperatura del aire y humedad relativa en la estación meteorológica de Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

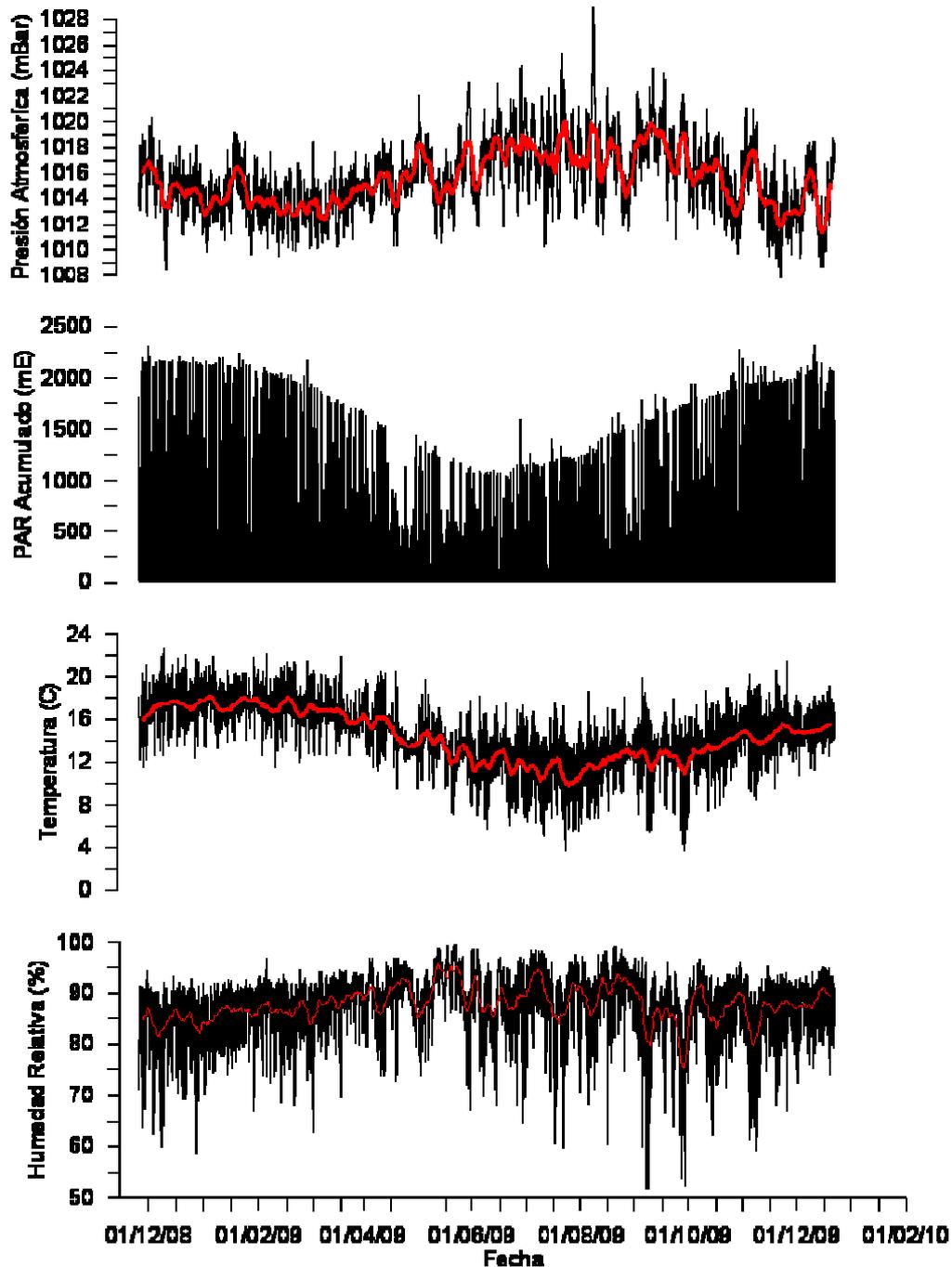


Figura 82. Series de tiempo de presión atmosférica, radiación incidente acumulada, temperatura del aire y humedad relativa en la estación meteorológica de Bahía Coquimbo. (Fuente: elaboración propia).



3.7 Información geográfica sobre la distribución espacio temporal de las principales especies causantes de floraciones algales nocivas identificadas en cada una de las bahías contempladas en el estudio.

3.7.1 Fitoplancton Bahía Inglesa

Se evaluó la distribución del fitoplancton en Bahía Inglesa desde fines de año 2005 a diciembre del 2009, en tres estaciones (B1, B5, B10) y desde enero del 2008 a diciembre de 2009 considerando una nueva estación (B3).

En general las densidades fitoplanctónicas en todas las estaciones fueron muy similares en el tiempo, presentando las mayores densidades (> 2 millones cél L^{-1}) en la época primavera verano, alcanzando la mayor densidad (> 5 millones cél L^{-1}) en noviembre de 2009. Por el contrario las menores concentraciones (< 100.000 cél L^{-1}) se registran en los meses de invierno (Fig. 83).

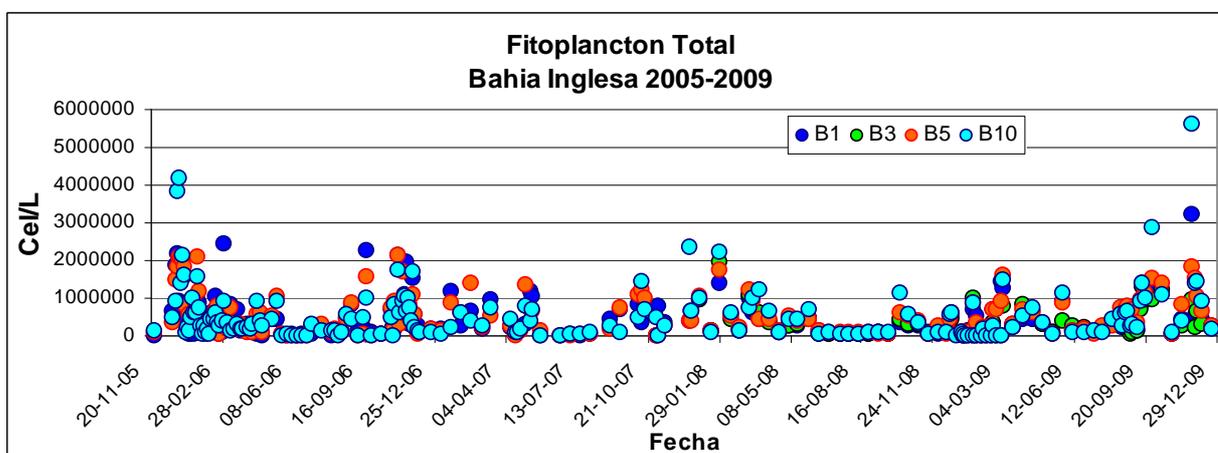


Figura 83. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).



3.7.1.1 *Pseudo-nitzschia australis*

La diatomea *Pseudo-nitzschia australis* ha sido detectada durante estos 5 años de estudio, registrándose periodos cortos de aparición en el mes de diciembre de 2005 con un máximo de 68.182 cél L⁻¹ y representando un porcentaje de dominancia de un 3% con respecto al fitoplancton total de la muestra.

En 2006 se registró durante todo el año, con apariciones esporádicas en los meses de enero (< 3%), abril (< 29%), agosto (<5%) y diciembre (<5%) y dos eventos con cierre de bahía. Cabe señalar que se ha detectado toxina amnésica cuando el porcentaje de la población *P. australis* supera el 60% (cuando SERNAPESCA solicita muestreo de contingencia). El primer evento se presentó entre los meses de julio y agosto (40 días) con una concentración máxima 487.341 cél L⁻¹ (87%), y el segundo evento se registró fines de octubre a principios a mediados de noviembre (21 días) con un máximo de 1.795.455 cél L⁻¹ (85%), siendo este último evento de mayor concentración de todos los años en estudio.

En 2007, la concentración de *Pseudonitzschia australis* fue menor con respecto a los otros años, su presencia fue detectada entre los meses de abril-mayo, octubre y diciembre, con una duración máxima de 8 días en octubre con una concentración máxima de 86.364 cél L⁻¹ (7%) y en diciembre con una concentración máxima de 500.000 cél L⁻¹ (21%).

Durante el año 2008 la presencia de esta diatomea fue escasa, y no fue registrada, presentando una primera ventana entre febrero hasta abril del 2006 y la segunda de junio del 2008 hasta fines de enero (Fig. 84).

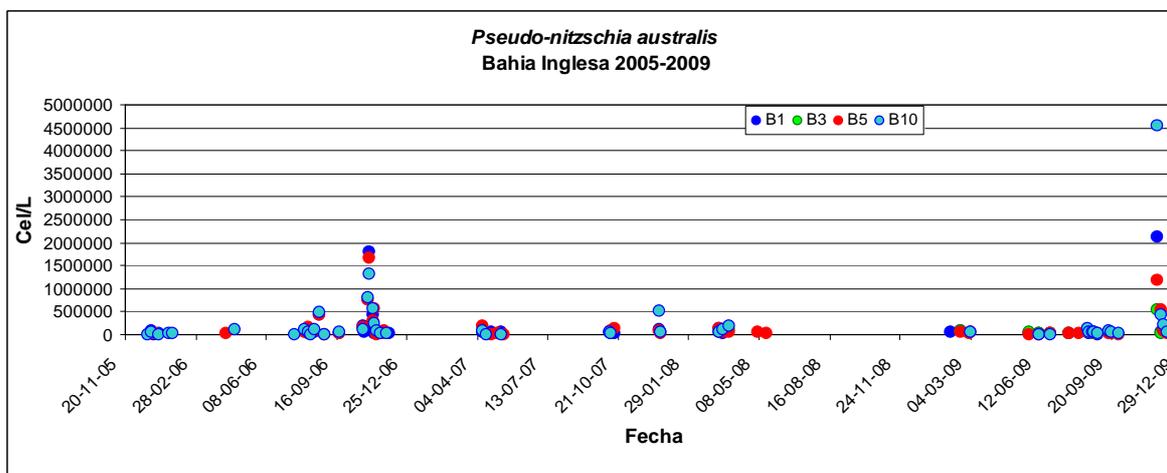


Figura 84. Distribución espacio temporal de *Pseudonitzschia australis* en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.1.2 *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*)

En esta zona geográfica, las detecciones de ácido domoico, siempre fue asociada a la presencia de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis*. Sin embargo, en algunas ocasiones se detectaba la presencia de niveles sub-tóxicos de esta toxina cuando se encontraba presente una diatomea clasificada preliminarmente como *P. pseudodelicatissima*. Por esta razón, se aisló la especie para ser cultivada y posteriormente clasificarla taxonómicamente y evaluar la producción de ácido domoico.

Los análisis taxonómicos revelaron que lo que se consideró por años como *P. pseudodelicatissima*, es realmente un complejo formado por floraciones multiespecíficas de *P. pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia calliantha* (Alvarez et al., 2009), las que solo pueden ser clasificadas utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido.

El complejo *P. calliantha/pseudodelicatissima*, presentó una alta densidad en diciembre del 2005, alcanzando concentraciones superiores 1 millón de cél L⁻¹. Posteriormente el año 2006 presentó una alta frecuencia pero con densidades inferiores a los 200.000 cél L⁻¹ (Fig. 85). Esta diatomea es una especie frecuente en Bahía Inglesa, excepto primavera-verano 2007-2008 y verano - otoño de 2008 - 2009.

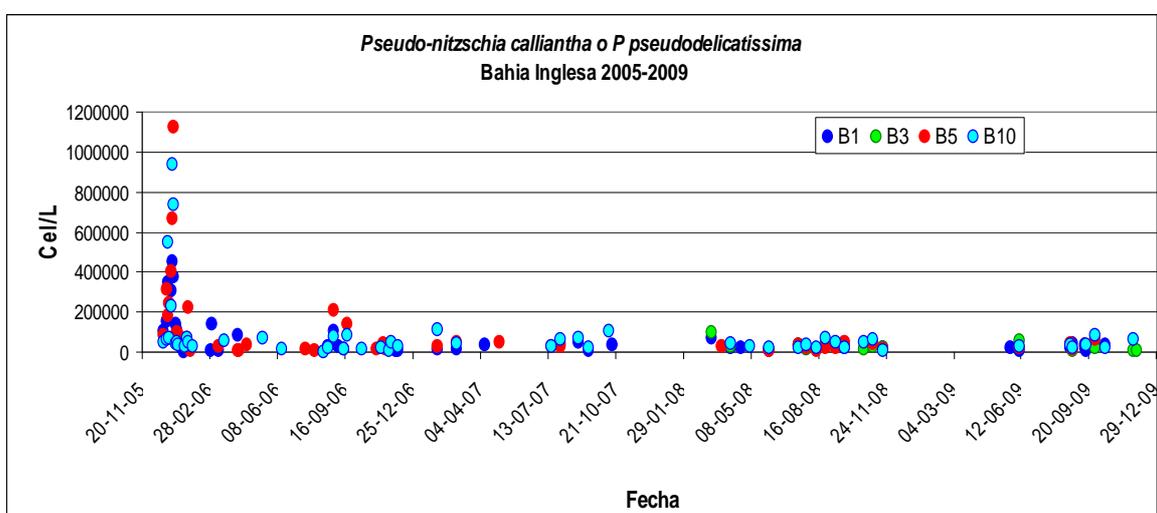


Figura 85. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia calliantha* (*Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*) en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.1.3 *Dinophysis acuminata*

La presencia de *Dinophysis acuminata* se concentró entre diciembre de 2005 y mayo de 2006, registrándose una máxima concentración de 2.000 cél L⁻¹ en marzo de este último año. Desde diciembre de 2006 a enero de 2007 se mantuvo en concentraciones menores a 500 cél L⁻¹, sin embargo entre enero y mayo de 2007 se presentan registros de 6.329 cél L⁻¹. Cabe señalar que en estos dos años no se detectó presencia de *D. acuminata* en los meses de junio, julio y agosto.

Para 2008, la presencia de *D. acuminata* se concentró entre los meses de enero y julio, con concentraciones mayores a 9.000 cél L⁻¹, los cuales solo son detectados en una o dos estaciones de la bahía (B5 y B10). Desde octubre de 2008 a diciembre de 2009, esta especie siempre ha estado presente (Fig. 86), sin embargo no se ha detectado VDM en esta época de estudio.

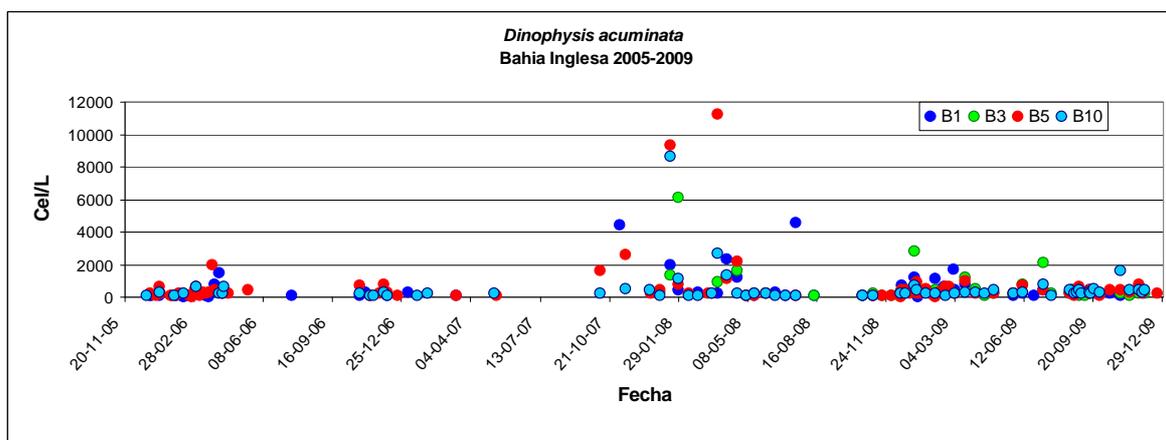


Figura 86. Distribución espacio temporal de *Dinophysis acuminata* en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.1.4 *Rhizosolenia imbricata*

La diatomea *Rhizosolenia imbricata* fue poco frecuente entre los años 2005 y 2007, mientras que entre enero y marzo de 2008 se registró la primera floración de esta especie, que tuvo una duración de 65 días con una concentración máxima de 972.727 cél L⁻¹ (46%) en la estación BI-10 (Fig. 87).

El segundo evento ocurrió entre diciembre de 2008 y febrero de 2009 con concentraciones que alcanzaron los 590.000 cél L⁻¹, con una duración de 60 días. En ambos eventos los ostiones tomaron un sabor amargo, especialmente la gónada en su parte femenina, impidiendo que las empresas pectinicultoras

podrían procesar el producto por el tiempo de 120 días, provocando un fuerte desempleo en las plantas procesadoras.

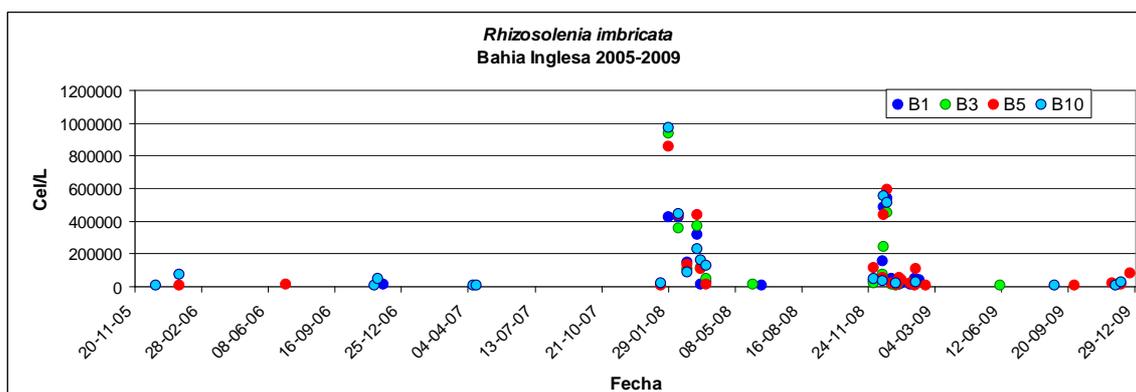


Figura 87. Distribución espacio temporal de *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.1.5 *Guinardia striata*

Guinardia striata se puede considerar como una especie levemente nociva para la acuicultura de pectínidos, que no provoca un daño a la salud humana y no afecta al crecimiento y la supervivencia del ostión. Esta diatomea provoca un cambio de coloración en la gónada de ostión (específicamente en su parte femenina), cambiando de color rojizo a un color blanquecino cremoso similar a la tonalidad que esta presenta cuando la gónada se encuentra desovada (Fig. 88).

G. striata, se registró generalmente en los meses de otoño (Fig. 89), pero su mayor densidad ($> 700.000 \text{ cél L}^{-1}$) se observó en febrero del 2006, posteriormente se presentó con valores relativamente bajos ($< 200.000 \text{ cél L}^{-1}$).



Figura 88. Cambio de coloración de la gónada femenina de *Argopecten purpuratus* durante una floración de la diatomea *Guinardia striata*. (Fuente: elaboración propia)

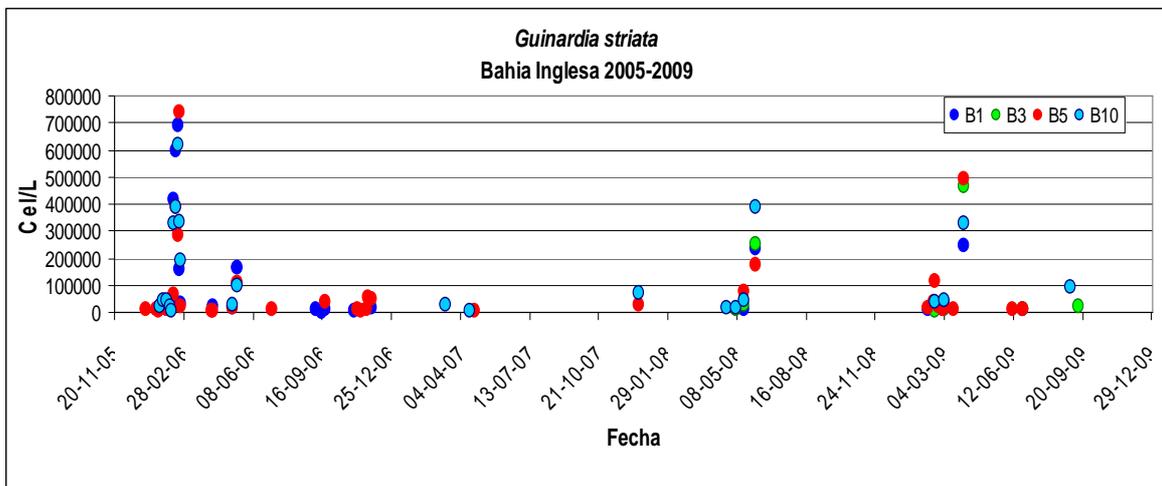


Figura 89. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Inglesa entre 2005 – 2009. (Elaboración propia).

3.7.2 Fitoplancton Bahía Guanaqueros

La distribución del fitoplancton en Bahía Guanaqueros desde fines de año 2005 a diciembre de 2009 en 4 estaciones (G2, G3, G7, GC), muestra las mayores densidades (> 2 millones cél L^{-1}) corresponden a la época de primavera y que estas disminuyen a valores inferiores a $100.000 \text{ cél L}^{-1}$ en los meses de invierno (Fig.90).

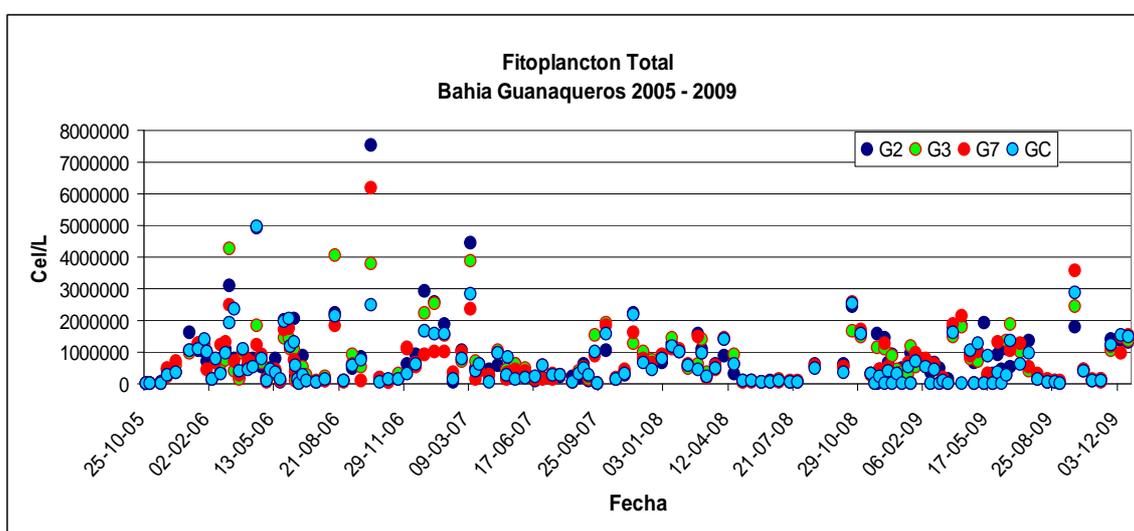


Figura 90. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Inglesa entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.2.1 *Pseudo-nitzschia australis*

La diatomea *Pseudo-nitzschia australis* ha sido detectada durante estos 4 años, encontrándose sus mayores densidades ($495.000 \text{ cél L}^{-1}$) en el mes de mayo y junio del 2009 con una duración del evento de 90 días, sin embargo su concentración porcentual alcanzó al 54% donde se registró toxina amnésica a nivel sub-tóxico ($4,5 \text{ ug g}^{-1}$).



Desde febrero del 2006 a mayo del 2008 se registró esta especie de diatomea en bajas concentraciones ($< 100.000 \text{ cél L}^{-1}$) excepto en algunas muestras puntuales donde su densidad llegó a las $300.000 \text{ cél L}^{-1}$. (Fig. 91).

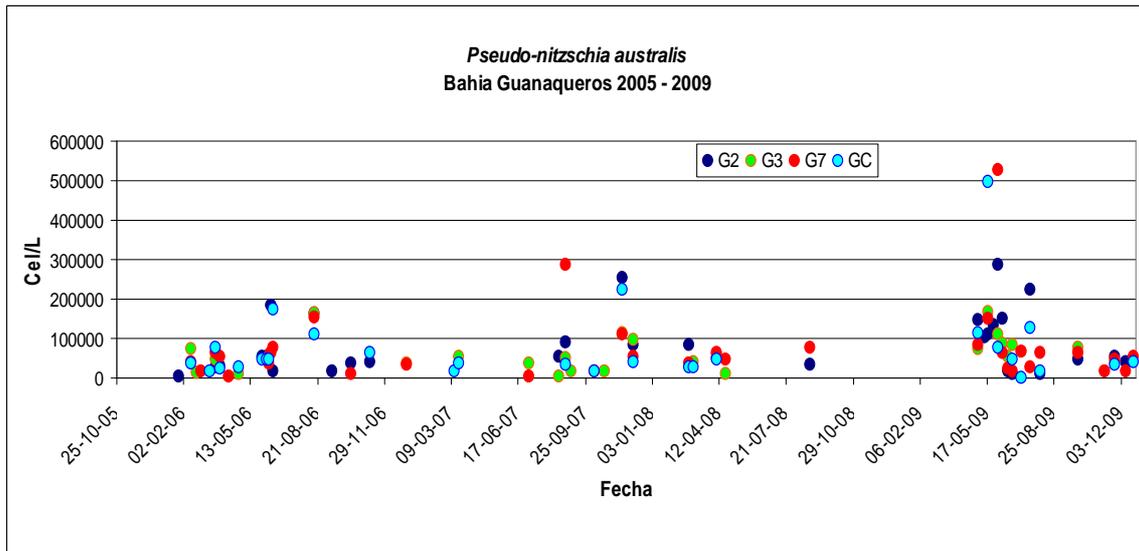


Figura 91. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia australis* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.2.2 *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*)

P. calliantha y *P. pseudodelicatissima*, son especies muy frecuentes en Bahía Guanaqueros. Sus mayores densidades ($>800.000 \text{ cél L}^{-1}$) se registraron en abril de 2006, en noviembre de 2007 y febrero de 2008 (Fig. 92). Se puede considerar como las especies más frecuentes en Bahía Guanaqueros, excepto en el año 2009 donde no se registró desde enero a mayo. Cabe señalar que durante este período se han registrado eventos VAM pero no se registró durante las mayores concentraciones de estas especies en Bahía Guanaqueros.

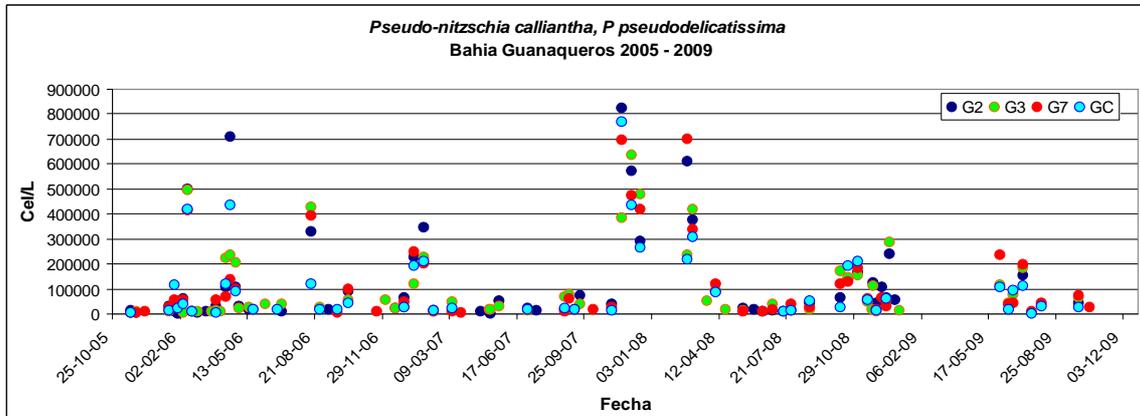


Figura 92. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*) en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.2.3 *Dinophysis acuminata*

Dinophysis acuminata estuvo presente durante todo el periodo de estudio, excepto en cortos períodos de invierno del 2007 y 2008. Las mayores densidades alcanzaron las 2000 cél L⁻¹ ya sea en verano o invierno, excepto en el mes de octubre del 2007 donde alcanzó las 8000 cél L⁻¹ (Fig.93).

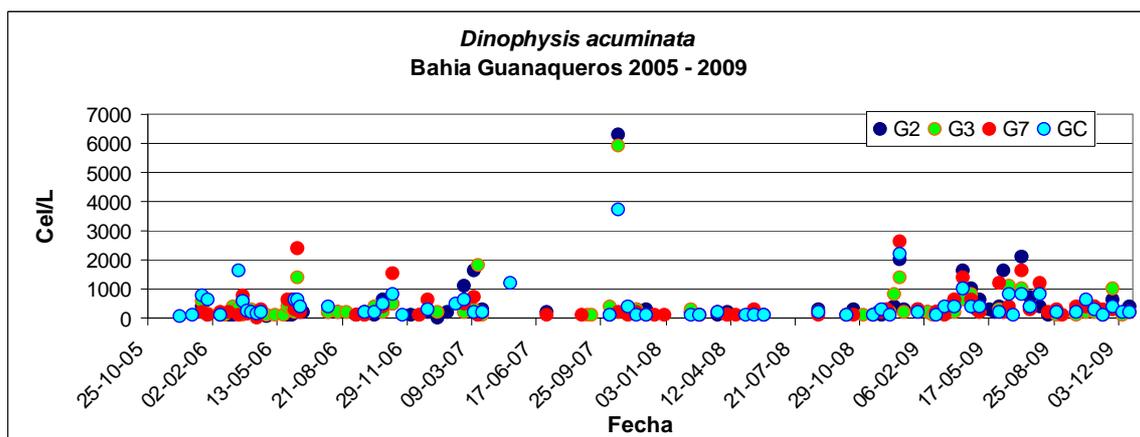


Figura 93. Distribución espacio temporal de *Dinophysis acuminata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).



3.7.2.4 *Rhizosolenia imbricata*

La presencia de la diatomea *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Guanaqueros durante estos últimos 5 años fue poco frecuente. Esta diatomea solo pudo ser detectada en los meses de mayo de 2007 y mayo de 2008, con una densidad de 40.000 cél L⁻¹ que no superó el 5 % de abundancia relativa (Fig. 94).

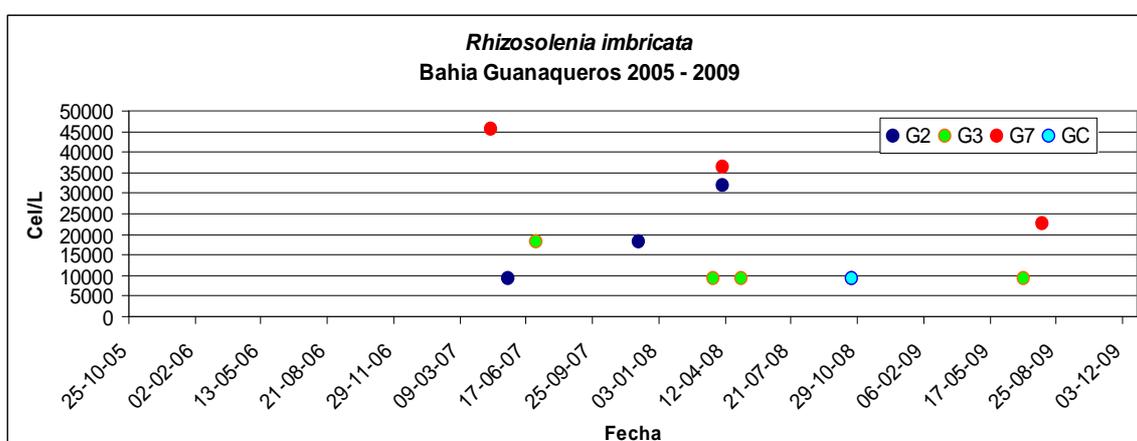


Figura 94. Distribución espacio temporal de *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.2.5 *Guinardia striata*

La presencia de *Guinardia striata* en Bahía Guanaqueros ha sido frecuente, presentando dos eventos de alta densidad, en enero de 2006 con más de 1.200.000 cél L⁻¹ y en abril de 2008 con más de 400.000 cél L⁻¹ (Fig. 95). Durante el primer evento se registró un cambio de color rojo a crema de la parte femenina de la gónada del ostión, como ya había sido mencionado en Bahía Inglesa (Fig. 88).

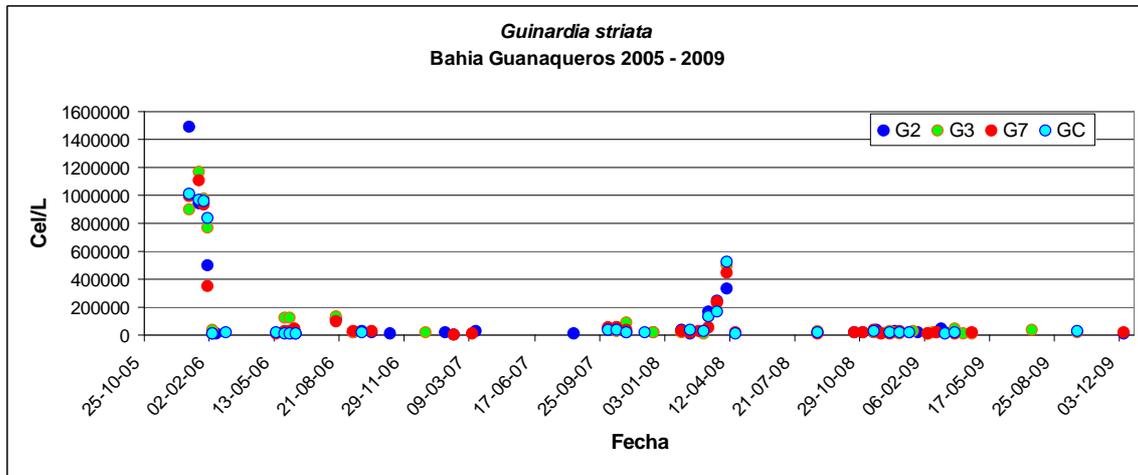


Figura 95. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Guanaqueros entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.3 Fitoplancton Bahía Tongoy

Se evaluó la distribución del fitoplancton en Bahía Tongoy entre los años 2005 a 2009, en tres estaciones (T3, T4, T5) y desde enero de 2008 a diciembre de 2009 considerando dos nuevas estaciones (T11 y TC).

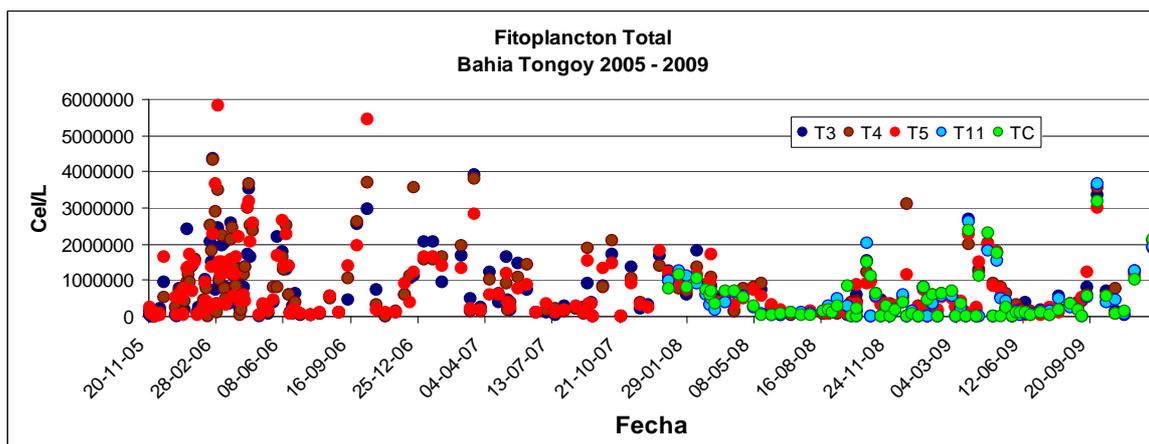


Figura 96. Distribución espacio temporal del fitoplancton en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).



En las 5 estaciones se observó que las mayores densidades (>2 millones cél L^{-1}) se presentan en la época primavera-verano. Por el contrario las épocas de pobreza fitoplanctónica (<200.000 cél L^{-1}) se presentaron durante los meses de invierno. Cabe señalar que las máximas concentraciones de fitoplancton (> 5 millones cél L^{-1}) se registraron durante el verano y la primavera del año 2006 (Fig. 96).

3.7.3.1 *Pseudo-nitzschia australis*

La diatomea *Pseudo-nitzschia australis* ha sido detectada durante estos 5 años en Bahía Tongoy, registrándose sus mayores densidades (> 200.000 cél L^{-1}) en marzo de 2006 y en agosto de 2007 (donde alcanza la máxima concentración que corresponde a 900.000 cél L^{-1}) y en mayo de 2009 (Fig. 97). Cabe señalar que la estructura de distribución de esta especie muy similar a la observada en Bahía Guanaqueros. Además esta especie no fue registrada desde mayo a octubre del 2008 y entre diciembre del 2008 has mediado de mayo del 2009.

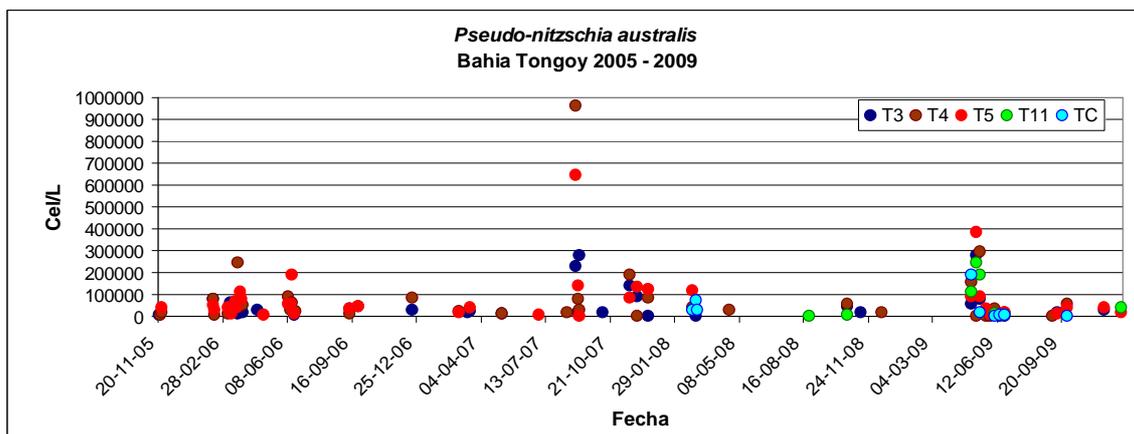


Figura 9765. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia australis* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).



3.7.3.2 *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*)

P. calliantha, como *P. pseudodelicatissima* presentaron una alta frecuencia y una alta densidad en Bahía Tongoy entre el 2006 y 2009, alcanzando la mayor concentración (931.000 cél L⁻¹) en diciembre del 2007, generalmente la suma de estas dos especies registran una densidad inferior a las 100.000 cél L⁻¹ (Fig. 92).

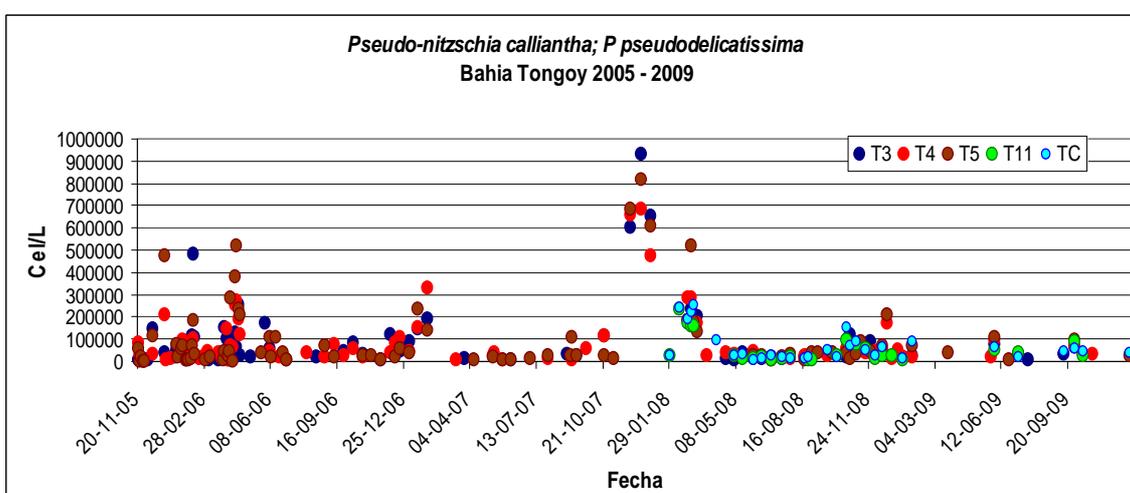


Figura 98. Distribución espacio temporal de *Pseudo-nitzschia calliantha* (*P. pseudodelicatissima*) en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.3.3 *Dinophysis acuminata*

Dinophysis acuminata es una especie frecuente en Bahía Tongoy en estos últimos 4 años de registro, con una densidad que fluctúa entre las 100 a 2000 cél L⁻¹ (Fig. 99). Sin embargo, durante todo este periodo no se ha registrado VDM en especial durante abril del 2009 donde se registró las mayores densidades (>1000 cél L⁻¹).

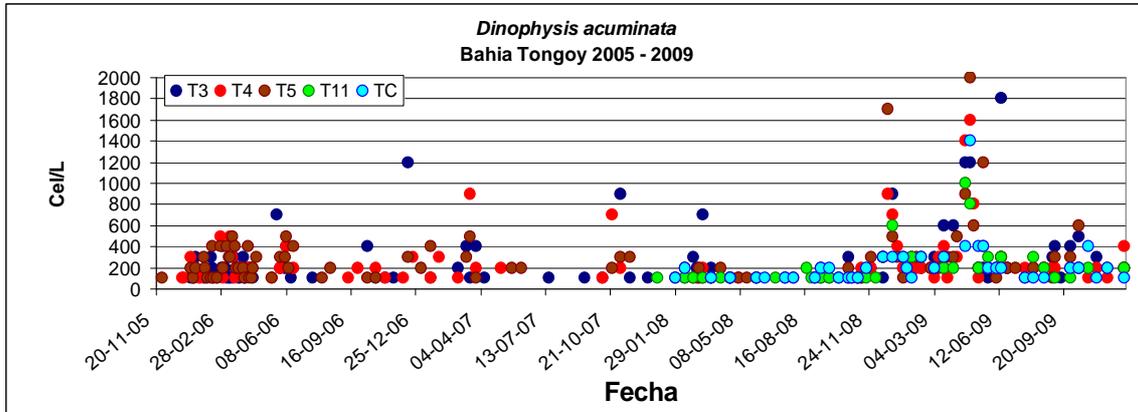


Figura 99. Distribución espacio temporal de *Dinophysis acuminata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.7.3.4 *Rhizosolenia imbricata*

La presencia de la diatomea *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Tongoy durante estos últimos 4 años fue escasamente, solo fue detectada en el mes de abril de 2006 con menos de 40.000 cél L⁻¹ y un evento entre febrero y abril del 2008 con densidades que superaron los 40.000 cél L⁻¹. Además se presentó en baja densidad (< 20.000 cél L⁻¹) entre agosto y noviembre de 2009 (Fig. 100).

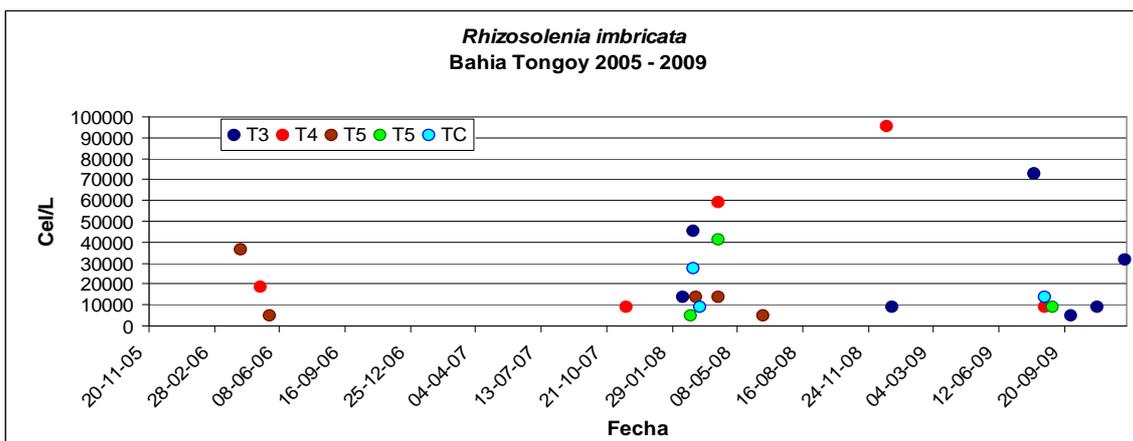


Figura 100. Distribución espacio temporal de *Rhizosolenia imbricata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Elaboración propia).

3.7.3.5 *Guinardia striata*

La presencia de *Guinardia striata* en Bahía Tongoy ha sido frecuente, presentando dos eventos de alta densidad, en enero de 2006 con más de 1.200.000 cél L⁻¹ y en abril de 2008 con más de 400.000 cél L⁻¹ (Fig. 101). Durante el primer evento se registró un cambio de color de la gónada femenina del ostión. Cabe señalar que la estructura de distribución para las bahías Guanaqueros y Tongoy, son muy similares.

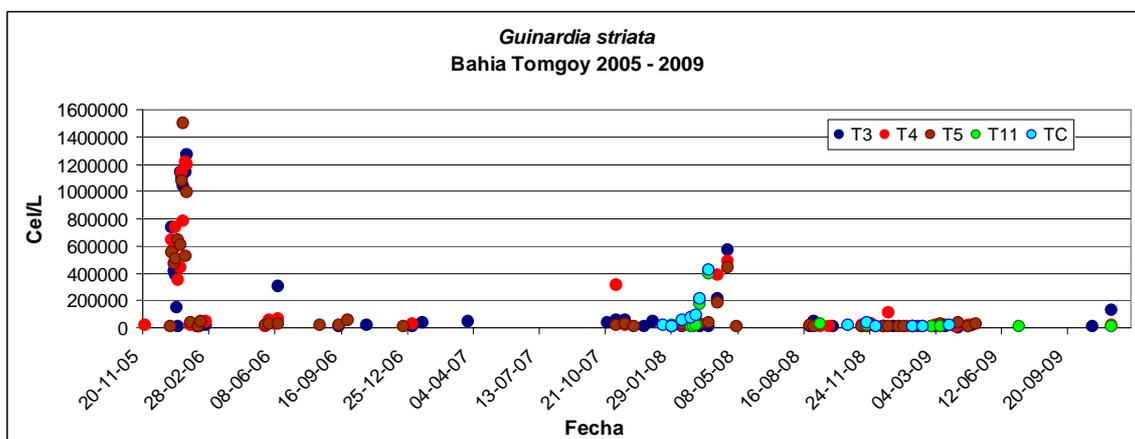


Figura 101. Distribución espacio temporal de *Guinardia striata* en Bahía Tongoy entre los años 2005 y 2009. (Fuente: elaboración propia).

3.8 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (abundancia y frecuencia) en relación a variables ambientales (temperatura superficial del mar, índice de surgencia e índice de turbulencia).

3.8.1 Bahía Inglesa

3.8.1.1 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación a la temperatura superficial del mar (TSM), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.

La relación entre la distribución del fitoplancton y la temperatura superficial del mar (TSM); que presentó un rango térmico entre los 13 a 19 °C; es similar para *Dinophysis acuminata*, y *Rhizosolenia imbricata*.

Sin embargo, *Guinardia striata* presenta una mayor frecuencia con una temperatura de 15 °C. En el caso de *Pseudo-nitzschia australis* y *P. calliantha* estas son más frecuentes en aguas más frías (14 °C) (Fig. 102).

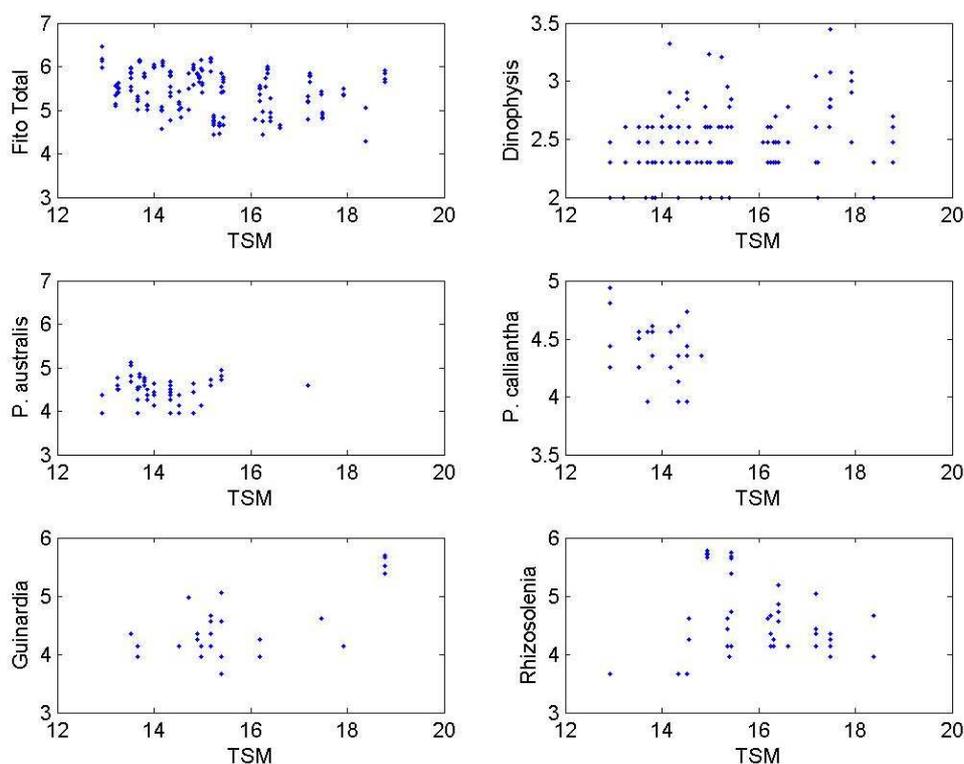


Figura 102. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

3.8.1.2 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.

En Bahía Inglesa, el fitoplancton y las microalgas nocivas se presentan con un Índice de Surgencia (IS) entre 0 y 500 (Fig. 103). Solo *D. acuminata* se encontró con valores negativos, que indica su presencia durante un pulso de hundimiento (downwelling). La mayor frecuencia para todas las diatomeas se encontró con un valor de IS cercano a 0, que indica que el máximo de concentración se detectó durante el periodo de relajación de la surgencia (Fig. 103).

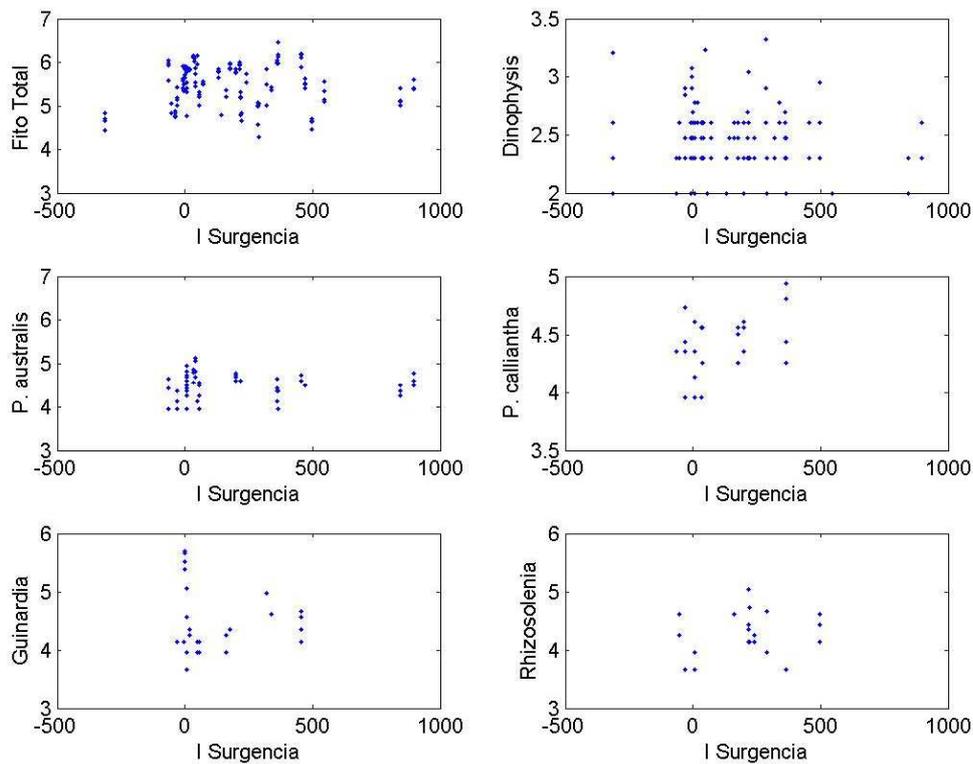


Figura 103. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).



3.8.1.3 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Inglesa.

El Fitoplancton en general, el dinoflagelado *Dinophysis acuminata* y la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* se encontraron con un Índice de Turbulencia (IT) entre 0 y 450 (Fig. 104). En tanto, las diatomeas *Pseudo-nitzschia calliantha*, *Guinardia striata* y *Rhizosolenia imbricata* se encontraron en un rango de IT entre 0 y 190. Sin embargo, la mayor frecuencia para las especies tóxicas o nocivas se encontró con un IT cercano al 0, que indica que la presencia de estas especies en momentos de calma y estabilidad en la columna de agua (Fig. 104).

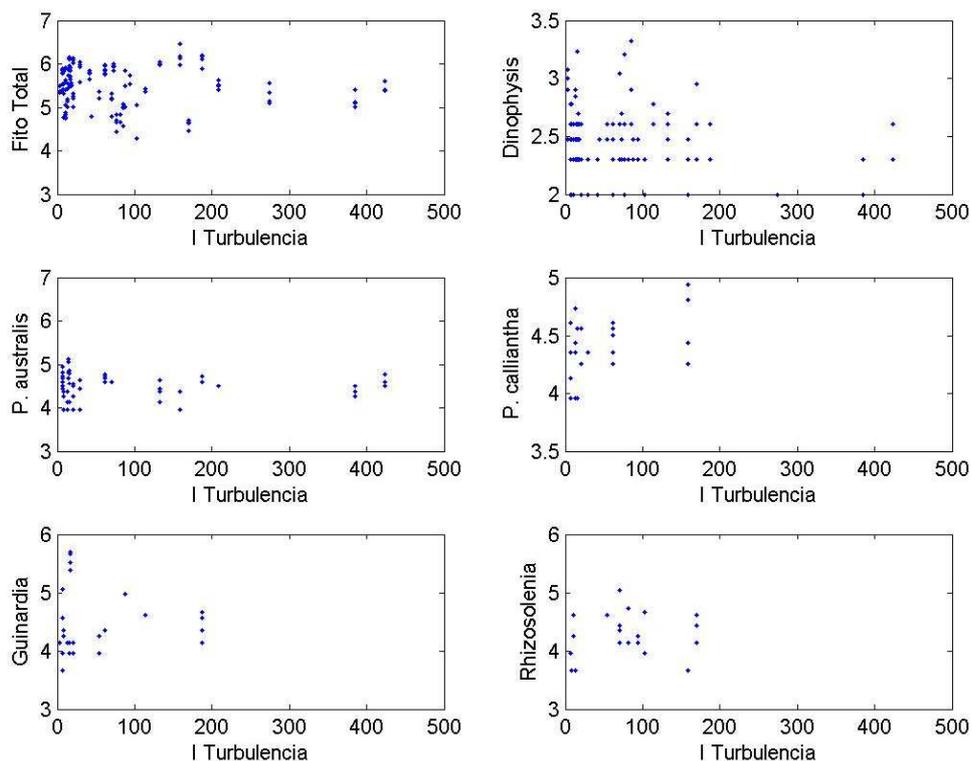


Figura 104. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Inglesa. (Fuente: elaboración propia).

3.8.2 Bahía Guanaqueros

3.8.2.1 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros

La distribución del fitoplancton en relación a la temperatura superficial del mar (TSM) se encontró en un rango térmico que va de los 12 a los 18 °C. Esta distribución es similar a la registrada para *Dinophysis acuminata*. En el caso de *Pseudo-nitzschia australis*, esta se encontró en un rango térmico entre 12 y 15 °C mientras que *P. calliantha* se encontró entre 12 y 17 °C. *Guinardia striata* se encontró entre 15 y 18 °C y finalmente *Rhizosolenia imbricata* se presentó de forma accidental en esta bahía (Fig. 105).

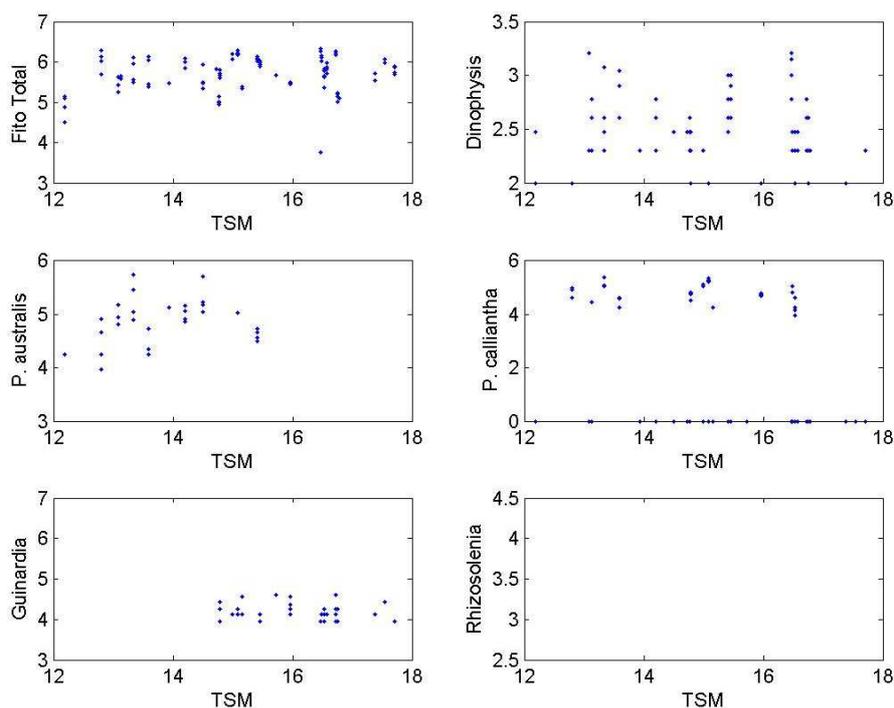


Figura 105. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia).

3.8.2.2 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros

El fitoplancton en general y las microalgas nocivas se encontraron con un Índice de Surgencia (IS) entre -100 y 100 (Fig. 106). Los valores negativos indican pulsos de hundimiento (downwelling) y valores positivos pulsos de surgencia. Cabe señalar que el centro de surgencia más cercano se encuentra en Punta Lengua de vaca al sur de Bahía Tongoy.

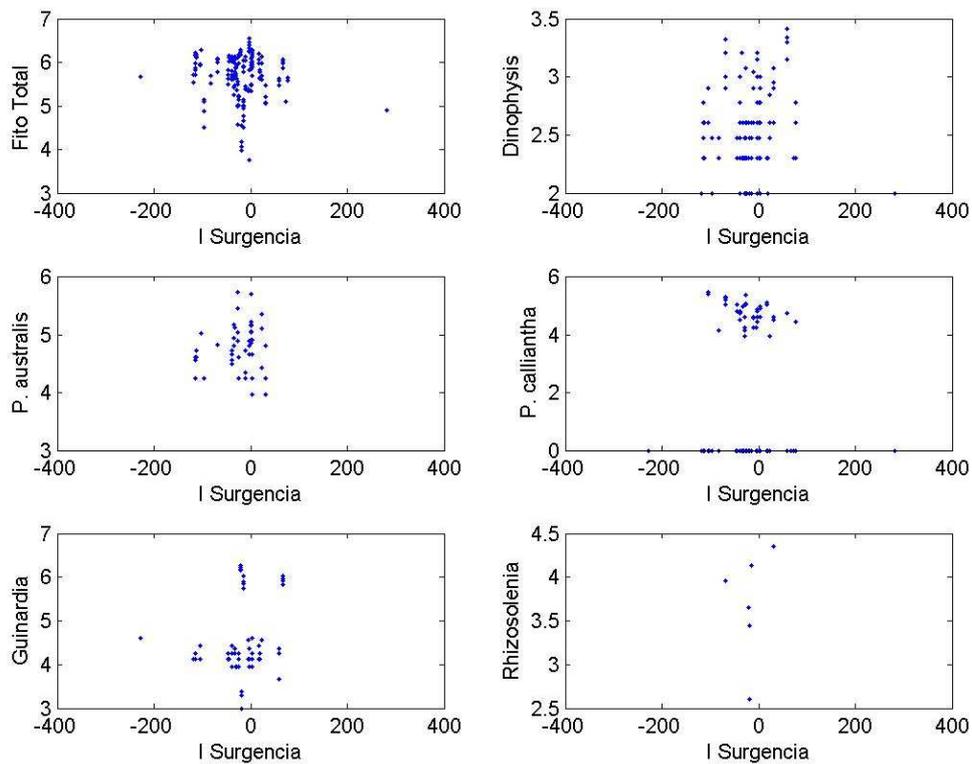


Figura 106. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia).



3.8.2.3 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros.

El Fitoplancton, como las especies nocivas, se encontraron con un Índice de Turbulencia (IT) entre 0 y 100 (Fig. 107). Cabe señalar que la baja frecuencia de *R. imbricata* que solo se registró cuando el índice de turbulencia se estaba entre 0 y 50.

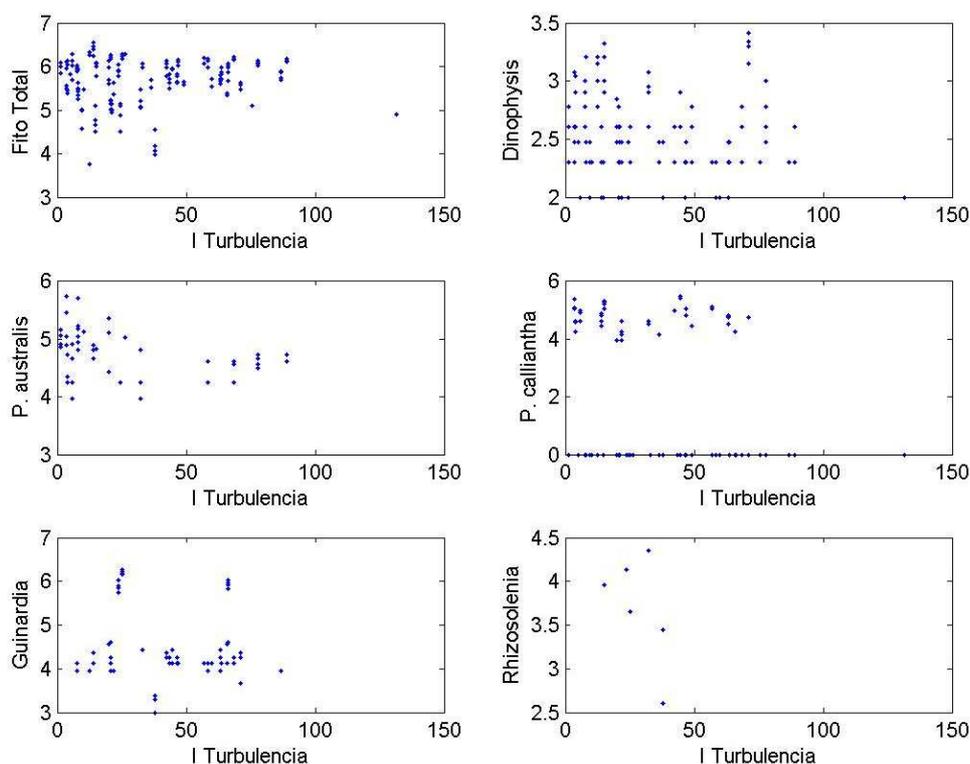


Figura 107. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Guanaqueros. (Fuente: elaboración propia).

3.8.3 Bahía Tongoy

3.8.3.1 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación a la temperatura superficial del mar (TSM), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.

En figura 108, se puede observar que la distribución del fitoplancton en Bahía Tongoy, presenta una similitud a lo observado en B Guanaqueros con un rango térmico que va desde 12 a 18 °C. Similar distribución térmica presentaron *Dinophysis acuminata* y *Pseudo-nitzschia calliantha*, mientras que *P. australis* se encontró con un rango térmico entre 12 a 15 °C. En relación a *Guinardia striata* el rango corresponde a valores entre 15 y 18 °C y finalmente *Rhizosolenia imbricata* se presentó de forma accidental en Bahía Tongoy (Fig. 100).

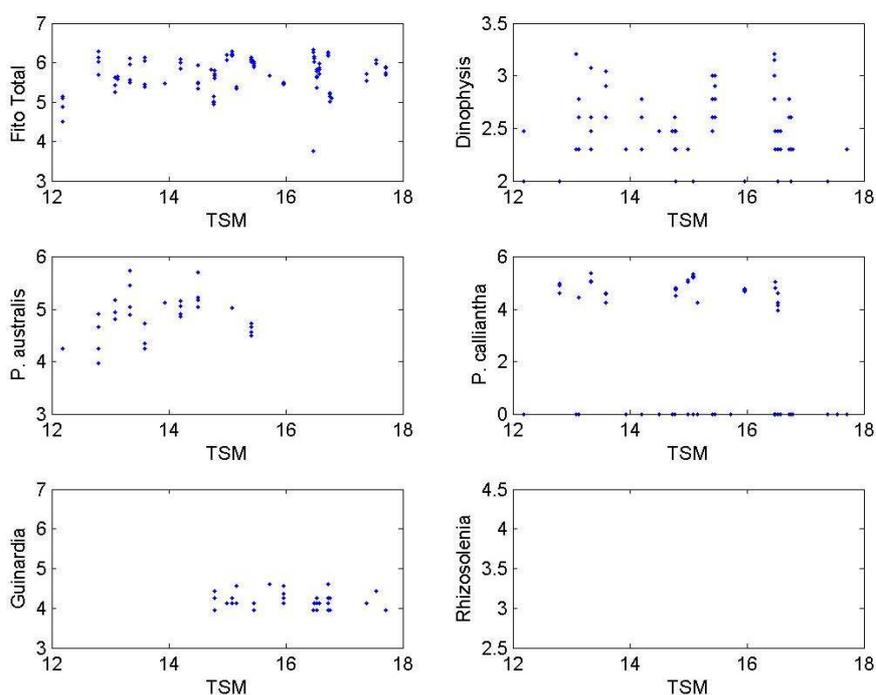


Figura 108. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad) en relación a la temperatura superficial del mar, durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).

3.8.3.2 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.

El Fitoplancton y las microalgas nocivas se presentaron con un Índice de Surgencia (IS) entre -200 y 200 (Fig. 109), valores que son en 100 unidades mayores que los encontrados en Bahía Guanaqueros. Cabe señalar que en esta oportunidad *G. striata* y *R. imbricata* se encontraron con rangos entre -100 a 100.

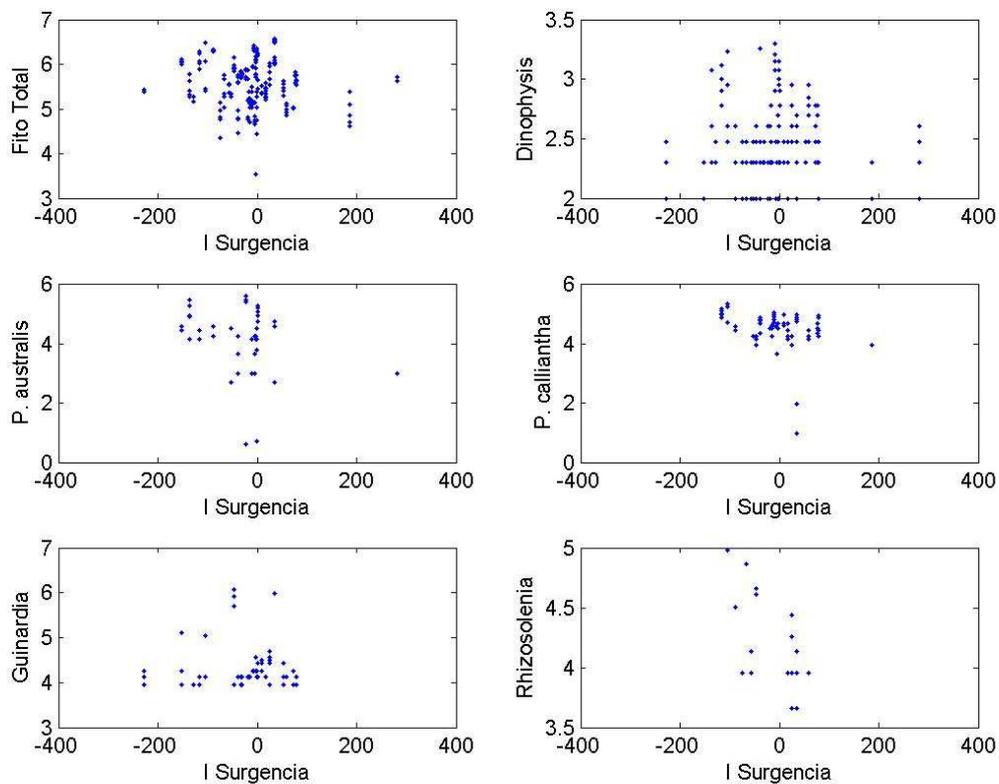


Figura 109. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Surgencia (IS), durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).

3.8.3.3 Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas en relación al Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Tongoy.

El Fitoplancton, como *D. acuminata* y *P. australis*, se encontraron con un Índice de Turbulencia (IT) entre 0 y 450 (Fig. 110), mientras que *P. calliantha*, *G. striata* y *R. imbricata* se presentaron con un rango entre 0 a 190.

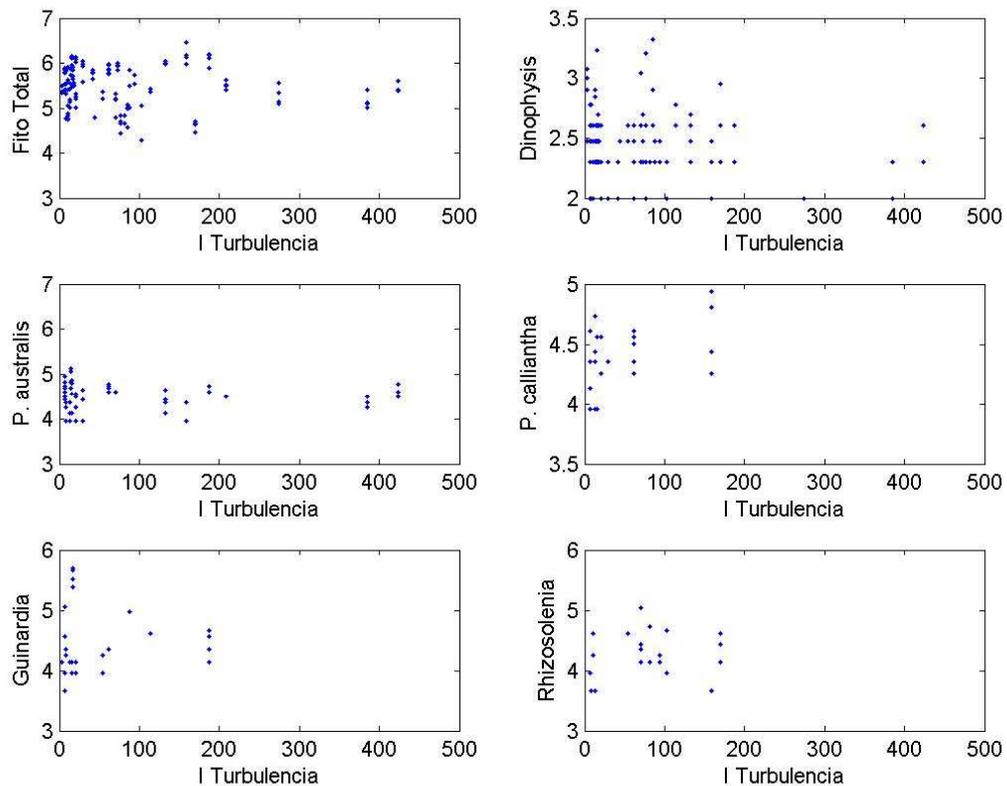


Figura 110. Distribución del fitoplancton y especies de microalgas nocivas (log densidad), en relación Índice de Turbulencia (IT), durante la época de estudio en Bahía Tongoy. (Fuente: elaboración propia).



3.9 Determinación de los géneros o especies fitoplanctónicas que pueden ser considerados como plagas hidrobiológicas.

3.9.1 Especies productoras de ácido domoico

En la zona norte de Chile, las diatomeas *Pseudo-nitzschia australis* y *P. calliantha*, son hasta la fecha las únicas especies identificadas como productoras de ácido domoico (toxina amnésica). Sin embargo, debido a que las floraciones producidas por estas especies son multi-específicas, es necesario determinar si la diatomea *P. pseudodelicatissima*; que co-existe con *P. calliantha* durante estos episodios; tiene la capacidad de producir esta toxina.

Considerando la frecuencia intermitente de la detección de toxina amnésica durante el periodo de estudio, en las tres principales bahías en las que se desarrolla el cultivo de pectínidos (Regiones de Atacama y Coquimbo), podemos decir que estas zonas geográficas pueden ser clasificadas como “Áreas de Floraciones Algales Nocivas” (área de FAN).

Por otra parte, es importante destacar que estas especies probablemente se encuentren distribuidas a lo largo de toda la costa entre las regiones de Atacama y Coquimbo, por lo que no debería ser necesario aplicar medidas de contención para el traslado de bivalvos o fómites entre las bahías de ambas regiones.

3.9.2 Especies productoras de toxinas paralizantes

Durante el periodo anterior al desarrollo de este proyecto, la presencia de toxinas paralizantes en la zona norte de Chile era esporádica y se centraba principalmente en la Región de Coquimbo. Actualmente, mediante los análisis de glándula digestiva de *Argopecten purpuratus* se ha comprobado que esta toxina se encuentra frecuentemente en todas las principales bahías en las que se desarrolla el cultivo de este bivalvo. Debido a la continua detección de este tipo de toxinas en la glándula digestiva de este bivalvo, podemos decir que estas zonas geográficas



pueden ser clasificadas como “Áreas de Floraciones Algales Nocivas” (área de FAN).

Considerando el perfil de toxinas detectados en las muestras analizadas, la detección de células pertenecientes al género *Alexandrium* y la presencia de quistes que podrían pertenecer a estos dinoflagelados, es probable que estas toxinas sean producidas por diferentes cepas o clones de los dinoflagelados *Alexandrium tamarense* o *Alexandrium minutum*.

Sin embargo, es necesario desarrollar un trabajo más detallado que incluya la germinación de quistes y el posterior cultivo de las especies obtenidas para determinar con exactitud cuál o cuáles son las especies productoras de las toxinas paralizantes. Considerando estos antecedentes, no es posible determinar por una parte, si estas especies son nativas o fueron introducidas recientemente y por otra, si se requiere la aplicación de medidas de contención para evitar su propagación.

3.9.3 Especies productoras de toxinas lipofílicas

3.9.3.1 Especies productoras de toxinas diarreogénicas

En relación a los dinoflagelados con la capacidad de producir toxinas diarreogénicas en la zona norte de Chile, podemos destacar la presencia de *Dinophysis acuminata* y probablemente de alguna especie perteneciente al género *Azadinium*, como por ejemplo *Azadinium spinosum*.

En el caso de *D. acuminata*, es necesario destacar que en la zona norte de Chile, este dinoflagelado solo tendría la capacidad de sintetizar pectenotoxinas (PTX), entre las que se encuentran la PTX2 y PTX11 y no presentaría toxinas diarreogénicas como ácido okadaico, dinofisistoxinas y sus derivados acilados. Este perfil de toxinas, ha sido detectado en diferentes bahías en las que se desarrolla la acuicultura y la explotación de moluscos como por ejemplo Bahía



Inglesa y Bahía Salada (Región de Atacama), Bahía Coquimbo, Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy (Región de Coquimbo) y recientemente en Bahía Arica (Región de Arica y Parinacota). Considerando esta información, podemos inferir que éste dinoflagelado se encuentra distribuido en todo el norte de Chile por lo que la aplicación de medidas de contención para evitar la propagación de este dinoflagelado en esta amplia zona geográfica no son necesarias.

En el caso de dinoflagelados del género *Azadinium*, se requiere un estudio más detallado para determinar cuál es la especie productora de azaspiracido-1 detectado en machas y almejas extraídas desde Bahía Coquimbo, y si esta corresponde a la misma especie productora de azaspiracido-2 detectado en ostiones extraídos desde diferentes bahías de las regiones de Atacama y Coquimbo. Debido a reciente descripción taxonómica de esta especie y a la falta de equipos cromatográficos que permitan desarrollar este tipo de investigaciones no es posible determinar, por una parte si esta especie es introducida o siempre ha estado presente en la zona norte de nuestro país y por otra, si existe algún riesgo asociado al no tener medidas de contención para evitar su propagación.

3.9.3.2 Especies productoras de toxinas no diarreogénicas

En relación a la presencia de dinoflagelados productores de toxinas lipofílicas no diarreogénicas, debemos destacar la presencia del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*. Este dinoflagelado productor de yesotoxinas es un componente frecuente del fitoplancton de Bahía Mejillones y tiene la capacidad de producir floraciones. Además, los estudios de identificación de quistes, revelaron una alta densidad de quistes pertenecientes a esta especie los que pueden contribuir a la producción de los episodios tóxicos. Durante este trabajo, la presencia de yesotoxinas, ha sido registrada en las principales bahías en las que se desarrolla



el cultivo del ostión del norte. Recientemente, este tipo de toxinas ha sido detectada en Bahía Arica y fue asociada a la presencia de quistes similares a *Operculodinium centrocarpum* que corresponde al quiste que da origen a este dinoflagelado. Considerando estos antecedentes, podemos inferir que esta especie probablemente es autóctona y que se encuentra distribuida preferentemente en las regiones de Arica y Parinacota, Tarapaca y Antofagasta, por lo que la aplicación de medidas cautelares para evitar su propagación serían necesarias especialmente para evitar el traslado de organismos o fómites hacia las bahías de las regiones de Atacama y Coquimbo.

Finalmente, es necesario desarrollar más estudios para determinar de forma inequívoca la distribución del dinoflagelado *Gonyaulax spinifera* (productor de yesotoxinas), la presencia del dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* (debido a la detección de quistes similares a los producidos por este dinoflagelado) y determinar cuál o cuáles son los organismos productores de espirólidos en esta amplia zona geográfica, con el propósito de fortalecer la clasificación de las diferentes áreas de explotación y cultivo contemplando el reglamento de plagas hidrobiológicas.



Tabla XXX. Principales toxinas marinas y especies fitoplanctónicas detectadas en la zona norte de Chile

	Toxina	Posible agente causal	Agente causal confirmado
Toxinas paralizantes	Saxitoxina Gonyautoxina 1 Gonyautoxina 2 Gonyautoxina 3 Gonyautoxina 5 dcSaxitoxina dcGonyautoxina 2 dcGonyautoxina 3 C1 C2	<i>Alexandrium tamarense</i> <i>Alexandrium minutum</i>	No disponible
Toxinas amnésicas	ácido domoico	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> <i>Pseudo-nitzschia pseudo-delicatissima</i> <i>Amphora coffaeiformis</i>	<i>Pseudo-nitzschia australis</i> <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>
Toxinas lipofílicas diarreogénicas	Azaspirácido 1 Azaspirácido 2	<i>Azadinium spinosum</i>	No disponible
Toxinas lipofílicas no diarreogénicas	Pectenotoxina 2 Pectenotoxina 11	<i>Dinophysis acuminata</i> <i>Dinophysis acuminata</i> <i>Gonyaulax spinifera</i> <i>Lyngulodinium polyedra</i>	<i>Dinophysis acuminata</i>
	Yesotoxina		<i>Protoceratium reticulatum</i>
Iminas cíclicas	Espirólidos	<i>Alexandrium peruvianum</i> <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	No disponible



3.10 Impactos económicos generados por la aparición de floraciones algales nocivas en la industria pectinicultura en el norte de Chile.

Según las estadísticas de ProChile, para los años 2007, 2008 y 2009 el monto total exportado (en US\$) fue el siguiente para cada una de las empresas presentes en la industria. Como se puede observar en la tabla XXXI, Compañía Pesquera Camanchaca S.A. representa el 37% del promedio del total de lo exportado por Chile para el periodo 2007-2009.

Tabla XXXII. Exportación de Ostiones (US\$) entre los años 2007 y 2009.

Empresa	2007		2008		2009	
Cía. Pesquera Camanchaca S.A.	6.974.379	34%	12.093.502	40%	7.131.834	37%
Pesquera San José S.A.	6.284.500	31%	6.930.714	23%	5.698.876	30%
Invertec Ostimar S.A.	2.387.183	12%	5.439.537	18%	2.636.614	14%
Comercial e Inversiones Loanco Ltda.	2.130.836	10%	2.547.069	8%	1.899.399	10%
Inversiones Centinela S.A.	1.564.649	8%	2.297.412	8%	1.257.243	7%
Pesquera El Golfo S.A.	596.033	3%				
Sociedad Comercial Bahía Tongoy S.A.	278.902	1%	590.997	2%	350.077	2%
Exportadora Mytilus S.A.	237.400	1%				
Comercial y Pesquera South Wind S.A.	54.431	0%	161.828	1%	105.229	1%
Grusic Barrios Marko Bozidar	24.710	0%				
Comercial Aquagro Ltda.			101.229	0%		
Soc Inv Rebolledo Ferreira Ltda.			59.739	0%		
Sociedad Distribuidora de Productos del Mar Ltda.			189.771	1%		
Proyecta Corp. S.A.					99.287	0,52%
Chile Seafoods Comercial Spa					39.637	0,21%
PisciSeafood Ltda.					6.576	0,03%
Total	20.533.023	100%	30.411.798	100%	19.224.772	100%

(Fuente: ProChile)

Los datos proporcionados por Compañía Pesquera Camanchaca S.A. durante el estudio, revelan que durante los periodos con eventos tóxicos o nocivos los costos de operación fueron de US\$ 683.659, los costos por muerte de individuos correspondieron a US\$ 51.434 y, el monto no percibido por los desembarques no realizados fue de US\$ 2.726.010. El costo para la Cía. Pesquera Camanchaca S.A. se determinó como sigue: US\$ 51.434 por muerte de ostiones y US\$ 2.042.351 por utilidades no percibidas en el periodo. Esto es la diferencia entre los ingresos no percibidos por embarques no realizados menos los costos de operación del periodo.



En el ranking de empresas exportadoras, aparecen 6 empresas principales para el año 2008, Cía. Pesquera Camanchaca S.A., Pesquera San José S.A., Inversiones Ostimar S.A., Comercial e Inversiones Loanco Ltda. e Inversiones Centinela S.A.

Se consideró el costo declarado por Pesquera Camanchaca como el costo representativo de la industria y se estimó que cada una de las restantes empresas presentó igual costo para el periodo analizado. Si bien explícitamente no se obtuvo información de compañías grandes como San José o Invertec, si se han considerado dentro del análisis, ya no utilizando un porcentaje representativo, sino asumiendo que las 5 principales empresas de la industria han presentado pérdidas equivalentes.

Con lo anterior el costo para la empresa tipo es de US\$ 2.093.785 y la industria en su totalidad US\$ 10.468.927, con una capitalización a 10 años a una tasa del 7% el impacto económico global de los eventos descritos es de US\$ 20.593.964.



4. Discusión

4.1 Toxinas amnésicas en el norte de Chile

En la zona norte de nuestro país, la primera detección de ácido domoico corresponde al año 1999 en muestras de ostiones obtenidos de centros de cultivo de la Región de Coquimbo (Suárez-Isla et al., 2002). Desde este estudio, se ha registrado al menos un episodio anual de este tipo de toxicidad, los que han sido asociados a la presencia de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis*

El incremento en la aparición de este tipo de toxinas y la alta frecuencia de esta diatomea en esta amplia zona geográfica, determinaron que el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) estableciera una mayor frecuencia de monitoreo de fitoplancton y toxinas marinas. Desde el año 2004 hasta septiembre de 2008 (al inicio del proyecto), se detectaron 10 cierres cautelares debido a la presencia de ácido domoico con niveles por sobre el límite regulatorio, siendo Bahía Inglesa la principal zona afectada con un 50% de cierres, seguida por las Bahías de Tongoy (33%) y Bahía Guanaqueros (17%) (Servicio Nacional de Pesca, 2009).

La aplicación de estos cierres cautelares, están basada en el cumplimiento de del reglamento 854/2004 (European Commission, 2004) y las decisiones 2003/804/CE y 2004/623/CE, y sus modificaciones, en las cual los análisis del cuerpo entero del bivalvo o cualquier parte comestible de este no debe superar los $20 \mu\text{g g}^{-1}$ (revisado por Paseiro et al. (2009)). Considerando estos antecedentes, la Norma Técnica N°3 del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos menciona en el párrafo 2.1.2 “Si los niveles de abundancia de *Pseudo-nitzschia australis* es superior al 65% del total de las especies presentes en la muestra de fitoplancton, se aplicara un muestreo intensivo para fitoplancton y análisis de ácido domoico en muestras de carne. En caso de detectarse en niveles superiores a 15 ppm de ácido domoico en muestras de carne, se cerrará el área y se aplicará un muestreo



intensivo con el fin de evaluar la evolución del evento. Si el nivel detectado es igual o inferior a 15 ppm, se deberá aplicar solamente un muestreo intensivo, que consiste muestreos cada dos días y se suspende al obtener dos resultados negativos consecutivo.” Actualmente, la Comisión Europea (CE), a través de su Agencia de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encuentra analizando la posibilidad de cambiar la legislación, disminuyendo el límite regulatorio de esta toxina a $4,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (EFSA, 2009c), situación que ha sido duramente criticada por el sector productivo en países como España, Francia y Portugal. Si este cambio en la legislación es aceptado, afectará negativamente las exportaciones de bivalvos de nuestro país hacia la Comunidad Europea, debido a las concentraciones de esta toxina registrada en las tres bahías estudiadas y en especial en Bahía Inglesa son superiores al límite regulatorio sugerido. Por este motivo, durante la ejecución de este proyecto, se decidió realizar los análisis de toxinas en la glándula digestiva de *Argopecten purpuratus*, debido a que este órgano retiene cerca del 55% de la toxina (Uribe *et al.*, 2007), lo que nos permitió determinar con una mayor precisión la distribución temporal del ácido domoico en este bivalvo.

En Bahía Inglesa (Región de Atacama), el ácido domoico parece estar restringido a los periodos de primavera y verano. En diciembre de 2008, se registró la mayor concentración de esta toxina en las glándulas digestivas con valores cercanos a $33 \mu\text{g g}^{-1}$. Este registro, coincidió con la prohibición de cosecha de este molusco dictaminada por SERNAPESCA al detectar durante el PSMB niveles cercanos al límite regulatorio en los tejidos comestibles de *Argopecten purpuratus* (Servicio Nacional de Pesca, 2009). Cabe señalar que durante este evento se registró la presencia de la diatomea *P. australis* con una densidad muy baja ($54.000 \text{ células L}^{-1}$), que sin embargo correspondió al 54% del total del fitoplancton. Los análisis posteriores a este episodio, demostraron que la glándula digestiva de este bivalvo mantuvo una concentración entre $6 \text{ y } 1 \mu\text{g g}^{-1}$ hasta el final del verano, lo que puede ser explicado debido a que la depuración de este órgano es muy lenta o



que la presencia de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* en este periodo pudieran re-intoxicar al bivalvo. Es importante destacar, que a pesar de que las glándulas digestivas se encontraron tóxicas, no se generó un nuevo cierre cautelar para la cosecha de este bivalvo. El último registró de toxina en Bahía Inglesa, corresponde a finales de 2009 con concentraciones de ácido domoico en la glándula digestiva cercanas a $15 \mu\text{g g}^{-1}$. Al igual que al comienzo del estudio, este registró coincidió nuevamente con el cierre cautelar para la cosecha de este bivalvo, ya que los tejidos comestibles alcanzaron valores cercanos al límite regulatorio (Servicio Nacional de Pesca, 2009). La presencia de esta toxina, nuevamente estuvo asociada a la presencia de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, con una clara dominancia de *P. australis* con concentraciones superiores a los 2.000.000 de células L^{-1} .

En el caso de Bahía Guanaqueros (Región de Coquimbo), al igual que en Bahía Inglesa, la presencia de ácido domoico se encuentra mayoritariamente en los periodos de primavera y verano, aunque en Guanaqueros, se registró un episodio en el otoño de 2009. En esta bahía, durante el periodo de enero a noviembre de 2009 se registraron dos episodios en los cuales la concentración de toxina en la glándula digestiva no sobrepasó los $5 \mu\text{g g}^{-1}$. Esos episodios estuvieron asociados a la presencia de *P. australis*, con una concentración máxima de 495.000 células L^{-1} detectada en el mes de mayo de 2009. El único registró importante corresponde a diciembre de 2009, en el cuál la concentración de la toxina en la glándula digestiva alcanzó un nivel de $24,41 \mu\text{g g}^{-1}$, que al parecer no generó un cierre para las actividades acuícolas de acuerdo a la información generada por el PSMB (Servicio Nacional de Pesca, 2009). La presencia de esta toxina, estuvo asociada a *P. australis*, cuya densidad fue muy baja, no superando las 50.000 células L^{-1} y con un porcentaje de no superior al 4% con respecto a la densidad total.



En Bahía Tongoy (Región de Coquimbo), al igual que en las otras bahías la presencia de esta toxina corresponde mayoritariamente al periodo verano-primavera, con un episodio aislado en otoño. Durante el periodo estival, se detectó la presencia de cuatro episodios, siendo los más importantes el ocurrido a finales de 2008 con una concentración de ácido domoico en las glándulas digestivas cercana a $12 \mu\text{g g}^{-1}$ y otro detectado durante marzo de 2009 con una concentración de ácido domoico en las glándulas digestivas cercana a $16 \mu\text{g g}^{-1}$, ninguno de los cuales se encontró asociado a algún cierre cautelar decretado por SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca, 2009). Ambos episodios, estuvieron relacionados con la presencia de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*. El primer episodio, se encontró dominado por el complejo *P. calliantha* / *pseudodelicatissima* con concentraciones cercanas a $150.000 \text{ células L}^{-1}$, seguida por *P. australis* con una concentración cercana a las $50.000 \text{ células L}^{-1}$. En tanto, el episodio ocurrido en marzo de 2009 fue producido por la por el complejo *P. calliantha* / *pseudodelicatissima* destacando que no se registró la presencia de *P. australis*. El siguiente registro de ácido domoico corresponde a otoño (mayo de 2009), con una concentración de toxina que no superó los $2 \mu\text{g g}^{-1}$, el que estuvo asociado a la presencia de *P. australis* con una densidad cercana a las $400.000 \text{ células L}^{-1}$. Finalmente, el último registro de esta toxina corresponde al inicio de la primavera, con una concentración de toxina cercana a los $5 \mu\text{g g}^{-1}$ y el que estuvo asociado nuevamente a la presencia de *P. australis* y *P. calliantha* (*P. pseudodelicatissima*), destacando que ninguno de los eventos, se encontró asociado a cierres cautelar decretado por SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca, 2009).

Es importante destacar que la aplicación de cierres cautelares aplicados por el Servicio Nacional de Pesca se genera cuando los análisis superan una concentración de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ en una muestra constituida por la totalidad de los tejidos del bivalvo. Considerando estos antecedentes, es lógico encontrar una



mayor frecuencia de esta toxina en las glándulas digestivas al ser analizadas por separado, debido a que es órgano contribuye con más de un 55% del contenido total de esta toxina, por lo que frecuencia de detección en uno y otro caso no tienen porque presentar el mismo patrón temporal.

Por otra parte, este trabajo, demuestra que las diatomeas del genero *Pseudo-nitzschia* son componentes habituales de las poblaciones fitoplanctónicas de las principales bahías en las que se desarrolla el cultivo de *Argopecten purpuratus* en el norte de Chile. Estas especies tienen la capacidad de producir floraciones (especialmente en primavera, verano y al menos un episodio en otoño. Todas estas floraciones, se han desarrollado durante los días posteriores a los eventos de surgencia, con temperaturas que se encuentran entre los 13 a 15 °C y con un bajo índice de turbulencia (< 100).

Al igual que en otros lugares del mundo, especies tóxicas y no tóxicas de este género, pueden coexistir durante sus floraciones (Bates, 1998; Trainer et al., 1998; Cho et al., 2002; Trainer et al., 2002; Quijano-Scheggia *et al.*, 2008a). Los resultados de este trabajo, demuestran que al menos cuatro de estas especies pueden coexistir durante un episodio tóxico. Estas especies son *P. australis*, *P. calliantha*, *P. pseudodelicatissima* y *P. subfraudulenta*.

En Chile, *P. australis* ha sido detectada en tres zonas geográficas separadas entre sí por más de 1.000 km. En la zona norte, ha sido descrita por Rodríguez (2004) en Bahía Antofagasta (23°01' S, 70°25' W), en la zona central por Avaria (1962) en Bahía Valparaíso (33°01' S, 71°38' W) y en el extremo sur del país (36° - 41° S) (Rivera, 1985). Las características morfológicas de los cultivos de *P. australis* obtenidos en Bahía Inglesa y Bahía La Herradura, son similares a los descritos por Rivera (1985); Hasle y Syvertsen (1997); Rhodes (1998) y Cusack (2002). La principal diferencia se encuentra en la longitud del eje transapical, siendo más



delgadas que las células descritas por Rivera (1985) en el sur de Chile. Esta especie, ha sido reportada en todas las bahías contempladas en el estudio, presentando una mayor frecuencia y densidad en Bahía Inglesa, especialmente con temperaturas cercanas a 14 °C en momentos de relajación de la surgencia y una estabilidad de la columna de agua. Además, es importante destacar que *P. australis* presenta su mayor tasa de crecimiento ($\mu = 1,82$) a 14 °C con una irradiancia de $166 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los análisis de toxinas confirman a *P. australis* como principal fuente de ácido domoico en el norte de Chile. En este país, esta especie había asociada a la intoxicación de mariscos en la zona sur de Chile (Suárez-Isla et al., 2002). Todos los cultivos de *P. australis*, excepto el cultivo (PA1), fueron capaces de producir ácido domoico. La concentración celular de los cultivos se encontró en un rango de no detectable a $1,74 \text{ pg célula}^{-1}$. Estos valores pueden ser comparados con los reportados por Villac et al. (1993) (no detectable a $0,4 \text{ pg célula}^{-1}$), Rhodes et al. (1996) (2 pg célula^{-1}), Campbell et al. (2001) ($1,20$ a $1,32 \text{ pg célula}^{-1}$), Rhodes et al. (2002) (2 pg célula^{-1}) y Cusack et al. (2002) ($0,21$ a $0,98 \text{ pg célula}^{-1}$).

Por otra parte, el presente estudio permitió identificar y realizar dos cultivos de *P. calliantha*. Esta es la primera que se identifica esta especie en aguas costeras del norte de Chile ($27^\circ - 30^\circ \text{ S}$), debido a que sólo estaba descrita a 2.000 km más al sur, en Dalcahue, Isla de Chiloé ($42^\circ 22' \text{ S}$, $73^\circ 38' \text{ W}$) (Lundholm et al., 2003). Los caracteres taxonómicos identificados en estos cultivos, son similares a los descritos por Lundholm et al. (2003); Caroppo et al. (2005); Besiktepe et al. (2008). La principal diferencia se encuentra en el número de poroides de nuestras células (5-8 en $1 \mu\text{m}$) es mayor que el descrito por otros autores para esta especie. Al igual que en el caso de *P. australis*, el desarrollo de floraciones de esta diatomea ocurre durante periodos de relajación de la surgencia, alcanzando su máxima tasa de crecimiento ($\mu = 1,48$) con una temperatura de 13 °C y a una irradiancia de $209 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Uribe et al., 2007). Sin embargo, es posible



detectar células en aguas más cálidas (17°C), que probablemente puedan ser células de la especie *P. pseudodelicatissima*, debido a que no es posible identificarlas bajo un microscopio fotónico. La detección de ácido domoico en el cultivo de *P. calliantha* (PCA2), indica que *P. australis* no es la única especie capaz de contaminar los moluscos con toxina amnésica. La producción de esta toxina por esta diatomea, fue reportada en la Bahía de Fundy, Canadá (Martin *et al.*, 1990), en las costas de Dinamarca (Lundholm *et al.*, 1997), en la laguna de Bizerte, Túnez (Inès y Asma, 2006) y en la Bahía de Sebastopol, Mar Negro (Besiktepe *et al.*, 2008). La concentración celular de esta toxina en nuestros cultivos se encontró alrededor de 0,01 pg célula⁻¹. Esta concentración, es menor que la reportada por Besiktepe *et al.* (2008) (1,3 pg célula⁻¹), pero igual a la concentración descrita por Martin *et al.* (1990) (0,01 pg célula⁻¹). Esta información es muy importante para su utilización en el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) en el Norte de Chile.

Adicionalmente, este trabajo permitió identificar dos de los cultivos como *P. subfraudulenta*. Este resultado, es la primera identificación de esta especie en aguas costeras de Chile (27° - 30° S) y Sudamérica, debido a que solo estaba descrita en el Golfo de California (Hasle, 1965), en las costas del Pacífico Mexicano (Licea *et al.*, 2000; Gómez-Aguirre *et al.*, 2004; Sierra-Beltran *et al.*, 2005) y en el Golfo de Panamá (Hasle, 1965). Los caracteres taxonómicos identificados en estos cultivos, son similares a los descritos por Hasle y Syvertsen (1997); Cho *et al.* (2001) y Sierra-Beltrán *et al.* (2005). Destacando entre estos, la presencia de más de una estría por fíbula, utilizado para separar esta especie de *P. fraudulenta*, descrita en Chile (18° 20' S, 53° 50' W) por Rivera (1985). Estos cultivos de *P. subfraudulenta* no contenían ácido domoico, al igual que otras razas en otras áreas en el mundo descritas por Cho *et al.* (2001) y Orsini *et al.* (2002).



Finalmente, los análisis realizados a las muestras de fitoplancton evidenciaron la presencia de *P. pseudodelicatissima*, especie descrita por Rivera (1985) (23° 50' S, 53° 13' W) y Hasle (1965). Los caracteres taxonómicos identificados en las células, son similares a los descritos por Lundholm et al. (2003), pero se ajustan más a las descripciones realizadas por Ferrario et al. (2004) en muestras obtenidas en el Paso de Drake. Lamentablemente, no se pudo establecer el cultivo de esta especie, por lo que es necesario el desarrollo de más estudios para confirmar si *P. pseudodelicatissima*, tiene la capacidad de producir ácido domoico debido a que esta especie coexiste frecuentemente con *P. calliantha* durante las floraciones del fitoplancton.

A pesar de la presencia de las diatomeas *P. australis* y *P. calliantha* en las principales bahía en las que se desarrolla la pectinicultura y su relación con la presencia de ácido domoico en la zona, no se puede considerar estas dos especies como plaga, debido a los siguientes motivos: a) son especies que han sido registradas entre Antofagasta y Chiloé; b) los florecimientos de estas especies presentan una estrecha relación con los eventos de surgencia, procesos oceanográficos que ocurren frecuentemente desde Chiloé hasta Arica, c) los eventos de surgencia son de corta duración, no mayores a 7 días, d) la intoxicación y depuración del ácido domoico en *A. purpuratus* es muy rápida, (entre 10 y 15 días, e) concentraciones variables para producir ser un evento nocivo (entre 50,000 células L⁻¹ a más de 1 millón de células L⁻¹).

4.2 Toxinas paralizantes en el norte de Chile

La toxicidad de tipo paralizante, esta frecuentemente presente en las tres principales bahía en las que se desarrolla el cultivo de *Argopecten purpuratus*. En Bahía Inglesa, los resultados positivos de los análisis de las glándulas digestivas mediante bioensayo se encontraron con toxicidades entre 31 y 69 µg equivalentes de STX 100 g⁻¹. Los perfiles de toxinas observados en estas muestras fueron



frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estas toxinas más dcGTX2, dcGTX3, dcSTX, C1 y GTX1. La coincidencia de cinco de estas toxinas a lo largo del periodo de estudio, sugiere que estas fueron producidas por el mismo organismo fitoplanctónico, generándose una nueva intoxicación de los bivalvos cada vez que se incrementó la proporción de GTX5, debido a que esta toxina no pudo ser producida por una desulfatación de las toxinas C2 ó C1 por que la cantidad de estas no es suficiente para explicar su incremento.

En Bahía Guanaqueros, los resultados positivos por bioensayo demostraron que la toxicidad de las muestras fueron similares a los registrados en Bahía Inglesa y se encontraron entre 31 y 56 μg equivalentes de STX 100 g^{-1} . Los perfiles de toxinas observados en estas muestras fueron frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estas toxinas más dcGTX2, dcGTX3, C1, dcSTX y GTX1. Al igual que en Bahía Inglesa, la presencia de GTX5 permitiría identificar una nueva intoxicación en los bivalvos.

En Bahía Tongoy, los resultados positivos por bioensayo presentaron toxicidades entre 31 y 71 μg equivalentes de STX 100 g^{-1} , valores muy similares a los obtenidos en las otras bahías. Los perfiles de toxinas observados en las muestras analizadas fueron frecuentemente dominados por GTX5, GTX2, GTX3, STX, C2 y esporádicamente con la presencia de estas toxinas más dcGTX2, dcGTX3 y, destacando la presencia de GTX1 en diciembre de 2008 la que pudo transformarse por reducción de un grupo hidroxilo a GTX2. Es importante destacar, que la alta frecuencia de GTX5 en esta bahía especialmente en el otoño hace suponer que estos bivalvos se encontraron frecuentemente expuestos al microorganismo causal de las toxinas.



Considerando estos perfiles, podríamos establecer que este bivalvo tendría la capacidad de biotransformar algunas toxinas paralizantes. El caso más claro es la conversión de C2 en C1 por epimerización, la conversión enzimática de C1 en dcGTX2 y C2 en dcGTX3 y la epimerización de esta última en dcGTX2 (Oshima, 1993). Además, tendrían la capacidad de transformar GTX1 en GTX2 por reducción del grupo hidroxilo (Jaime *et al.*, 2007) y se descartaría la transformación de dcGTX2/3 por decarbamoilación de GTX2/3 y la formación de STX por desulfatación enzimática de GTX2/3. En el caso de GTX5, esta probablemente proviene del fitoplancton y sin embargo, no es descartable que esta provenga de una desulfatación de C1 ó C2 (Choi *et al.*, 2003).

El perfil toxicológico de las glándulas digestivas de *A. purpuratus* obtenidos en las tres bahías coincidió prácticamente en todas las toxinas, siendo las mayoritarias GTX5, GTX2, STX, GTX3, acompañadas frecuentemente por dcGTX2 y C2. Este perfil es similar al registrado en muestras analizadas durante el año 2006 por nuestro equipo de trabajo, en las cuales se analizó extractos obtenidos a partir del cuerpo entero de este bivalvo obtenidos desde Bahía Guanaqueros y Bahía Tongoy durante la aparición de un evento sub-tóxico (Álvarez *et al.*, 2009). Sin embargo, ambos perfiles toxicológicos difieren por la alta proporción de GTX5 obtenidas en las muestras analizadas durante el transcurso de este proyecto.

Comparando el perfil de toxinas con otros descritos en la literatura, los perfiles de *A. purpuratus* obtenidos en las tres bahías, pueden ser considerados excepcionales, debido a que no existen descripciones en la literatura que se ajusten totalmente a ellos, salvo la descripción de un perfil similar en la almeja *Megapitaria squalida* durante un episodio de *Gymnodinium catenatum* (Gárate-Lizarraga *et al.*, 2004) y el perfil de toxinas de la cianobacteria *Anabaena circinalis* (Negri *et al.*, 2003a).



Descartando la GTX5, la presencia de STX, GTX2 y GTX3 como constituyentes principales, ha sido asociada a diferentes especies de *Alexandrium* como *A. minutum* obtenidos en el Océano Adriático (Honsell *et al.*, 1996), *A. minutum* obtenidos en las costas del Reino Unido (Nascimento *et al.*, 2005), *A. minutum* obtenidos en las costas desde Dinamarca (Hansen *et al.*, 2003) y *A. tamarense* obtenidos en las costas de las costas Australianas (de Salas *et al.*, 2000) (Negri *et al.*, 2003a). En bivalvos, solamente se ha registrado un perfil similar por Abouabdellah *et al.* (2008) en la glándula digestiva de *Perna perna*, durante una proliferación de *A. minutum* en Marruecos.

En Bahía Mejillones durante el año 2006, (Álvarez *et al.*, 2009) registró una floración de *Alexandrium tamarense*, de la cual se obtuvo un cultivo el que fue analizado posteriormente por cromatografía sin detectar la presencia de toxinas paralizantes. Sin embargo, el perfil de toxinas de *A. purpuratus* demostró la presencia de C2, GTX2, GTX3 y dcGTX2 y la ausencia de STX. A pesar de que esta toxina podría haber sido producida por una desulfatación enzimática de la GTX2, este tipo de transformación no ocurriría en este bivalvo, lo sugiere que la STX en los bivalvos de Bahía Inglesa, Guanaqueros y Tongoy proviene directamente de las poblaciones de fitoplancton y además que las toxinas acumuladas por los bivalvos en Bahía Mejillones son producidas por otra población de dinoflagelados diferente a la de las bahías mencionadas anteriormente. El perfil de toxinas encontrado en los bivalvos provenientes de Bahía Mejillones, es similar a los descritos por Percy *et al.* (2002) para *Alexandrium minutum* obtenidos de la costa Sur del Reino Unido, por Furey *et al.* (1997) en muestras de *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* obtenidas durante la presencia de una floración de *Alexandrium tamarense* en Puerto Cork, Irlanda, y por Chan *et al.* (2006) en *Alexandrium tamarense* provenientes del la bahía de Daya, China, detectándose la presencia de C2 solo en el último caso.



Todos los perfiles encontrados, difieren considerablemente de los de la principal especie responsable de este tipo de toxicidad en el sur de Chile. En esa zona (43 a 55 °S), los episodios de intoxicación paralizante son producidos por el dinoflagelado *Alexandrium catenella*. Lagos et al. (1996); Krock et al. (2007) determinaron el perfil tóxico de este dinoflagelado el cual se caracterizó por tener altas concentraciones de toxinas sulfocarbamato (C1, C2 y GTX5) y una elevada proporción de los epímeros GTX1 y GTX4 y bajas proporciones de GTX2, GTX3 y STX. Adicionalmente, Molinet *et al.* (2003); Navarro *et al.* (2006) y Villanueva (2005) mencionan que los valores óptimos de temperatura y salinidad para el desarrollo de una proliferación de este dinoflagelado debe ser menor a 14 °C y estar entre 22 a 26 psu. Considerando todos los antecedentes expuestos y las notables diferencias climáticas entre las zonas Norte y Sur de Chile, se sugiere que los episodios de tipo paralizante ocurridos en la zona Norte de Chile, son producidos por diferentes poblaciones o razas del género *Alexandrium* u otra especie fitoplactónica, pero no por *A. catenella*.

En este sentido, se recomienda que durante la toma de muestras desarrolladas por el PSMB se utilicen redes fitoplanctónicas con abertura de poro inferior a 20 µm, especialmente porque dinoflagelados como *Alexandrium minutum* no pueden ser capturados con las redes utilizadas actualmente. Adicionalmente, se sugiere que además de las muestras fijadas con formaldehído (cualitativas) y con lugol (cuantitativas), se disponga de una muestra fresca para la identificación de especies de dinoflagelados desnudos como por ejemplo, *Gymnodinium*. Como no se ha podido identificar la especie (s) productoras de veneno paralizante en la bahía donde se cultiva el ostión del norte, se debe estar siempre alerta ya que la glándula digestiva de *A. purpuratus* nos mostró la presencia de esta toxina paralizante en alta frecuencia, lo que no se había registrado con los muestreos realizados por el PSMB, debido posiblemente a que el análisis solo se realiza a músculo y gónada. Sin embargo, en marzo del 2010 en Bahía Tongoy, el PSMB



declaró contingencia por la presencia de VPM. Cabe señalar que la Norma Técnica N°3, dice; “*en el caso de detectarse veneno paralizante en muestras de carne, independiente al resultado de muestras de agua, se deberá aplicar el muestreo intensivo, si los niveles de toxinas son iguales o inferiores a 60 ug de equivalente de saxitoxina por 100 gr de carne y cerrar el área si los niveles de toxina los superan*”. Con respecto a la especie productora de este veneno, solo se refiere a *Alexandrium catenella*. Como aun no tenemos claro cuál sería la especie productora del veneno paralizante en la zona norte de Chile, y solo tenemos sospechas, se debe seguir trabajando hasta su identificación, y su potencial como plaga hidrobiológica.

4.3 Toxinas lipofílicas

La presencia de toxinas lipofílicas solo se había reportado en la zona sur de Chile. En esta zona geográfica, se ha detectado la presencia de yesotoxinas (Yasumoto y Takizawa, 1997a), principalmente ácido okadaico (AO) y dinophysistoxinas (DTX), siendo las dos últimas toxinas asociadas a episodios de intoxicación diarreica por moluscos (Zhao et al., 1993; Uribe et al., 2001; García et al., 2006).

En la zona norte del país durante el desarrollo del PSMB, entre los años 2005 y 2007 se produjeron numerosos cierres cautelares por resultados positivos en los bioensayos para toxinas lipofílicas y además por la presencia de dinoflagelados del género *Dinophysis* (Servicio Nacional de Pesca, 2009). *Dinophysis acuminata* es una especie muy interesante se encuentra durante todo el año en las cuatro bahías en estudio. Cabe señalar que su presencia está en un amplio rango de temperatura (entre 12 a 19°C), durante eventos de surgencia, relajación y hundimiento de las aguas en las bahías, además con sistemas turbulentos o de estabilidad en la columna de agua.



Durante, el periodo de toma de muestras del proyecto se demostró que la toxicidad producida por toxinas lipofílicas, esta frecuentemente presente en las tres principales bahía en las que se desarrolla el cultivo de *Argopecten purpuratus*. Esta toxicidad, no tiene un patrón de distribución temporal en las bahías estudiadas, a pesar de que en Bahía Guanaqueros parece estar concentrada en la temporada de primavera y verano, lo que realmente se debería a la menor disponibilidad de muestras. En las tres bahías estudiadas, la toxicidad lipofílica puede ser explicada por la presencia de tres tipos de toxinas, que en orden de importancia corresponden a la yesotoxina (YTX), azaspirácido 2 (AZA2), pectenotoxina 2 (PTX2) y su ácido secoico (PTX2sa).

En el caso de la yesotoxina, esta se encontró con concentraciones entre 0,01 y 1,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, lo que explica la mortalidad de los ratones en la mayoría de los bioensayos, debido a que la LD50 (dosis mortal 50%) por inyección intraperitoneal corresponde a 0,08 $\mu\text{g g}^{-1}$ (revisado por Paz *et al.* 2008). Al igual que en otros lugares del mundo, las toxinas en los bivalvos son producidas principalmente por el dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*. En este proyecto, se realizaron los estudios taxonómicos y toxicológicos de esta especie a partir de muestras tomadas el año 2007, durante una proliferación de este dinoflagelado en Bahía Mejillones. Los estudios taxonómicos, revelaron que las células analizadas coinciden con las descripciones realizadas por Hansen *et al.* (1997) y (Balech (1988) (descrito como *Gonyaulax grindleyi*). Sin embargo, en este estudio, las células fueron ligeramente más pequeñas y delgadas que las reportadas en la literatura. Por otra parte, los estudios taxonómicos permitieron identificar un quiste similar al originado por este dinoflagelado, conocido como *Operculodinium centrocarpum*. La morfología de este quiste se ajusta a las descripciones realizadas por Wall y Dale (1967) y Fukuyo *et al.* (1990), con pequeñas diferencias en los extremos de los procesos en forma de "T". Sin embargo, es muy similar al descrito por Lembeye (2004) en Bahía Borja (53°32'S - 72°30'W), el que



fue atribuido a este dinoflagelado. Los análisis de toxinas de las muestras de fitoplancton dieron como resultado que la concentración de yesotoxina está entre 0,2 y 0,4 pg célula⁻¹. Esta concentración es inferior a la detectada por Samdal *et al.* (2004) (19 a 34 pg célula⁻¹), Paz *et al.* (2007) (2,9 a 28,7 pg célula⁻¹) y Suzuki *et al.* (2007) (59,8 pg célula⁻¹), pero es similar a la concentración detectada por Eiki *et al.* (2005) (0,9 pg célula⁻¹) y Stobo *et al.* (2003) (0,3 pg célula⁻¹). Además, nuestros análisis revelaron que este perfil es similar al descrito por Krock *et al.* (2009a) en muestras de plancton obtenidas en la Bahía de Arica.

Adicionalmente, en este trabajo se detectó la presencia de yesotoxina durante una floración de un dinoflagelado identificado preliminarmente como *Gonyaulax spinifera*, sin embargo, más estudios taxonómicos son necesarios para determinar la especie de forma inequívoca. La producción de este tipo de toxinas, ha sido demostrada en esta misma especie en países como Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 2006) y Sudáfrica (Krock *et al.*, 2008). Cabe señalar, que quistes de *Gonyaulax spinifera* y *Protoceratium reticulatum* se encuentran en las cuatro bahías estudiadas y con mayor densidad relativa en Bahía Mejillones.

P. reticulatum se ha presentado en forma accidental en las bahías de la III y IV Región. Sin embargo, el 21 de febrero del 2007 en Bahía Mejillones, se registró una floración que alcanzó una densidad máxima de 408. 200 células L⁻¹. Este episodio, no fue un evento local debido a que nuevos antecedentes nos indican que el 14 del mismo mes se registraron densidades de 383.520 células L⁻¹ en Caleta Chipana (21.32°S – 70.07°O) (Ferrés, 2008), cabe señalar que entre ambos puntos geográficos hay una distancia de 200 km. Por alta densidad y la extensión del evento de *P. reticulatum* y su capacidad de producir yesotoxina, se podría considerar este dinoflagelado como una especie potencial de Plaga Hidrobiológicas según DS345/2005. Por esta razón, se debería considerar una restricción en el traslado de moluscos bivalvos, provenientes de la zona norte



(Bahía Mejillones – Arica) a bahías de las regiones de Atacama y de Coquimbo donde se cultiva *Argopecten purpuratus*.

La segunda de las toxinas lipofílicas registradas en esta zona geográfica son las pectenotoxinas. Los análisis de las muestras, revelaron que en las glándulas digestivas de *A. purpuratus* el perfil estuvo dominado por PTX2 con una concentración entre 0,01 y 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ y su ácido secoico PTX2sa. Este perfil, es similar al encontrado por Blanco et al. (2007) en diferentes bivalvos extraídos en el norte de Chile, destacando además que no se detectó la presencia de ácido okadaico (AO) o dinofisistoxinas (DTX). En muestras de fitoplancton, solo se encontró la presencia de un compuesto con la misma masa molecular de la PTX1, que es un metabolito de la PTX2 producido por la actividad heterotrófica del fitoplancton (Suzuki et al., 1998). Sin embargo, podría tratarse de PTX11 que tiene el mismo peso molecular de PTX1 y que ha sido reportada en *Dinophysis acuta* (Suzuki et al., 2006), desafortunadamente la concentración de este compuesto fue muy baja y no pudo ser confirmado con exactitud. Adicionalmente, durante el desarrollo de este trabajo, se realizó análisis de células de *Dinophysis acuminata* aisladas de muestras de fitoplancton provenientes de Bahía Inglesa, debido a que el cultivo de esta especie es difícil de realizar por la necesidad de tener una pequeña cadena trófica, en la cual este dinoflagelado es alimentado con el ciliado *Myrionecta rubra* (= *Mesodinium rubrum*), el que a su vez es alimentado con el nanoflagelado *Teleaulax* sp (Park et al., 2006). Los resultados obtenidos, demostraron que este organismo solo contenía pectenotoxina 2 (PTX2) con una concentración de 180 pg célula^{-1} , siendo esta la concentración de PTX2 más alta reportada para este género. Este perfil toxicológico es considerado como atípico, debido a que en otras partes del mundo esta misma especie además de tener PTX2 como la toxina principal, siempre tienen asociada la presencia de AO (Mackenzie et al., 2005; Miles et al., 2004b) y en otros casos *Dinophysis acuminata* no contiene pectenotoxinas (Vale y Sampayo, 2002a; Fernández et al.,



2003). La coincidencia de este perfil toxicológico en los moluscos de áreas distantes como Bahía Inglesa y Bahía Tongoy, sugieren que *Dinophysis acuminata* se encuentra distribuida en toda la costa del norte de Chile, lo que queda corroborado por la reciente detección de PTX2 en la Bahía de Arica por Krock et al. (2009a). Por lo tanto, *D. acuminata* en la zona norte (entre Bahía Arica y Bahía Tongoy) no debe ser considerada como una especie nociva para la salud humana, ni menos como una plaga hidrobiológica, ya que ha estado presente en las bahías durante todo el año y por mucho tiempo, sin haberse registrado evidencias de diarreas en la población consumidora de este pectínido en las bahías de las regiones de Atacama y de Coquimbo.

La última toxina lipofílica detectada durante el desarrollo del proyecto corresponde a los azaspirácidos. Entre estas toxinas, durante este estudio se detectó la presencia de azaspirácido 2 (AZA2) de manera frecuente en las principales bahías en las que se desarrolla la pectinicultura. Es importante destacar, que en todos los casos, la concentración de la toxina se encontró entre el límite de detección ($0,01 \mu\text{g g}^{-1}$) y el de cuantificación que corresponde a $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$. La presencia de este tipo de toxinas, específicamente de azaspirácido 1, ya había sido descrita por nuestro grupo de trabajo en muestras de macha (*Mesodesma donacium*) y almeja (*Mulinia edulis*) obtenidas desde Bahía Coquimbo (Álvarez et al., 2010), siendo esta la primera detección en nuestro país y en el Hemisferio Sur. Posteriormente, López-Rivera et al. (2010) detectaron la presencia de AZA-2 en glándulas digestivas de *Argopecten purpuratus*, con concentraciones inferiores a los límites regulatorios.

En relación al agente causal de la toxina, recientemente, Krock et al. (2009b) detectó la presencia de AZA-1 y AZA-2 en muestras de fitoplancton obtenidas en nuestro país, sugiriendo la presencia del dinoflagelado *Azadinium spinosum*. Es probable que esta especie, o algún dinoflagelado asociado a este género sea el



organismo responsable de la presencia de azaspirácidos en el norte de Chile. *Azadinium spinosum* es una especie muy pequeña que no pasa los 10 μm de longitud, por lo que no se puede capturar con una red de fitoplancton estándar (23 μm). Además es una especie muy similar a las pertenecientes al género *Ensiculifera*, por lo que es difícil su identificación bajo el microscopio fotónico. En el presente estudio se pudo registrar especies muy similares a especies del género *Azadinium*, pero lamentablemente debido a su baja densidad no pudieron ser concentradas para desarrollar estudios de microscopía electrónica, por lo que, se espera obtener en el futuro una muestra con una mayor densidad que permita realizar los estudios taxonómicos y toxicológicos de esta nueva especie.

Finalmente, debemos destacar la presencia de espirólidos. A pesar de que estas toxinas no fueron encontradas en las glándulas digestivas de *A. purpuratus*, estas fueron detectadas durante el periodo de estudio por nuestro grupo de trabajo en muestras de macha y almeja obtenidas de Bahía Coquimbo. En estos bivalvos, sólo se detectó la presencia de 13-desmetil-C (SPX-1) en las dos especies estudiadas. El espectro de fragmentación (MS^2) de este compuesto es similar al descrito por Sleno *et al.* (2004) durante la fragmentación de la estructura del SPX-1, caracterizado por las pérdidas sucesivas de moléculas de agua durante la fragmentación en una trampa iónica.

En conclusión, la utilización de glándulas digestivas para caracterizar la presencia de diferentes tipos de toxicidad en esta amplia zona geográfica, nos permitió determinar que los tres principales grupos de toxicidad, se encuentran frecuentemente presentes en las bahías en las que se desarrolla el cultivo de esta especie. Entre estos, es importante destacar la alta frecuencia de toxinas paralizantes, que a pesar de no haber generado un cierre cautelar durante el periodo del proyecto deben ser consideradas como una amenaza potencial para la salud de la población. Por otra parte, la alta frecuencia de toxinas lipofílicas,



especialmente la detección de azaspirácidos (toxinas diarreogénicas) y el riesgo potencial que sugiere la presencia de espiróridos, hace necesario que los sistemas de control desarrollados por el Gobierno de Chile dispongan de técnicas cromatográficas que sean complementarias a los bioensayos, como por ejemplo la espectrometría de masas.

Por otra parte, es necesaria una actualización de la Norma Técnica N°3 del PSMB, en la cual, existen deficiencias como por ejemplo:

- Asumir que solo *Dinophysis acuta* (especie que no se encuentra en el norte de nuestro país) es la única especie productora de toxinas pertenecientes a este género. La detección de pectenotoxinas en la zona norte de Chile y la alta frecuencia espacio temporal del dinoflagelado *Dinophysis acuminata*, requiere esta especie también sea considerada en el presente reglamento.
- Asumir que *Protoperdinium crassipes*, está asociado a la producción de azaspirácidos. Es necesario destacar que este dinoflagelado heterótrofo es solo un vector de estas toxinas por lo que es necesario realizar estudios específicos para identificar la presencia del dinoflagelado *Azadinium spinosum* y su posterior inclusión en la normativa.
- Se debe considerar la inclusión de los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera* como organismos productores de yesotoxinas.
- Se debe considerar la inclusión de las diatomeas del complejo *Pseudo-nitzschia calliantha/pseudodelicatissima* como especies productoras de ácido domoico. A pesar que *P. pseudodelicatissima* no ha sido confirmada como productora de esta toxinas, la inclusión de este complejo se debe principalmente a que estas no pueden ser identificadas mediante las



técnicas de microscopía consideradas en la norma técnica y por lo tanto se debe aplicar como una medida preventiva.

Finalmente, es necesario destacar que con la escasa información disponible, no es posible determinar con exactitud cuál o cuáles de las especie tóxicas encontradas corresponde a organismos nativos o exóticos. Esta situación se debe a que es necesario realizar estudios taxonómicos de mayor complejidad como por ejemplo: realizar estudios de identificación de organismos fitoplanctónicos en aguas de lastre, estudios completos de quistes en sedimentos que incluya germinación y posterior análisis de toxinas de los cultivos obtenidos, comparaciones morfológicas y de perfil de toxinas con especies obtenidas en partes del mundo y estudios filogenéticos que permitan clasificar de manera inequívoca la clasificación taxonómica y la relación con diferentes clones o cepas encontradas en otras partes del mundo.

4.4 *Rhizosolenia imbricata*: distribución, taxonomía y relación con los episodios nocivos en el norte de Chile

Durante este trabajo, se detectó el desarrollo de dos floraciones de *Rhizosolenia* durante dos veranos consecutivos en Bahía Inglesa (Región de Atacama). Los análisis taxonómicos de las muestras de fitoplancton obtenidas durante estos episodios, revelaron que la especie implicada *Rhizosolenia imbricata*. Las características taxonómicas de las células analizadas son similares a las descritas por Lebour (1930); Cupp (1943); Hasle y Syvertsen (1997). Sin embargo, las células registradas durante estas floraciones presentaron una menor longitud que la reportada por estos autores. El diámetro es mayor que el descrito por Cupp (1943) y se encuentra en el rango mencionado por Lebour (1930) y Hasle y Syvertsen (1997). El proceso con forma de espina, presenta una longitud similar a la descrita por Hasle y Syvertsen (1997) y se encuentra insertado en una pequeña



otaría que ocupa un tercio de la longitud de este proceso, similar a lo descrito por Lebour (1930).

Los resultados demuestran que esta diatomea tiene la capacidad de producir floraciones algales en Bahía Inglesa, con concentraciones que pueden superar las 900.000 células L⁻¹, similar a lo descrito por Uribe (2003) en episodios detectados en dos bahías ubicadas 400 km al sur, donde también se desarrolla el cultivo de pectínidos. Estos episodios, están asociados a la presencia de un fuerte sabor amargo en los tejidos de los bivalvos cultivados en la zona, especialmente cuando *R. imbricata* se presenta en altas concentraciones y con una dominancia superior al 60% con respecto a las poblaciones del fitoplancton.

Este tipo de episodios, fue descrito por primera vez en Australia por Parry et al. (1989), quienes asociaron la presencia de la diatomea *Rhizosolenia chunii* con un fuerte sabor amargo en tres moluscos de importancia comercial. Durante esta floración, esta diatomea alcanzó una concentración máxima de 84.000 células L⁻¹ con un 95% de dominancia en la comunidad fitoplanctónica. Además, estos autores mencionan que esta diatomea podría producir algún tipo de toxina que genera lesiones en los tejidos de la glándula digestiva, que podrían ser la causa de altas mortalidades en las poblaciones de moluscos afectados por la presencia de esta diatomea. Al contrario a lo ocurrido en Australia, en las floraciones producidas por *R. imbricata*, no se detectaron lesiones ni mortalidad de los bivalvos cultivados, a pesar de que esta tuvo una concentración un orden de magnitud superior a la de *R. chunii*. Sin embargo, el hecho de que dos especies del mismo género estén asociadas al sabor amargo de los organismos que los consumen, sugiere que es muy probablemente que estas dos especies de *Rhizosolenia* son los organismos causantes.



La diferencia en toxicidad asociada podría deberse a que *R. chunii* produzca una mayor cantidad del compuesto que da sabor amargo (si este es tóxico) o la especie australiana produzca además otros compuestos que le puedan conferir toxicidad. A pesar que el primer episodio de este tipo en Australia, ocurrió hace más de 20 años, el compuesto que produce el amargo sigue sin ser identificado, por lo que se desconoce si realmente tiene la capacidad de producir algún tipo de efecto tóxico o si este se encuentra presente en otras especies pertenecientes al género *Rhizosolenia*, como es el caso de *R. imbricata*.

4.5 Distribución anatómica del sabor amargo en *Argopecten purpuratus*

Los únicos tejidos que se vieron afectados fueron el músculo aductor y la gónada. Entre estos, el músculo adquirió un leve sabor amargo que para algunos evaluadores resultó casi imperceptible. Por el contrario, la gónada presentó un intenso sabor amargo, especialmente en la zona distal que corresponde a la gónada femenina, que, de acuerdo a información obtenida por parte de los cultivadores, puede persistir entre dos a cuatro meses.

La distribución del sabor amargo en los tejidos de *Argopecten purpuratus*, es muy distinta a la descrita por Parry et al. (1989) en *Mytilus edulis*, *Ostrea angasi* y *Pecten alba* y por Lee (1995) en *Crassostrea gigas*, en los cuales se acumula preferencialmente en la glándula digestiva. Solo en un erizo *Hemicentrotus pulcherrimus* se ha encontrado una distribución del sabor amargo (debido a un compuesto denominado pulcherrimina) similar a la de *A. purpuratus* (Murata et al., 2001).

Actualmente, este tipo de episodios se han convertido en el principal problema generado por el fitoplancton en esta zona geográfica. Esta situación, puede ser explicada por dos motivos. El primero de ellos está relacionado con la distribución temporal de estas floraciones, las que durante los últimos años se han generado



frecuentemente durante los meses de verano, coincidiendo con la temporada de cosecha del ostión del Norte. El segundo motivo corresponde a la alta capacidad de retención del sabor amargo por los tejidos de la gónada, como se mencionó anteriormente puede persistir hasta cuatro meses haciendo inviable la elaboración del principal producto de exportación que corresponde al formato “roe on” (gónada y musculo), el que es comercializado en un 90% a la Comunidad Europea. El costo para la Cía. Pesquera Camanchaca S.A. por estos episodios, ha sido de US\$ 51.434 por muerte de ostiones al no poderlos cosechar a tiempo y US\$ 2.042.351 por utilidades no percibidas en el periodo por embarques no realizados menos los costos de operación del periodo.

Finalmente, desde el punto de vista de los sistemas de control, es importante destacar que a la fecha este tipo de eventos no ha sido relacionado con la intoxicación de personas. Sin embargo, es necesario determinar cuál es el compuesto responsable de este sabor amargo y conocer si este tiene alguna actividad biológica positiva o negativa en los organismos marinos y en el ser humano. La presencia de *R imbricata* ha provocado un fuerte impacto económico para las empresas pectinicultoras, en especial las ubicadas en Bahía Inglesa, donde consideran a esta especie como una Plaga Hidrobiológica, bajo en concepto económico y no para la salud humana.

4.6 Identificación del compuesto químico que da origen al sabor amargo de los bivalvos

Hasta el momento la identidad del compuesto responsable del sabor amargo de *A. purpuratus* no ha podido ser establecida. Ya que el sabor amargo no se elimina con un tratamiento de tripsina y sin embargo sí desaparece al intentar la purificación con columnas de fase reversa, parece claro que no es un péptido como los responsables del sabor amargo de la ostra en Corea de Sur (Lee, 1995). El compuesto en el sabor amargo de los bivalvos en Australia no se conoce. De



todas formas, la diferente distribución anatómica en los bivalvos (principalmente en la glándula digestiva) sugiere que no debe tratarse tampoco del mismo tipo de compuestos. El otro compuesto asociado a sabor amargo de invertebrados marinos, la pulcherrimina es un aminoácido hidrosoluble (Murata et al., 2001). Esta última característica hace imposible que se trate del causante del amargo en *A. purpuratus* ya que en este caso el compuesto no es hidrosoluble.

Existen diversos grupos de productos naturales que frecuentemente son responsables de sabor amargo como los aminoácidos, alcaloides, flavonoides y los terpenos (Bassoli et al., 2008). Lamentablemente, a excepción de los aminoácidos, todos estos compuestos pueden ser extraídos con solvente orgánicos como el metanol y el cloroformo. Además si consideramos el rango de masas de los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos, resulta casi imposible determinar a cuál de estos grupos corresponde el compuesto que da sabor amargo a los ostiones, debido a que la mayoría de estos pueden encontrarse dentro de estos tamaños moleculares. Por lo tanto, debemos continuar con el proceso de purificación para lograr la cantidad material necesaria para la realización de los estudios de resonancia magnética nuclear (NRM) adicionales que puedan dar resultados inequívocos.

De los datos obtenidos por espectrometría de masas, en caso de que se confirmase que el compuesto que produce el amargo es el de 491.1 m/z en modo positivo habría que descartar muy probablemente compuestos no nitrogenados, ya que el hecho de que el ión con carga positiva (presumiblemente el [M+1]) sea impar pero sufra una pérdida neutra impar (117) sugiere que contiene átomos de nitrógeno y en número par. Una pérdida adicional del fragmento obtenido tras la pérdida de 117 m/z, sufre una pérdida idéntica, por lo que parece que el compuesto contiene dos grupos iguales o similares y que contienen nitrógeno.



5. Conclusiones

1. La utilización de glándulas digestivas para caracterizar la presencia de diferentes tipos de toxicidad, nos permitió determinar que los tres principales grupos de toxicidad, se encuentran frecuentemente presentes en las bahías en las que se desarrolla el cultivo de *Argopecten purpuratus*.
2. Los análisis toxicológicos realizados a los cultivos de *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia calliantha* demostraron que ambas especies tienen la capacidad de producir ácido domoico, siendo la primera la principal especie productora en las aguas costeras del Norte de Chile. Por otra parte, permitió descartar que *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* tenga la capacidad de generar este tipo de toxinas.
3. Es importante destacar la alta frecuencia de toxinas paralizantes, que a pesar de no haber generado un cierre cautelar durante el periodo del proyecto deben ser consideradas como una amenaza potencial para la salud de la población.
4. Los perfiles tóxicos de los moluscos contaminados por toxinas paralizantes, sugieren que las especies productoras de estas toxinas son dinoflagelados del género *Alexandrium*, provenientes de diferentes poblaciones o razas, pero no son producidas por el dinoflagelado *Alexandrium catenella*.
5. Las principales toxinas lipofílicas detectadas en la zona corresponden a yesotoxinas, azaspirácido-2, pectenotoxinas-2 y su ácido secoico.
6. Al igual que en otros lugares del mundo, la yesotoxina es producida por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera*, especies



que son frecuentes en nuestras costas.

7. La detección de azaspirácidos (toxinas diarreogénicas) y el riesgo potencial que sugiere la presencia de espiróolidos, hace necesario que los sistemas de control desarrollados por el Gobierno de Chile dispongan de técnicas cromatográficas que sean complementarias a los bioensayos, como por ejemplo la espectrometría de masas, para fortalecer el programas de vigilancia desarrollados por el Ministerio de Salud del Gobierno de Chile y el PSMB.
8. La presencia del sabor amargo, se encuentran asociada a la presencia de la diatomea *Rhizosolenia imbricata*. Provocando impacto económico negativo a la industria pectinicultrora, debido a la extensión de la floraciones de esta especie (>50 días), impidiendo la cosecha y la exportación del ostión. Adicionalmente, se ha logrado un importante avance en el proceso de purificación del compuesto, pero lamentablemente hasta la fecha no ha podido ser caracterizado.
9. La mayoría de las especies fitoplanctónicas nocivas en el norte de Chile podrían ser nativas. Sin embargo es necesario el desarrollo de investigaciones más específicas como por ejemplo estudios filogenéticos.



6. Referencias

Aasen, J., Mackinnon, S. L., Leblanc, P., Walter, J. A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam, M. A. 2005. Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chemical Research in Toxicology* 18:509-515.

Abouabdellah, R., Taleb, H., Bennouna, A., Eler, K., Chakif, A., Mourim, A. 2008. Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from south Atlantic coast of Morocco. *Toxicon* 51:780-786.

Álvarez, G. 2009. *Episodios tóxicos y nocivos para el desarrollo de la acuicultura y la explotación de moluscos en el norte de Chile*. Diploma de Estudios Avanzados, Universidad de Santiago de Compostela, 94 pp.

Álvarez, G., Uribe, E., Ávalos, P., Mariño, C., Blanco, J. 2010. First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon* 55:638-641.

Álvarez, G., Uribe, E., Vidal, A., Ávalos, P., González, F., Mariño, C., Blanco, J. 2009. Paralytic shellfish toxins in *Argopecten purpuratus* and *Semimytilus algosus* from northern Chile. *Aquat. Living Resour* 22:341-347.

Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., Abadie, E. 2007. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drugs* 5:168-179.

Antinori, J., Sánchez, L. M., Mendoza, J. A., Flores, O., Ascón, D. 2002. Monitoring of marine biotoxins and presence of HAB events in Peru: current status. *En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J. L., Beiras, R. [Eds.] Proceeding of 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela-España, pp. 203-210.

Armstrong, M., Kudela, R. 2006. Evaluation of California isolates of *Lingulodinium polyedrum* for the production of yessotoxin. *Afr. J. Mar. Sci.* 28:399-401.

Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T. 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxins towards mice. *Toxicon* 40:77-82.

Aune, T., Yndestad, M. 1993. Diarrhetic shellfish poisoning. *En: Falconer, I. R. [Ed.] Algal Toxins Seafood Drinking Water*. Academic, London, UK.



Avaria, S. 1962. Diatomeas y Silicoflagelados de la Bahía de Valparaíso. *Revista de Biología Marina* 12:61-118.

Avaria, S. 1979. Red tides off the coast of Chile. *En*: Taylor, F. J., Seliger, H. H. [Eds.] *Toxic dinoflagellates blooms*. Elsevier, Amsterdam, pp. 161-164.

Bakun, A. 1973. Coastal upwelling indices, West Coast of North America, 1946 - 1971. . *US Department of Commerce. NOAA Technical Report NMFS-SSRF 671* 103 pp.

Bakun, A. 1975 Daily and weekly upwelling indices, West Coast of North America, 1967 - 1973. . *US Department of Commerce, NOAA Technical Report NMFS. SSRF, 693:113* pp.

Bakun, A. 1987. Monthly variability in the ocean habitat off Peru as deduced from maritime observations, 1953 to 1984. *En*: Pauly, D., Tsukayama, I. [Eds.] *Peruvian anchoveta and its upwelling ecosystem: three decades of changes*. ICLARM Studies and Reviews, pp. 46-74.

Bakun, A., Parrish, R. 1982. Turbulence, transport, and pelagic fish in the California and Peru Current System. . *CalCOFI. Rep Vol XXIII:99-112*.

Balech, E. 1988. *Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental*. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, 310.

Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzman, J., Garate-Lizarraga, I., Lechuga-Deveze, C. H., Reinhardt, K., Luckas, B. 2005. Paralytic Shellfish Toxin Profile in Strains of the Dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* Graham and the Scallop *Argopecten Ventricosus* G.b. Sowerby li From Bahia Concepcion, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae* 4:21-31.

Barraza, J. E., Armero-Guardado, J. A., Valencia de Toledo, Z. M. 2004. The red tide event in El Salvador, August 2001-January 2002. *Rev. biol. trop* 52:1-4.

Bassoli, A., Borgonovo, G., Busnelli, G. 2008. Alkaloids and the bitter taste. *En*: Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O. [Eds.] *Modern alkaloids: structure, isolation and biology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 53-72.

Bates, S. S. 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. *En*: Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M. [Eds.] *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. p 405-426.



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

Beitler, M. 1991. Toxicity of adductor muscles from the purple hinge rock scallop (*Crassodoma gigantea*) along the Pacific coast of North America. *Toxicon* 29:889-894.

Berrios, M., Olivares, J. 1996. Caracterización granulométrica y contenido de carbono orgánico de los sedimentos marinos superficiales, en el sistema de bahías de la IV Región Coquimbo. *Cienc. Tecnol. Mar* 19: 53-61.

Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V., Lee, R. 2008. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (Bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae* 7:438-442.

Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* 256:283-290.

Blanco, J. 1989a. Quistes de Dinoflagelados de las costas de Galicia. I. Dinoflagelados Gonyaulacoides. *Scientia Marina* 53:785-796.

Blanco, J. 1989b. Quistes de Dinoflagelados de las costas de Galicia. II. Dinoflagelados Peridinioides. *Scientia Marina* 53:797-812.

Blanco, J. 1989. Quistes de Dinoflagelados de las costas de Galicia. III. Dinoflagelados Gymnodinioides. *Scientia Marina* 53:813-819.

Blanco, J. 2001. Episodios nocivos por fitoplancton. En: Maeda-Martínez, A. N. [Ed.] *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, Mexico, pp. 285-324.

Blanco, J., Álvarez, G., Uribe, E. 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon* 49:710-716.



Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M. L. 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Monog.)* 1:70.

Boni, L., Ceredi, A., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., Poletti, R., Pomperi, M. 2001. Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridinales, Dinophyta) in the North-Western Adriatic Sea (Italy). *En: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Lewis, R. J. [Eds.] Harmful Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 137-140.

Bornet, B., Antoine, E., Francoise, S., Marcaillou-Le Baut, C. 2005. Development of sequence characterized amplified region markers from intersimple sequence repeat fingerprints for the molecular detection of toxic phytoplankton *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) and *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) from French coastal waters. *Journal of Phycology* 41:704-711.

Boyer, G. 2009. Algal toxins and their detection. *En: Shumway, S. E., Rodrick, G. E. [Eds.] Shellfish safety and quality*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 129-154.

Burgess, V. A. 2003. Toxicology investigation with the Pectenotoxin-2 seco acids. *Ph.D Thesis. National Research Centre for Environmental Toxicology and the School of Public Health. Griffith University. Queensland, Australia:272*.

Campbell, D. A., Kelly, M. S., Busman, M., Bolch, C. J., Wiggins, E., Moeller, P. D. R., Morton, S. L., Hess, P., Shumway, S. E. 2001. Amnesic shellfish poisoning in the king scallop, *Pecten maximus*, from the west coast of Scotland. *Journal of Shellfish Research* 20:75-84.

Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L., Albertano, P. 2005. On the Presence of Pseudo-Nitzschia Calliantha Lundholm, Moestrup Et Hasle and Pseudo-Nitzschia Delicatissima (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Journal of Plankton Research* 27:763-774.

Carver, C. E., Mallet, A. L., Warnock, R., Douglas, D. 1996. Red-coloured digestive glands in cultured mussels and scallops: the implication os *Mesodinium rubrum*. *Journal of Shellfish Research* 15:191-201.

Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M. A. 1999. Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Natural Toxins* 7:197-206.



Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A. 2005. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4:33-48.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S., Tartaglione, L., Cangini, M., Pompei, M., Guerrini, F., Boni, L., Pistocchi, R. 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47:597-604.

Claramunt, G. 2006. Phytoplankton abundance at several stations in January 2005, Chipana, Chile. *Publishing Network for Geoscientific & Environmental Data* doi:10.1594/PANGAEA.547748.

Clayden, J., Read, B., Hebditch, K. R. 2005. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. *Tetrahedron* 61:5713-5724.

Cohen, P., Holmes, C. F., Tsukitani, Y. 1990. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15:98-102.

Compagnon, D., Lembeye, G., Marcos, N., Ruíz-Tagle, N., Lagos, N. 1998. Accumulation of Paralytic Shellfish Poisoning toxins in the bivalve *Aulacomya ater* and two carnivorous gastropods *Concholepas concholepas* and *Argobuccinum ranelliformes* during an *Alexandrium catenella* bloom in southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 17:67-73.

Cruz-Rivera, E., Villareal, T. A. 2006. Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs. *Harmful Algae* 5:497-525.

Cupp, E. E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography of the University of California (USA)* 5:1-238.

Cusack, C. 2002. *The diatom Pseudo-nitzschia in Irish waters*. PhD, National University of Ireland, 380 pp.

Cusack, C. K., Bates, S. S., Quilliam, M. A., Patching, J. W., Raine, R. 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *Journal of Phycology* 38:1106-1112.

Chan, L. L., Sit, W., Kwan-Sing Lam, P., Hsientang Hsieh, D. P., Hodgkiss, I. J., Man-FanWan, J., Yam-Tat Ho, A., Man-Chi Choi, N., Wang, D., Dudgeon, D. 2006.



Identification and characterization of a “biomarker of toxicity” from the proteome of the paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Proteomics* 6:654-666.

Chiang, R. M. T. 1988. Paralytic shellfish management program in British Columbia, Canada. *Journal of Shellfish Research* 7:637-642.

Cho, E. S., Hur, H. J., Byun, H. S., Lee, S. G., Rhodes, L. L., Jeong, C. S., Park, J. G. 2002. Monthly monitoring of domoic acid producer *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle using species-specific DNA probes and WGA lectins and abundance of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) from Chinhae Bay, Korea. *Botanica Marina* 45:364-372.

Cho, E. S., Park, J. G., Oh, B. C., Cho, Y. C. 2001. The application of species specific DNA-targeted probes and fluorescently tagged lectin to differentiate several species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Chinhae Bay, Korea. *Scientia Marina* 65:207-214.

Choi, M. C., Hsieh, D. P. H., Lam, P. K. S., Wang, W. X. 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Biology* 143:927-934.

Christian, B., Below, A., Drebler, N., Scheibner, O., Luckas, B., Gerdt, G. 2008. Are spirolides converted in biological systems? - A study. *Toxicon* 51:934-940.

de Salas, M., van Emmerik, M. J., Hallegraeff, G. M., Negri, A., Vaillancourt, R., Bolch, C. 2000. Toxic Australian *Alexandrium* dinoflagellates: introduced or indigenous? *En: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S., Bolch, C., Lewis, R. [Eds.] Harmful Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco, Tasmania, pp. 214-217.

Deeds, J. R., Terlizzi, D. E., Adolf, J. E., Stoecker, D. K., Place, A. R. 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) - a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae* 1:169-189.

Dell'aversano, C., Hess, P., Quilliam, M. A. 2005. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Paralytic Shellfish Poisoning (Psp) Toxins. *Journal of Chromatography a* 1081:190-201.



Department of Primary Industries 2005. Geelong Arm Aquaculture Fisheries Reserves Management Plan. *Fisheries Victoria Management Report Series N° 34:86*.

Díaz, R. 2010. Efecto de las Bajas de Oxígeno disuelto en la mortalidad de *Argopecten purpuratus* (Lamark) en Bahía Mejillones. Memoria para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Católica del Norte. Sede Coquimbo.

Domínguez, H., Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Franco, J. M., Fernández, J. J. 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56:191-217.

Doucette, G. J., Kodama, M., Franca, S., Gallagher, S. 1998. Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology. *En: Anderson, D. M., Cembella, A., Hallegraeff, G. M. [Eds.] Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, New York, pp. 649-652.

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

Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P., Poletti, R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* 34:923-935.

Draisci, R., Lucentini, L., Mascioni, A. 2000. Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology and analysis. *En: Botana, L. M. [Ed.] Seafood toxicity: mode of action, pharmacology. and physiology of phycotoxins*. Marcel Dekker, New York, pp. 289-324.

EFSA 2008a. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids. *The EFSA Journal* 723:1-52.

EFSA 2008b. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal* 589:1-62.



EFSA 2009a. 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* 1019:1-76.

EFSA 2009b. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – pectenotoxin group. *The EFSA Journal* 1109:1-47.

EFSA 2009c. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *The EFSA Journal* 1306:1-23.

Eiki, K., Satake, M., Koike, K., Ogata, T., Mitsuya, T., Oshima, Y. 2005. Confirmation of yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Mutsu Bay. *Fisheries Science* 71:633-638.

European Commission 2004. Regulation N° 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004, laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities* L 222/83:45.

Evans, K. M., Bates, S. S., Medlin, L. K., Hayes, P. K. 2004. Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40:911-920.

Evitt, W. R. 1985. Sporopollenin dinoflagellate cysts: their morphology and interpretation. *American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation* 333 p.

Fernández, M. L. 2007. Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos. *Tesis Doctoral. Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela*:348.

Fernández, M. L., Míguez, A., Martínez, A., Moroño, A., Arévalo, F., Pazos, Y., Salgado, C., Correa, J., Blanco, J., González-Gil, S., Reguera, B. 2003. First report of pectenotoxin-2 in phytoplankton net-hauls and mussels from the Galician Rías Baixas (NW Spain) during proliferations of *Dinophysis acuta* and *Dinophysis caudata*. *En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J., Beiras, R. [Eds.] Molluscan Shellfish Safety*. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 75-83.



Fernández, M. L., Reguera, B., González-Gil, S., Míguez, A. 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain). *Toxicon* 48:477-490.

Fernández Puente, P., Fidalgo Sáez, M. J., Hamilton, B., Furey, A., James, K. J. 2004. Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 44:919-926.

Ferrario, M. E., Licea, S., Balestrini, C. F., Ferreyra, G. 2004. Species of (*Pseudo-nitzschia*) in the Drake Passage (54°-61°S to 46°-64°W). *En*: Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C. R., Vargo, G. A. [Eds.] *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Florida, pp. 434-436.

Ferrés, M. 2008. Estudi del progrés d'una marea roja de *Protoceratium reticulatum* a la badia de Chipana (Xile) a través d'un cicle intensiu: Efectes del fenomen de El Niño. Memoria del Projecte Fi de Carrera de Ciències Ambientals. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. 64pp.

Flanagan, A. F., Callanan, K. R., Donlon, J., Palmer, R., Forde, A., Kane, M. 2001. A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins. *Toxicon* 39:1021-1027.

Flanagan, A. F., Kane, M., Donlon, J., Palmer, R. 1999. Azaspiracid, detection of a newly discovered phycotoxin in vitro. *Journal of Shellfish Research* 18:716.

Franco, J. M., Fernández-Vila, P. 1993. Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography, with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35:613-620.

Fritz, L., Quilliam, M. A., Wright, J. L. C., Beale, A. M., Work, T. M. 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *Journal of Phycology* 2:439-442.

Fukuyo, Y., Takano, H., Chihara, M., Matsuoka, K. 1990. *Red tides organisms in Japan: An illustrated taxonomic guide*. Uchida Rokakuho, Tokio, Japan, 430.

Furey, A., James, K. J., Sherlock, R. 1997. First report of paralytic shellfish poisoning toxins in the Republic of Ireland. *En*: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez,



M. L., Wyatt, T. [Eds.] *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 70-71.

Gárate-Lizarraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Erler, K., Muñetón-Gómez, M. S., Luckas, B., Tripp-Quezada, A. 2004. Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam, *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae), in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Rev. Biol. Trop.* 52:133-140.

Gárate-Lizarraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., López-Cortés, D. J., Hernández-Sandoval, F., Releer, K., Luckas, B. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles in net phytoplankton samples from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 52:800-815.

Garate-Lizarraga, I., Bustillos-Guzman, J. J., Morquecho, L., Band-Schmidt, C. J., Alonso-Rodriguez, R., Erler, K., Luckas, B., Reyes-Salinas, A., Gongora-Gonzalez, D. T. 2005. Comparative Paralytic Shellfish Toxin Profiles in the Strains of *Gymnodinium Catenatum* Graham From the Gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 50:211-217.

García, C., Schonstedt, V., Santelices, J. P., Lagos, N. 2006. High amount of dinophysistoxin-3 in *Mytilus chilensis* collected in Seno de Reloncaví, Chile, during massive human intoxication associated with outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Toxicol. Sci* 31:305–314.

Garrison, D. L., Conrad, S. M., Eilers, P. P., Waldron, E. M. 1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol* 28:604-607.

Gentien, P., Arzul, G. 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 70:571-581.

Gerssen, A., Mulder, P. P. J., McElhinney, M., Boer, J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions *Journal of Chromatography A* 9:1421 - 1430.

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



Gómez-Aguirre, S., Licea, S., Gómez, S. 2004. Proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) y otras especies del microplancton en la Bahía de Mazatlán, México. *Revista Biología Tropical* 52:69-76.

González, A. V., Rodríguez-Velasco, M. L., Ben-Gigirey, B., Botana, L. M. 2006. First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48:1068-1074.

Goto, H., Igarashi, T., Watai, M., Yasumoto, T., Gomez, O. V., Valdivia, G. L., Noren, E., Gisselson, L. A., Graneli, E. 2000. Worldwide occurrence of pectenotoxins and yessotoxins in shellfish and phytoplankton. *En: Hallegraeff, G. M. [Ed.] Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*. Hobart, Tasmania, Australia, pp. 20.

Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *En: Smith, W. L., Chanley, M. H. [Eds.] Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Publishing Corporation.

Guzmán, L., Campodónico, I. 1975. Marea roja en la región de Magallanes. *An. Inst. Pat., Ser. Monogr* 9:1- 44.

Guzmán, L., Campodónico, I. 1978. Mareas Rojas en Chile. *Interciencia* 3:144 - 151.

Guzmán, L., Pacheco, H., Pizarro, G., Alarcón, C. 2002. *Alexandrium catenella* y veneno paralizante de los mariscos en Chile. *En: Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B. [Eds.] Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía España, pp. 237-256.

Hall, S., Gessner, B., Poli, M., Eilers, P., Conrad, S., Waldron, E., Brewer, V. 1996. An outbreak of paralytic shellfish poisoning in Kodiak, Alaska: comparison of toxin detection methods. *Toxicon* 34:338-338.

Hallegraeff, G. M., Hara, Y. 2003. Taxonomy of harmful marine Raphidophytes. *En: Hallegraeff, G. M., Cembella, A. D., Anderson, D. M. [Eds.] Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 511-522.

Hamano, Y., Kinoshita, Y., Yasumoto, T. 1986. Enteropathogenicity of Diarrhetic Shellfish Toxins in intestinal models. *J. Food Hyg. Soc. Japan*. 27:375-379.

Hansen, G., Daugbjerg, N., Franco, J. M. 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with



some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2:317-335.

Hansen, G., Moestrup, O., Roberts, K. R. 1997. Light and electron microscopical observations on *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae). *Archiv Fur Protistenkunde* 147:381-391.

Hasle, G. R. 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*. *Skr. Norske Vidensk-Akad. I. Mat.-Nat. Kl. Ny Series* 18:1-45.

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

Hasle, G. R. 1978. The inverted microscope method. *En: Sournia, A. [Ed.] Phytoplankton manual.* UNESCO, Paris, pp. 88-96.

Hasle, G. R. 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseries* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology, and distribution. *Journal of Phycology* 31:428-435.

Hasle, G. R. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1:137-146.

Hasle, G. R., Syvertsen, E. E. 1997. Marine Diatoms. *En: Tomas, C. R. [Ed.] Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates.* Academic Press San Diego, California, pp. 5-385.

Holmes, M. J., Lewis, R. J., Jones, A., Wong Hoy, A. W. 1995. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Nat. Toxins* 3:355-362.

Honsell, G., Poletti, R., Pompei, M., Sidari, L., Milandri, A., casadei, C., Viviani, R. 1996. *Alexandrium minutum* Halim and PSP contamination in the northern Adriatic sea (Mediterranean Sea). *En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and Toxic Algal Blooms.* Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 77-80.

Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M., Wright, J. L. C. 1995a. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* 20:2159-2161.



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

Hu, T. M., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Wright, J. L. C. 2001. Characterization of spirolides A, C, and 13-Desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of Natural Products* 64:308-312.

Ines, S., Asmas, S.H. 2006. First detection of toxic *Pseudonitzschia calliantha* in Bizerte Lagoon, Tunisia, *Harmful Algae News* 30:8-9.

Ito, E., Frederick, M. O., Koftis, T. V., Tang, W. J., Petrovic, G., Ling, T. T., Nicolaou, K. C. 2006. Structure toxicity relationships of synthetic azaspiracid-1 and analogs in mice. *Harmful Algae* 5:586-591.

Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Kurita, N., McMahon, T., James, K., Yasumoto, T. 2000. Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon* 38:917-930.

Ito, E., Terao, K., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. 1998. Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels. *En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L., Wyatt, T. [Eds.] Harmful Algae*. IOC of UNESCO and Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain, pp. 588-589.

Jaime, E., Gerds, G., Luckas, B. 2007. In Vitro Transformation of Psp Toxins by Different Shellfish Tissues. *Harmful Algae* 6:308-316.

James, K. J., Bishop, A., Draisci, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M., Yasumoto, T. 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *Journal of Chromatography, A* 844:53-65.

James, K. J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. 2003a. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41:145-151.



James, K. J., Sierra, M. D., Lehane, M., Magdalena, A. B., Furey, A. 2003b. Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 41:277-283.

Kat, M. 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. *En: Taylor, D. L., Seliger, H. H. [Eds.] Toxic dinoflagellates blooms*. Elsevier/North-Holland, New York, pp. 215-220.

Kat, M. 1984. "Red" oysters (*Ostrea edulis*) caused by *Mesodinium rubrum* in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 38:375-377.

Kodama, M., Ogata, T., Sato, S., Sakamoto, S. 1990. Possible association of marine bacteria with paralytic shellfish toxicity of bivalves. *Marine Ecology Progress Series* 6:203-206.

Korringa, P., Roskam, R. T. 1961. An unusual case of mussel poisoning. *International Council of the Exploration of the Sea (ICES). Council meeting* 49:2

Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C. V., Huyen, N. T. M., Hoi, N. C., Fukuyo, Y., Kodama, M. 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *Journal of Phycology* 36:1057-1060.

Krock, B., Alpermann, T., Tillmann, U., Pitcher, G., Cembella, A. 2008. Yessotoxin profiles of the marine dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. *En: Moestrup, O. [Ed.] Proceedings of the 12th international conference of harmful algae*. ISSHA and IOC of Unesco, Copenhagen, pp. 303-305.

Krock, B., Seguel, C. G., Cembella, A. D. 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6:734-744.

Krock, B., Seguel, C. G., Valderrama, K., Tillmann, U. 2009a. Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, north Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 54:364-367.

Krock, B., Tillmann, U., Cembella, A. 2009b. Isolation and toxin composition of the azaspiracid-producing dinoflagellate *Azadinium spinosum* from the Danish west coast. *En: Lassus, P. [Ed.] Molluscan Shellfish Safety*. Ifremer, Nantes, pp. 74.



Krock, B., Tillmann, U., John, U., Cembella, A. 2009c. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8:254-263.

Lagos, N., Compagnon, D., Seguel, M., Oshima, Y. 1996. Paralytic shellfish toxin composition: A quantitative analysis in Chilean mussels and dinoflagellate. *En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and Toxic Algal Blooms.* Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 121-124.

Lebour, M. V. 1930. *The plankton diatoms of Northern Seas.* Ray Society, London, 244.

Lee, J. S. 1995. Isolation and some properties of bitter taste compounds from cultured oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Korean Fish. Soc* 28:98-104.

Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1:147-152.

Lembeye, G. 1994. *Dinophysis acuta* y brotes de intoxicaciones diarreicas en Chile. *En: UNESCO, C.-. [Ed.].* pp. 30-33.

Lembeye, G. 1998. Seguimiento de la toxicidad en recursos pesqueros de importancia comercial en la X y XI Región. *Informe final proyecto FIP 97-49:89.*

Lembeye, G. 2004. Distribución de quistes de *Alexandrium catenella* y otros dinoflagelados en sedimentos de la zona Sur- Austral de Chile. *Cienc. Tecnol. Mar* 27:21-31.

Lembeye, G., Campodónico, I. 1984. First record bloom of the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. in South-Central Chile. *Botanica Marina* 27.

Lembeye, G., Yasumoto, T., Zhao, J. Y., Fernández, R. 2003. DSP outbreak in Chilean fiords. *En: Smayda, T. J., Shimizu, Y. [Eds.] Toxic phytoplankton blooms in the sea.* Elsevier, Amsterdam, pp. 525-529.

Licea, S., Gómez-Aguirre, S., Moreno, J. L. 2000. The occurrence of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Mexican coastal waters, 1979-2000. *En: Athens, I. a. U. o. [Ed.] Proceedings of the 16th International Diatom Symposium.* Athens, Greece, pp. 78



Lindahl, O. 1986. A dividable hose for phytoplankton sampling. *ICES C.M. /L:26*, 1986.

Long, R. R., Sargent, J. C., Hammer, K. 1990. Paralytic Shellfish Poisoning: A case report and serial electrophysiological observations. *Neurology* 40:1310-1311.

López-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriarty, M., O'Driscoll, D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K. J. 2010. First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55:692-701.

López-Rivera, A., Pinto, M., Insinilla, A., Suarez-Isla, B. A., Uribe, E., Álvarez, G., Lehane, M., Furey, A., James, K. J. 2009. The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: The tunicate *Pyura chilensis* (piure). *Toxicon* 54:754-762.

Lundholm, N., Daugbjerg, N., Moestrup, O. 2002a. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology* 37:115-134.

Lundholm, N., Hasle, G. R., Fryxell, G. A., Hargraves, P. E. 2002b. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *Pseudo-nitzschia linea*. *Phycologia* 41:480-497.

Lundholm, N., Moestrup, O., Hasle, G. R., HoefEmden, K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* / *cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology* 39:797-813.

Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, O. 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia*. pp. 475-478.

Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, O. 1997. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2.: Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36:381-388.

Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4:75-85.



MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon* 40:1321-1330.

MacKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J. E., Mountfort, D., White, D. 1998. Dinoflagellate blooms associated DSP toxicity in shellfish in New Zealand. *En: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L., Wyatt, T. [Eds.] Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 74-77.

MacKinnon, S. L., Cembella, A. D., Quilliam, M. A., LeBlanc, P., Lewis, N. I., Hardstaff, W. R., Burton, I. W., Walter, J. A. 2004. The characterization of two new spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *En: Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C. R., Vargo, G. A. [Eds.] Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg Beach, FL, USA, pp. 186-188.

Maranda, L., Wang, R., Musauda, K., Shimizu, Y. 1990. Investigation of the source of domoic acid in mussels. *En: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M. [Eds.] Toxic marine phytoplankton*. Elsevier Sci. Publ. Co., Inc, New York., pp. 300-304.

Martin, J. L., Haya, K., Burrige, L. E., Wildish, D. J. 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima* - a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67:177-182.

Mata, L., Abarca, G., Marranghello, L., Viquez, R. 1990. Intoxicación parálitica por mariscos (IPM) por *Spondylus calcifer* contaminado con *Pyrodinium bahamense*, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 38:129-136.

Matsuoka, K., Fukuyo, Y. 2000. Guía técnica para el estudio de quistes de dinoflagelados actuales *COI-IEO, WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC*:30.

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

Meléndez, A. 2006. Marea Roja en el Occidente de Nicaragua, Noviembre 2005. *Boletín Epidemiológico*. Ministerio de Salud Nicaragua.



Miles, C. O., Aasen, J., Dahl, E., Samdal, I., Aune, T., L.R., B., Olseng, C. D., Edvarsen, B., Naustoll, L. J. 2002. Yessotoxin in Norwegian blue mussels caused by *Protoceratium reticulatum*. En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J. L., Beiras, R. [Eds.] *Molluscan Shellfish Safety*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, pp. 99.

Miles, C. O., Wilkins, A. L., Hawkes, A. D., Jensen, D. J., Selwood, A. I., Beuzenberg, V., MacKenzie, A. L., Cooney, J. M., Holland, P. T. 2006. Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand. *Toxicon* 48:152-159.

Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, R., Dines, M. H., Hawkes, A. D., Briggs, L. R., Sandvik, M., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Holland, P. T., Quilliam, M. A., Mackenzie, A. L., Beuzenberg, V., Towers, N. R. 2004a. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43:1-9.

Miles, C. O., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M. A., Naustvoll, L. J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D. J., Cooney, J. M. 2004b. A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chemical Research in Toxicology* 17:1423-1433.

Miller, P. E., Scholin, C. A. 1996. Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes. *Journal of Phycology* 32:646-655.

Moestrup, Ø., Codd, G. A., Elbrächter, M., Faust, M. A., Fraga, S., Fukuyo, Y., Cronberg, G., Halim, Y. E. 2008. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Available online at <http://www.marinespecies.org/HAB:Accessed> on 2010-2004-2001.

Moestrup, O., Thomsen, H. A. 2003. Taxonomy of toxic Haptophytes (Prymnesiophytes). En: Hallegraeff, G. M., Cembella, A. D., Anderson, D. M. [Eds.] *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 433-463.

Molinet, C., Lafon, A., Lembeye, G., Moreno, C. A. 2003. Spatial and temporal distribution patterns of blooms of *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech 1985, on inland seas of northwest Patagonia, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76:681-698.



Muñoz, P., Avaria, S., Sievers, H., Prado, R. 1992. Presencia de dinoflagelados tóxicos del género *Dinophysis* en el seno Aysén, Chile. *Revista de Biología Marina* 27:187-212.

Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48:69-72.

Murata, M., Masanori, K., Lee, J. S., Yasumoto, T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Tetrahedron Letters* 28:5869-5872.

Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48:549-552.

Murata, Y., Usata, N., Yokohama, M., Kuwahara, R., Kaneniwa, M., Oohara, I. 2001. Determination of a novel bitter amino acid, pulcherrimine, in the gonad of the green sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Fisheries Science* 67.

Nascimento, S. M., Purdie, D. A., Lilly, E. L., Larsen, J., Morris, S. 2005. Toxin profile, pigment composition, and large subunit rDNA phylogenetic analysis of an *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) strain isolated from the Fleet Lagoon, United Kingdom. *Journal of Phycology* 41:343-353.

Navarro, J. M., Muñoz, M. G., Contreras, A. M. 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5:762-769.

Negri, A., Llewellyn, L., Doyle, J., Webster, N., Frampton, D., Blackburn, S. 2003a. Paralytic shellfish toxins are restricted to few species among Australia's taxonomic diversity of cultured microalgae. *Journal of Phycology* 39:663-667.

Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J., Willis, R. 2003b. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology* 16:1029-1033.

Neilan, B. A., Pearson, L. A., Moffit, M. C., Mihali, K. T., Kaebernick, M., Kellmann, R., Pomati, F. 2008. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. *En:*



Kenneth, H. H. [Ed.] *Cyanobacterial harmful algal blooms. State of the science and needs research*. Springer, pp. 950.

Nishitani, L., Chew, K. 1988. PSP toxins in the pacific coast states: monitoring programs and effects on bivalve industries. *Journal of Shellfish Research* 7:653-669.

Ofuji, M., Satake, M., McMahon, T., Silke, J., James, K. J., Naoki, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1999. Two analogs of azaspiracids isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Natural Toxins* 7:99-102.

Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T., Carmichael, W. W. 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya Wollei*. *Natural Toxins* 5.

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

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

Oshima, Y. 1993. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. *En: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. [Eds.] Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Science Publishers, pp. 475-480.

Oshima, Y. 1995. Post-column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. *En: Hallegraef, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. [Eds.] Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 81-94.

Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, Y. 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. *En: Granelli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M. [Ed.] Toxic marine phytoplankton*. Elsevier Science Publishing, New York, pp. 391-396.



Park, M. G., Kim, S., Kim, H. S., Myung, G., Kang, Y. G., Yih, W. 2006. First Successful Culture of the Marine Dinoflagellate *Dinophysis Acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology* 45:101-106.

Parry, G. D., Langdon, J. S., Huisman, J. M. 1989. Toxic effects of a bloom of the diatom *Rhizosolenia chunii* on shellfish in Port Phillip Bay, Southeastern Australia. *Marine Biology* 10 2:25-41.

Parsons, M. L., Scholin, C. A., Miller, P. E., Doucette, G. J., Powell, C. L., Fryxell, G. A., Dortch, Q., Soniat, T. M. 1999. *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: Molecular probe field trials, genetic variability, and domoic acid analyses. *Journal of Phycology* 35:1368-1378.

Paseiro, P., Cameán, A. N., Cepeda, A. 2009. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios de seguridad aplicables al contenido de ácido domoico en la vieira (*Pecten maximus*) para su recolección. *Revista del comité científico de la AESAN* 10:41-52.

Pavela-Vrancic, M., Mestrovic, V., Marasovic, I., Gillman, M., Furey, A., James, K. J. 2002. DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40:1601-1607.

Paz, B. 2007. Producción de YTX por cultivos de *Protoceratium reticulatum*: Variabilidad en el perfil de toxinas de diferentes cepas. *Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica e Alimentaria, Universidad de Vigo*:189.

Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Riobo, P., Franco, J. M., Fernández, J. J. 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: An overview. *Marine Drugs* 6:73-102.

Paz, B., Riobo, P., Ramilo, I., Franco, J. M. 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* 50:1-17.

Paz, B., Riobo, P., Souto, M. L., Gil, L. V., Norte, M., Fernández, J. J., Franco, J. M. 2006. Detection and identification of glycoyessotoxin A in a culture of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Toxicon* 48:611-619.

Percy, L., Lewis, J., Morris, S., Stone, D. M., Higman, W. 2002. The relationship between *Alexandrium* species in water and PSP toxins in shellfish from the Fal estuary, United Kingdom. *En: Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C. R.,*



Vargo, G. A. [Eds.] *Proceedings of the Xth International Conference on Harmful Algae*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, FL, pp. 229.

Perl, T. M., Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, J. C., Todd, E., Remis, R. S. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England J. Med.* 322:1775-1780.

Powell, C. L., Doucette, G. J. 1999. A receptor binding assay for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins: recent advances and applications. *Natural Toxins* 7:393-400.

Prakash, A., Medcof, J. C., Tennant, A. D. 1971. Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Fish. Res. Board Can. Bull.*:177-187.

Price, D. W., Kizer, K. W., Hansgen, K. H. 1991. California's paralytic shellfish poisoning prevention program, 1927-89. *J. Shellfish Res* 10:119-145.

Priisholm, K., Moestrup, O., Lundholm, N. 2002. Taxonomic notes on the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the Andaman Sea near the island of Phuket, Thailand, with a description of *Pseudo-nitzschia micropora* sp nov. *Diatom Research* 17:153-175.

Quayle, D. B. 1969. Paralytic shellfish poisoning in British Columbia. *Bull. Fish Res. Board Can* 168:1-69.

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Flo, E., Fernandez-Tejedor, M., Diogène, J., Camp, J. 2008a. Bloom dynamics of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in two coastal bays (NW Mediterranean Sea). *Scientia Marina* 72.

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

Quilliam, M. A. 2003. Chemical method for lipophilic shellfish toxins. *En: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. [Eds.] Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 211-245.

Quilliam, M. A., Thompson, B. A., Scott, G. J., Siu, K. W. M. 1989. Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid Comm. Mass Spectrom* 3:145-150.



RaLonde, R. 1996. PSP: Paralytic Shellfish Poisoning: The Alaska problem. *En: RaLonde, R. [Ed.] Paralytic Shellfish Poisoning: The Alaska Problem. Alaska marine resources.* United States, pp. 12-15.

Ravn, H. 1995. Amnesic shellfish poisoning (ASP). *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Manuals and Guides.* 1:1-15.

Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M. A. 2008. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels *Mytilus edulis* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22:549-558.

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

Rhodes, L. L., Holland, P., Adamson, J. E., McNabb, P., Selwood, A. I. 2002. Production of a new isomer of domoic acid by New Zealand isolates of the diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *En: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J. L., Beiras, R. [Eds.] Proceeding of 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela-España.* Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela.

Rhodes, L. L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., Gladstone, M. 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax Spinifera*. *Harmful Algae* 5:148-155.

Rhodes, L. L., Scholin, C., Garthwaite, I., Haywood, A., Thomas, A. 1998. Domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species educed by whole cell DNA probe-based and imunochemical assays. *En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L., Wyatt, T. [Eds.] Harmful Algae.* Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, pp. 274-277.

Rhodes, L. L., White, D., Syhre, M., Atkinson, M. 1996. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. *En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and toxic algal blooms.* Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris., pp. 155-158.

Riccardi, M., Guerrini, F., Roncarati, F., Milandri, A., Cangini, M., Pigozzi, S., Riccardi, E., Ceredi, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino,



M., Tartaglione, L., Pistocchi, R. 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic Sea: toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae* 8:279-290.

Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M. 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. *En: Hallegraeff, G. M., Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Lewis, R. J. [Eds.] Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 383-386.

Rivera, P. 1985. Las especies del género *Nitzschia* Hassall, sección *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) en las aguas marinas chilenas. *Gayana Bot* 42:9-38.

Rodríguez, D. C., Etzel, R. A., Hall, S., de Porras, E., Velasquez, O. H., Tauxe, R. V., Kilbourne, E. M., Blake, P. A. 1990. Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 42:267-271.

Rodríguez, L. 2004. Observaciones sobre efectos de El Niño 1997-1998 en el fitoplancton de bahía Antofagasta y durante un fenómeno de surgencia en bahía Mejillones del Sur, Antofagasta, Chile. *En: Avaria, S., Carrasco, J., Ruttlund, J., Yáñez, E. [Eds.] El Niño-La Niña 1997-2000. Sus Efectos en Chile*. CONA, Valparaíso, Chile, pp. 97-118.

Samdal, I. A., Naustvoll, L. J., Olseng, C. D., Briggs, L. R., Miles, C. O. 2004. Use of ELISA to identify *Protoceratium reticulatum* as a source of yessotoxin in Norway. *Toxicon* 44:75-82.

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

Sasaki, K., Satake, M., Yasumoto, T. 1997. Identification of the absolute configuration of pectenotoxin-6, a polyether macrolide compound, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, phenylglycine methyl ester. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61:1783-1785.

Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsy, S., Oshima, Y. 1999. Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Natural Toxins* 7:147-150.



Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T. 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5:164-167.

Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120:9967-9968.

Satake, M., Terasawa, K., Kadowaki, Y., Yasumoto, T. 1996. Relative configuration of YTX and isolation of two new analogs from toxic scallops. *Tetraedron Letters* 37:5955-5958.

Servicio Nacional de Pesca 2007. Anuario estadístico de pesca 2007. *Servicio Nacional de Pesca, Valparaíso*. 15 de junio de 2009. <<http://www.sernapesca.cl/>>.

Servicio Nacional de Pesca 2009. "Servicio Nacional de Pesca". Moluscos bivalvos, Listado de áreas de extracción. 31 de mayo de 2009. <<http://www.sernapesca.cl/>>.

Servicio Nacional de Pesca 2010. "Servicio Nacional de Pesca". Plán de contingencia para biotoxinas marinas y otras emergencias de contaminación. Norma Técnica N° 3, Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos. 3 de septiembre de 2010. <<http://www.sernapesca.cl/>>.

Sierra-Beltrán, A., Morquecho-Escamilla, M. L., Lechuga-Deveze, C., Ochoa, J. L. 1996. PSP monitoring program at Baja California Sur, Mexico. *En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. [Eds.] Harmful and toxic algal blooms*. IOC-UNESCO, Paris, pp. 105-108.

Sierra-Beltran, A. P., Cortés-Altamirano, R., Gallo-Reynoso, J. P., Licea-Duran, S., Égido-Villarreal, J. 2005. Is *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* toxin the principal cause of sardines, dolphins, sea lions and pelican mortality in 2004 in Mexico? *Harmful Algae News* 29:6-8.

Silva, E. S. 1990. Intracellular bacteria: the origin of the dinoflagellates toxicity. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol.* 10:124-128.

Sleno, L., Windust, A., Volmer, D. A. 2004. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry - Part I. Fragmentation pathways of 13-desmethyl spirolide C by collision-induced dissociation and infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 378:969-976.



Smith, J. C., Odense, P., Angus, R., Bates, S. S., Bird, C. J., Cormier, P., de Freitas, A. S. W., Léger, C., O'Neil, D., Pauley, K., Worms, J. 1990. Variation in domoic acid levels in *Nitzschia* species: implications for monitoring programs. *Bull. Aquacult. Assoc. Can* 90:27-31.

Sommer, H., Meyer, K. F. 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Arch Path* 24:569-598.

Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Truby, E. W., Roberts, B. S. 1998. First report of *Gymnodinium pulchellum* (Dinophyceae) in North America and associated fish kills in the Indian River, Florida. *Journal of Phycology* 34:431-437.

Stein, J. R. 1973. Culture Methods and Growth Measurements, Isolation and Purification (Section I). *Handbook of Phycological Methods*. University Press, Cambridge.

Stewart, G. R., Zorumski, C. F., Price, M. T., Olney, J. W. 1990. Domoic acid: a dementia-inducing excitotoxic food poison with kainic acid receptor specificity. *Exp. Neurology*. pp. 127-138.

Stobo, L. A., Lacaze, J., Scott, A. C., Gallacher, S., Smith, E. A., Quilliam, M. A. 2005. Liquid chromatography with mass spectrometry - detection of lipophilic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* 88:1371-1382.

Stobo, L. A., Lewis, J., Quilliam, M. A., Hardstaff, W. R., Gallacher, S., Webster, L., Smith, E., McKenzie, M. 2003. Detection of yessotoxin in UK and Canadian isolates of phytoplankton and optimization and validation of LC-MS methods. *En: Bates, S. S. [Ed.] Proceedings of the Eighth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*. Gulf Fisheries Centre, Moncton, New Brunswick, Canada, pp. 8-14.

Suárez-Isla, B. A., López-Rivera, A., Hernández, C., Clément, A., Guzmán, L. 2002. Impacto económico de las floraciones de microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de veneno amnésico de los mariscos. *En: Sar, E., Ferrario, M. E., Reguera, B. [Eds.] Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, pp. 257-268.

Suzuki, T., Beuzenberg, V., Mackenzie, L., Quilliam, M. A. 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry of spiroketal stereoisomers of pectenotoxins and the analysis of novel pectenotoxin isomers in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Journal of Chromatography A* 992:141-150.



Suzuki, T., Horie, Y., Koike, K., Satake, M., Oshima, Y., Iwataki, M., Yoshimatsu, S. 2007. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceratium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1142:172-177.

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

Suzuki, T., Walter, J. A., Leblanc, P., Mackinnon, S., Miles, C. O., Wilkins, A. L., Munday, R., Beuzenberg, V., Mackenzie, A. L., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Quilliam, M. A. 2006. Identification of pectenotoxin-11 as 34s-hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chemical Research in Toxicology* 19:310-318.

Takahashi, H., Kusumi, T., Kan, Y., Satake, M., Yasumoto, T. 1996. Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl)acetic Acid. *Tetrahedron Letters* 37:7087-7090.

Takemoto, T., Daigo, K. 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chem. Pharmaceutical Bull.* pp. 578-580.

Taleb, H., Vale, P., Amanhir, R., Benhadouch, A., Sagou, R., Chafik, A. 2006. First detection of azaspiracids in mussels in North West Africa. *Journal of Shellfish Research* 25:1067-1070.

Teitelbaum, J. S., Zatorre, R. J., Carpenter, S., Gendron, D., Evans, A. C., Gjedde, A., Cashman, N. R. 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *New England J. Med.* pp. 1781-1787.

Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto, T. 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24:1141-1151.

Tibbetts, J. 1998. Toxic tides. *Environmental Health Perspectives* 106:326-331.



Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. 2009. *Azadinium spinosum* Elbrächter et Tillmann gen. et sp. nov. *European Journal of Phycology* 44:63-79.

Todd, E. 1990. Amnesic shellfish poisoning - a new seafood toxin syndrome. *En: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D. M. [Eds.] Toxic marine phytoplankton*. Elsevier Sci. Publ. Co., Inc., New York., pp. 504-508.

Todd, E. C. D., Kuiper-Goodman, T., Watson-Wright, W., Gilgan, M. W., Stephen, S., Marr, J., Pleasance, S., Quilliam, M. A., Klix, H., Luu, H. A., Holmes, C. F. B. 1993. Recent illnesses from seafood toxins in Canada. *En: Smayda, T. J., Shimizu, Y. [Eds.] Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam., pp. p 335-340.

Touzet, N., Franco, J. M., Raine, R. 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7:782-797.

Toyofuku, H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin* 52:1735-1745.

Trainer, V., Adams, N., Bill, B., Anulacion, B., Wekell, J. 1998. Concentration and dispersal of a *Pseudo-nitzschia* bloom in Penn Cove, Washington, USA. *Natural Toxins* 6:113-125.

Trainer, V. L. 2002. Harmful Algal Blooms on the U.S. West Coast. *En: Taylor, F. J., Trainer, V. L. [Eds.] Harmful algal blooms in the PICES region of the North Pacific. PICES Scientific Report*. pp. 89-118.

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

Twiner, M., Rehmann, N., Hess, P., Doucette, G. J. 2008. Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Marine Drugs* 6:39-72.

Twiner, M. J., Hess, P., Dechraoui, M. Y. B., McMahon, T., Samons, M. S., Satake, M., Yasumoto, T., Ramsdell, J. S., Doucette, G. J. 2005. Cytotoxic and cytoskeletal affects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines. *Toxicon* 45:891-900.



Ulrike, C. 2002. *Living with Harmful Algae Blooms: HAB managements for aquaculture farms*. Diplomarbeit im Diplom- Studiengang. Marine Umweltwissenschaften, University of Oldenburg, 66 pp.

Uribe, E. 2003. Deleterious effect of diatoms of the genus *Rhizosolenia* in *Argopecten purpuratus* in the bays of northern Chile. *En: Blake, N., Sweat, D., Miller-Tipton, B. [Eds.] 14th International Pectinid Workshop*. St. Petersburg, FL pp. 70.

Uribe, E. 2009. Noxious effects of *Rhizosolenia imbricata* blooms on aquaculture of *Argopecten purpuratus* in three northern Chilean bays. *17th International Pectinid Workshop*. Santiago de Compostela, España, pp. 120-121.

Uribe, E., López-Rivera, A., Alvarez, G. 2007. Determinación toxicocinética de intoxicación y detoxificación del ácido domoico (Veneno Amnésico de los Mariscos) producida por microalgas del genero *Pseudo-nitzschia* spp. en el recurso ostión. *En: Innovación, F. d. D. a. I. [Ed.]. Comité Innova- Chile*, pp. 256 p.

Uribe, J. C., García, C., Rivas, M., Lagos, N. 2001. First report of diarrhetic shellfish toxins in magellanic fjords, southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 20:69-74.

Uribe, P., Espejo, R. T. 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:659-662.

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung ver quantitativen Phytoplankton Methodic. *Mitt. Int. Verein. Limnol* 9:1-38.

Valdés, I., Vargas, G., Sifeddine, A., Ortlieb, L., Guiñez, M. 2005. Distribution and enrichment evaluation of heavy metals in Mejillones bay (23°S), northern Chile: geochemical and statistical approach *Marine Pollution Bulletin* 50:1558-1568.

Vale, P., Rangel, I., Silva, B., Coelho, P., Vilar, A. 2009. Atypical profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Luanda and Mussulo bays, Angola. *Toxicon* 53:176-183.

Vale, P., Sampayo, M. A. 2002a. Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal. *Toxicon* 40.



Vale, P., Sampayo, M. A. d. M. 2002b. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro Lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40:989-996.

Villac, M. C., Roelke, D. L., Chavez, F. P., Cifuentes, L. A., Fryxell, G. A. 1993. *Pseudonitzschia australis* and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production. *Journal of Shellfish Research* 12:457-465.

Villanueva, F. 2005. *Biogeografía y análisis retrospectivo de Alexandrium catenella (dinoflagellata) en la zona Austral de Chile*. Biólogo Marino, Universidad Austral de Chile, 81 pp.

Villarroel, O. 2005. Informe programa de vigilancia de la marea roja en Chile MINSAL - ISP - SEREMIS. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile.9.

Villarroel, O. 2008. Informe programa de vigilancia de la marea roja en Chile MINSAL - ISP - SEREMIS. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile.15.

Villarroel, O., Muñoz, P. 1991. Episodios de marea roja y monitoreo de las toxinas parálíticas y diarreicas en Chile. *Alimentos* 5:5-8.

Walker, T. 2009. Fisheries Victoria. Victorian marine biotoxin management plan. *Third Edition*. Fisheries Victoria pp. 87.

Wall, D., Dale, B. 1967. The resting cysts of modern marine dinoflagellates and their paleontological significance. *Review of Palaeobotany and Palynology*:349-354.

Wilkins, A. L., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F., Miles, C. O. 2006. Identification of fatty acid esters of pectenotoxin-2 seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54:5672-5678.

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



Yasumoto, T., Igarashi, T., Satake, M. 2001. Chemistry of phycotoxins-structural elucidation. *En: Ponsen & Looyen De Koe, W. J., Samson, R. A., Van Egmond, H. P., Gilbert, J., Sabino, M. [Eds.] Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium.* Wageningen, the Netherlands, Guarujá, Brazil, pp. 465-474.

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

Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J. S., Torigoe, K. 1989. *Polyeter toxins produced by dinoflagellates.*, Amsterdam, 375-382.

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

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46:1405-1411.

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

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

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

Yasumoto, Y., Seino, N., Murakami, Y., Murata, M. 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biological Bulletin* 172:128-131.

Zhao, J. Y., Lembeye, G., Cenci, B., Wall, B., Yasumoto, T. 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. *En: Smayda, T. J., Shimizu, Y. [Eds.] Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 587-592.



ANEXOS



Anexo I. Plan detallado de asignación de profesional (total de horas asignadas)

Nombre	Coordinación y planificación	Medición de variaciones cuantitativas temporales de los venenos VPM, VAM y VDM en especies transvectoras	Identificación de especie fitoplanctónicas productoras de FAN	Determinación de géneros o especies fitoplanctónicas que pueden ser consideradas plagas	Levantar y analizar información sobre variables oceanográficas y meteorológicas asociadas a los eventos FANs	Evaluar el impacto de los eventos tóxicos y nocivos, en las actividades productivas y económicas	Informes	Total
Eduardo Uribe	16		72	72	80	51	17	308
Gonzalo Álvarez	15	173		139			23	350
Sergio Rosales	2				156		10	168
Pamela Ramírez	60					113	23	196
Carolina Castillo	10	50	83	80			15	238
Rosario Díaz	15		110	131	86		22	364
Técnico	15	414	430				23	882
TOTAL	133	637	695	422	322	164	133	2506