

## ***Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis* (BACILLARIOPHYCEAE) DEL PARQUE NACIONAL SISTEMA ARRECIFAL VERACRUZANO: CULTIVO Y RESPUESTA FISIOLÓGICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

Herrera-Pérez, Vanessa<sup>1</sup> & Lorena María Durán-Riveroll<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México. Avenida Guelatao 66, Iztapalapa, Ejército de Oriente, 09230 Ciudad de México, México. <sup>2</sup>CONACYT-Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C. Carretera Tijuana-Ensenada 3918, Fraccionamiento Zona Playitas, Ensenada, Baja California, México. \*Autor de correspondencia. email: lduran@conacyt.mx

**RESUMEN.** Los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) de especies productoras de toxinas pueden afectar a diversos organismos. Varias especies del género *Pseudo-nitzschia* producen ácido domoico (AD), una neurotoxina que ocasiona, entre otros síntomas, la pérdida de memoria anterógrada. Dentro del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV), se han reportado especies tóxicas de este género, y actualmente el sistema presenta un incremento en la concentración de compuestos inorgánicos, situación que podría favorecer la ocurrencia de FAN de organismos de este y otros géneros potencialmente nocivos. El objetivo del trabajo fue aislar células de *Pseudo-nitzschia*, establecer cultivos para su identificación morfotaxonomía y analizar si la concentración de nitratos en el medio de cultivo se relaciona directamente con el crecimiento y la producción de AD en condiciones de laboratorio. Para ello, se realizaron cultivos con diferentes concentraciones de nitratos (98.9 µM, 1,978.2 µM, y 3,956.4 µM) y se evaluó la producción de toxinas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La determinación morfotaxonomía se realizó con microfotografía electrónica de barrido y de transmisión. Se determinó que los aislados pertenecen al complejo *P. americana*, y se reporta como *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis*. A pesar de que los análisis de toxinas resultaron negativos, se comprobó que esta especie sobrevive en múltiples regímenes de nutrientes en un estado cambiante. Adicionalmente, en algunos cultivos se observó la coexistencia de *P. cf. brasiliensis* con diatomeas del género *Minidiscus*, las cuales, después de un tiempo, desplazaron por completo a *P. cf. brasiliensis*. Dentro del PNSAV se han registrado diversas especies del género *Pseudo-nitzschia*, sin embargo, este es el primer análisis autoecológico y toxicológico sobre el género en esta zona.

**Palabras clave:** Ácido domoico, complejo *P. americana*, nitratos, Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano

### ***Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis* (Bacillariophyceae) of the Veracruz Reef System National Park: culture and physiological response to different nitrate concentrations under laboratory conditions**

**ABSTRACT.** Harmful Algal Blooms (HABs) of toxin-producing species can affect diverse organisms. Several species of the genus *Pseudo-nitzschia* are domoic acid (DA) producers, which is a neurotoxin that causes, among other symptoms, the loss of anterograde memory. Within the Veracruz Reef System National Park (PNSAV), toxic species of *Pseudo-nitzschia* have been reported. At present, the system presents an increase in the concentration of inorganic compounds, a situation that could favor the occurrence of HABs from organisms of this and other potentially harmful genera. The objective of this work was to isolate *Pseudo-nitzschia* sp. cells, set up cultures for morphotaxonomic determination, and analyze whether the concentration of nitrates in the culture medium is directly related to survival and DA production of the diatom under laboratory conditions. Cultures with different nitrates concentrations (98.9 µM, 1,978.2 µM, y 3,956.4 µM) were carried out, and toxin production was evaluated by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Morphotaxonomic determination was performed by scanning and transmission electron micrography. The isolates belonged to the *P. americana* complex, and we reported them as *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis*. Although the toxin analyzes were negative for DA, it was proven that this species is capable of survival in multiple nutrient regimes in a changing state. Additionally, in some isolates, the coexistence of *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis* with diatoms of the genus *Minidiscus* was observed, and the diatom, after some time, completely displaced *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis*. Within the PNSAV, diverse species of the genus *Pseudo-nitzschia* have been documented; however, this is the first autecological and toxicological analysis of a species from this genus from the area.

**Keywords:** Domoic acid, *P. americana* complex, nitrate, Veracruz Reef System National Park

Herrera-Pérez, V. & L. Ma. Durán-Riveroll. 2019. *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliensis* (Bacillariophyceae) del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano: cultivo y respuesta fisiológica a diferentes concentraciones de nitratos en condiciones de laboratorio. *CICIMAR Oceanides*, 34(2): 1-16.

### **INTRODUCCIÓN**

Los Florecimientos Algales Nocivos (FAN), ocurren cuando hay un aumento súbito en la densidad celular de ciertas poblaciones de fitoplancton (Anderson *et al.*, 2001; Hernández-Orozco, 2006). Los FAN son fenómenos biológicos que ocurren de manera natural, aunque en las últimas décadas se ha observado un incremento en su frecuencia, duración, distribución geográfica, intensidad y toxicidad (Ha-

llegraeff, 1993). Aparentemente, existen diferentes factores que promueven el crecimiento de grupos específicos, entre los que se encuentran la variabilidad hidrodinámica natural, la disponibilidad de luz, el aumento en la concentración de nutrientes, los patrones fisiológicos y de comportamiento de los organismos y los procesos relacionados con el cambio climático (Dale *et al.*, 2006; Hallegraeff, 2010), sin embargo, se han asociado la eutroficación y los

eventos de surgencia como las principales causas para los cambios en la hidrodinámica del ecosistema y la expansión temporal y geográfica de los FAN.

Los daños que pueden causar estos eventos incluyen la producción de toxinas por algunos grupos fitoplanctónicos. Algunas especies incluso ejercen efecto tóxico a bajas densidades, sin llegar a formar florecimientos visibles (Anderson *et al.*, 2001; Hernández-Orozco, 2006; Herrera *et al.*, 2008). También afectan las actividades productivas como la pesca, la acuicultura e, indirectamente, al turismo (Hallegraeff, 1995; Mancera *et al.*, 2010). En el sureste asiático se han registrado pérdidas económicas que han alcanzado los 300,000 USD día<sup>-1</sup> (Llewellyn *et al.*, 2006), pero en nuestro país aún no existen estudios económicos sobre los impactos de estos fenómenos.

El ácido domoico (AD) es un aminoácido no proteico; presenta ocho isómeros (ácidos isodomoicos A, B, C, D, E, F, G y H) y el diastereoisómero C5'. Contiene tres grupos carboxilo, responsables de su alta polaridad. Su estructura química es similar a la del ácido kaínico, y ambos son altamente afines a los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolpropiónico (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA), por lo que el ácido domoico actúa como una análogo estructural del glutamato o ácido glutámico, el cual es el neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central, que controla cerca de un tercio de toda la actividad sináptica (Wright & Quilliam, 1995; Holland *et al.*, 2005; Trainer *et al.*, 2008). Este aminoácido es producido mayormente por especies del género *Pseudo-nitzschia*, y al ser consumido a través de la ingesta de bivalvos que previamente se alimentaron de estas diatomeas, causa diversos síntomas de intoxicación, que en el humano incluyen la pérdida de la memoria anterógrada (Alvarez-Falconi, 2009).

Las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* son marinas y de hábitat cosmopolita. Se han descrito 52 especies, de las cuales 26 (50%) se han reportado como productoras de AD (Guiry, 2019; Dao *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Ajani *et al.*, 2018; Bates *et al.*, 2018). Los FAN de este género han afectado a los humanos, y también ha causado la muerte de peces, aves y mamíferos marinos (Bates & Trainer, 2006; Costa *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2018).

Los principales caracteres diagnósticos para la identificación de las especies de este género están establecidos en la morfología detallada o ultraestructura de la frústula y en las medidas morfométricas que solo son distinguibles a través de microscopía electrónica (Teng *et al.*, 2013). De cualquier manera, la determinación inequívoca de algunas especies es un desafío, particularmente con las especies crípticas y pseudocrípticas, que son muy comunes dentro de este género (Orsini *et al.*, 2004; Lundholm *et al.*, 2006; Amato *et al.*, 2007; Quijano-Scheggia *et*

*al.*, 2009), por lo cual se distinguen complejos (Teng *et al.*, 2013). El complejo *P. americana* incluye tres especies pseudocrípticas: *P. lineata*, *P. americana* y *P. brasiliana* (Lundholm *et al.*, 2002a).

El Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (PNSAV) se localiza en el litoral del estado de Veracruz de Ignacio de la Llave; es el primer Parque Marino, decretado el 24 de agosto de 1992. Este Parque incluye 28 formaciones arrecifales de tipo plataforma, dentro de las cuales se ubican dos zonas núcleo: "Blanca" y "Santiaguillo" (Diario Oficial de la Federación, 1992). El PNSAV es un área natural protegida y se ha denominado como uno de los Sitios Ramsar de México (Sitios de Humedales de Importancia Internacional) (Carvajal-Hinojosa, 2004). Su objetivo es asegurar el equilibrio y la continuidad de sus procesos ecológicos, salvaguardar la diversidad genética de las especies existentes, asegurar el aprovechamiento racional de los recursos y proporcionar un campo propicio para la investigación científica. Sin embargo, se encuentra fuertemente impactado por las actividades humanas, ya que en aguas cercanas se vierten contaminantes como hidrocarburos y metales pesados (Horta-Puga & Tello-Musi, 2009). Además, la explotación irracional de sus recursos, la falta de planeación y de aplicación de políticas adecuadas de desarrollo turístico y pesquero, las descargas de aguas residuales municipales, industriales y agropecuarias, así como la deforestación en la zona continental adyacente, favorecen un aumento de la cantidad de sólidos que son arrastrados y desembocan en él, lo que provoca un incremento en las concentraciones de nutrientes (Nixon & Fulweiler, 2009; Anderson *et al.*, 2012; Aké-Castillo *et al.*, 2014). Estos compuestos inorgánicos disponibles en el medio marino favorecen la presencia de microorganismos fotosintéticos y su rápido crecimiento poblacional, lo que ocasiona florecimientos algales (Aké-Castillo *et al.*, 2014).

En el Golfo de México se han reportado por lo menos 18 especies del género *Pseudo-nitzschia* (Lelong *et al.*, 2012), y en el PNSAV se ha estudiado la diversidad y la morfología del género. Así, en muestras de campo se han identificado siete especies potencialmente productoras de toxinas: *P. brasiliana*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* y *P. cf. subcurvata* (probablemente *P. sabit*) (Okolodkov *et al.*, 2009; Aké-Castillo *et al.*, 2014; Okolodkov *et al.*, 2015), lo que implica un riesgo potencial a la salud pública (Parsons *et al.*, 2012). Es necesario realizar estudios toxicológicos para comprobar la toxigenicidad de las especies del lugar, ya que diversos autores han reportado densidades celulares de este género superiores a los límites máximos permisibles establecidos por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (Rodríguez-Gómez, 2013; Okolodkov *et al.*, 2015; Gómez-Arroyo *et al.*, 2016).

Considerando la creciente concentración de compuestos inorgánicos importantes para el desarrollo de FAN y las fuertes descargas de aguas residuales dentro del PNSAV, se decidió evaluar el crecimiento y la toxicidad de *Pseudo-nitzschia* en cultivo con diversas condiciones de nitratos. Adicionalmente, se realizaron observaciones de un segundo género en coexistencia con *Pseudo-nitzschia*, la diatomea *Minidiscus* sp., la cual influyó en el crecimiento de algunos cultivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento e identificación morfológica

Se establecieron los cultivos con células colectadas de Isla Verde 19°11'56.71"N; 96°49'89"W y Santiaguillo 19°08'60.2"N; 95°48'64.2"W dentro del PNSAV, en Veracruz, México (Fig. 1). Las células individuales fueron aisladas con el método de pipeta reducida y con diluciones seriadas (Guillard, 1973; Andersen & Kawachi, 2005), hasta obtener cultivos que se consideraron monoclonales. Estos se colocaron en matraces Erlenmeyer de policarbonato de 125 mL con 100 mL de medio de cultivo GSe (Blackburn *et al.*, 2001) modificado, enriquecido con silicatos (164.4 µM) y sin extracto de suelo. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 26±1°C con una intensidad luminosa de 95.3 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> en un régimen de L:O de 12:12 horas.

Se realizaron micrografías por microscopía electrónica de barrido (MEB) (JEOL JSM-6360LV) y de transmisión (MET) (JEOL JEM- 1200 Ex II). Para ello se eliminó la materia orgánica con el método de blanqueamiento (Nagumo, 1990). La identificación se realizó de acuerdo con los criterios de

Lundholm y colaboradores (2002) y Teng y colaboradores (2013).

### Análisis del crecimiento de los aislados y experimento con diferentes concentraciones de nitratos

Se inocularon tres réplicas con 50 000 células en 100 mL de medio de cultivo (500 cél mL<sup>-1</sup>) de cada aislado. Se registró el crecimiento diariamente hasta terminada la fase exponencial. Para realizar los conteos, se tomó una alícuota de 1 mL y se fijó con Lugol ácido. Los conteos se realizaron diariamente con una cámara Neubauer en microscopio óptico a 400x (MICRO II, Micro- Optical Solutions, MA) (Vega *et al.*, 2017).

Las tasas de crecimiento específicas ( $\mu$ ) se calcularon mediante la ecuación de la velocidad específica de crecimiento de Monod:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

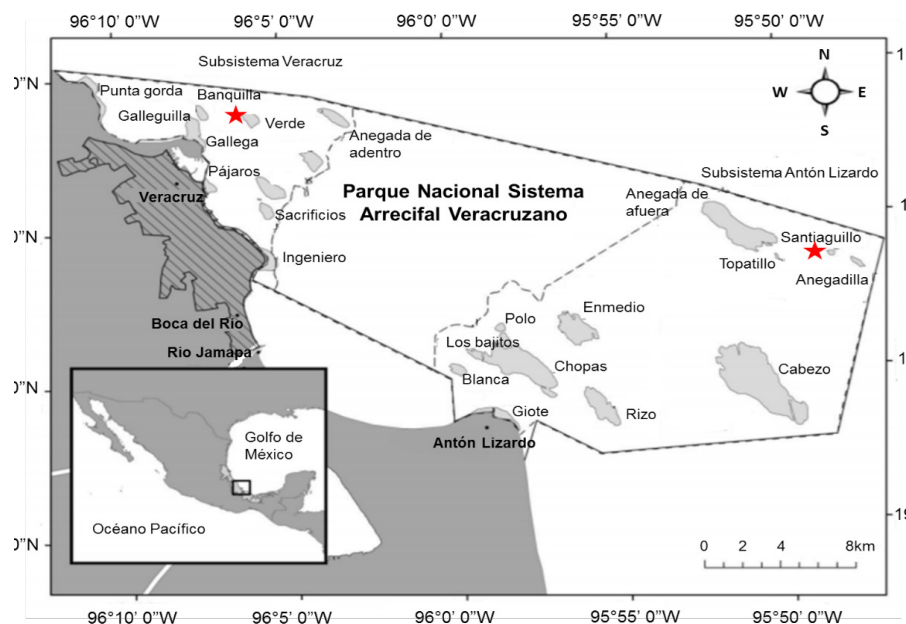
donde:

$X_1$  y  $X_2$  = número de células inicial y final

$t_1$  y  $t_2$  = tiempos de inicio y fin de la fase exponencial de crecimiento calculado en días (Guillard, 1973)

También se calculó el tiempo de generación ( $t_g$ ) a partir de la tasa de crecimiento mediante la ecuación:

$$t_g = \frac{0.6931}{\mu}$$



**Figura 1.** Polígono del PNSAV que incluye los subsistemas propuestos por Ortiz-Lozano *et al.* (2009). Se señalan con estrellas rojas los sitios de donde se aislaron las células para el establecimiento de los cultivos.

Para determinar el inicio y el final de la fase exponencial, se calculó la tasa de crecimiento con logaritmos en base 2 ( $\mu_2$ ), para posteriormente conocer la suma progresiva de las tasas de crecimiento diario ( $\sum \mu_2$ ), ya que cualquier cambio de la pendiente de estos datos indica una variación de la velocidad de duplicación (Guillard, 1973).

$$\mu_2 = \frac{\ln X_2 - \ln X_1 / \ln 2}{t_2 - t_1}$$

A partir de las curvas de crecimiento, se seleccionó el aislado 8C para el experimento, ya que fue el que mostró menor desviación estándar durante su crecimiento. Se sembraron 50,000 células en 100 mL ( $500 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) por triplicado para cada tratamiento. Los tratamientos (Tx) consistieron en la modificación de la concentración de nitratos en el medio GSe de la siguiente manera:

- 1) **Tx1:** mayor concentración de nitratos con respecto al medio de cultivo original ( $3,956.4 \mu\text{M}$ ).
- 2) **Tx2:** menor concentración de nitratos con respecto al medio de cultivo original ( $98.9 \mu\text{M}$ ).
- 3) **Control:** medio de cultivo sin modificar ( $1,978.2 \mu\text{M}$ ), en el que se encontraban aclimatados los cultivos.

Se evaluó la densidad celular diariamente durante el crecimiento y se calculó la tasa de crecimiento como se describió anteriormente.

Para identificar las diferencias en el crecimiento entre los aislados y en los tratamientos experimentales, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff y se utilizó el estadístico de Levene para confirmar normalidad y homocedasticidad de los datos. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para realizar una prueba *a posteriori* de rangos múltiples (Tukey) (Marques de Cantú, 1991). Todos los análisis se hicieron con el programa Statgraphics Centurion XVI.I (Statgraphics, 2014).

### Análisis de toxinas

Al final de la fase de crecimiento exponencial, se concentró la biomasa de cada aislado por centrifugación y de los tratamientos. El análisis de toxinas

se realizó por cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas en tándem (LC-MS/MS) en el laboratorio FICOTOX, en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.

La extracción de las toxinas consistió en la disrupción celular con perlas de sílice-zirconia de 0.5 mm de diámetro en 1 mL de una mezcla metanol:agua 1:1 en un Mini BeadBeater (Biospec Products Inc., E.U.A), agitando por 10 segundos a 500 rpm por triplicado, con un periodo de enfriamiento entre cada agitación. Se realizó la limpieza del extracto con dos periodos de centrifugación ( $13,000 \times g$  por 8 minutos), se colectó el sobrenadante y se transfirió a un microtubo limpio, en donde se colectó una alícuota a la cual se le adicionó ácido trifluoroacético con una concentración final de 0.15%. Se agitó con vórtex durante 30 segundos y se analizó por LC-MS/MS (Agilent 6470, CA) con triple cuadrupolo. La detección del AD se realizó mediante un monitoreo múltiple MRM (Multi Reaction Monitoring), con fuente de ionización en modo positivo.

## RESULTADOS

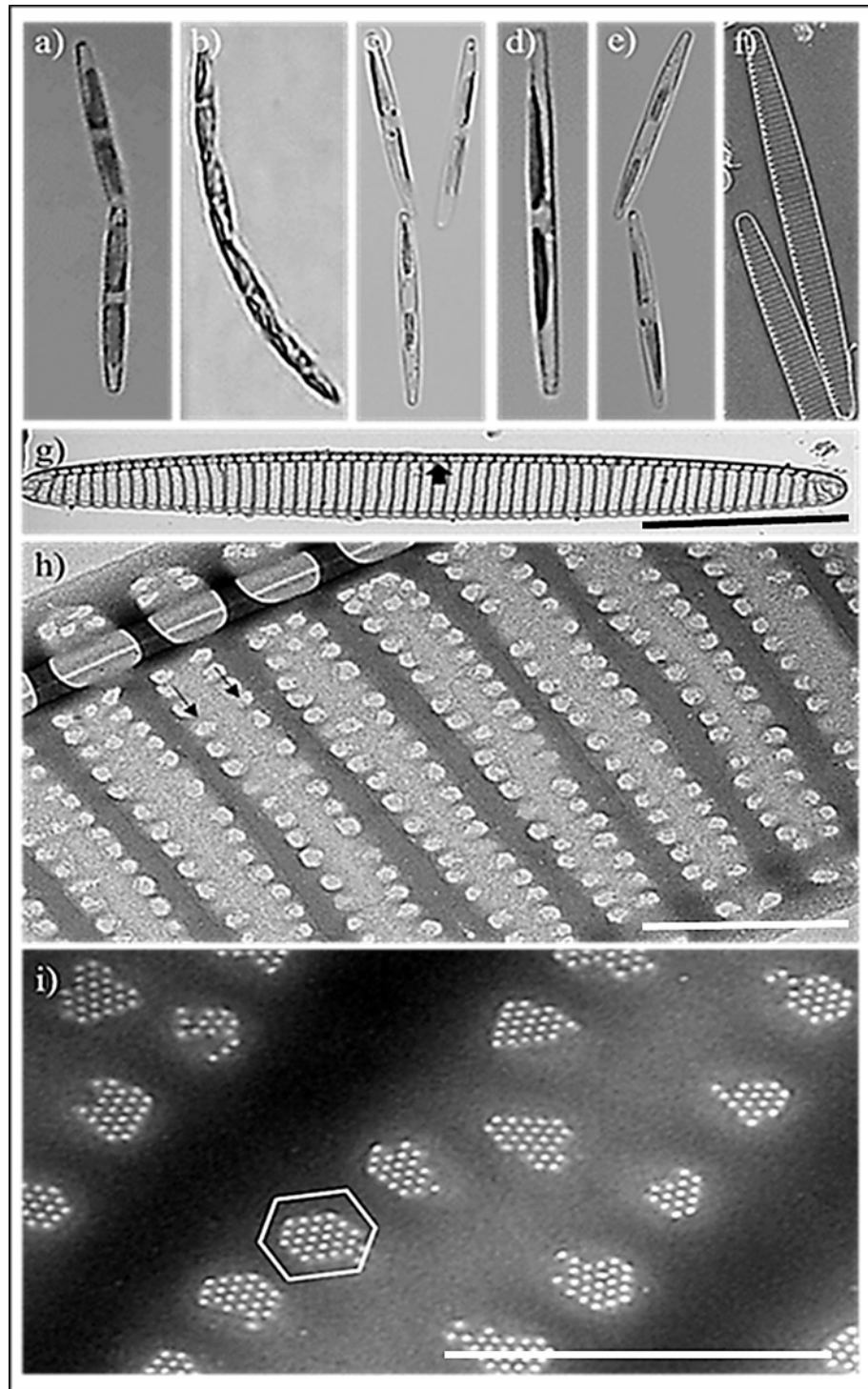
### Establecimiento de cultivos e identificación morfológica

Se obtuvieron cinco aislados; tres de Isla Santiago, denominados 5E, 8C, 4C y dos de Isla Verde, denominados 6D y 5A. Las medidas morfométricas se muestran en la Tabla 1, y fueron calculadas a partir de las micrografías en MEB y MET (Fig.2). En todos los aislados se presentaron las siguientes características: valvas rectangulares con extremos un poco redondeados, células con dos cloroplastos marrones, uno en cada extremo, y un núcleo central difícil de diferenciar. El rafe se observó excéntrico. Las estrías corren paralelas al eje transapical, excepto en los polos, donde algunas se vuelven perpendiculares a éste. Las fíbulas y las estrías a veces correspondieron en número, por lo que en ocasiones se observaron alineadas; en las estrías dos filas de poroides, pero se pudieron observar indicios de tres que aparecen como poroides aislados entre las dos filas regulares. Los poroides de ambas frústulas están marcados por pequeñas perforaciones (himen) en un patrón hexagonal y no se observó nódulo cen-

**Tabla 1.** Máximos y mínimos de las características morfométricas de los cinco aislados de *Pseudo-nitzschia cf. brasiliensis* del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano.

| Aislado | Ancho ( $\mu\text{m}$ ) | Largo ( $\mu\text{m}$ ) | Nódulo | Fíbulas en 10 $\mu\text{m}$ | Estrías en 10 $\mu\text{m}$ | Filas de poroides | Himen* | Poroides 1 $\mu\text{m}$ | N  |
|---------|-------------------------|-------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|--------|--------------------------|----|
| 4C      | 2.52-3.59               | 23.8-30.8               | -      | 20-27                       | 21-27                       | 2-3               | Hex.   | 8-11                     | 14 |
| 5A      | 2.37-3.13               | 21.0-27.1               | -      | 19-25                       | 21-28                       | 2-3               | Hex.   | 7-9                      | 15 |
| 8C      | 1.89-2.80               | 18.6-27.7               | -      | 21-29                       | 21-30                       | 2-3               | Hex.   | 10-8                     | 7  |
| 6D      | 2.05-3.45               | 19.1-29.5               | -      | 21-31                       | 22-32                       | 2-3               | Hex.   | 7-10                     | 12 |
| 5E      | 2.01-2.78               | 25.0-26.8               | -      | 21-25                       | 21-25                       | 2-3               | Hex.   | 8-9                      | 13 |

\* Hex = el acomodo de los poroides forma un hexágono.



**Figura 2.** Forma y estructura de la valva de los cinco aislados. a) Aislado 4C, arreglo de dos células en cadena; b) 5A, arreglo de cuatro células en cadena; c) 8C, arreglo de dos células en cadena; d) 6D, célula individual; e) 5E, dos células individuales; f) MEB del aislado 8C. Ningún aislado presentó nódulo central; g) flecha aislado 6D. Cada estria tiene dos filas de poroides; h) flechas 4C, algunos presentaron poroides aislados entre las dos filas; i) detalle de los poroides con forma hexagonal y sin dividirse en sectores (5A). a-e) Microscopio fotónico, 600x. f-i) MET. Las barras representan la escala g) 10  $\mu$ m, h) 1  $\mu$ m, i) 500 nm.

tral. El arreglo de las células fue en cadenas escalonadas, superpuestas de 1/8 a 1/11 (Lundholm *et al.*, 2002b).

### Características de crecimiento de los aislados

En la Figura 3 se muestran las curvas de crecimiento, las tasas de crecimiento, de división y la densidad celular máxima alcanzada por los cinco aislados. En la Tabla 2 se reportan los datos de crecimiento de los cinco aislados.

La tasa de crecimiento varió entre  $1.0 \pm 0.7$  div·día<sup>-1</sup> para el aislado 5E, y  $2.5 \pm 0.6$  div·día<sup>-1</sup> para el 8C. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las medias (Figura 3b). El menor tiempo de división fue de  $0.3 \pm 0.1$  días para los aislados 8C y 6D, y el mayor, de  $0.9 \pm 0.7$  días para el aislado 5A, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 3c y Tabla 2).

Los aislados 5E y 5A presentaron la menor tasa de crecimiento ( $1.0 \pm 0.7$  y  $1.1 \pm 0.7$  div·día<sup>-1</sup>, respectivamente) y el mayor tiempo de división, ( $0.8 \pm 0.4$  y  $0.9 \pm 0.7$  días, respectivamente; Fig. 3b y c). Estos aislados también obtuvieron la menor densidad celular máxima ( $65,347 \pm 10,376$  y  $19,583 \pm 3,819$  cél·mL<sup>-1</sup>, respectivamente; Fig. 3d), y presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de los aislados, por lo que se consideraron un grupo estadísticamente distinto en sus características de crecimiento (Fig. 3d y Tabla 2). (Ver siguiente apartado).

El aislado 8C mostró menor variación entre sus réplicas, por lo que fue seleccionado para el experimento con variación de nutrientes.

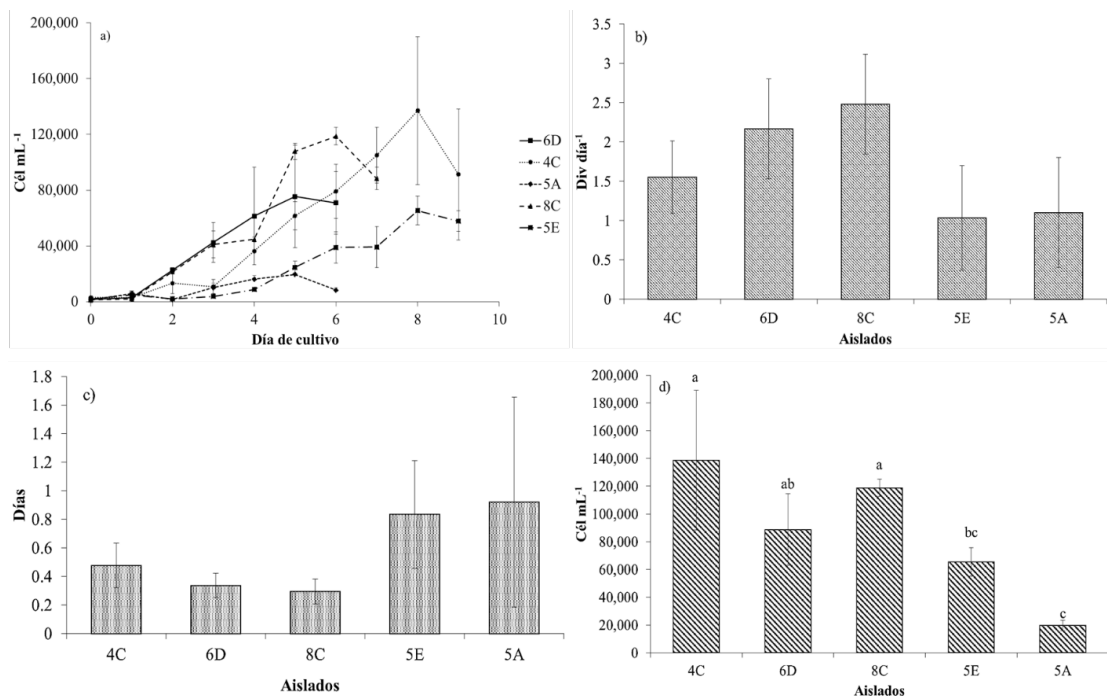
### Diatomeas del género *Minidiscus*

En los aislados 5A y 5E se observó la presencia de una segunda diatomea. Se tomaron fotografías de MEB y MET, y de esta manera se determinó que la diatomea asociada a estos cultivos pertenece al género *Minidiscus* Hasle, 1973. Esta es una diatomea céntrica, una de las más pequeñas del fitoplancton marino, que se superpone a las fracciones pico y nanoplánctónicas, con diámetros de  $<2$  a  $5 \mu\text{m}$ . En la Fig. 4 se observan las tres fultopórtulas alrededor del centro; cada fultopórtula está reforzada con un anillo de sílice en la base. La rimopórtula se ubica en el centro, y se observa un labio que sobresale de la valva (Park *et al.*, 2017).

### Experimento con diferentes concentraciones de nitratos

En la Figura 5 se muestran las curvas de crecimiento, tasa de crecimiento, tiempo de división y densidad celular máxima de los diferentes tratamientos. En la Tabla 3 se reportan los datos de crecimiento.

El Tx1 mostró la menor tasa de crecimiento, con  $0.7 \pm 0.4$  div·día<sup>-1</sup> con respecto a los otros dos, sin embargo, en la prueba de ANDEVA se determinó que las medias no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) (Figura 5b).



**Figura 3.** a) Curvas de crecimiento de los cinco aislados de *Pseudo-nitzschia cf. brasiliiana*; b) tasas de crecimiento; no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); c) tiempo de división; no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); d) densidad celular máxima. Las letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 2.** Datos de crecimiento de los cinco aislados en condiciones de laboratorio.

| Aislado | Inicio de la fase exponencial (día) | Fin de la fase exponencial (día) | Tasa de crecimiento (div·día <sup>-1</sup> ) | Tiempo de división (días) | Densidad celular inicial (cél·mL <sup>-1</sup> ) | Densidad celular máxima (cél·mL <sup>-1</sup> ) | Tiempo en alcanzar la densidad celular máxima (días) |
|---------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 4C      | 2.3±1.2                             | 3.3±1.2                          | 1.6±0.5                                      | 0.5±0.2                   | 2,917±722                                        | 138,750±50,420                                  | 7.6±0.6                                              |
| 5E      | 1.3±0.6                             | 2.7±1.2                          | 1.0±0.7                                      | 0.8±0.4                   | 3,750±1,250                                      | 65,347±10,376                                   | 8.0±0.0                                              |
| 5A      | 1.7±0.6                             | 3.3±0.6                          | 1.1±0.7                                      | 0.9±0.7                   | 1,389±481                                        | 19,583±3,819                                    | 5.0±0.0                                              |
| 8C      | 1.0±0.0                             | 2.0±0.0                          | 2.5±0.6                                      | 0.3±0.1                   | 1,250±1,250                                      | 118,750±6,250                                   | 6.0±0.0                                              |
| 6D      | 1.0±0.0                             | 2.0±0.0                          | 2.2±0.6                                      | 0.3±0.1                   | 1,667±833                                        | 88,750±25,830                                   | 5.7±1.2                                              |

Se utilizó medio GSe modificado con silicatos, con una concentración de nitratos de 1,978.2 µM.

El tiempo de división varió entre 0.5±0.1 y 1.5±1.3 días, pero tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las medias, sin embargo, en la Figura 5c se observa que el control mostró menor tiempo de división que los tratamientos.

La densidad celular máxima varió entre 172,083±10,943 células·mL<sup>-1</sup> en el Tx1 y 340,833±16,314 células·mL<sup>-1</sup> en Tx2, lo que agrupa estadísticamente al Tx2 y al control (b) separados del Tx1 (a), por presentar densidad celular menor (Figura 5d y Tabla 3).

#### Análisis de toxinas

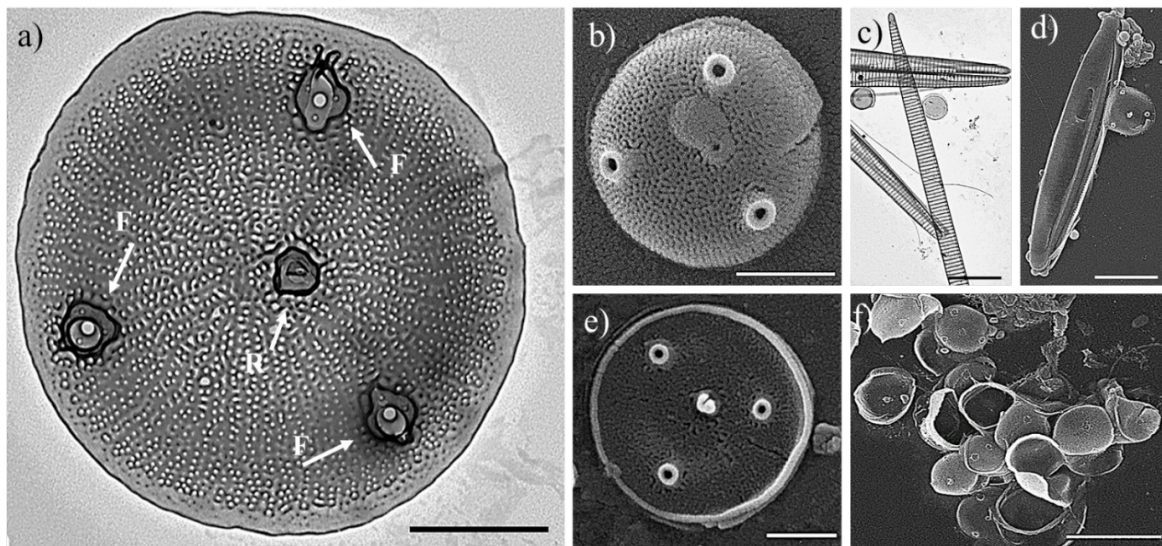
El análisis de toxinas se realizó para cada uno de los cinco aislados y para cada réplica de los tratamientos del experimento, con un total de 14 muestras analizadas, todas en la fase estacionaria de crecimiento. Todos los resultados fueron negativos para AD.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

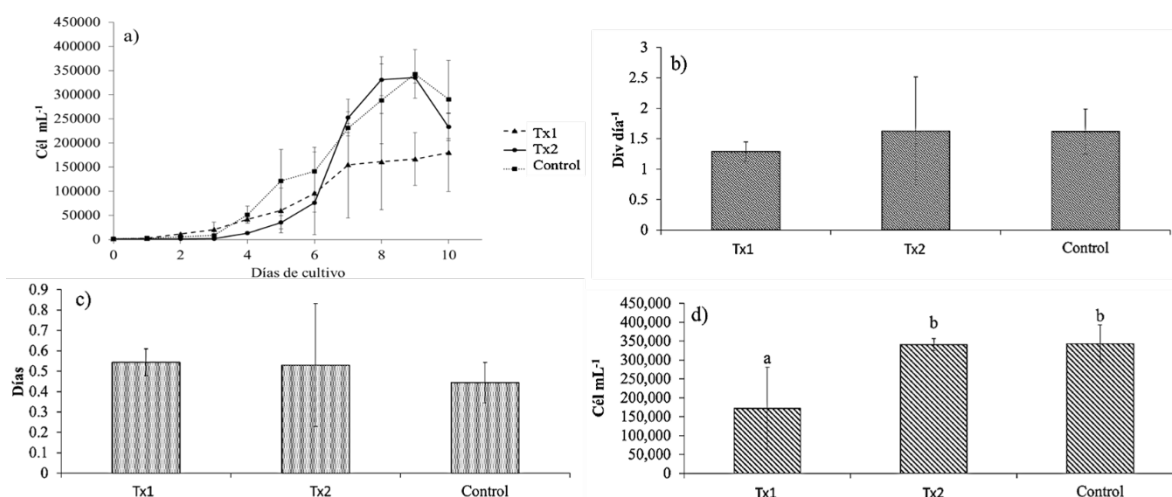
### Determinación del taxón

Las medidas morfométricas entre los aislados no variaron de manera suficiente para distinguir a nivel de especie, sin embargo, se puede afirmar que todos los organismos pertenecen al complejo *P. americana*, el cual comprende a *P. americana*, *P. brasiliiana* y *P. lineae*, descritas por Lundholm y colaboradores (2002). Estas tres especies están estrechamente relacionadas por ser pseudo-crípticas, por lo cual la distinción entre ellas es complicada y se basa en la estructura de la valvocúpula (primera banda que está en contacto con la valva en el cíngulo) la cual solo se puede visualizar en vista cingular, sin embargo, no fue posible observar esta vista en las micrografías.

Las tres especies se han reportado en el Golfo de México: a) *P. americana*, se reportó, junto con otras especies, en las costas de Louisiana en los Es-



**Figura 4.** Diatomea del género *Minidiscus*. Forma y estructura de la valva. a) micrografía (MET). Las flechas señalan los procesos de la valva. R = rimopórtula central. F = fultopórtulas que rodean el centro; b) micrografía (MEB); c) (MET) *Pseudo-nitzschia* cf. *brasiliiana* y *Minidiscus*; d) (MEB) Una célula de *Minidiscus* y una de *Pseudo-nitzschia*; e) envés de la valva de *Minidiscus* (MEB); f) colonia de *Minidiscus* (MEB). Las barras representan la escala a), b) y e) 1 µm, c), d) y f) 5 µm.



**Figura 5.** a) Curvas de crecimiento de los dos tratamientos con diferentes concentraciones de nitratos y el control; b) tasas de crecimiento de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); c) tiempo de división de los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); d) densidad celular máxima de los tratamientos. Las letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

tados Unidos de América (EUA), y en ese estudio se evidencia por primera vez al género como un posible vector de AD en el Golfo de México, aunque esta especie no ha sido reportada como tóxica (Del Rio *et al.*, 2010); b) *P. lineae*, se ha registrado en las costas de Florida en los EUA, aunque no se ha comprobado su toxicidad (Lundholm *et al.*, 2002); y c) *P. brasiliensis* se ha registrado en las costas de Veracruz en el PNSAV (Parsons *et al.*, 2012) y se ha reportado como productora de toxinas en el Mar Mediterráneo (Sahraoui *et al.*, 2011).

*P. americana* y *P. lineae* se han observado como epífitas en otras diatomeas y *P. brasiliensis* se ha reportado como tóxica y de vida libre (Lundholm *et al.*, 2002b). Esto indica que, a pesar de ser muy parecidas morfológicamente, existen diferencias fisiológicas.

Cabe mencionar de manera adicional, que los cultivos después de la parte experimental se mantuvieron por un periodo largo (7 meses); Quijano-Scheggia y colaboradores (2009) experimentaron con cultivos monoclonales y observaron la formación de auxosporas en *P. brasiliensis*, por lo que propuso que esta especie es homotética, de manera que las células son monoicas (el mismo individuo produce estructuras masculinas y femeninas) y se

pueden autofecundar, lo que conlleva a que los cultivos puedan mantenerse por un tiempo más prolongado. Debido a este comportamiento reproductivo, se estima que los cultivos pertenecen a la especie *P. brasiliensis*, aunque para afirmarlo, es necesario su identificación molecular (Fig. 6) (Garcés *et al.*, 2001; Amato *et al.*, 2007).

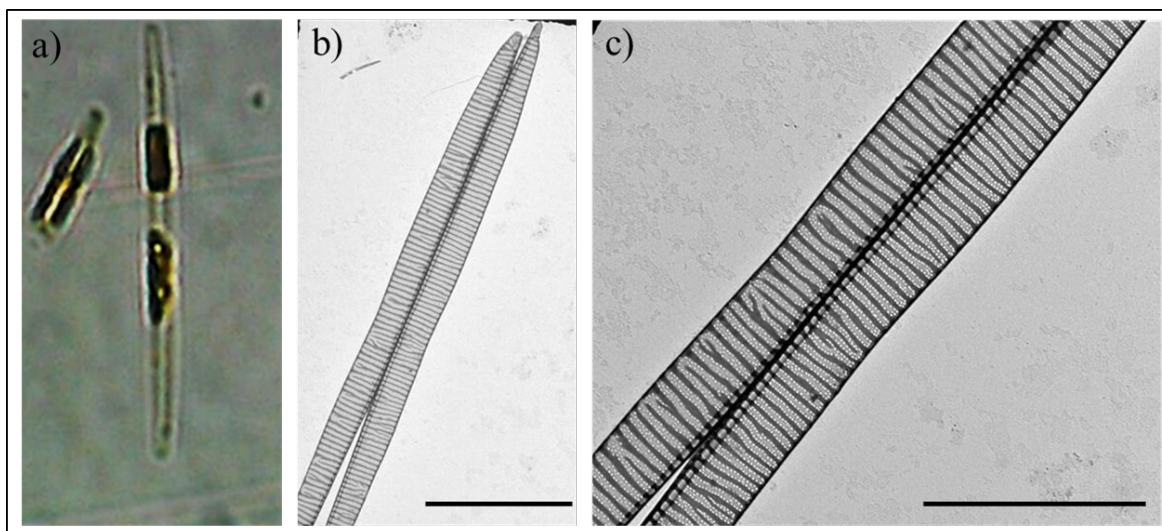
### Importancia de una correcta identificación

En general, la determinación de especies del género *Pseudo-nitzschia* ocasiona problemas para los taxónomos debido a que muchas de las características morfológicas se comparten en distintas especies. Además, tienden a presentar deformaciones, tanto en campo como después de periodos cortos en cultivo (Villac, 1996; Sommer, 1998), lo que representa un inconveniente para diferenciar entre especies toxigénicas y no toxigénicas, y ambas pueden coexistir en el medio (Teng *et al.*, 2013). En algunos casos de FAN se pueden presentar cepas genéticamente similares de diferentes especies, e incluso pueden presentarse varios complejos (Pettersson & Pozdnyakov, 2012; Rodríguez-Gómez, 2013).

Por otro lado, para conocer mejor sobre su ecología, fisiología y toxicidad, es fundamental esclarecer su especie, y para ello generalmente se utiliza

**Tabla 3.** Datos de crecimiento del aislado 8A en el experimento con diferentes concentraciones de nitratos.

| Tratamiento<br>(concentración<br>de KNO <sub>3</sub> ) | Inicio de la<br>fase<br>exponencial<br>(día) | Fin de la fase<br>exponencial<br>(día) | Tasa de<br>crecimiento<br>(div·día <sup>-1</sup> ) | Tiempo<br>de división<br>(días) | Densidad<br>celular inicial<br>(cél·mL <sup>-1</sup> ) | Densidad<br>celular máxima<br>(cél·mL <sup>-1</sup> ) | Tiempo en<br>alcanzar la<br>densidad celular<br>máxima<br>(días) |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>Tx1</b> (3,956.4 µM)                                | 1.7±0.6                                      | 3.3±0.6                                | 1.3±0.4                                            | 0.5±0.1                         | 1,667±1,443                                            | 172,083±10,943                                        | 8.7±1.5                                                          |
| <b>Tx2</b> (98.9 µM)                                   | 2.7±0.6                                      | 4.3±0.6                                | 1.6±0.9                                            | 0.5±0.3                         | 1,250±0                                                | 340,833±16,314                                        | 8.3±0.6                                                          |
| <b>Control</b> (1,978.2 µM)                            | 2.7±0.6                                      | 4.0±0.0                                | 1.6±0.4                                            | 0.4±0.1                         | 1,250±1,250                                            | 342,917±50,068                                        | 9.0±0.0                                                          |



**Figura 6.** Células alargadas después de la reproducción sexual. a) Fotografía con microscopio óptico, aumento 400x, diferentes tamaños de las frústulas; b) y c) fotografía con MET, células alargadas, presentaron entrecruzamiento en las estrias. Las barras representan la escala 10  $\mu\text{m}$ .

microscopía electrónica. Esta técnica ha tenido un papel importante en el diagnóstico taxonómico para la clasificación de grupos y subgrupos basados en su morfología (Teng *et al.*, 2013). Las características de este género han sido bien documentadas (Hasle *et al.*, 1996; Lundholm *et al.*, 2002b), sin embargo, es difícil distinguir entre especies crípticas y pseudo-crípticas (Lundholm *et al.*, 2006), como en el caso del complejo *P. americana*, por lo que es necesario complementar esa información con caracteres moleculares. Por lo anterior, su estudio e identificación representan un desafío para la gestión de los FAN (Anderson, 2009).

En México, la COFEPRIS, a través de las autoridades sanitarias estatales, ha diseñado programas de monitoreo permanente para realizar muestreos y análisis de fitoplancton potencialmente tóxico. Los lineamientos de trabajo de este programa incluyen descripción y análisis cuantitativos y cualitativos de especies a través de conteos expresados en abundancias relativas. Además, requiere de la identificación de especies hasta el nivel taxonómico que sea posible. Estos resultados son considerados para determinar si se implementa una veda sanitaria (COFEPRIS, 2016). Sin embargo, debido a que estos análisis se realizan con microscopía fotónica, el procedimiento que se sigue para su monitoreo resulta limitado para la correcta identificación de especies, y se pueden generar confusiones sobre la especie que se encuentra y su potencial toxigenicidad.

En el PNSAV se han identificado por lo menos siete especies de *Pseudo-nitzschia* reportadas como productoras de toxinas, lo cual significa una problemática ambiental y un riesgo potencial a la salud (Parsons *et al.*, 2012), por lo que es preciso mejorar las técnicas de muestreo para afrontar los

desafíos que presenta la identificación de especies y confirmar el potencial tóxico de las especies a través estudios toxinológicos.

#### Crecimiento de los aislados y coexistencia con el género *Minidiscus*

El tiempo de crecimiento hasta la fase de senescencia de todos los aislados fue de 7 a 10 días, lo que corresponde con lo reportado por otros autores (7 a 18 días) (Howard *et al.*, 2007; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011; Radan & Cochlan, 2018). Las tasas de crecimiento en este trabajo fueron relativamente altas (entre  $1.0 \pm 0.7$  y  $2.5 \pm 0.6$  div·día<sup>-1</sup>), en comparación con las reportadas en la literatura, que varían de  $0.49 \pm 0.063$  a  $1.05 \pm 0.033$  div·día<sup>-1</sup> (Trainer *et al.*, 2012). La duración de la fase exponencial de todos los aislados osciló entre 1 y 2 días, mientras que otros autores han reportado de 4 a 7 días, y las densidades celulares máximas se encontraron dentro de lo reportado anteriormente (entre  $7 \times 10^4$  y  $1.97 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>) (Thessen *et al.*, 2009; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011; Radan & Cochlan, 2018). Los análisis estadísticos revelaron que no existieron diferencias significativas en el crecimiento entre los aislados, tal como se esperaba al tratarse de organismos del mismo complejo. Sin embargo, los aislados 5A y 5E presentaron menores tasas de crecimiento, mayor tiempo de división y menor densidad celular ( $p < 0.05$ ) con respecto al resto (Tabla 2, Fig. 3), lo que sugiere que para estos aislados fue más complicada la adaptación al medio de cultivo, probablemente debido a la competencia con las diatomeas del género *Minidiscus* presentes. Los cultivos se mantuvieron por siete meses, pero en los aislados 5A y 5E se observó que *Minidiscus* desplazó por completo a *Pseudo-nitzschia*.

Las diatomeas del género *Minidiscus* se encuentran entre los primeros 20 géneros más abundantes, y a pesar de que nunca se ha descrito como una de las principales especies causantes de FAN, podrían ser contribuyentes importantes (Malviya *et al.*, 2016; Leblanc *et al.*, 2018). Los miembros de este género suelen pasar desapercibidos debido a que los métodos tradicionales de identificación y recolecta (mallas de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de luz, cuando el diámetro de los miembros de este género se encuentra entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ ), han impedido su observación. No obstante, los FAN de estas diatomeas podrían ser más frecuentes de lo que se aprecia actualmente, tanto en mar abierto como en áreas costeras. Se han reportado FAN de *Minidiscus* spp. en la Bahía de Monterey, California, que es una región costera caracterizada por fuertes eventos de surgencia (Buck *et al.*, 2008), así como en áreas eutróficas del Océano Pacífico Subártico (Clemons & Miller, 1984), en una cuenca de Noruega (Daniels *et al.*, 2015) y en la Península Antártica (Kang *et al.*, 2003; Annett *et al.*, 2010). Esta diatomea podría ejercer un control ecológico sobre el desarrollo de células más grandes, y de esta manera, abrir un nicho para el éxito de las diatomeas de talla pequeña (Bork *et al.*, 2015); esto puede deberse a que presentan mayor superficie de contacto en un menor volumen celular, lo cual las hace más eficientes en la incorporación de nutrientes. Actualmente no existen trabajos que demuestren la existencia de una relación ecológica entre los géneros *Pseudo-nitzschia* y *Minidiscus*, pero se ha reportado que en presencia de esta última no se presenta *Pseudo-nitzschia*, y viceversa (Kang *et al.*, 2003; Leblanc *et al.*, 2018).

#### Crecimiento con diferentes concentraciones de nitratos

Los estudios autoecológicos proporcionan información sobre el ciclo de vida de las especies y sobre las condiciones en las cuales pueden sobrevivir; así se refuerza el conocimiento existente y se pueden formular nuevas hipótesis sobre su comportamiento bajo diversos regímenes, especialmente en el contexto actual de cambio climático global y rápida eutrofización de los ambientes costeros, como es el caso del PNSAV.

Comúnmente, los FAN de *Pseudo-nitzschia* se presentan en zonas ricas en nutrientes (Adams *et al.*, 2000; Trainer *et al.*, 2008; Trainer *et al.*, 2009b). Dentro de estos compuestos, el nitrógeno juega un papel importante para la síntesis de aminoácidos, y por lo tanto cumple una función en el crecimiento y la división celular, así como para la síntesis de AD (Lelong *et al.*, 2012). En cultivo se ha observado como prerrequisito que existan concentraciones no limitantes de nitrógeno para el crecimiento celular, la reproducción y la producción de la toxina (Bates, 1998; Kudela *et al.*, 2002a; Kudela *et al.*, 2002b). En el medio natural es el nitrato la principal fuente inorgánica de nitrógeno, que mantiene el incremen-

to de la biomasa (Smith, 1991; Clarke & Leakey, 1996; Camargo & Alonso, 2007). Se han realizado estudios con cultivos de *Pseudo-nitzschia* enfocados en comprender el vínculo entre la producción de toxinas y las condiciones ambientales (concentraciones de micro y macronutrientes, temperatura e irradiancia, salinidad y pH) (Trainer *et al.*, 2008; Lelong *et al.*, 2012), así como con diferentes fuentes de nitrógeno. En relación con los nitratos, se ha demostrado que el crecimiento celular puede variar en función de la disponibilidad de luz y de la temperatura durante la experimentación (Lomas & Glibert, 1999; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011; Auro & Cochlan, 2013), pues la absorción y la reducción de éste depende de la cantidad de energía disponible, particularmente en forma de calor; cuando las temperaturas son bajas, las enzimas de reducción de nitrato son limitadas (Lomas & Glibert, 2000), y las diatomeas en particular absorben grandes cantidades de nitratos en condiciones de alta irradiancia (Lomas & Glibert, 1999, 2000). La iluminación en este estudio fue constante, por lo que la capacidad de los aislados para absorber los nitratos y aprovecharlos metabólicamente para el crecimiento pudo haber dependido de la energía necesaria para su reducción. Probablemente por esta razón los diferentes tratamientos y el control no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de crecimiento ni en el tiempo de división durante la fase exponencial, a pesar de ser sometidos a concentraciones diferentes de nitratos (de 98.9 a 3,956.4  $\mu\text{M}$ ). La toxina se analizó al finalizar la fase exponencial y las diferentes concentraciones no desencadenaron la producción de AD. Anteriormente, se tenía la idea generalizada de que el AD se producía una vez que la división celular cesaba (Bates & Richard, 1996; Bates *et al.*, 1998), y principalmente si el cultivo se encontraba limitado en nutrientes, ya fuera en la fase estacionaria temprana o tardía (Marchetti *et al.*, 2008; Thessen *et al.*, 2009; Lundholm *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado su producción también durante el inicio la fase exponencial, concluyendo así que la fase en la que se produce el AD puede variar dependiendo la especie, o bien, de la cepa (Auro & Cochlan, 2013; Harðardóttir *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2018).

La producción de AD y las tasas de crecimiento se han evaluado en función a la fuente de nitrógeno, sin embargo, los resultados reportados en la literatura muestran que todavía no hay consistencia ni se ha comprendido completamente el uso de diferentes fuentes de nitrógeno, ni la relación entre la fuente de nitrógeno y la tasa de crecimiento (ver Thessen *et al.*, 2009; Auro & Cochlan, 2013), ni la relación entre la fuente de nitrógeno y el nivel de toxicidad celular (ver Martín-Jézéquel *et al.*, 2015), aunque se sabe que las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* son capaces de utilizar otras fuentes de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas (nitritos, urea y amonio) (Howard *et al.*, 2007; Cochlan *et al.*, 2008).

Nuestros resultados también sugieren que las células pueden sobrevivir en múltiples regímenes de nitratos en un entorno que cambia drásticamente, ya que las diferencias en la concentración de nitratos no favorecieron ni perjudicaron el crecimiento celular (Thessen *et al.*, 2009), sin embargo, es importante considerar que en este estudio, en los tres tratamientos probablemente hubo suficiente nitrógeno para las funciones celulares.

Las concentraciones de nitratos utilizadas en este experimento, aún con el nitrógeno reducido, fueron altas (entre 98.9 y 3,956.4  $\mu\text{M}$ ), en comparación con las utilizadas en otros trabajos, los cuales reportan concentraciones de entre 55 y 500  $\mu\text{M}$  (Howard *et al.*, 2007; Santiago-Morales & García-Mendoza, 2011). Sin embargo, la concentración menor en este estudio es similar a la reportada en experimentos realizados con la especie *P. multiseriata*, la cual produjo toxinas con 50-110  $\mu\text{M}$  (Bates *et al.*, 1993); con *P. fraudulenta* y *P. calliantha*, con 88  $\mu\text{M}$  (Thessen *et al.*, 2009) y con *P. australis*, con 50  $\mu\text{M}$  (Howard *et al.*, 2007).

De acuerdo con las micrografías de nuestros cultivos, en las que se observa que hay reproducción sexual, sugerimos que se trata de la especie *P. brasiliiana*. Existe controversia con respecto a la producción de AD en esta especie, pues existen reportes en las costas de Brasil y Malasia de aislados que no lo producen (Lundholm *et al.*, 2002b; Lim *et al.*, 2010), mientras que otros han confirmado la presencia de la toxina en organismos de la bahía de Bizerta en Túnez (Sahraoui *et al.*, 2011; Sahraoui *et al.*, 2012). En el PNSAV se ha documentado su presencia, junto con otras seis especies toxigénicas: *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens* y en la especie reportada como *P. cf. subcurvata*, aunque no se han realizado análisis toxinológicos que comprueben la producción de AD. *P. cuspidata* y *P. brasiliiana* se presentan en altas abundancias en el ambiente cuando existe una razón alta de silicatos y nitratos (Villac *et al.*, 2005; Trainer *et al.*, 2009a; Sahraoui *et al.*, 2011; Sahraoui *et al.*, 2012), por lo que el aumento en la concentración de nutrientes dentro de la zona representa un riesgo potencial de estimular FAN de estas especies.

Por otro lado, los datos reportados por los diversos autores no son uniformes entre especies, lo que impide una extrapolación correcta, y se ha reportado que existe una amplia diferencia fisiológica entre ellas (Thessen *et al.*, 2009). Además, para que ocurran eventos de FAN, las variables suelen ser múltiples. Estas incluyen factores ambientales, condiciones fisiológicas y asociaciones con otros organismos (bacterias, depredadores, consumidores primarios, etc.). Por este motivo, los factores específicos que promueven la producción de AD y el crecimiento de estas diatomeas aún no se conocen en su totalidad (Kudela *et al.*, 2002b; Lundholm *et al.*, 2004;

Trainer *et al.*, 2012; Lema *et al.*, 2017), motivo por el cual existe una evidente necesidad de realizar más estudios autoecológicos y toxinológicos sobre este género dentro del PNSAV, siendo este el primero en su tipo.

## CONCLUSIONES

En este estudio se ha comprobado la dificultad al identificar especies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente toxigénicas de importancia para la economía y la salud pública en el PNSAV, y concluimos que es preocupante que actualmente se está monitoreando únicamente con microscopía fotónica. Consideramos que es necesario el uso de, al menos, la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET), e idealmente, de métodos moleculares para identificar inequívocamente a las especies en el caso de un FAN, además de los correspondientes estudios toxinológicos, para que, con esta información, se decida si se emite la alerta y se cierran las pesquerías. Una correcta identificación es fundamental por las implicaciones económicas y de salud que una falsa alarma o una intoxicación podrían provocar. Consideramos que es relevante el hecho de que, en tres diferentes concentraciones de nitratos, *P. cf. brasiliiana* fue capaz de sobrevivir sin aparentes inconvenientes fisiológicos y sin diferencias estadísticas significativas en la mayoría de los indicadores, lo que significa que esta especie sobreviviría a las condiciones adversas provocadas por la creciente eutrofización del sistema, y probablemente podría competir con mayor ventaja que otras especies. Finalmente, concluimos que es importante continuar con los estudios autoecológicos con *Pseudo-nitzschia* del PNSAV en sistemas con diferentes concentraciones de nutrientes y temperaturas, así como con las diatomeas del género *Minidiscus*, pues podrían tener una fuerte relación ecológica en el PNSAV en relación con los eventos de FAN de las especies de *Pseudo-nitzschia*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando García Hernández, de la Unidad de Imagenología, IFC-UNAM. A la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga, del Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido, ICML-UNAM., al Dr. Fernando González Farías, Laboratorio de Química Ambiental y al Dr. Martín López Hernández, Técnico Académico Titular B, ICML-UNAM. Al Dr. José A. Aké Castillo y al Dr. Yuri Okolodkov, ICIMAP-UV. A la Dra. Martha E. Ferrario, de la Universidad de La Plata, Argentina. Al Dr. Ernesto García Mendoza, y al M. en C. Yaireb Alejandra Sánchez Bravo, del Laboratorio FICO-TOX, CICESE.

## REFERENCIAS

- Adams, N. G., Lesoing, M. & Trainer, V. L. 2000. Environmental conditions associated with domoic acid in razor clams on the Washington

- coast. *Journal of Shellfish Research*, 19(2), 1007-1015.
- Ajani, P. A., Verma, A., Lassudrie, M., Doblin, M. A., & Murray, S. A. (2018). A new diatom species *P. hallegraeffii* sp. nov. belonging to the toxic genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from the East Australian Current. *PloS One*, 13(4), e0195622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195622>
- Aké-Castillo, J. A., Okolodkov, Y. B., Rodríguez-Gómez, C. F., & Campos-Bautista, G. (2014). Florecimientos algales nocivos en Veracruz: especies y posibles causas (2002-2012). In Botello, A., Rendón von Osten, J., Benítez, J. A., & Gold-Bouchot, G. (Eds.), *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (3 ed., pp. 133-146). México, DF: UAC, UNAM-ICMyL, CINVESTAV-Unidad Mérida.
- Alvarez-Falconí, P. P. (2009). Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4), 505-516.
- Amato, A., Kooistra, W. H., Ghiron, J. H. L., Mann, D. G., Pröschold, T., & Montresor, M. (2007). Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, 158(2), 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.10.001>
- Andersen, R. A., & Kawachi, M. (2005). Microalgae Isolation Techniques. *Algal culturing techniques*, 83. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50007-X>
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & Coastal Management*, 52(7), 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.006>
- Anderson, D. M., Andersen, P., Bricelj, V. M., Cullen, J. J., & Rensel, J. J. (2001). *Monitoring and management strategies for harmful algal blooms in coastal waters* APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris.
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. (2012). Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual Review of Marine Science*, 4, 143-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>
- Annett, A. L., Carson, D. S., Crosta, X., Clarke, A., & Ganeshram, R. S. (2010). Seasonal progression of diatom assemblages in surface waters of Ryder Bay, Antarctica. *Polar biology*, 33(1), 13-29. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0681-7>
- Auro, M. E., & Cochlan, W. P. (2013). Nitrogen Utilization and Toxin Production by Two Diatoms of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* Complex: *P. cuspidata* and *P. fryxelliana*. *Journal of Phycology*, 49(1), 156-169. <https://doi.org/10.1111/jpy.12033>
- Bates, S., & Richard, J. (1996). Domoic acid production and cell division by *Pseudo-nitzschia multiseries* in relation to a light: Dark cycle in silicate-limited chemostat culture. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 140-143.
- Bates, S., & Trainer, V. (2006). The ecology of harmful diatoms. In: Granéli E., Turner J.T. (eds) *Ecology of Harmful Algae. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, vol 189. Springer, Berlin, Heidelberg
- Bates, S. S. (1998). Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. *NATO ASI Series G Ecological Sciences*, 41, 405-426. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_7)
- Bates, S. S., Garrison, D. L., & Horner, R. A. (1998). Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. In Anderson, D. M., Cembella, A. D., & Hallegraeff, G. M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms* (pp. 662).
- Bates, S. S., Hubbard, K. A., Lundholm, N., Montresor, M., & Leaw, C. P. (2018). *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: new research since 2011. *Harmful Algae*, 79, 3-43. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.001>
- Bates, S. S., Worms, J., & Smith, J. C. (1993). Effects of ammonium and nitrate on growth and domoic acid production by *Nitzschia pungens* in batch culture. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 50(6), 1248-1254. <https://doi.org/10.1139/f93-141>
- Blackburn, S. I., Bolch, C. J., Haskard, K. A., & Hallegraeff, G. M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40(1), 78-87. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-1-78.1>
- Bork, P., Bowler, C., De Vargas, C., Gorsky, G., Karsenti, E., & Wincker, P. (2015). Tara Oceans studies plankton at planetary scale: American Association for the Advancement of Science, 873-873. <https://doi.org/10.1126/science.aac5605>
- Buck, K., Chavez, F., & Davis, A. (2008). *Minidiscus trioculatus*, a small diatom with a large presence in the upwelling systems of central California.

*Nova Hedwigia Beihefte* 114, 133, 1.

- Camargo, J., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Carvajal-Hinojosa, E. (2004). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). <http://siaver-sedema.org.mx/wp-content/uploads/2018/04/Parque-Nacional-Sistema-Arrecifal-Veracruz-no.pdf>, 1-13.
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L., & Vyverman, W. (2005). Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 40(4), 379-395. <https://doi.org/10.1080/09670260500254735>
- Clarke, A., & Leakey, R. J. (1996). The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients, and the microbial community in a nearshore Antarctic marine ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 41(6), 1281-1294. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.6.1281>
- Clemons, M. J., & Miller, C. B. (1984). Blooms of large diatoms in the oceanic, subarctic Pacific. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 31(1), 85-95. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(84\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0198-0149(84)90076-1)
- Cochlan, W. P., Herndon, J., & Kudela, R. M. (2008). Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*, 8(1), 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.008>
- COFEPRIS, (2016). Lineamiento de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotoxinas marinas. *Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, Comisión de Operación Sanitaria*, 1-24.
- Costa, L. G., Giordano, G., & Faustman, E. M. (2010). Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology*, 31(5), 409-423. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.003>
- Dale, B., Edwards, M., & Reid, P. (2006). Climate change and harmful algal blooms. *Ecology of Harmful Algae*, 367-378. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_28)
- Daniels, C., Poulton, A. J., Mario, E., Paulsen, M. L., Bellerby, R., St John, M., & Martin, A. P. (2015). Phytoplankton dynamics in contrasting early stage North Atlantic spring blooms: composition, succession, and potential drivers. *Biogeosciences Discussions*, 12: 93-133. <https://doi.org/10.5194/bgd-12-93-2015>
- Dao, H. V., Phan, V. B., Teng, S. T., Uchida, H., Leaw, C. P., Lim, P. T., Suzuki, T., & Pham, K. X. (2015). *Pseudo-nitzschia fukuyoi* (Bacillariophyceae), a domoic acid-producing species from Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. *Fisheries Science*, 81(3), 533-539. <https://doi.org/10.1007/s12562-015-0864-9>
- Del Rio, R., Bargu, S., Baltz, D., Fire, S., Peterson, G., & Wang, Z. (2010). Gulf menhaden (*Brevoortia patronus*): a potential vector of domoic acid in coastal Louisiana food webs. *Harmful Algae*, 10(1), 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.05.006>
- Diario Oficial de la Federación, D. (1992). Decreto por el que se declara área natural protegida con el carácter de Parque Marino Nacional, la zona conocida como Sistema Arrecifal Veracruzano, ubicada frente a las Costas de los municipios de Veracruz, Boca del Río y Alvarado del Estado de Veracruz Llave, con superficie de 52,238-91-50 hectáreas. *Diario Oficial de la Federación*.
- Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B., & Dale, B. (2001). Life histories of microalgal species causing harmful blooms: Calvi, Majorca, Spain. Report of a European workshop organised jointly by the Fifth Framework Programme Energy, Environment and Sustainable Development of the European Commission, the Institut de Ciències del Mar, CMIMA-CSIC (Barcelona) and the Calvià Town Council (Majorca, Balearic Islands). 214 p.
- Guillard, R. R. (1973). Division rates. En: Stein, J.R. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, London. pp 289-311
- Guiry, M. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 10 June 2019
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-2-79.1>
- Hallegraeff, G. M. (1995). Harmful algal blooms: a global overview. *Manual on harmful marine microalgae*, 33, 1-22.
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology*, 46(2), 220-235. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x>
- Harðardóttir, S., Pančić, M., Tammilehto, A., Krock,

- B., Möller, E. F., Nielsen, T. G., & Lundholm, N. (2015). Dangerous relations in the Arctic marine food web: interactions between toxin producing *Pseudo-nitzschia* diatoms and *Calanus* copepods. *Marine Drugs*, 13(6), 3809-3835. <https://doi.org/10.3390/md13063809>
- Hasle, G., Lange, C., & Syvertsen, E. (1996). A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 50(2), 131. <https://doi.org/10.1007/BF02367149>
- Hernández-Orozco, M. L. Gárate-Lizárraga, I. (2006). Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomédica*, 17(1), 45-60. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v17i1.438>
- Herrera, S. A., Sierra, B. A., & Hernández, S. N. (2008). Floraciones Algales Nocivas: perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *BioTecnología*, 12(1), 23-40.
- Holland, P. T., Selwood, A. I., Mountfort, D. O., Wilkins, A. L., McNabb, P., Rhodes, L. L., Doucette, G. J., Mikulski, C. M., & King, K. L. (2005). Isodomoic acid C, an unusual amnesic shellfish poisoning toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chemical Research in Toxicology*, 18(5), 814-816. <https://doi.org/10.1021/tx0496845>
- Horta-Puga, G., & Tello-Musi, J. (2009). Sistema Arrecifal Veracruzano: condición actual y programa permanente de monitoreo: Primera etapa. *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DM005. México DF.*
- Howard, M. D. A., Cochlan, W. P., Ladizinsky, N., & Kudela, R. M. (2007). Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae*, 6(2), 206-217. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.06.003>
- Kang, J.-S., Kang, S.-H., Kim, D., & Kim, D.-Y. (2003). Planktonic centric diatom *Minidiscus chilensis* dominated sediment trap material in eastern Bransfield Strait, Antarctica. *Marine Ecological Progress Series*, 255, 93-99. <https://doi.org/10.3354/meps255093>
- Kudela, R., Cochlan, W., & Roberts, A. (2002a). Spatial and temporal patterns of *Pseudo-nitzschia* spp. in central California related to regional oceanography. *Harmful Algae*, 347-349.
- Kudela, R., Roberts, A., & Armstrong, M. (2002b). Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. *Harmful Algae*, 136-138.
- Leblanc, K., Quéguiner, B., Diaz, F., Cornet, V., Michel-Rodriguez, M., de Madron, X. D., Bowler, C., Malviya, S., Thyssen, M., & Grégori, G. (2018). Nanoplanktonic diatoms are globally overlooked but play a role in spring blooms and carbon export. *Nature communications*, 9(1), 953. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03376-9>
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., & Bates, S. S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51(2), 168-216. <https://doi.org/10.2216/11-37.1>
- Lema, K. A., Latimier, M., Nézan, E., Fauchot, J., & Le Gac, M. (2017). Inter and intra-specific growth and domoic acid production in relation to nutrient ratios and concentrations in *Pseudo-nitzschia*: phosphate an important factor. *Harmful Algae*, 64, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.03.001>
- Li, Y., Huang, C. X., Xu, G. S., Lundholm, N., Teng, S. T., Wu, H., & Tan, Z. (2017). *Pseudo-nitzschia simulans* sp. nov. (Bacillariophyceae), the first domoic acid producer from Chinese waters. *Harmful Algae*, 67, 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.06.008>
- Lim, H.-C., Su, S. N.-P., Mohamed-Ali, H., Kotaki, Y., Leaw, C.-P., & Lim, P.-T. (2010). Toxicity of diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Science and Technology in the Tropics*, 6, S116-S119.
- Llewellyn, L., Negri, A., & Robertson, A. (2006). Paralytic shellfish toxins in tropical oceans. *Toxin Reviews*, 25(2), 159-196. <https://doi.org/10.1080/15569540600599217>
- Lomas, M. W., & Glibert, P. M. (1999). Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. *Limnology and Oceanography*, 44(3), 556-572. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3.0556>
- Lomas, M. W., & Glibert, P. M. (2000). Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology*, 36(5), 903-913. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99029.x>
- Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., Bill, B. D., Connell, L. B., Léger, C., & Trainer, V. L. (2012). Cryptic and pseudo-cryptic diversity in

- diatoms—with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. 1. *Journal of Phycology*, 48(2), 436-454. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01132.x>
- Lundholm, N., Daugbjerg, N., & Moestrup, Ø. (2002a). Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*, 37(1), 115-134. <https://doi.org/10.1017/S096702620100347X>
- Lundholm, N., Hansen, P. J., & Kotaki, Y. (2004). Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Marine Ecological Progress Series*, 273, 1-15. <https://doi.org/10.3354/meps273001>
- 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(5), 480-497. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-5-480.1>
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., & Miller, P. (2006). Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses 1. *Journal of Phycology*, 42(2), 464-481. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00211.x>
- Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., de Vargas, C., & Bittner, L. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), E1516-E1525. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113>
- Mancera, P. J. E., Gavio, B., & Arencibia Carballo, G. (2010). Floraciones algales nocivas, intoxicación por microalgas e impactos en el desarrollo regional: El caso de San Andrés Isla, Caribe Colombiano. *Cuadernos del Caribe*, 13.
- Marchetti, A., Lundholm, N., Kotaki, Y., Hubbard, K., Harrison, P. J., & Virginia Armbrust, E. (2008). Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from iron-limited waters in the northeast subarctic Pacific. *Journal of Phycology*, 44(3), 650-661. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00526.x>
- Marques de Cantú, M. J. (1991). *Probabilidad y estadística: para ciencias químico-biológicas* (9684222459). Consultado en línea <http://bibliotecasibe.ecosur.mx/sibe/book/000022688> el 18 de enero de 2018.
- Martin-Jézéquel, V., Calu, G., Candela, L., Amzil, Z., Jauffrais, T., Séchet, V., & Weigel, P. (2015). Effects of organic and inorganic nitrogen on the growth and production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. australis* (Bacillariophyceae) in culture. *Marine Drugs*, 13(12), 7067-7086. <https://doi.org/10.3390/md13127055>
- Nagumo, T. (1990). The bleaching method for gently loosening and cleaning a single diatom frustule. *Diatom*, 5, 45-50.
- Nixon, S., & Fulweiler, R. (2009). Nutrient pollution, eutrophication, and the degradation of coastal marine ecosystems. *Global loss of coastal habitats: rates, causes and consequences*, 23-58.
- Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Parsons, M., Torres-Salgado, R., & Aké-Castillo, J. (2009). El género *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, Golfo de México: taxonomía y dinámica estacional. *Resúmenes del Taller sobre Florecimientos Algales Nocivos (FAN): Integración del Conocimiento sobre Eventos de FAN en México*, 9-11.
- Okolodkov, Y. B., Aké-Castillo, J. A., Campos-Bautista, G., Lara-Martínez, R., & Jiménez-García, L. F. (2015). Dinámica anual del género *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) en el Sistema Arrecifal Veracruzano. In Granados, B. A., Ortiz, Lozano L., Salas, Monreal D., González, Gándara C (Ed.), *Aportes al conocimiento del Sistema Arrecifal Veracruzano: hacia el Corredor Arrecifal del Suroeste del Golfo de México* (pp. 249-266): Universidad Autónoma de Campeche.
- 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. <https://doi.org/10.3354/meps271087>
- Ortiz-Lozano, L., Granados-Barba, A., & Espejel, I. (2009). Ecosystemic zonification as a management tool for marine protected areas in the coastal zone: Applications for the Sistema Arrecifal Veracruzano National Park, Mexico. *Ocean & Coastal Management*, 52(6), 317-323. [doi:10.1016/j.ocecoaman.2009.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.03.004)
- Park, J. S., Jung, S. W., Ki, J.-S., Guo, R., Kim, H. J., Lee, K.-W., & Lee, J. H. (2017). Transfer of the small diatoms *Thalassiosira proschkiniae* and *T. spinulata* to the genus *Minidiscus* and their taxonomic re-description. *PloS One*, 12(9), e0181980.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181980>
- Parsons, M. L., Okolodkov, Y. B., & Aké-Castillo, J. A. (2012). Diversity and morphology of the species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) of the National Park Sistema Arrecifal Veracruzano, SW Gulf of Mexico. *Acta Botánica Mexicana* (98), 51-72. <https://doi.org/10.21829/abm98.2012.1140>
- Pettersson, L. H., & Pozdnyakov, D. (2012). *Monitoring of harmful algal blooms*: Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68209-7>
- Quijano-Scheggia, S., Garces, E., Andree, K., Fortunato, J. M., & Camp, J. (2009). Homothallic auxosporulation in *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 45(1), 100-107. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00636.x>
- Radan, R. L., & Cochlan, W. P. (2018). Differential toxin response of *Pseudo-nitzschia multiseries* as a function of nitrogen speciation in batch and continuous cultures, and during a natural assemblage experiment. *Harmful Algae*, 73, 12-29. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.01.002>
- Rodríguez-Gómez, C. F. (2013). *Contribución de especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos a la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano*. (Maestría en Ecología y Pesquerías), Universidad Veracruzana, Boca del Río.
- Sahraoui, I., Bates, S., Bouchouicha, D., Hadj, M. H., & Sakka, H. A. (2011). Toxic and potentially toxic *Pseudo-nitzschia* populations in Bizerte Lagoon (Tunisia, SW Mediterranean) during 2006-2007, and first report of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia brasiliensis* Lundholm. Hasle, & GA Fryxell. *Diatom Research*, 26(3), 293-303. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.597990>
- Sahraoui, I., Grami, B., Bates, S. S., Bouchouicha, D., Chikhaoui, M. A., Mabrouk, H. H., & Hlaili, A. S. (2012). Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 102-103, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.018>
- Santiago-Morales, I. S., & García-Mendoza, E. (2011). Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO<sub>3</sub> ratios. *Harmful Algae*, 12, 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.004>
- Smith, J. (1991). *Population dynamics and toxicity of various species of Dinophysis and Nitzschia from the southern Gulf of St. Lawrence*. Paper presented at the Proceedings of the Second Canadian Workshop in Harmful Algae, 1991.
- Sommer, U. (1998). Silicate and the functional geometry of marine phytoplankton. *J Plankton Research*, 20(9), 1853-1859. <https://doi.org/10.1093/plankt/20.9.1853>
- Statgraphics Centurion, X. V. I.I., (2014), Statpoint Technologies. INC. version 17.
- Teng, S. T., Leaw, C. P., Lim, H. C., & Lim, P. T. (2013). The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Malaysia, including new records and a key to species inferred from morphology-based phylogeny. *Botanica Marina*, 56(4), 375-398. <https://doi.org/10.1515/bot-2012-0194>
- Thessen, A. E., Bowers, H., & Stoecker, D. K. (2009). Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae*, 8(5), 792-810. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.01.003>
- Trainer, V. L., Bates, S. S., Lundholm, N., Thessen, A. E., Cochlan, W. P., Adams, N. G., & Trick, C. G. (2012). *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14, 271-300. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.025>
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., & Bates, S. S. (2008). Toxic Diatoms. In Walsh, J. P., Smith, L. S., Fleming, E. L., Gabriele, M. H., & Gerwick, H. W. (Eds.), *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Sea* (pp. 219-237). San Diego, California: Academic Press.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., Lessard, E. J., Cochlan, W. P., Trick, C. G., Wells, M. L., MacFadyen, A., & Moore, S. K. (2009a). Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnology and Oceanography*, 54(1), 289-308. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.1.0289>
- Trainer, V. L., Hickey, B. M., Lessard, E. J., Cochlan, W. P., Trick, C. G., Wells, M. L., MacFadyen, A., & Moore, S. K. (2009b). Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnology and Oceanography*, 54(1), 289-308. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.1.0289>
- Vega, B. O. A., Lobina, D. V., Zenteno, S. T., Arce, M. M., & Gómez, A. G. A. (2017). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (2da ed.). La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas

del Noroeste.

- Villac, M. C. (1996). *Synecology of the genus Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from Monterey Bay, California, USA. (Doctoral dissertation, Texas A & M University).
- Villac, M. C., de Melo, S., Menezes, M., & Tenenbaum, D. R. (2005). *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (Bacillariophyceae), uma diatomácea oportunista da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Atlântica (Rio Grande)*, 27(2), 139-145.
- Wright, J., & Quilliam, M. (1995). Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. In Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., & Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides* (Vol. 33, pp. 113-127): United Nations Educational, .

Copyright (c) 2019 V. Herrera-Pérez & L. Durán-Riveroll



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)