



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

“EL GÉNERO *Pseudo-nitzschia* PRESENTE  
EN LA BAHÍA DE SAMANCO (ANCASH,  
PERÚ) Y SU IMPACTO EN EL CULTIVO  
DE *Argopecten purpuratus* (LAMARCK,  
1819)”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN  
SANIDAD ACUÍCOLA

ROSA ISABEL VILLEGAS RUIZ

LIMA – PERÚ

2018



DR. ARMANDO HUNG CHAPARRO

ASESOR

## **DEDICATORIA**

A toda mi hermosa familia por su apoyo inagotable en especial a mis padres Gaspar y María que me supieron formar en mi vida personal y profesional. Por supuesto, a mis hermanos David y Fabián, a mi esposo Reynaldo, por ser un compañero incondicional, pero sobre todo a mi hija Luciana, el motor en todo lo que emprendo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Blga. Acui. Liliana Tapia Ugáz por su confianza, tiempo y dedicación en el desarrollo de este trabajo de investigación y sobre todo por su amistad brindada.

A mi asesor el Dr. Armando Hung Chaparro por otorgarme su confianza y apoyo.

A la Blga. Marcela Mora Chió, por su apoyo en la redacción.

A la Blga. Acui. Kelly Ramos Alfaro por su inmenso apoyo en los monitoreos semanales de fitoplancton.

A la Dra. Nancy Rojas, por su amabilidad y colaboración en la microscopia electrónica de barrido.

A la Blga. Acui. Liliana Valiente Terrones por su ayuda incondicional en la identificación de microalgas.

A la Blga. Acui. Glenda Peña Gonzáles por su colaboración en la colección de muestras.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia y a su excelente equipo de trabajo por sus conocimientos, amabilidad, paciencia, y amistad brindada.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por permitirme realizar el proyecto en sus instalaciones.

A mi alma mater, la Universidad Nacional del Santa y los excelentes profesores que siempre me dieron su apoyo en esta etapa.

A mi familia que son mi gran fortaleza, a mis grandes amigos del programa de maestría, en especial a Claudia Quispe, Adhemir Valera y Jeansen Montesinos por su inmenso apoyo.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT-CIENCIA ACTIVA) por el apoyo financiero brindado al Programa de SANIDAD ACUÍCOLA – UPCH.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÒN</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 PROBLEMÁTICA</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>1.2 JUSTIFICACIÓN</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>1.3 OBJETIVOS</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>1.4HIPÓTESIS</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>2.1 ANTECEDENTES:</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>2.2 Propiedades y características de la biotoxina:</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>2.3 Absorción de la biotoxina:</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2.4 El género Pseudo- nitzschia (H. peragallo. 1900):</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2.5 Condiciones que favorecen el crecimiento de especies de Pseudo- nitzschia:</b> .....                           | <b>19</b> |
| <b>2.6 Métodos de análisis para la detección de ácido domoico:</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>2.7 Argopecten purpuratus (Lamarck ,1819):</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>2.8 Fitoplancton nocivo en los bivalvos:</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>2.9 Impacto generado por la presencia de biotoxina amnésica (ASP) en la producción de moluscos bivalvos:</b> ..... | <b>28</b> |
| <b>2.10 Mitigaciòn de los episodios tòxicos:</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS:</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>3.1Lugar de muestreo</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>3.2 Recolección de muestras de fitoplancton y evaluación de los parámetros oceanográficos</b> .....                | <b>31</b> |
| <b>3.3 Identificación, cuantificación y aislamiento de especies de género Pseudo- nitzschia</b> .....                 | <b>31</b> |
| <b>3.4 Cultivo de especies del género Pseudo -nitzschia</b> .....   | <b>34</b> |
| <b>3.5Caracterización de especies del género Pseudo-nitzschia:</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>VI. RESULTADOS</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>4.1 Lugar de muestreo</b> .....  | <b>36</b> |

|  |    |
|--|----|
| <i>4.2 Recolección de muestras y evaluación de los parámetros oceanográficos</i> .....                         | 37 |
| <i>4.3 Identificación de especies de género Pseudo-nitzschia por microscopio con contraste de fases</i> .....  | 39 |
| <i>4.4 Cuantificación de las concentraciones celulares de los dos grupos del género Pseudo-nitzschia</i> ..... | 40 |
| <i>4.5 Aislamiento y cultivo de especies de género Pseudo-nitzschia</i> :.....                                 | 45 |
| <i>4.6 Caracterización de Pseudo-nitzschia subpacífica por microscopía electrónica de barrido</i> :.....       | 46 |
| <br>   |    |
| <b>V. DISCUSIÓN</b> :.....   | 49 |
| <br>   |    |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....  | 53 |
| <br>   |    |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b> .....  | 54 |
| <br>   |    |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 55 |
| <br>   |    |
| <b>IX. ANEXOS</b> .....  | 66 |

## INDICE DE TABLAS

- TABLA 1:** Coordenadas geográficas de la zona de muestreo en la bahía de Samanco establecida para la recolección de fitoplancton. (pág. 35)
- TABLA 2:** Registro de los parámetros físico-químicos evaluados en la bahía de Samanco durante el periodo julio – noviembre del 2017. (pág. 37)
- TABLA 3:** Concentraciones celulares ( $\text{cel/L}^{-1}$ ) de los grupos *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* (PNGD) y *Pseudo-nitzschia grupo seriata* (PNGS) provenientes de la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo julio a noviembre del 2017. (pág. 42)

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Estructura química de los ácidos domoico, glutámico y kaínico, que muestra la semejanza entre tres excitotoxinas. (Fuente: Botana, 2000). (pág. 14)
- Figura 2:** Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. (Fuente: Botana, 2000). (pág. 15)
- Figura 3:** Cadena corta de *Pseudo-nitzschia*, formada por tres células observadas con microscopio con contraste de fases. (pág. 18)
- Figura 4:** Estructuras principales que diferencian a las especies del género *Pseudo-nitzschia*: estría, rafe, fíbulas, poroides e interespacio central. (pág. 18)
- Figura 5:** Anatomía interna de *Argopecten purpuratu* “concha de abanico” **ma** - músculo aductor; **b** - branquias; **m** - manto; **o** - ovario; **t** – testículo (Fuente: FAO, 2006). (pág. 26)
- Figura 6:** Distribución de la acumulación de AD en *A. purpuratus* (Fuente: Tenorio, 2014) (pág. 27)
- Figura 7:** Recolección de muestras de fitoplancton en la bahía de Samanco-Ancash (Método: IMARPE, 2010). (pág. 32)

- Figura 8:** Recuento celular de las especies del género *Pseudo nitzschia* (pág. 33)
- Figura 9:** Zona de muestreo establecida en la bahía de Samanco (pág. 36)
- Figura 10:** Especies pertenecientes a *Pseudo Nitzschia grupo delicatissima* (A) y *Pseudo Nitzschia grupo seriata* (B) observadas en microscopio con contraste de fases a 400 X. (pág. 39)
- Figura 11:** *Pseudo-nitzschia subpacífica* (MEB), aspecto general de la valva con extremos lanceolados(A); vista interna de uno de los extremos valvares (B). Escalas: Fig. A: 10  $\mu\text{m}$ ; Fig. B: 5  $\mu\text{m}$ . (pág. 47)
- Figura 12:** *Pseudo-nitzschia subpacífica* (MEB), vista interna de estrías, fíbulas y dos hileras de poroides(A); superposición de extremos celulares (B). Escalas: Fig. A: 1  $\mu\text{m}$ ; Fig. B: 5  $\mu\text{m}$ . (pág. 48)

## INDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Fluctuación de la carga celular de *Pseudo-nitzschia grupo seriata* ( $\text{cel/L}^{-1}$ ) en relación a la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y oxígeno disuelto ( $\text{mg/L}^{-1}$ ) registrado en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio-noviembre del 2018. (pág. 42)
- Gráfico 2:** Fluctuación de la carga celular de *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* ( $\text{cel/L}^{-1}$ ) en relación a la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y oxígeno disuelto ( $\text{mg/L}^{-1}$ ) registrado en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio-noviembre del 2018. (pág. 43)
- Gráfico 3:** Fluctuaciones de las concentraciones celulares los grupos *Pseudo-nitzschia grupo seriata* y *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio a noviembre del 2017. (pág. 44)

**Gráfico 04:** Curva de crecimiento celular de *Pseudo-nitzschia subpacífica* presentes en SAM-1, se muestra la fase exponencial en el día 3. (pág. 45)

**Gráfico 05:** Curva de crecimiento celular de *Pseudo-nitzschia subpacífica* presentes en SAM-2, se muestra la fase exponencial en el día 3. (pág. 46)

## INDICE DE ANEXOS

**ANEXO 1:** Síndromes Ocasionados por Microalgas Tóxicas (Fuente: Mancera *et al.*, 2013). (pág. 66 y 67)

**ANEXO 2:** Distribución Mundial del Género *Pseudo-nitzschia* (Fuente: Trainer *et al.*, 2012). (pág. 68)

**ANEXO 3:** Lista de Especies Tóxicas del Género *Pseudo-nitzschia*. (pág.69)

**ANEXO 4:** Episodios con mayor trascendencia en la producción de moluscos bivalvos ocasionados por la presencia de ASP. (pág.70)

**ANEXO 5:** Trabajo Realizado en el Desarrollo de la Investigación. (pág. 71)

## RESUMEN

La presencia de biotoxinas en productos hidrobiológicos afecta a la salud humana, marina y la economía mundial. La biotoxina amnésica, ha generado controversias en el sector acuícola debido a que hasta la actualidad no se ha registrado su presencia en el mar peruano. Sin embargo, se viene realizando su control en periodos constantes por varios años.

Se recolectaron muestras de fitoplancton en la bahía de Samanco – Ancash, semanalmente, por un periodo de cinco meses, con la finalidad de identificar a especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia*, causantes de la intoxicación amnésica de mariscos (ASP) o intoxicación por ácido domoico (AD). Se identificaron a los dos grupos de este género de microalgas, *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima* y *Pseudo-nitzschia* grupo *seriata*. Las variaciones de la temperatura y la cantidad de oxígeno disuelto influyen en las concentraciones celulares de este género.

Las condiciones de cultivo en laboratorio favorecieron el crecimiento paulatino de la especie *Pseudo-nitzschia subpacífica*, su identificación se realizó por microscopía electrónica de barrido (MEB). Durante el periodo de evaluación, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera no reportó la presencia de ácido domoico en *Argopecten purpuratus*, provenientes de la misma zona de estudio.

El mar peruano no está ajeno a las floraciones algales nocivas. Sin embargo, la ausencia de registros de toxicidad de ácido domoico es un fenómeno que se debe continuar investigando.

## ABSTRACT

The presence of biotoxins in hydrobiological products affects human health, marine and the global economy. Amnesic biotoxin has generated controversy in the aquaculture sector because until now its presence in the Peruvian sea has not been registered. However, its control has been carried out in constant periods for several years.

Phytoplankton samples were collected in the bay of Samanco - Ancash, weekly, for a period of five months, in order to identify toxic species of the genus *Pseudo-nitzschia*, causing amnesic shellfish poisoning (ASP) or Domoic acid intoxication (AD). The two groups of this microalgae genus, *Pseudo-nitzschia delicatissima* group and *Pseudo-nitzschia seriata* group, were identified. Variations in temperature and the amount of dissolved oxygen influence the cellular concentrations of this genus.

The culture conditions in the laboratory favored the gradual growth of the subpacific species *Pseudo-nitzschia*, its identification was made by scanning electron microscopy (SEM). During the evaluation period, the Organismo Nacional de Sanidad Pesquera did not report the presence of domoic acid in *Argopecten purpuratus*, from the same study area. The Peruvian sea is not immune to harmful algal blooms. However, the absence of records of domoic acid toxicity is a phenomenon that should be investigated further.

## I. INTRODUCCIÓN

La lucha contra el hambre ha sido una de las prioridades de las naciones, a pesar de los progresos un gran número de personas padecen hambre en diferentes partes del mundo, lo que impide desarrollar una vida activa y saludable (FAO, 2015a), si a esto le sumamos la alarmante sobreexplotación de los mares, surge la acuicultura como un enorme potencial para responder a la creciente demanda de alimentos que se está llevando lugar debido al crecimiento de la población mundial (FAO, 2014). La acuicultura peruana viene experimentando un crecimiento significativo en las últimas décadas, las especies más cultivadas en la parte continental son la trucha, tilapia, paiche, gamitana y paco, entre otros y las de mayores volúmenes de cosecha, especies marinas, como la concha de abanico *Argopecten purpuratus* y el langostino *Litopenaeus vannamei* (Baltazar & Palacios, 2015), las grandes producciones de estos últimos organismos son destinadas a la exportación. Cabe resaltar que el 90 % de las conchas son destinadas al mercado extranjero y solo un 10 % al mercado local (Ruíz, 2012). A pesar de los problemas que haya tenido el cultivo de la concha de abanico, este posee un alto potencial de crecimiento gracias a las favorables condiciones que aún mantiene el mar peruano para desarrollar esta actividad (FAO, 2003). Este organismo posee altos valores nutritivos donde destaca su importante contenido proteico. En la actualidad, se encuentra entre los doce pectínidos con mayor acogida en el mercado internacional como son los Estados Unidos, Japón y Europa,

principalmente Francia. (De Franssu, 1990). Por lo tanto, el cultivo de este molusco bivalvo tiene que enfrentar fuertes barreras sanitarias que exige su mayor demandante, el mercado europeo.

Frente a esta perspectiva del cultivo de *A. purpuratus*, en el mundo la inocuidad alimentaria alcanza un gran protagonismo con mercados estrictos donde cumplir con los parámetros sanitarios es fundamental. (Loaharanu, 2001) menciona que la amplia divulgación y el creciente interés del público respecto de la inocuidad de los alimentos han alcanzado un nivel más alto. Esto obliga a los países avanzar en tecnologías para lograr la rápida detección de sustancias nocivas, presentes en los alimentos, que pueden ocasionar daños irreversibles.

La intoxicación amnésica por mariscos (ASP) es causada por el ácido domoico (AD), una potente biotoxina marina sintetizada por algunas especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, diatomeas pennadas cosmopolitas de hábitos planctónicos marinos (Hasle, 2002), sus características se basan principalmente por el contenido silíceo que poseen, es así que adquieren formas alargadas, fusiformes (Ferrario *et al.*, 2002); se pueden encontrar como células solitarias o formando cadenas escalonadas, formadas por superposición de los extremos valvares de 1/3 a 1/4 del largo total de las células. La producción de AD entre las diversas especies descritas como tóxicas es complicado de comparar, esto se debe a las diversas condiciones de crecimiento que tienen cada una de ellas (Cusack *et al.* 2002). Estas microalgas tóxicas pueden ser acumuladas por diversos organismos filtradores de gran interés comercial, un ejemplo claro son los moluscos bivalvos; la presencia de estas biotoxinas puede afectar a la salud

humana, marina y la economía mundial (Gilbert & Pitcher, 2001). Los síntomas, entre otros, producidos por alimentos contaminados con esta biotoxina son: dolores abdominales, náuseas, diarrea y pérdida de memoria (Hallegraeff, 1995). La intoxicación por AD ocasiona hiperexcitación neuronal, posteriormente pérdida crónica de función en sistemas neurales y susceptibilidad a degeneración excitotóxica (Bell, 2003). El AD es un aminoácido cristalino, soluble en agua. Puede purificarse por diversos métodos cromatográficos (Wright, 1995). El mecanismo de excitotoxicidad provocado por esta toxina en diversos organismos encierra el paso de AD mediante la barrera sangre-cerebro (Lefebvre *et al.*, 1999).

Como parte del monitoreo sanitario que realiza el Organismo Nacional de la Sanidad Pesquera (SANIPES), la detección de ácido domoico en los moluscos bivalvos ha venido generando diversas controversias debido a la ausencia de esta biotoxina en el litoral peruano, aun cuando se han registrado incrementos masivos del fitoplancton responsable de este evento tóxico en época de verano y primavera. Este hecho ha originado cuestionamientos en los productores acuícolas, autoridades e instituciones relacionadas directamente con el tema. La bahía de Samanco - Ancash, es una de las más importantes en el litoral peruano, en ella se viene desarrollando hace varios años el cultivo de concha de abanico a gran escala (IMARPE, 2008), pero que por su condición geográfica cerrada el florecimiento de microalgas tóxicas, es uno de sus principales problemas. Por lo tanto, este proyecto de investigación tiene por objetivo evaluar el género *Pseudo-nitzschia* presente en la bahía de Samanco (Ancash, Perú) y su impacto en el cultivo de *Argopecten purpuratus*. Los resultados

obtenidos en esta investigación contribuirán en las decisiones del marco normativo sanitario de esta zona de producción acuícola y anteceder a las decisiones normativas del país.

## **1.1 PROBLEMÁTICA**

La demanda de productos inocuos ha obligado a las autoridades competentes desarrollar instrumentos, técnicas y metodologías que permitan la rápida detección de factores de riesgo para la salud humana. Frente a esto, SANIPES con la finalidad de proteger la salud pública, mediante una correcta vigilancia en el sector pequero y acuícola a nivel nacional, viene desarrollando diversos protocolos y programas sanitarios destinados para tal fin.

El análisis de biotoxinas marinas es una de las más importantes pruebas que se realizan a los moluscos bivalvos, dentro de las cuales se encuentra la detección de biotoxinas lipofílicas, paralizantes y amnésica, ésta última ha venido generando controversias debido a que hasta la actualidad no se han reportado eventos de toxicidad ocasionados por AD, según los estudios elaborados por la autoridad sanitaria. No obstante, el IMARPE durante el periodo 2003-2013 ha reportado la presencia de especies tóxicas pertenecientes al género *P. nitzschia*, en las zonas costeras de Pisco y Sechura; sin embargo, al realizarse el análisis para su detección en el tejido de los moluscos, tal como indica el método descrito por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), no se llega a

detectar toxicidad. Por consiguiente, esto ha generado diversos cuestionamientos respecto a la expresión de la toxina en las especies de *P. nitzschia* encontradas en el mar peruano.

La bahía de Samanco es una de las más importantes de la región Ancash, donde se desarrolla el cultivo de *A. purpuratus*, esto debido a sus buenas características oceanográficas, donde destaca la abundancia de sus nutrientes lo que la hace muy vulnerable a las floraciones algales nocivas pero al igual que en todas las áreas de producción la ausencia de AD nos permite plantear la interrogante ¿las especies de *Pseudo nitzschia* presentes en la bahía de Samanco codifican para la biotoxina amnésica? A esta problemática se suma la carencia de estudios que contribuyan al conocimiento de las comunidades fitoplanctónicas tóxicas y su importancia para un buen desarrollo de la maricultura.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

La primera manifestación de toxina amnésica fue en 1987 en Canadá, produciendo intoxicación alimentaria en más de cien personas, llegando a ocasionar la muerte de algunos individuos, esto después de haber ingerido mejillones intoxicados con *P. nitzschia pungens* (Álvarez, 2009), sumados a estos numerosos eventos, las investigaciones basadas en la detección de biotoxinas en organismos hidrobiológicos filtradores son fundamentales debido a las consecuencias severas que han tenido en la salud pública, asimismo la trascendencia ambiental y económica que ha conllevado a los

países a una vigilancia permanente. A su vez el consumo de productos inocuos ha tomado mayor protagonismo en los últimos años, lo que obliga a los productores ofrecer alimentos sanos y libres de contaminantes. En el Perú existe una elevada demanda de moluscos bivalvos por parte del mercado europeo, acompañado de un estricto control sanitario. Las microalgas del género *Pseudo-nitzschia*, han sido descritas como las responsables de producir AD o biotoxina amnésica. Hoy en día no existen registros de toxicidad por AD en nuestro país, aun cuando se han manifestado brotes elevados de estas “microalgas tóxicas”, lo que ha generado controversias en el sector acuícola. Es por ello que los estudios y/o investigaciones orientados a los análisis de riesgos para su temprana detección son imprescindibles para poder realizar predicciones a corto, mediano o largo plazo de eventos tóxicos y de esta manera poder asegurar el bienestar alimentario y económico del país. La información obtenida contribuirá en el sector acuícola y podrá ser presentada a la autoridad sanitaria del país con la finalidad de participar en las decisiones normativas que intervienen en esta problemática.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el género *P. nitzschia* presente en la bahía de Samanco (Ancash, Perú) y su impacto en el cultivo de *Argopecten purpuratus*.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Registrar los parámetros físico-químicos principales (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH) en la bahía de Samanco.
- Identificar, aislar y cultivar bajo condiciones de laboratorio especies del género *P. nitzschia*.
- Caracterizar por microscopía electrónica de barrido especies del género *P. nitzschia*.

## 1.4 HIPÓTESIS

Basados en los reportes que señalan la presencia de los dos grupos del género *Pseudo-nitzschia* en el mar peruano, planteamos la siguiente hipótesis:

Ho: Es posible describir la presencia de especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* en la bahía de Samanco.

Ha: No es posible describir la presencia de especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* en la bahía de Samanco.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES:

Durante el transcurso de los últimos años, se ha manifestado un gran deterioro de las comunidades ecológicas marinas, a partir de esto, el interés por estudiar las comunidades fitoplanctónicas ha incrementado (Hernández, 2014), estas comunidades están conformadas por abundantes organismos algales y protistas en diversas tallas y formas. El fitoplancton representa el primer eslabón de la cadena trófica (COFEPRIS; 2005), encargado de más del 45% de la producción primaria neta del mundo (Simón *et al.*, 2009).

La presencia de fitoplancton sigue un ciclo dinámico. Sin embargo, pueden manifestarse incrementos repentinos en donde, dependiendo de diversos factores ambientales se generan Floraciones de Algas Nocivas (FAN). Las floraciones algales son cambios de color del agua debido a proliferaciones de microorganismos planctónicos pigmentados (Mancera, 2013) donde una especie domina en más de un 50% en relación a todo el fitoplancton, llegando a alcanzar concentraciones de  $10^6$  células / L<sup>-1</sup> (Estrada *et al.*, 2002). Asimismo, las FAN pueden producir efectos deletéreos sobre la salud humana, turismo, recursos pesqueros y acuícolas, por ende los estudios asociados a esta problemática ha adquirido una gran relevancia. Las toxinas acumuladas en organismos filtradores atraen cada vez más la atención de los científicos debido a su potente bioactividad y estructuras químicas únicas (Botana, 2000).

El género *Pseudo-nitzschia* son el grupo de microalgas que han sido descritas como las productoras de la neurotoxina conocida como ácido

domoico (AD) o toxina amnésica (ASP). La producción de AD suele activarse en condiciones desfavorables del medio acuático (Morales & García, 2011). El ácido domoico, pertenece a un grupo de aminoácidos que interfieren con la neurotransmisión de mecanismos en el cerebro, es un ácido tricarboxílico análogo al ácido Kaínico, que se une a receptores glutamatérgicos en neuronas del sistema nervioso central (Perl *et al.*, 1990), esta biotoxina se puede acumular en los organismos que filtran una serie de especies de *P. nitzschia*. La ingestión de mariscos contaminados con ácido domoico puede conducir a una intoxicación, donde los síntomas incluyen vómitos, dolores abdominales, desorientación y pérdida de memoria (amnesia) y puede llegar a causar la muerte en los casos más graves (AESAN, 2008).

Trish *et al.*, (1990) indican que el AD fue encontrada en cultivos de mejillones azules (*Mytilus edulis Linnaeus*) en noviembre de 1987 en Canadá específicamente en la Isla Prince Edward. Al realizarse los análisis químicos en las partes blandas de los mejillones se pudo determinar altas concentraciones de AD ( $> 900 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en tejido de molusco). El contenido intestinal de los moluscos y las muestras de agua demostraron la floración monoespecífica de cadenas de *P. nitzschia pungens* y *multiseriis*.

(Álvarez, 2009) manifiesta que otro episodio se manifestó en Argentina, la muerte anormal de aves marinas en las costas de la Patagonia alertó a las autoridades sanitarias del mencionado país. En los análisis de estómago e intestinos se encontró AD que provinieron de las anchoas y mejillones, con los que se alimentaron. Se realizaron estudios en las zonas marinas y los

resultados reportaron altas concentraciones de *P. nitzschia australis*. Asimismo, (Lefebvre, 1999) indica que un nuevo evento de mortalidad inusual involucró leones marinos de California (*Zalophus californianus*). La potente neurotoxina (AD) fue transmitida a leones a través de anchoas del norte planctívoros (*Engraulis mordax*)

Suarez *et al.*, (2002) indican que el primer registro de AD en las costas de Chile ocurrió en enero de 1997, provenientes de extractos de mariscos, la biotoxina fue encontrada en moluscos de bancos naturales y en diferentes áreas de cultivos, la especie causante de este evento fue *P. nitzschia australis* con una dominancia mayor al 90 %. No obstante, los autores mencionan que las floraciones de *P. nitzschia* en las costas de Chile son frecuentes.

Frente a este panorama, hoy en día se desarrollan diversos programas de vigilancia y control de biotoxinas marinas en todo el mundo. Es así que el Perú como todos los países que exportan productos hidrobiológicos están estrictamente obligados a cumplir con los protocolos sanitarios. Tal como se indica, Chile ha registrado la presencia de ácido domoico en su litoral marino. Sin embargo, nuestro país que limita por el lado sureste con el anterior mencionado no ha detectado hasta la fecha presencia de esta biotoxina marina, a pesar de los constantes monitoreos que se realizan. Encontrar una posible respuesta a este evento es primordial para reformular decisiones en el marco legal sanitario.

Debido a los riesgos para la salud humana, las pruebas de Control Oficial (OC) se lleva a cabo a base de análisis de moluscos, como se especifica en

la legislación europea 853 /2004. Esto indica que los moluscos bivalvos no deben exceder de 20 mg de DA / kg tejidos de los moluscos. Actualmente el método de HPLC se define por la Unión Europea como el método de referencia para la determinación de ASP en los mariscos y forma la base para la detección cuantitativa de AD en pescados y mariscos. Johnson *et al.*, (2016).

Si bien, como ya se ha mencionado, en nuestro país no se han registrado eventos de intoxicación ocasionado por AD, de todas formas, debemos estar alertas desarrollando estrategias de prevención y análisis de riesgos. Mora *et al.*, (2015) indican que conocer mejor los organismos fitoplanctónicos y monitorear el mar peruano de forma constante ayudará a reducir los efectos negativos que trae consigo semejante eventualidad. Por lo tanto, la importancia de monitorear las áreas marino costeras es trascendental para poder realizar análisis de riesgos e identificar de manera temprana la presencia de microalgas tóxicas, cabe resaltar que las extracciones, el consumo y las exportaciones de concha de abanico son canceladas cuando se detecta la presencia de biotoxinas, lo que trae consigo perjuicios económicos a los productores y por supuesto al país, por lo tanto mitigar cualquiera de estos efectos es trascendental.

### ***2.2 Propiedades y características de la biotoxina:***

La intoxicación amnésica por mariscos (ASP), es causada por el ácido domoico (AD) un aminoácido tricarbóxico, es un compuesto natural que pertenece a la categoría de los Kainoides y es estructuralmente muy similar al compuesto original, el ácido kaínico, así como a los aminoácidos más

conocidos, como el glutamato y la prolina su estructura se muestra en la Figura 1. Químicamente, el ácido domoico es (2S, 3S, 4S) -2-carboxi-4-l-metil-5 (R) -carboxil-1 (Z), 3 (E) -hexadienil pirrolidina-ácido acético ( $C_{15}H_{21}NO_6$ ) y tiene un peso molecular anhidro de 311.14. Puede ser aislado de micro y macroalgas, es soluble en agua, actúa como un análogo del neurotransmisor glutamato y es un potente agonista del receptor de glutamato, al poseer un cromóforo fuerte hace que su detección por espectroscopia UV sea viable (FAO, 2005b).

En un principio el AD fue descubierto en 1950 en la macroalga *Chondria armata*, pero su capacidad tóxica se descubrió en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, al encontrarse en poblaciones celulares de *Pseudo nitzschia multiseriis*.

El AD es un aminoácido no proteico, se han conocido hasta 8 isómeros (Figura 2), los cuales son análogos estructurales del ácido glutámico, neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central (Trainer *et al.*, 2008). Sin embargo, la activación neuronal puede ser controlada por enzimas específicas cuando se trata del glutamato, pero la ausencia de un sistema de remoción para el AD que controle la activación neuronal conlleva a la liberación secundaria de óxido nítrico y glutamato endógeno, lo que ocasiona muerte neuronal.

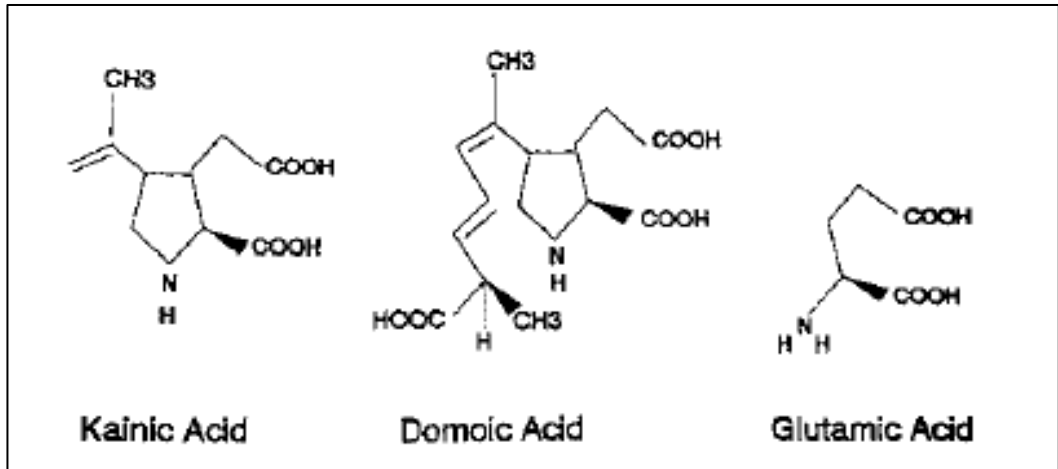


Figura 1: Estructura química de los ácidos domoico, glutámico y kaínico, que muestra la semejanza entre tres excitotoxinas. (Fuente: Botana, 2000).

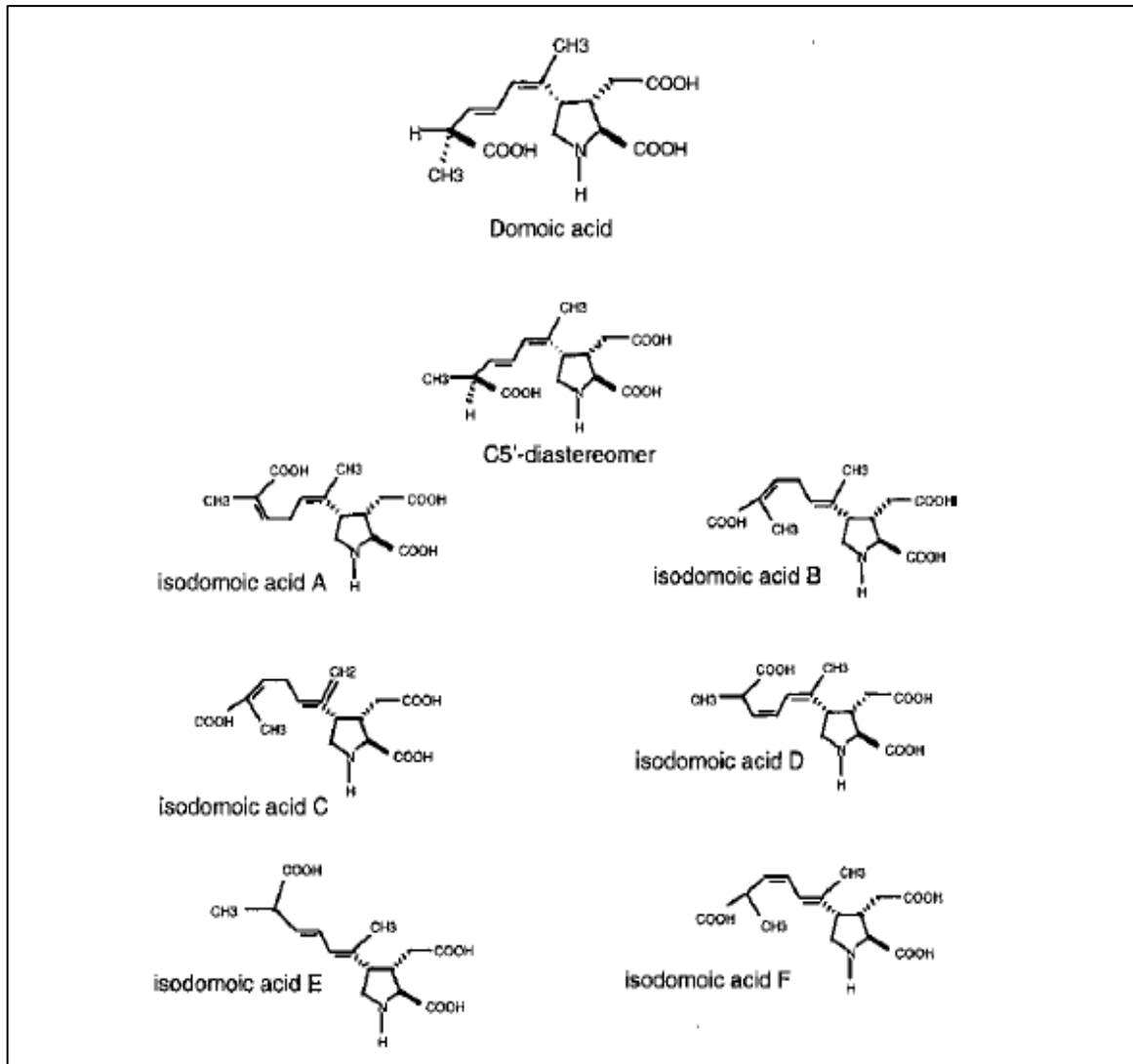


Figura 2: Estructura química del ácido domoico y sus isómeros. (Fuente: Botana, 2000)

### 2.3 Absorción de la biotoxina:

El ácido domoico se une con alta afinidad a los subtipos de kainato ( $K_d \sim 5$  nM) y AMPA ( $K_d \sim 9$  nM) del receptor de glutamato. La activación persistente del receptor de glutamato de kainato da como resultado un  $Ca^{2+}$  intracelular muy elevado a través de interacciones cooperativas con subtipos de receptores de glutamato NMDA y no NMDA y canales de

calcio dependientes de voltaje (Yang, 1995). La neurotoxicidad debida al ácido domoico produce un calcio intracelular elevado y lesiones posteriores en áreas del cerebro donde las vías glutaminérgicas están muy concentradas, particularmente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, áreas responsables del aprendizaje y el procesamiento de la memoria. Sin embargo, los déficits de memoria ocurren a dosis inferiores a las que causan daño estructural. El LD50 para el ácido domoico en ratas es de 4 mg / kg; sin embargo, la potencia oral es sustancialmente menor (35-70 mg / kg) (Lange, 1990). En el brote de 1987, la toxicidad humana se produjo a 1-5 mg / kg, lo que sugiere que los individuos susceptibles son más sensibles que los roedores a la toxicidad oral del ácido domoico. Los individuos que se encontraron más susceptibles fueron las personas de edad avanzada y las personas con función renal alterada que dieron como resultado un aclaramiento deficiente de la toxina. El aumento de la susceptibilidad de las personas de edad avanzada parece deberse a un deterioro del aclaramiento de toxinas, como indican los estudios en animales de experimentación y recién nacidos.

Experimentos realizados con roedores indican que el AD se deposita en la corriente sanguínea como una molécula hidrofílica, distribuyéndose a todos los tejidos, se elimina por la orina mediante filtración glomerular. La nefrectomía conlleva a la elevación plasmática e incremento de su ingreso cerebral mediante la barrera hematoencefálica que siempre limita su pase, aunque no en su totalidad (Suzuki, 1993). El AD al ser administrado a los roedores se observa una absorción lenta, la toxicidad se manifiesta con alrededor de diez veces la dosis tóxica por vía parenteral.

En humanos la ingesta de mariscos contaminados con ASP incluyen efectos gastrointestinales (por ejemplo, náuseas, vómitos, diarrea) y efectos neurológicos, que incluyen mareos, desorientación, letargo, convulsiones y pérdida permanente de la memoria a corto plazo (Botana, 2000).

#### ***2.4 El género *Pseudo-nitzschia* (H. peragallo. 1900):***

*Pseudo-nitzschia* es un género de microalgas representado por diatomeas pennadas cosmopolitas, sus principales características que las definen están relacionados a su tipo de hábitat exclusivamente planctónico-marino, se las puede encontrar solitarias o formando colonias escalariforme resultado de la superposición de los extremos de las células contiguas, la localización del rafe a nivel de la superficie valvar, la ausencia de poroides en las paredes del canal. Morfológicamente son células alargadas, fusiformes a estrechamente lanceoladas y con dos cloroplastos situados en su parte central (Ferrario *et al.*, 2002).

Las diversas especies de este género se diferencian esencialmente por la longitud y amplitud de la valva, longitud del traslape de las puntas valvares, forma de las puntas valvares, densidad lineal de interestrías y fíbulas y presencia del interespacio central (Lundholm *et al.*, 2002; 2011). En los últimos tiempos se están utilizando técnicas moleculares para definir a las especies debido a que muchas veces su diferenciación morfológica es complicada.

Tras el primer episodio de intoxicación humana ocurrido en Canadá por el consumo de mejillones contaminados con AD diversas investigaciones

dieron a conocer que al menos 12 especies del género *Pseudo-nitzschia* tienen la capacidad de producir esta biotoxina.

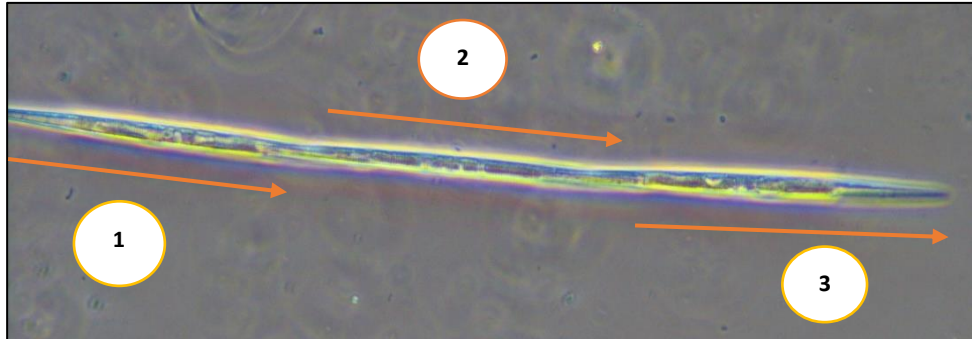


Figura 3: Cadena corta de *Pseudo-nitzschia*, formada por tres células observadas con microscopio con contraste de fases.

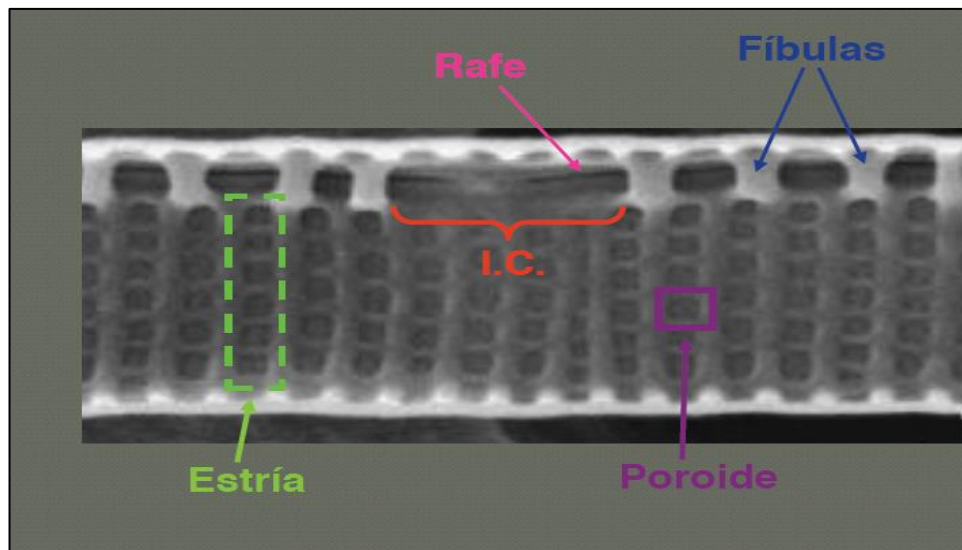


Figura 4: Estructuras principales que diferencian a las especies del género *Pseudo-nitzschia*: estría, rafe, fíbulas, poroides e interespacio central.

## ***2.5 Condiciones que favorecen el crecimiento de especies de Pseudo-nitzschia:***

Diferentes especies de *P. nitzschia* producen cantidades variables de toxina AD en diferentes partes del mundo bajo diferentes condiciones ambientales. Estudios realizados con *P. multiseriata* concluyeron que la producción de AD fue óptimo durante la fase estacionaria del ciclo de crecimiento y fue provocado por los bajos niveles de silicato y fosfato y por el alto nivel de nitratos, lo que reduce la división celular; mientras que cultivos hechos con la misma especie bajo las mismas condiciones no detectaron la biotoxina. La producción diferencial de AD por la misma especie de diatomeas en condiciones de cultivo idénticas puede estar relacionada con diferencias genéticas, contaminación bacteriana y / o morfología celular. Durante la fase estacionaria, las células sufren deformación y una reducción en el tamaño de sus células antes de la reproducción sexual. *P. pungens* produce AD diez días después de haber ingresado a la fase estacionaria. Los iones de amonio ralentizan la división de las células de la diatomea en cultivo pero inducen la producción de AD antes de la fase estacionaria. Estos resultados indican que la división celular reducida en la fase estacionaria puede de alguna manera iniciar la producción de AD por *P. multiseriata*. Estas condiciones ambientales y nutricionales variables en las aguas de diferentes partes del mundo pueden ser responsables de cantidades variables de producción de AD.

La temperatura es un factor determinante en las proliferaciones del género *P. nitzschia*, se ha reportado que su dominancia se da en ambientes fríos. Sin embargo, existen especies que pueden vivir hasta en 30°C (Villac *et al.*,

1993) y otras como *P. pungens* *F. multiseriis* que pueden habitar ambientes acuáticos con (-1 a 3 °C) no obstante, esto ha sido relacionado con factores externos que contribuyen al crecimiento celular. Se ha concluido que el rango óptimo de crecimiento para la mayoría de especies es de 14-20 °C.

La fotosíntesis es otro factor importante en el crecimiento de este género, este es un proceso donde la luz es capturada por organismos autótrofos y convertida en energía química, los cambios ambientales inducen a los organismos autótrofos ajustar su aparato fotosintético. Los diversos factores de estrés influyen en eventos asociados con los procesos fotosintéticos tales como transporte de electrones, fijación de carbono, entre otros. Estos cambios pueden estar relacionados con la producción de AD en *Pseudo-nitzschia*.

La orientación de las corrientes marinas también ha sido asociada con el crecimiento de las especies del género *P. nitzschia*, estudios descritos por (Villac *et al.*, 1993) indican que los movimientos verticales de agua fría con concentraciones de nitrógeno elevadas favorecen el crecimiento poblacional de *P. nitzschia multiseriis*, esta actividad contribuye al intercambio de nutrientes en la columna de agua.

La cantidad de luz también tiene una influencia considerable en la síntesis y producción de AD por el fitoplancton en cultivo. Durante el período de luz, la absorción de silicato por fitoplancton y ADN celular es alta. En ausencia de luz hay un rápido aumento en la división celular, acompañado por una reducción de ADN / célula, una captación mejorada de silicato y una mayor producción de AD (Lembeye *et al.*, 1991). Parece que el estrés fisiológico

causado por la reducción del silicato desencadena la producción de AD por parte del fitoplancton. Durante la fase exponencial, la fotosíntesis es alta debido a la mayor demanda de adenosina trifosfato (ATP) para diferentes procesos metabólicos. Sin embargo, como el crecimiento del fitoplancton disminuye durante la fase estacionaria, el ATP está disponible para la síntesis de AD (Konovalova *et al.*, 1993).

## ***2.6 Métodos de análisis para la detección de ácido domoico:***

### **2.6.1 Bioensayos**

#### ***2.6.1.1 Bioensayo en ratón:***

Este análisis es empleado en su mayoría para la detección de biotoxina paralizante (PSP), pero también permite detectar AD en concentraciones de aproximadamente 40 µg/g tejido. Se realiza la extracción con agua de la biotoxina en medio ácido, posteriormente se inyecta a los ratones 1 ml intra peritoneal. Se registra el tiempo de inyección y se espera aproximadamente 15 minutos; la muerte de los ratones debe estar dentro de este tiempo. Los ratones presentan típica sintomatología, se rascan los hombros con la pata trasera, seguido de convulsiones (FAO, 2005b). La desventaja de esta técnica radica en que su límite de detección no es confiable para el límite regulatorio (20 mg AD/ Kg carne de molusco).

## **2.6.2 Ensayos Químicos:**

### **2.6.2.1 Cromatografía líquida:**

En la actualidad esta es una de las técnicas más aplicadas para la detección de AD. Este método fue desarrollado por (Quilliam *et al.* 1995). Las separaciones más eficientes para el análisis de AD se logran con cromatografía líquida de fase revertida (CL-UV), el principio de esta técnica se basa en la extracción del tejido del bivalvo con una mezcla de metanol y agua. El extracto se filtra a través de un filtro de membrana y se mide utilizando un equipo HPLC con elución isocrática y detector UV. La cantidad de AD se calcula por el método del estándar externo.

La separación eficaz del AD se puede lograr utilizando condiciones isocráticas con la fase móvil que se administra a 1,0-1,5 ml / min. Se prefieren las fases ácidas móviles, y la mayoría de los trabajadores han usado una mezcla de acetonitrilo y agua acidificada con ácido tricloroacético (TCA) o ácido fosfórico (Yasumoto *et al.*, 1976). Para el análisis del ácido domoico en mariscos, se puede lograr un tiempo de retención de 7- 10 minutos con una mezcla de acetonitrilo / agua de 1: 4 (v / v), mientras que las muestras de suero requieren que el elución domoate a los 10-20 minutos para evitar picos interferentes, por lo que se prefiere una mezcla de acetonitrilo / agua de 1:10 (v / v).

### **2.6.2.2 Cromatografía de capa fina:**

El AD puede analizarse semicuantitativamente mediante cromatografía en capa fina (TLC). Se pueden aplicar muestras o patrones directos o concentrados (50-100 µL) a placas de TLC unidimensional (gel de sílice

60 de 250  $\mu\text{m}$  con indicador F254) y eluir con butanol / ácido acético / agua (3: 1: 1 v / v) solvente. Después del secado, la placa puede examinarse bajo una luz de 254 nm para detectar la presencia de una mancha de enfriamiento UV. Rociar la placa con una solución de 1% de ninhidrina hará que el ácido domoico aparezca como una mancha amarilla (Botana, 2000).

### **2.6.2.3 Electroforesis capilar**

Cohen *et al.*, (1992) describieron el uso de CE para el análisis del ácido domoico y de los isómeros domoato en mariscos. Se prepararon homogeneizados brutos en metanol y se aplicaron a una columna de intercambio aniónico fuerte (SAX) preacondicionada. El domoato y los isómeros se eluyeron con ácido fórmico y el eluyente se aplicó luego a una columna de intercambio catiónico fuerte (SCX) y se eluyó con un disolvente de tetraborato de sodio / acetonitrilo. El extracto limpio se aplicó luego a un sistema CE interconectado a un detector UV de longitud de onda variable que funciona a 242 nm. La resolución efectiva del ácido domoico y cinco isómeros de domoato se logró usando una fase líquida compuesta de tetraborato de sodio 22,5 mM que contenía 20 mM de  $\beta$ -ciclodextrina y un potencial de separación de 30 kV. Los volúmenes de inyección utilizados hacen que la técnica sea menos sensible que la HPLC para muestras de moluscos.

#### **2.6.2.4 Espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

En los últimos años, LC-MS y LC-MS-MS se han convertido en herramientas comunes cada vez mayores para muchos laboratorios de análisis por contrato, por lo que es bastante concebible que estas poderosas técnicas analíticas se vuelvan mucho más comunes en el futuro cercano. Además, la espectrometría de masas sigue siendo la técnica que la mayoría de las jurisdicciones consideran el método de confirmación legalmente aceptado para el ácido domoico (DA) y la mayoría de las otras toxinas de los mariscos.

A mediados del 2002, se realizó un estudio interlaboratorio con el nuevo método CL-EM para determinar toxinas ASP y DSP en mariscos (Holland *et al.*, 2005). Los ocho laboratorios participantes en general obtuvieron conjuntos de datos consistentes para el amplio grupo de toxinas analitos, hasta niveles bajos (< 5ng/ml, equivalente a 0,05 mg/kg) (FAO, 2005b). Los resultados fueron los esperados para aquellos interesados en métodos alternativos a los bioensayos en ratón, debido a que este método da un número relativamente alto de falsos positivos.

#### **2.6.3 Ensayos Bioquímicos:**

##### **2.6.3.1 Inmunoensayos:**

Se desarrolló un ELISA para detectar la presencia de AD en suero y orina de mamíferos, empleando anticuerpos policlonales producidos en conejos. El método fue eficaz para determinar concentraciones de AD en orina de rata, con un límite inferior informado de cuantificación de 40 ng/ml (FAO, 2005b).

Garthwaite *et al.* (1998) desarrollaron un ELISA grupal para toxinas ASP, NSP, PSP, DSP y yesotoxina para un bloque de muestras de mariscos contaminadas. La prueba ELISA detectó a un grupo de muestras sospechosas, lo que demostró la función de la técnica estandarizada.

### ***2.7 Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819):***

*Argopecten purpuratus*, es un Bivalvo, Pectinidae, que se encuentra distribuido a lo largo de las costas del Pacífico de Perú y del Norte de Chile, entre Paita y Valparaíso (Mendo, 2003). Los moluscos bivalvos al ser organismos netamente filtradores son susceptibles a la acumulación de biotoxinas, una de las más grandes problemáticas que enfrenta su cultivo.

Morfológicamente se caracteriza por poseer una concha grande, sólida, circular, moderadamente convexa, más larga que alta. Generalmente la valva derecha con una costilla menos que la izquierda, posee estrías de interrupción del crecimiento concéntricas bien marcadas (Figura 5). Es uno de los moluscos bivalvos que alcanza grandes niveles de exportación con mayor aceptación en el mercado europeo; posee importantes propiedades nutricionales donde destaca su contenido proteico. Es una buena fuente de fosfato, magnesio y de potasio, también destaca su aporte de vitamina B12 (Valenzuela *et al.*, 2011).

En el Perú podemos encontrar a *A. purpuratus* desde Paita a Ilo. Sin embargo, las principales zonas de producción se encuentran en Piura y Ancash. Por lo tanto, desarrollar investigaciones en las diversas zonas de

cultivo es primordial para contribuir con el crecimiento de esta actividad acuícola.

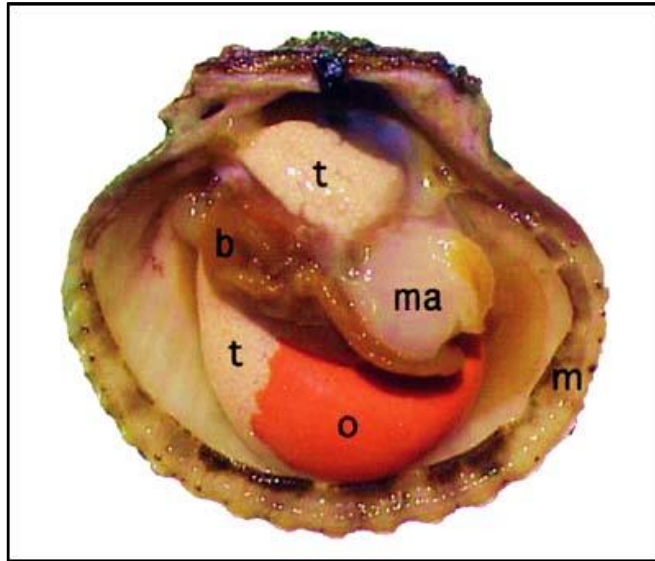


Figura 5: Anatomía interna de *Argopecten purpuratu* “concha de abanico” **ma** - músculo aductor; **b** - branquias; **m** - manto; **o** - ovario; **t** – testículo (Fuente: FAO, 2006).

### ***2.8 Fitoplancton nocivo en los bivalvos:***

Los moluscos bivalvos son organismos filtradores y como tales su relación con el fitoplancton es muy intensa. Los efectos positivos del fitoplancton como alimento, están bien asumidos entre los cultivadores de bivalvos en general, y de pectínidos en particular. Al igual que lo están los efectos negativos de materiales contaminados en suspensión tanto orgánicos como inorgánicos. La alteración del medio por parte del fitoplancton es proporcional a la biomasa. Este tipo de efectos está por tanto asociado a grandes proliferaciones de diatomeas o de dinoflagelados (Maeda, 2001). En las primeras fases de estos episodios, la actividad fotosintética durante el día es muy intensa y por tanto, el agua se hipersatura de oxígeno y

produce elevaciones de pH durante las noche se produce lo contrario, reduciéndose la concentración de oxígeno en el agua. Estos procesos son frecuentes en áreas de alta productividad. Representan un peligro especial en zonas donde los periodos de alta productividad fitoplanctónicas, se alternan con otros de acumulación de la biomasa contra la costa por el hundimiento de las masas de agua. Estos son factores, entre otros, que influyen en las floraciones algales nocivas, donde su actividad afecta el gasto energético, tasa de alimentación y ventilación de los moluscos bivalvos.

La acumulación de ácido domoico se representa en la figura 6.

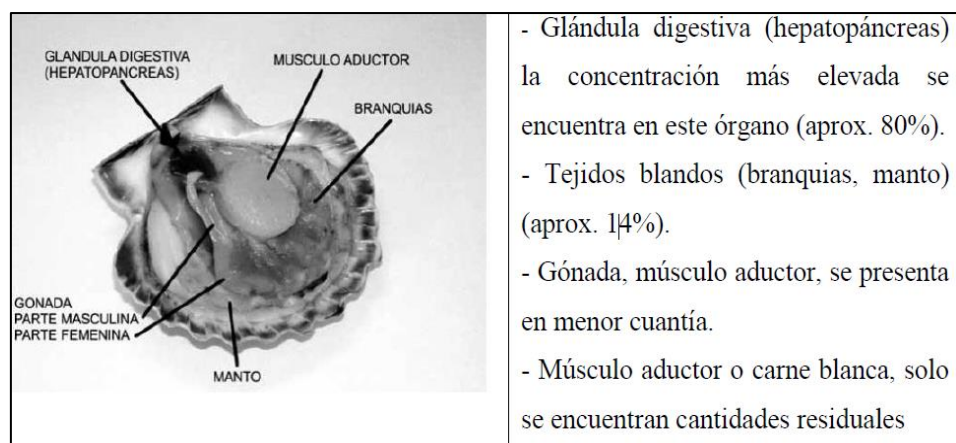


Figura 6: Distribución de la acumulación de AD en *A. purpuratus* (Fuente: AESAN, 2009)

## ***2.9 Impacto generado por la presencia de biotoxina amnésica (ASP) en la producción de moluscos bivalvos:***

En el mundo, los impactos generados por la presencia de biotoxina amnésica en la producción de moluscos bivalvos abarcan diversos aspectos, esto va a depender de la magnitud del evento tóxico, (Trainer, 2012) hace referencia que los más grandes eventos tóxicos se manifestaron en países como USA, España, Canadá e Irlanda; las consecuencias de estos brotes incluyen desde suspensiones de la cosecha de los moluscos hasta cierres permanentes. Eventos como los ocurridos en USA en 1991, donde se detectó niveles altos de AD en navajas provocado por *P. nitzschia australis*, provocando el cierre indefinido del área de cultivo, en Irlanda la presencia de AD en mejillones ocasionó la prohibición de venta de productos trayendo grandes pérdidas económicas. Otros países como Portugal, Escocia y Chile también se han visto afectados por la presencia de esta biotoxina, donde han ocasionado cierres temporales y suspensión de la cosecha hasta depuración. Recientemente, Argentina ha sido afectada por este tipo de floraciones nocivas donde la de mayor relevancia fue la ocurrida en el año 2010 donde la presencia de *P. nitzschia pungens*, *P. nitzschia calliantha* y *P. nitzschia fraudulentata* produjeron altas concentraciones de AD en concha de abanico, provocando la suspensión de la cosecha hasta la depuración de los organismos. En el año 2000 Chile sufrió la presencia de *P. nitzschia australis* en sus costas donde afectó la producción de concha de abanico suspendiendo la cosecha hasta depuración. Cabe resaltar que la mayoría de eventos tóxicos han sido propiciados por la especie *Pseudo-nitzschia*

*australis*, por lo que la capacidad que posee esta especie en producir altas concentraciones de AD en diversos ambientes acuáticos no está en discusión.

### ***2.10 mitigación de los episodios tóxicos***

Debido a que los episodios nocivos incluyen al desarrollo del fitoplancton, a los bivalvos y al hombre, los esfuerzos para disminuir sus impactos se han centrado en cada uno de esos aspectos.

La única lucha contra el desarrollo de proliferaciones nocivas realizada con éxito hasta el momento, fue hecha en Corea para combatir los episodios de *Cochlodinium polykrikoides*, la técnica consistió en la dispersión de arcillas en el agua, las que al sedimentarse arrastraron un porcentaje muy elevado de células nocivas (Tomas & Gerritsen 2000).

La aplicación biológica es otra manera de luchar con el desarrollo de poblaciones de fitoplancton nocivo, se ha descubierto que *Alexandrium catenella*, especie causante del veneno paralizante en mariscos (PSP), se ve afectado por la infección de un protozoo *Amoebophria ceratii*. Sin embargo, esto no se ha puesto en práctica a nivel masivo por temor a los impactos secundarios que pueda generar. La utilización de bacterias, virus y hongos resulta también en una posibilidad, estudios revelan que estos organismos pueden producir serios trastornos en el crecimiento poblacional de diversas especies de microalgas nocivas.

Una de las formas más viables de actuar sobre los bivalvos cuando adquieren toxicidad, consiste en diseñar tratamientos que eliminen los

tóxicos in vivo o en el procesado industrial. Se ha intentado de acelerar el proceso de depuración de toxinas PSP en diferentes organismos y con diversos compuestos como el ozono; pero los resultados no son los esperados. La eliminación más sencilla mediante el proceso industrial consiste en la eliminación de las partes del organismo que acumula mayor cantidad del tóxico, que para el caso de los pectínidos sería la glándula digestiva (Figura 6 ) que muy raras veces es consumida. La optimización de la regulación durante los episodios tóxicos, pueden disminuir las pérdidas. Por lo tanto, los sistemas de monitoreo se deben realizar de forma estratégica y sobre todo en periodos de cuarentena, esto se puede lograr con buena implementación de los sistemas de control e integración.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### ***3.1 Lugar de muestreo***

Las microalgas pertenecientes al género *Pseudo-nitzschia* fueron provenientes de la bahía de Samanco, ubicada en la provincia del Santa, Departamento de Ancash. La recolección de muestras se realizó de forma semanal debido a que condiciones oceanográficas de esta zona manifiestan cambios constantes; el estudio se llevó a cabo durante el periodo de julio a noviembre de 2017, meses en que la temperatura propicia el crecimiento de estos organismos, se estableció una única zona de muestreo (Fig.01). La identificación y aislamientos de las muestras se realizaron en el laboratorio de acuicultura de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### ***3.2 Recolección de muestras de fitoplancton y evaluación de los parámetros oceanográficos:***

La recolección de las muestras se hizo mediante arrastres verticales, empleando una manga de fitoplancton de 10  $\mu\text{m}$  utilizando el método descrito por (IMARPE, 2010), Figura 7. Los filtrados obtenidos fueron almacenados en frascos estériles de 200 ml debidamente rotulados (cuatro frascos por muestreo) y se enviaron bajo condiciones de refrigeración al laboratorio de Acuicultura de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Por otro lado, las sub muestras obtenidas fueron preservadas con

formalina al 10% y se observaron usando un microscopio en contraste de fases.

Durante el periodo de estudio se registraron los parámetros físico-químicos más importantes; tales como temperatura, pH, oxígeno y salinidad. Toda la información obtenida fue almacenada en un cuaderno de campo, posteriormente adjuntadas a tablas Excel. Asimismo, la data recopilada fue relacionada con la carga celular de *Pseudo-nitzschia* encontrada, de esta manera se realizaron gráficos que faciliten la interpretación de los resultados obtenidos.



Figura 7: Recolección de muestras de fitoplancton en la bahía de Samanco- Ancash (Método: IMARPE, 2010).

### ***3.3 Identificación, cuantificación y aislamiento de especies de género***

#### ***Pseudo-nitzschia:***

La identificación de las cadenas y dimensiones celulares se realizó usando un microscopio en contraste de fases, para este proceso las muestras se encontraron sin fijar. Una vez que se identificó la presencia de *P. nitzschia*,

se procedió al conteo de células empleando una cámara de sedimentación (cámara Utermohl) y un microscopio óptico invertido, siguiendo la metodología establecida por (IMARPE, 2010).

Para el aislamiento de las especies se siguió el método de aislamiento con pipeta y lavados sucesivos (Andersen & Kawachi, 2005), este método consiste en separar la especie identificada utilizando pipetas Pasteur con punta fina, para esto se coloca una gota de muestra más una gota de medio de cultivo Guillard  $f/2$  (Guillard & Ryther, 1962), en un portaobjeto, al visualizar la especie objetivo se procede a la absorción de la misma usando la pipeta, que fue preparada para tal fin, esta gota se coloca en otro portaobjeto que contiene dos gotas de medio  $f/2$  posteriormente, se vuelve a observar para comprobar la presencia de la especie separada; de no ser así el proceso tiene que ser repetido o en caso existan otras especies acompañando a la célula objetivo se debe volver a separar hasta lograr que la célula o cadenas de células queden solas.

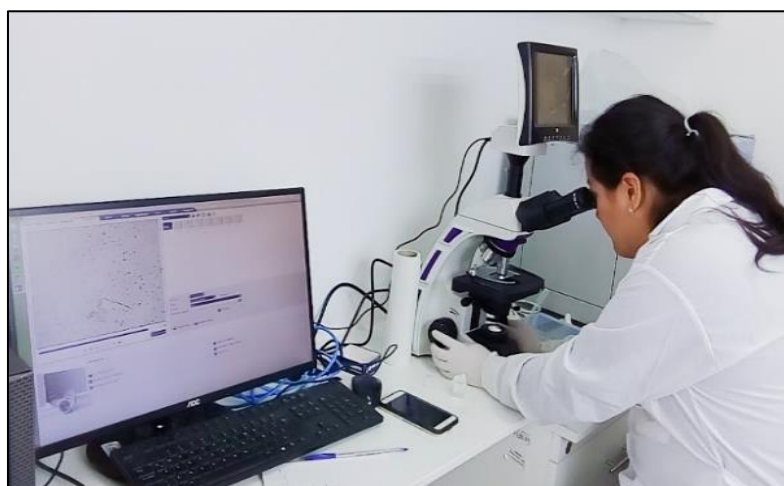


Figura 8: Recuento celular de las especies del género *Pseudo nitzschia*

### ***3.4 Cultivo de especies del género Pseudo-nitzschia:***

Una vez que se logró separar las especies de *P. nitzschia*, estas fueron colocadas en dos matraces de 50 ml siguiendo el método descrito por (Tenorio, 2014), en donde se colocó 10 ml de medio de cultivo *f/2*, los matraces fueron transferidos a una incubadora con un rango de temperatura de 14-15 °C, irradiancia  $92 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo 12:12 (luz-oscuridad). Los códigos asignados para cada uno de los matraces fueron SAM-01 y SAM-02. Después de tres días se visualizó crecimiento de las células, por lo que se procedió a desdoblar el contenido; para esto se utilizó agua de mar estéril y medio de cultivo *f/2* ( $1 \text{ ml/ L}^{-1}$ ).

Cabe resaltar que los intentos de cultivo se iniciaron a partir del segundo mes de muestreo hasta octubre, debido a que las concentraciones celulares encontradas en la bahía de Samanco en los meses de julio y noviembre fueron muy inferiores y no permitieron aislar las especies. Asimismo, el mejor resultado de cultivo se obtuvo en el mes de setiembre, aunque acompañado de una rápida fase de muerte; otros intentos favorecieron el crecimiento de las especies aisladas pero contaminadas con otras microalgas.

### ***3.5 Caracterización de especies del género Pseudo-nitzschia:***

Para la identificación estructural se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB), por lo que las muestras tuvieron que ser tratadas de la siguiente manera: primero se realizó la fijación en glutaraldehído al 2.5% seguido por lavados en agua destilada, luego se realizó una post fijación en

tetraóxido de osmio al 1% por 6 horas y nuevamente se procedió a lavar en agua destilada. Después de esto, las muestras ya se encontraron deshidratadas y pasaron a ser secadas a punto crítico para luego ser recubiertas en oro para su posterior observación. La identificación de las especies dependió de las formas de las estructuras más importantes que poseen este grupo de microalgas.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Lugar de muestreo

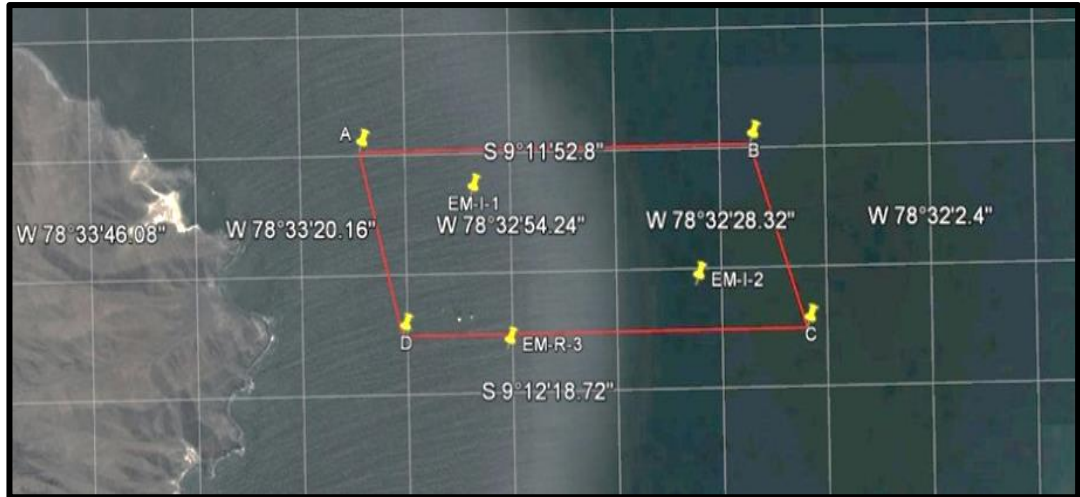


Figura 09. Zona de muestreo establecida en la bahía de Samanco (fuente Google Earth, 2018)

**Tabla 1:** Coordenadas geográficas de la zona de muestreo en la bahía de Samanco establecida para la recolección de fitoplancton.

| Zona de muestreo | Coordenadas geográficas |              |
|------------------|-------------------------|--------------|
|                  | Latitud                 | Longitud     |
| <b>EM-I-1</b>    | 9°11'52.8"              | 78°32'54.24" |
| <b>EM-I-2</b>    | 9°12'7.56"              | 78°32'28.32" |
| <b>EM-R-3</b>    | 9°12'18.72"             | 78°32'2.4"   |

Durante el periodo de estudio los muestreos se realizaron dentro de los puntos establecidos (fig.09), la captación de la muestra variaba según las condiciones oceanográficas dentro de la zona.

#### ***4.2 Recolección de muestras y evaluación de los parámetros oceanográficos:***

La recolección de muestras a 8 m de profundidad en la bahía de Samanco permitió identificar a los grupos *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* (PNGD) y *Pseudo-nitzschia grupo seriata* (PNGS). Los parámetros físico-químicos evaluados (temperatura, oxígeno, pH y salinidad) se detallan en la tabla 2. La relación que presentan las concentraciones celulares de PNGD y PNGS con las condiciones oceanográficas se muestran en las gráficas 1 y 2.

**Tabla 2:** Registro de los parámetros físico-químicos evaluados en la bahía de Samanco durante el periodo julio – noviembre del 2017.

| <b>FECHAS<br/>MUESTREADAS</b> | <b>PROFUNDIDAD<br/>(m)</b> | <b>TEMPERATURA<br/>(°C)</b> | <b>OXÍGENO<br/>DISUELTO<br/>(mg/L<sup>-1</sup>)</b> | <b>pH</b> | <b>salinidad<br/>(ppm)</b> |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---|-----------|----------------------------|
| 03/07/2017                    | 8                          | 18.6                        | 6.1   | 7.73      | 35.4                       |
| 10/07/2017                    | 8                          | 18.9                        | 5.8   | 7.77      | 35.7                       |
| 15/07/2017                    | 8                          | 17.1                        | 5.2   | 7.65      | 35.2                       |
| 24/07/2017                    | 8                          | 17.7                        | 5.7   | 7.71      | 35.5                       |
| 04/08/2017                    | 8                          | 17.63                       | 9.93  | 8.2       | 33.24                      |
| 14/08/2017                    | 8                          | 17.24                       | 8.44  | 7.44      | 33.21                      |
| 22/08/2017                    | 8                          | 17.5                        | 8.8   | 8.31      | 33.2                       |
| 28/08/2017                    | 8                          | 18.1                        | 10.2  | 8.4       | 33.26                      |
| 04/09/2017                    | 8                          | 17.18                       | 8.01  | 8.47      | 33.22                      |
| 11/09/2017                    | 8                          | 17.56                       | 8.67  | 8.31      | 35.19                      |
| 18/09/2017                    | 8                          | 15.74                       | 6.68  | 8.66      | 35.15                      |
| 25/09/2017                    | 8                          | 18.06                       | 9.56  | 8.72      | 35.25                      |
| 02/10/2017                    | 8                          | 16.4                        | 4.35  | 9.24      | 35.1                       |
| 09/10/2017                    | 8                          | 17.03                       | 7.1   | 8.12      | 35.21                      |
| 16/10/2017                    | 8                          | 14.5                        | 4.8   | 7.22      | 35.08                      |
| 23/10/2017                    | 8                          | 15.3                        | 5.9   | 7.29      | 35.1                       |
| 03/11/2017                    | 8                          | 15.65                       | 7.8   | 7.91      | 35.11                      |
| 11/11/2017                    | 8                          | 14.32                       | 2.25  | 7.67      | 34.97                      |
| 20/11/2017                    | 8                          | 16.25                       | 6.8   | 7.32      | 35.00                      |
| 27/11/2017                    | 8                          | 15.50                       | 7.7   | 7.88      | 35.12                      |

La temperatura fluctuó entre 14 y 18 C°, la salinidad se mantuvo en un promedio de 35 ppm y el pH entre 7 y 8. Sin embargo, los valores de oxígeno disuelto si mostraron variaciones, entre 2 y 10 mg/L<sup>-1</sup> durante las semanas evaluadas. Se puede observar una importante disminución de oxígeno disuelto durante la primera semana del mes de octubre y la segunda semana del mes de noviembre.

**4.3 Identificación de especies de género *Pseudo-nitzschia* por microscopio con contraste de fases:**

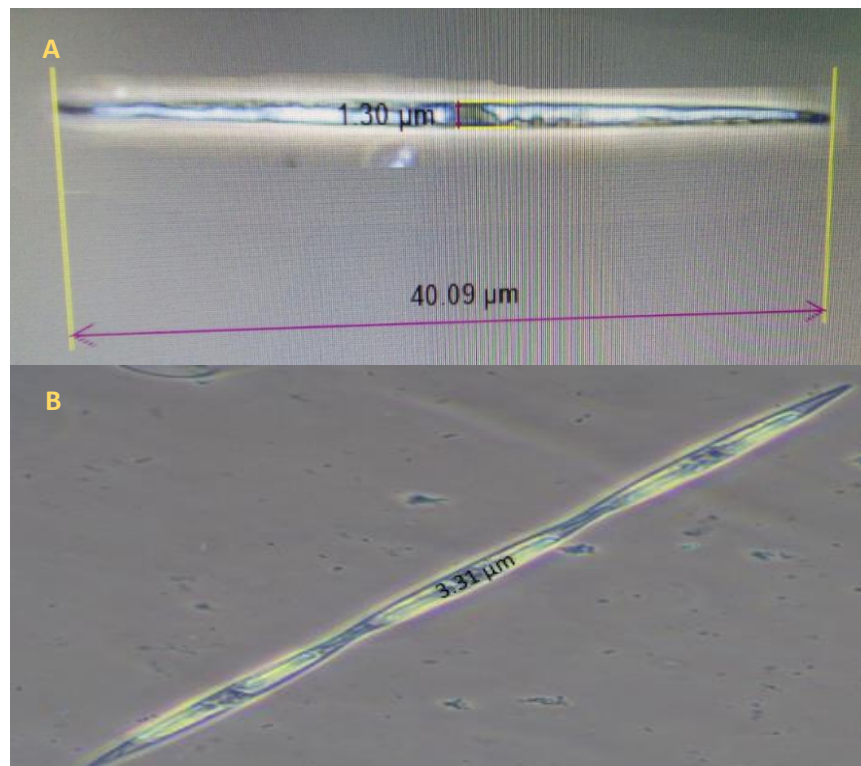


Figura 10: Especies pertenecientes a *Pseudo Nitzschia* grupo *delicatissima* (A) y *Pseudo Nitzschia* grupo *seriata* (B) observadas en microscopio con contraste de fases a 400 X; nótese que el eje transapical en A es menor a 3 µm, mientras que B presenta un eje transapical mayor a 3 µm.

#### 4.4 Cuantificación de las concentraciones celulares de los dos grupos del género *Pseudo-nitzschia*.

La cuantificación de concentraciones celulares de los grupos *P. nitzschia* grupo *delicatissima* (PNGD) y *P. nitzschia* grupo *seriata* (PNGS) en la cámara Utermohl dieron los siguientes resultados:

**Tabla 03:** Concentraciones celulares (cel/L<sup>-1</sup>) de los grupos *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima* (PNGD) y *Pseudo-nitzschia* grupo *seriata* (PNGS) provenientes de la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo julio a noviembre del 2017.

| FECHAS<br>MUESTREADAS | PNGD<br>(cel/L <sup>-1</sup> ) | PNGS<br>(cel/L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 03/07/2017            | 530                            | 250                            |
| 10/07/2017            | 500                            | 220                            |
| 15/07/2017            | 760                            | 120                            |
| 24/07/2017            | 200                            | 0                              |
| 04/08/2017            | 100                            | 100                            |
| 14/08/2017            | 4200                           | 240                            |
| 22/08/2017            | 4000                           | 230                            |
| 28/08/2017            | 4260                           | 300                            |
| 04/09/2017            | 20800                          | 2040                           |
| 11/09/2017            | 34520                          | 1600                           |
| 18/09/2017            | 1280                           | 2300                           |
| 25/09/2017            | 17040                          | 450                            |
| 02/10/2017            | 84182                          | 80                             |
| 09/10/2017            | 4200                           | 100                            |
| 16/10/2017            | 3200                           | 250                            |
| 23/10/2017            | 7400                           | 240                            |
| 03/11/2017            | 3000                           | 150                            |
| 11/11/2017            | 4200                           | 0                              |
| 20/11/2017            | 7040                           | 0                              |
| 27/11/2017            | 9550                           | 0                              |

Durante los meses de setiembre a octubre se muestra mayor variación de las concentraciones celulares de los grupos PNGD y PNGS; el grupo PNGD evidencia mayor presencia en la bahía de Samanco, este incremento coincide con la disminución de oxígeno disuelto en los meses indicados.



Gráfico 1: Fluctuación de la carga celular de *Pseudo-nitzschia grupo seriata* (cel/L<sup>-1</sup>) en relación a la temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/L<sup>-1</sup>) registrado en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio-noviembre del 2018.

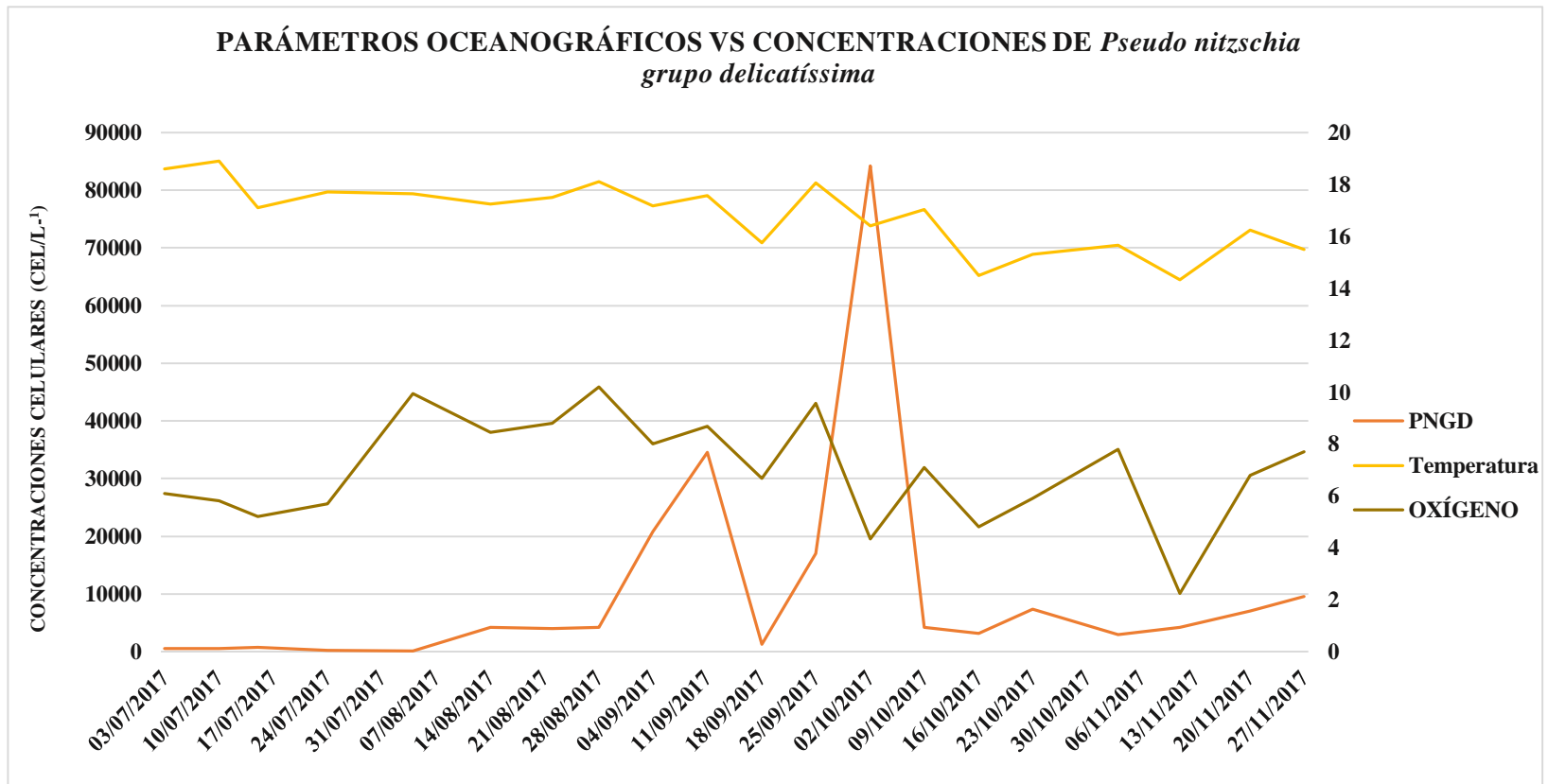


Gráfico 2: Fluctuación de la carga celular de *Pseudo-nitzschia* grupo *delicatissima* (cel/L<sup>-1</sup>) en relación a la temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/L<sup>-1</sup>) registrado en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio-noviembre del 2018.

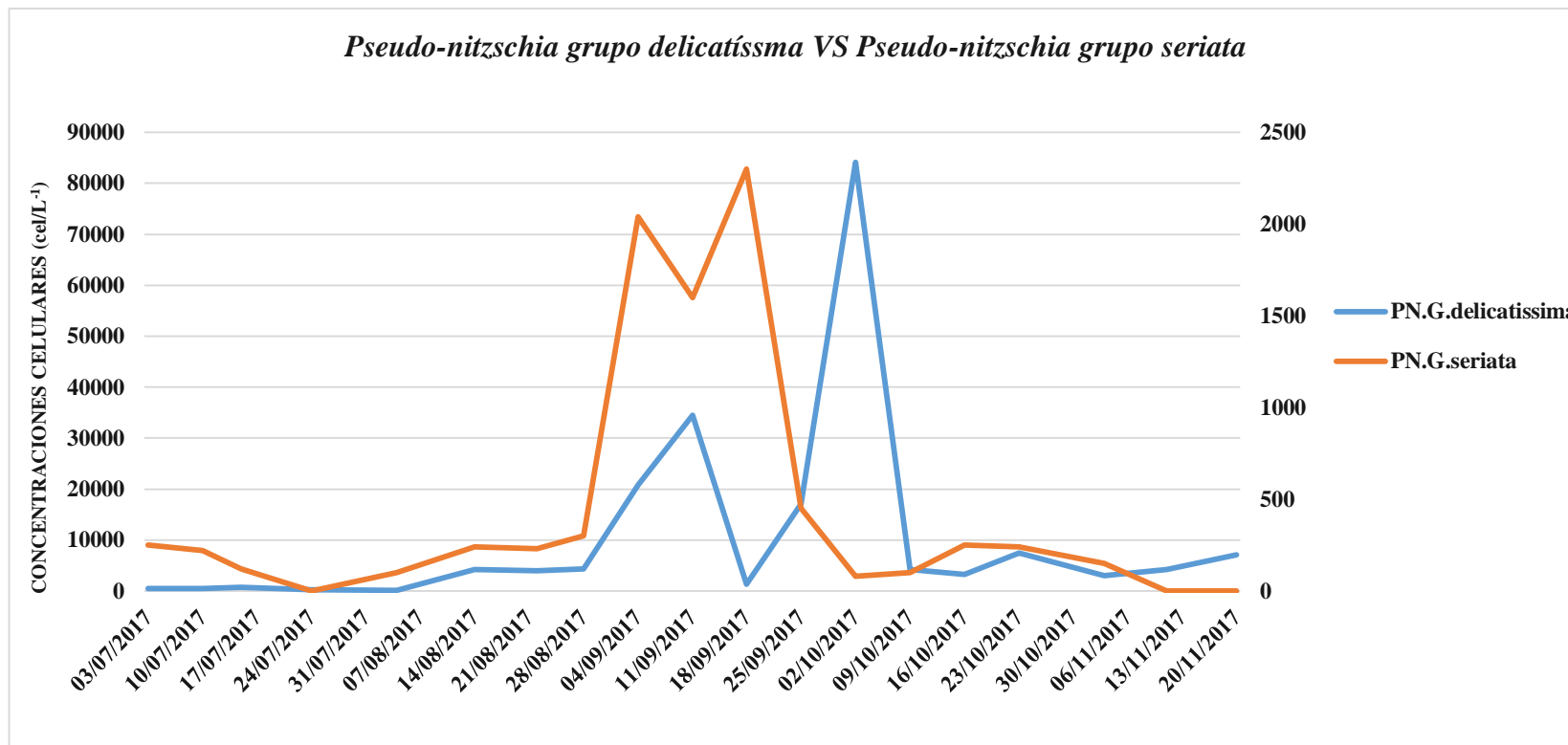


Gráfico 3: Fluctuaciones de las concentraciones celulares los grupos *Pseudo-nitzschia grupo seriata* y *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* en la bahía de Samanco – Ancash, durante el periodo de julio a noviembre del 2017.

#### 4.5 Aislamiento y cultivo de especies de género *Pseudo-nitzschia*:

La técnica del pipeteo descrita por (Andersen & Kawachi, 2005), permitió aislar a *Pseudo-nitzschia subpacífica* (Figura 11 y 12), esta especie pertenece al grupo PNGS (Figura 10 B). Las condiciones ambientales establecidas en el cultivo de las células aisladas favoreció el crecimiento poblacional de esta especie (SAM-1 y SAM-02), la curva de crecimiento celular se evidencia en las gráficas 4 y 5; las mismas que coinciden en crecimientos paulatinos.

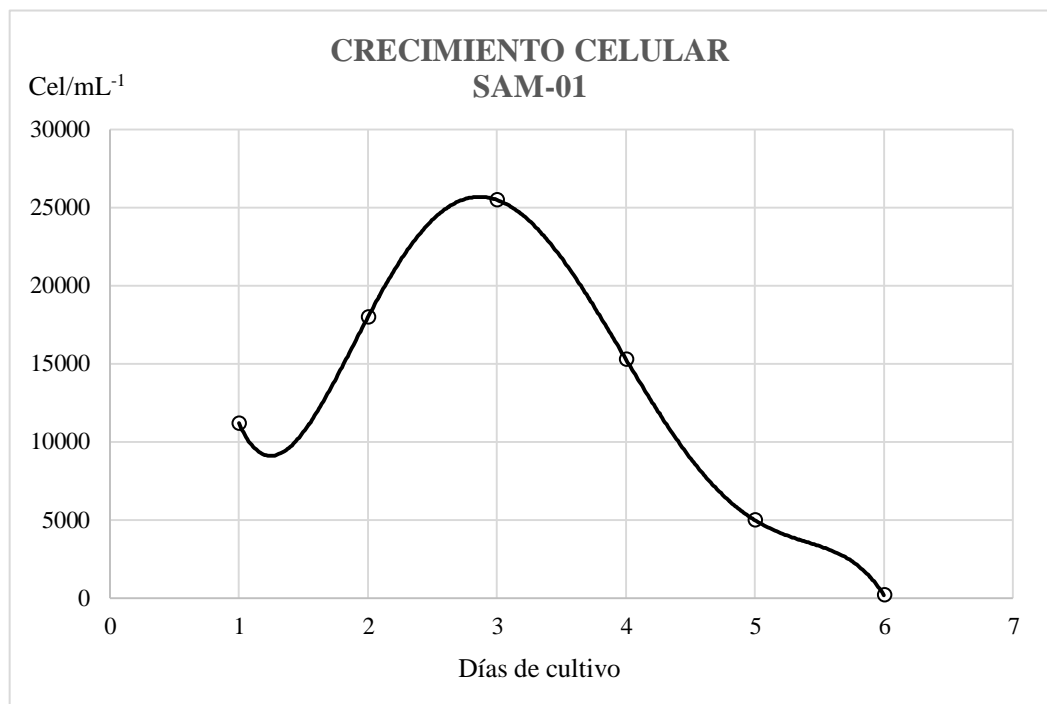


Gráfico 04: Curva de crecimiento celular de *Pseudo-nitzschia subpacífica* presentes en SAM-1, se muestra la fase exponencial en el día 3.

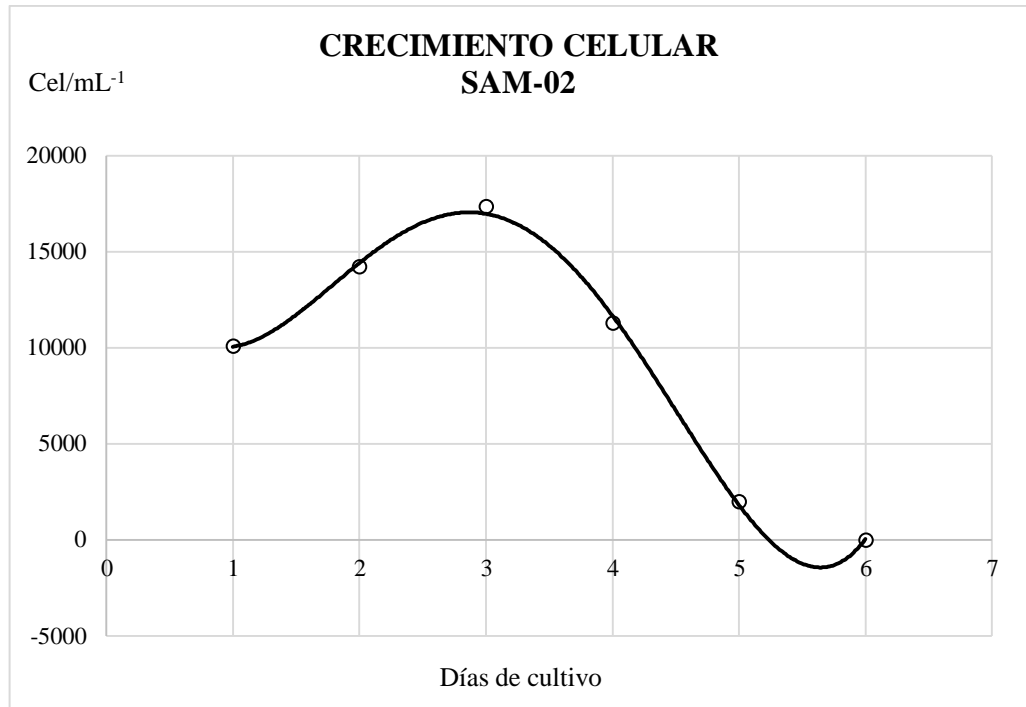


Gráfico 05: Curva de crecimiento celular de *Pseudo-nitzschia subpacífica* presentes en SAM-2, se muestra la fase exponencial en el día 3.

#### ***4.6 Caracterización de Pseudo-nitzschia subpacífica por microscopía electrónica de barrido:***

*Pseudo-nitzschia subpacífica* muestra valvas asimétricas con extremos lanceolados (Figura 11), evidencian dos hileras de poroides (Figura 12) con interespacio central. Al formar colonias muestran superposición de los extremos celulares (1/4).

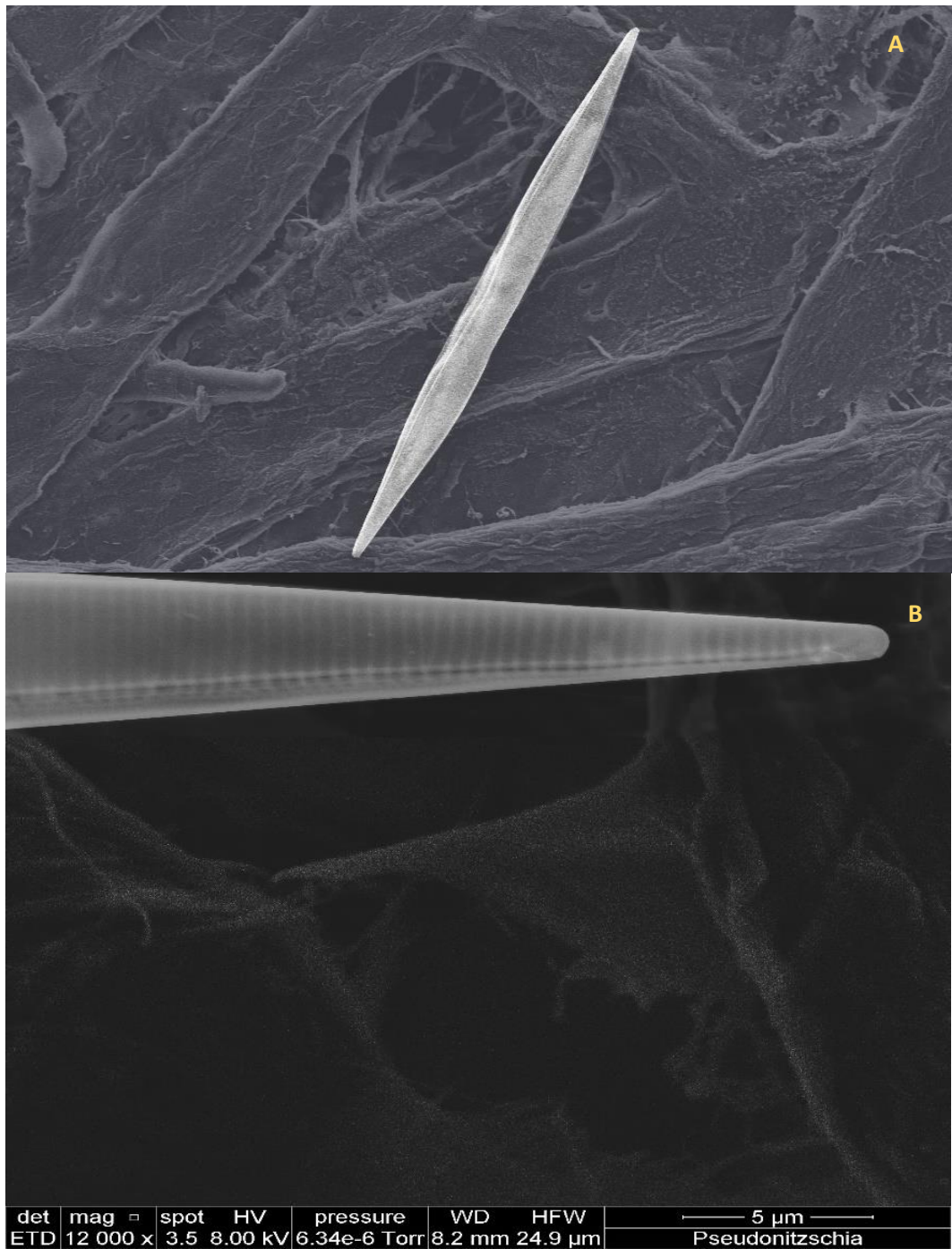


Figura 11: *Pseudo-nitzschia subpacífica* (MEB), aspecto general de la valva con extremos lanceolados(A); vista interna de uno de los extremos valvares (B). Escalas: Fig. A: 10 µm; Fig. B: 5 µm;

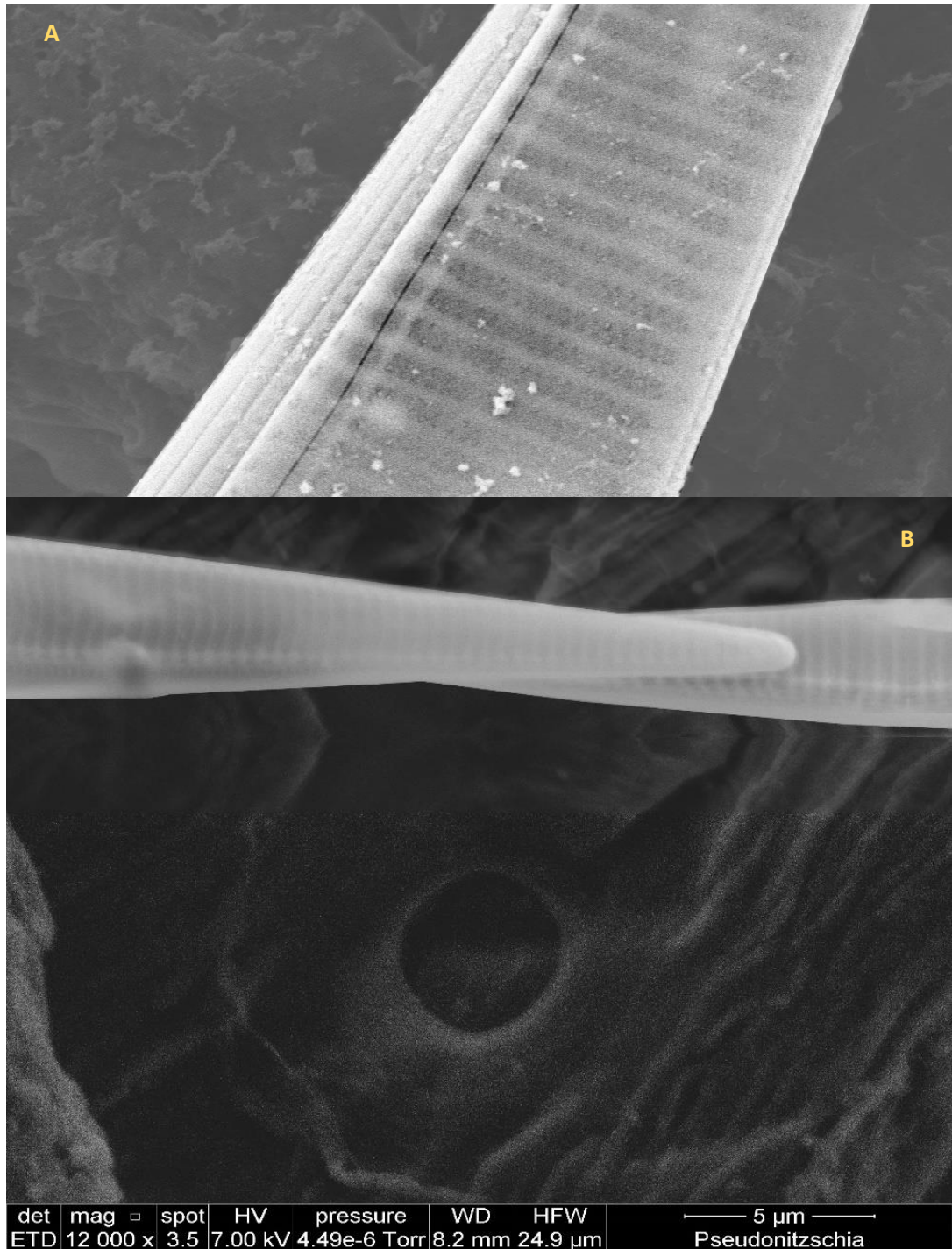


Figura 12: *Pseudo-nitzschia subpacífica* (MEB), vista interna de estrías, fíbulas y dos hileras de poroides(A); superposición de extremos celulares (B). Escalas: Fig. A: 1 µm; Fig. B: 5 µm.

## V. DISCUSIÓN

Durante el periodo de muestreo se identificaron a los grupos *P. nitzschia delicatissima* y *P. nitzschia seriata* (Tabla 3); los resultados muestran que las condiciones oceanográficas de la bahía de Samanco favorecen el crecimiento de *P. nitzschia grupo delicatissima* (gráficos 2 y 3); esto puede estar relacionado a la ventaja que presenta este grupo en poder crecer en condiciones bajas de silicatos y nitratos (Cusak et al. 2002).

Estudios realizados por (Santiago, 2011) demuestran que los factores ambientales y el estrés fisiológico está directamente relacionado con la población celular de este género y a su vez con la producción de AD. Por ello, se puede afirmar que la disminución de la temperatura y oxígeno disuelto (gráficos 1 y 2) propiciaron condiciones favorables para el crecimiento poblacional del género *P. nitzschia* durante la última semana del mes de setiembre y la primera semana del mes de octubre. Estos factores están íntimamente relacionados con la fotosíntesis, por ende su disminución afecta la producción de micro y macro nutrientes en el ambiente acuático, (Pan *et al.*, 2001) reporta que la energía de la fotosíntesis es requerida directamente para la producción de AD en *P. nitzschia*. ; (Wells *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2002) hacen hincapié que la disponibilidad de nutrientes es otro factor fundamental que influye en la producción de este tipo de microalgas; la bahía de Samanco se caracteriza por su alta concentración de nutrientes (IMARPE, 2010) lo que indica que las proliferaciones de microalgas nocivas pueden ser

frecuentes. Por otro lado, la salinidad y el pH se mantuvieron constantes en la zona de muestreo.

Las condiciones aplicadas en el cultivo de especies del género *Pseudo-nitzschia* favoreció el crecimiento de *Pseudo-nitzschia subpacífica* (Figuras 11 y 12), estas células se caracterizan por presentar asimetría con respecto al plano de la valva apical, menos fíbulas que estrías, poseen interespacio central y dos hileras de poroides. (Moschandreou *et al.*, 2012; Rivera, 1985).

En un principio los aislamientos se mantuvieron separados (SAM-1 y SAM - 2) creyendo que se trataban de especies distintas. Asimismo, el crecimiento de *P. nitzschia subpacífica* fue paulatino, la fase exponencial se pudo evidenciar al tercer día en ambos cultivos acompañados de una rápida fase de muerte (gráficas 4 y 5). Este fenómeno pudo estar relacionado a la irradiancia y/o temperatura del cultivo, debido a que durante el estudio estos factores eran muy vulnerables en el ambiente acondicionado. (Bates *et al.*, 1991) manifiesta que la irradiancia es un factor que puede influir en la producción de AD debido a que afecta directamente la actividad fotosintética. La concentración celular máxima alcanzada fue de  $25500 \text{ cel/mL}^{-1}$  lo que dificultó la aplicación del método estandarizado para la detección de AD directamente en el cultivo.

*P. nitzschia subpacífica* ha sido reportada en las costas de Chile (Rivera; 1985 & Hasle, 1972) donde es descrita como una especie no tóxica. Sin embargo (Krayevsky *et al.*, 2009; Moestrup & Lundholm, 2007) indican que se ha detectado niveles de AD en el norte del Golfo de México producido por esta especie y se relaciona su incremento poblacional con la eutrofización que presentan esos cuerpos de agua; lo más probable es que las actividades

pesqueras y acuícolas desarrolladas en la bahía de Samanco este influyendo en la floración de esta especie. No obstante, existen reportes de altas concentraciones celulares de los grupos de *P. nitzschia* en el norte del Perú sin llegar a detectar la toxina, por lo que es probable que otro factor este participando en la codificación de la toxina.

*P. nitzschia subpacífica* fue reportada en el 2013 por primera vez en las costas de Perú específicamente en la isla San Lorenzo por (Tenorio, 2014), la especie fue aislada en condiciones oceanográfica similares a las registradas en esta investigación. No obstante, los análisis en Espectrometría de Masa/Masa (LC-MS/MS) para AD dieron resultados no detectables.

Durante el periodo de estudio, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera no reportó la presencia de AD en los análisis de tejidos de *Argopecten purpuratus* provenientes de la misma de la misma zona de muestreo, el equipo HPLC empleado por la autoridad sanitaria posee un límite de detección de 0,42 mg AD/kg carne. Por lo tanto, durante este periodo no se manifestaron impactos negativos en la producción de *Argopecten purpuratus* propiciados por la presencia de Biotoxina Amnésica.

Estudios realizados en Chile indican que la detección de la toxina amnésica se da cuando existe dominancia del 90% de *P. nitzschia* tóxica y estas alcanzan valores máximos de densidad a los 7 a 10 días de su detección (Pizarro *et al.*, 2000). En nuestro caso las concentraciones celulares detectadas de *P. nitzschia* se encontraron por debajo de los niveles de riesgo. Sin embargo, en las revisiones mundiales de (Trainer *et al.*, 2012) manifiestan que en las costas de Perú existen altas concentraciones celulares de *P. nitzschia pungens* y *P.*

*nitzshia australis*, ambas descritas como potencialmente tóxicas (Hasle, 1995, 2002); la última especie ha sido causante de los episodios más graves de intoxicación en diferentes partes del mundo ocasionando, en algunos casos, cierres indefinidos de la zona de extracción seguida de grandes pérdidas económicas. Aunque *P. australis* ha sido reportada por los autores antes mencionados, su presencia no ha sido registrada por las autoridades competentes, lo que no sucede con *P. nitzschia seriata* y *P. nitzschia pungens*, que si fueron reportadas en el litoral peruano. Esto revela que el mar peruano no está ajeno a las floraciones nocivas producidas por este género, aunque hasta la actualidad no existen registros de toxicidad, este es un fenómeno que se debe continuar investigando por las consecuencias severas que ocasiona.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se registraron los principales parámetros físico-químicos en la bahía de Samanco; donde la temperatura y disponibilidad de oxígeno disuelto influyen en el incremento poblacional del género *Pseudo-nitzschia*.
2. Se identificaron los grupos *Pseudo-nitzschia grupo delicatissima* y *Pseudo-nitzschia grupo seriata*, el aumento de las concentraciones celulares se mostró favorecido por condiciones acuáticas adversas.
3. Se logró aislar y cultivar a *Pseudo-nitzschia subpacífica*, se evidenció un crecimiento paulatino con una rápida fase de muerte.
4. Se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (MEB) a *Pseudo-nitzschia subpacífica*; en la actualidad existen evidencias de la capacidad tóxica de esta especie.
5. Durante el periodo de estudio la autoridad sanitaria nacional no reportó la presencia de Biotoxina Amnésica.

## VII. RECOMENDACIONES

- Investigar las variables externas e internas que influyen en el cultivo de especies del género *Pseudo-nitzschia* presentes en el mar peruano.
- Cultivar a *Pseudo-nitzschia subpacífica* modificando factores ambientales tales como temperatura, pH y fotoperiodo.
- Realizar estudios genéticos de especies del género *Pseudo-nitzschia* presente en el litoral peruano.
- Elaborar mapas de análisis de riesgos en las zonas de mayor extracción de moluscos bivalvos, donde se priorice la mitigación de los efectos en la salud pública.
- Realizar investigaciones similares en todas las zonas donde se desarrolla el cultivo de moluscos bivalvos.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición [AESAN]. (2008). European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins. Sitio web: <http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/home.shtml>

Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición [AESAN]. (2009). (Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) sobre los criterios de seguridad aplicables al contenido de ácido domoico en la vieira (*Pecten maximus*) para su recolección; revista del comité científico N° 10, 2009-009, 41-52.

Álvarez, P. (2009). Ácido Domoico e Intoxicación Amnésica por Moluscos en Salud Pública. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 26(4), pp. 505-16.

Andersen, R. & Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae Isolation Techniques. En: Andersen, R.A. (ed), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. E.U.A., pp. 83-100.

Baltazar, M & Palacios, J. (2015). La acuicultura en el Perú: producción, comercialización, exportación y potencialidades. ReseachGate, VII, pp. 293-305.

Bates, S., Freitas, D., Milley, J., Pocklington, R., Quilliam, M., Smith, J., Worms, J., (1991). Controls on Domoic Acid Production by the Diatom *Nitzschia pungens f. multiseries* in Culture: Nutrients and Irradiance". Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1136-1144.

Bell, A., (2003). Nonprotein amino acids of plants: significance in medicine, nutrition, and agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2854-2865.

Botana, L. (2000). Amnesic Toxic Episodes. En *Seafood and Freshwater Toxins* (325-383). España: Editorial BOARD.

Cohen, C. Ertel, E. Smith, M. Venema, V. Adams, M. Lebowitz, M. (1992). High affinity block of myocardial L-type calcium channels by the spider toxin  $\omega$ -agatoxin IIIA: advantages over 1,4-dihydropyridines. *Mol Pharmacol* 42:947-951

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios [COFEPRIS]: (2005). Instrucción de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotoxinas marinas. Secretaría de Salud. Sitio web: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Documents/Lineamiento%20de%20Trabajo%20Muestreo%20y%20Deteccion.pdf>

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

De Franssu, L., (1990). The world market for bivalves - oyster - mussel - clam - scallop. *FAO Globefish Research Programme*, pp 4:117.

Estrada, M. Sar, E. & Reguera, B. (2002). Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano* (21-44). España: Instituto Español de Oceanografía.

Ferrario, M., Sar, A & Sala, S. (2002). Diatomeas potencialmente toxígenas del cono Sur Americano. 167-194. En: Sar, E. A., M. E. Ferrario y B. Reguera (Eds.). Floraciones algales nocivas en el cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Madrid. 311 p.

Garthwaite, Ross K., Miles, C. Hansen, R. Foster, D. Towers, N. (1998) An immunoassay for determination of domoic acid in shellfish and sea water. In: B Reguera, J Blanco, ML Fernandez, T Wyatt, eds., Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 559–562.

Glibert P. & Pitcher G. (2001). Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms (GEOHAB); science plan. An International Programme sponsored by the Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) and the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC). UNESCO document.

Guillard, L. & Ryther, H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of microbiology 8: pp. 229-239.

Hallegraeff, G. Anderson, D. & Cambella, A. (1995). Manual on Harmfull Marine Microalgae. Julio 22, 2016, de Intergovernmental Oceanographic Commission.

Sitio

web:

[http://www.whoi.edu/cms/files/Anderson\\_etal\\_1995\\_cystchapter\\_31145.pdf](http://www.whoi.edu/cms/files/Anderson_etal_1995_cystchapter_31145.pdf)

Hasle, G. R. (1972). The distribution of *Nitzschia seriata* and allied species. *Nova Hedwigia, Beith.* 39:171-190.

Hasle, G. R. (1995). *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae) nomenclatural history, morphology, and distribution. J. Phycol., 31: 428-435.

Hasle, G. R. (2002). Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia*? Harmful Algae, 1: 137-146. Ferrario, M. E., E. A. Sar y S. E. Sala. 2002. Diatomeas potencialmente toxígenas del cono Sur Americano. 167-194. En: Sar, E. A., M. E.

Hernández, D. (2014). Biodiversidad de algas planctónicas marinas (Cyanobacteria, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatophyceae, Parmophyceae, Raphidophyceae, Bacillariophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinoflagellata) en México. Rev. Mexicana de Biodiversidad, pp 2-5.

Holland, P., Selwood, A., Mountfort, D., Wilkins, A., McNabb, P., Rhodes, L., Doucette, G., Mikulski, C, King, K, (2005). Isodomoic Acid C, an Unusual Amnesic Shellfish Poisoning Toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. Chem. Res. Toxicol. 18: 814-816.

Instituto del Mar del Perú [IMARPE]. (2008). Informe Final: Estudio de Línea Base en el ámbito marino de la bahía de Samanco, pp 13 – 24

Instituto del Mar del Perú [IMARPE]. (2010). Manual de procedimientos para el muestreo y ensayo semicuantitativo y cuantitativo de fitoplancton potencialmente tóxico. Sitio web: [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe\\_res\\_de\\_210\\_2010\\_fitop.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_res_de_210_2010_fitop.pdf)

Johnson, J. Alahi, A & Fei-Fei, L. (2016). Porceptual Losses for Real-Time style Tranfer and Super-Resolution. Cornell University Library, pp 4.

Konovalova, G. (1991). Toxic and potentially toxic dinoflagellates from the far east coastal waters of the USSR. In: TJ Smayda, Y Shimizu, eds. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Newport (USA). Amsterdam: Elsevier, 1993, pp 275–279.

Krayevsky, D., Meave del Castillo E., Zamudio, Norris, J. & Frederique, S. (2009). Diatoms (Bacillariophyta) of the Gulf of Mexico. In: Felder, D. L. & D. K. Camp. Gulf of Mexico origin, waters, and biota. Vol. 1, Biodiversity. Texas A & M University Press. College Station, Texas. pp. 155–186.

Lange, W. (1990). Puffer fish poisoning. *Am Fam Physician* 42:1029–1033.

Lefebvre, K. Powell, C. Busman, M. Doucette, G. Moeller, P. Silver, J. Miller, P. Hughes, M. Singaram, S. Silver, M. & Tjeerdema, R. (1999). Detection of Domoic Acid in Northern Anchovies and California Sea Lions Associated with an Unusual Mortality Event. *Nat. Toxins* 7, pp. 85-92

Lembeye, G., Yasumoto, T. Zhao, T. Fernández, J. (1991). DSP outbreak in Chilean fjords. In: TJ Smayda and Y Shimizu, eds. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Proceedings of Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Newport (USA), Amsterdam: Elsevier, 1993, pp 525–529.

Loaharanu, P. (2001). Creciente demanda de los alimentos inocuos: La tecnología de las radiaciones constituye una respuesta oportuna. Boletín de la OIEA, pp. 6.

Lundholm, N., Daugbjerg, N., Møestrup, Ø., (2002). Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) based on partial LSU rDNA. Eur. J. Phycol. 37: 115-134.

Lundholm, N., (2011). Bacillariophyta, IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.

Maeda – Martínez, A.N. (ed.) (2001). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México, 501 pp.

Maldonado, M., Hughes.M., Rue, E. Wells, M.,(2002). The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *Pseudo-nitzschia australis*. Limnol. Oceanogr. 47(2): 515–526.

Mancera, J. Gavio, B & Arencibia, G. (2013). Floraciones algales nocivas, intoxicación por microalgas en impactos en el desarrollo regional: El caso de San Andrés isla, Caribe Colombiano. Universidad Nacional de Colombia, pp 4.

Mendo, J. & M. Wolff. (2003). El impacto del Niño sobre la producción de concha de abanico en bahía Independencia, Pisco, Perú (*Argopecten purpuratus*). Ecol. Apl., 2: 51-57.

Moestrup, Oe., Lundholm, N., 2007. IOC taxonomic reference list of toxic plankton algae diatoms. Disponible en : <http://www.bi.ku.dk/ioc/group1.asp>.

Mora, M. Ascón, D. & Hung, A. (2015). Evaluación y validación de la prueba de qPCR para el control y monitoreo de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* en las bahías de Guaynuna y Salinas. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 3(1), pp.13-22.

Morales, S. & García, 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, pp. 82-94

Moschandreou, K. Papaefthimiou, D. Katikou, P, Kalopesa. E, Panou. A & Nikolaidis, G. (2010). Morphology, phylogeny and toxin analysis of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) isolated from the Thermaikos Gulf, Greece. *Phycologia* 49(3): 260–273.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2003). *Visión General del Sector Acuícola*, pp. 15.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2014). *Desafíos de la Acuicultura Mundial*, pp 97.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2006). *Cultivo de Bivalvos en Criadero*. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/y5720s/y5720s06.htm#bm06.1>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2015a). *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*. Programa Mundial de Alimentos, pp. 15.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2015b). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. BIOTOXINAS MARINAS, pp. 97

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera-SANIPES.2016. Control Oficial de Zonas y Áreas de Producción Clasificadas de Moluscos Bivalvos, Perú. REV.01.

Pan, Y. Parsons, M. Busman, M. Moeller, P. Dortch, Q. Powell, C. Fryxell, G. & Doucette, G. (2001). *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* – a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. Mar. Ecol. Prog. Ser. 220: 83–92.

Perl T, Dedard L, Kosatsky T, Hockin J, Todd E, Remis R (1990). An outbreak of toxic encephalopathy by eating mussels contaminated with domoic acid. New Engl J Med 322:1775–1780.

Pizarro, G., M. Fauré, C. Salgado, L. Guzmán, H. Pacheco, C. Alarcón, M. Banciella & R. Igor, (2000). Análisis de VAM en vectores de la región de Magallanes. In II Seminario-Taller de Floraciones de Algas Nocivas: Enfoque Interdisciplinario e Intersectorial en la Búsqueda del Desarrollo Humano. Punta Arenas, Chile, Noviembre 2000: 9-10.

Quilliam, M; Xie M; Hardstaff, W. (1995). A rapid extraction and cleanup procedure for the liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. J AOAC Int. 78: 543-554.

- Rivera, P. (1985). Las especies del género *Nitzschia* Hassall, sección *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae), en las aguas marinas chilenas. *Gayana Bot.* 42(3-4): 9-38.
- Ruiz, L. (2012). Estado de la Acuicultura en el Perú. *Revista AquaTIC*, n°37, pp. 99-106
- Santiago, S. (2011) Potencial Tóxico de Cepas de *Pseudo-nitzschia* Aisladas de la Costa Occidental de Baja California. Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con Orientación en Biotecnología Marina. pp 161
- Simón, N. Cras, E. Foulon & R. Lemée. (2009). Diversity and evolution of marine phytoplankton. *C. R. Biologies* 332:159-170.
- Suárez, B. López, 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. Instituto Español de Oceanografía, pp. 259-266.
- Suzuki C, Hierlihy S. Renal clearance of domoic acid in the rat. *Food Chem Toxicol.* (1993); 31(10): 701-6.
- Tenorio C., (2014). Veneno Amnésico en Especies de *Pseudo-nitzschia* en la Costa Central del Perú y su Riesgo para la Producción de Pectínidos. Universidad Agraria La Molina – Perú, pp. 13.
- Thomas, H & Gerritsen, J. (2000). The most effective and enviromentally friendly way of killing algae. Pp. 61. Ninth Interntional Conference on Harmful Algal Blooms. Hobart. Tasmania. Australia.

Trainer, V. Hickey, B. Bates, S., (2008) . Toxic Diatoms, In: Walsh, P.J., Smith, S.L., Fleming, L.E., Solo-Gabriele, H., Gerwick, W.H. (Ed.), Oceans and human health: risks and remedies from the sea. Elsevier Science, New York, pp. 219-237.

Trainer, V; Bates, S; Lundholm, N; Thessen, A; Cochlan, W. (2012) Adams, NG; Trick CG.. Pseudo-nitzschia physiological, ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. Harmful Algae. 14, 271-300.

Trish, M. Bédard, L. Kosatsky, T. Hockin, J. Todd, E. & Remis, R. (1990). An Outbreak Of Toxic Encephalopathy Caused by Eating Mussels Contaminated With Domoic Acid. The New England Journal of Medicine, 322, pp. 1-6.

Valenzuela R, Bascuñán K, Valenzuela A. (2008) Ácido docosahexaenoico (DHA): una perspectiva nutricional para la prevención de la enfermedad de Alzheimer. Rev Chil Nutr.; 35: 250-61.

Villac, M., Roelke, D., Villareal, T., Fryxell, G., (1993). Comparison of two domoic acid-producing diatoms - a review. Hydrobiologia 269: 213-224.

Wells, M., Trick, C., Cochlan, W., Hughes, M.P., Trainer, V.L. (2005). Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. Limnol. Oceanogr. 50(6): 1908-1917.

Wright, J. (1995). Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. Food Research International 28(4), pp. 347-358.

Yang, C. Deng, J. Tsai, W. Lin, T. Han, K. (1995). An outbreak of tetrodotoxin poisoning following gastropod mollusk consumption. *Hum Exp Toxicol* 14:446–450

Yasumoto, T. Bagnis, R. Vernoux, J. (1976). Toxicity of the surgeonfishes—II Properties of the principal water-soluble toxin. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 42:359–365,

## IX. ANEXOS

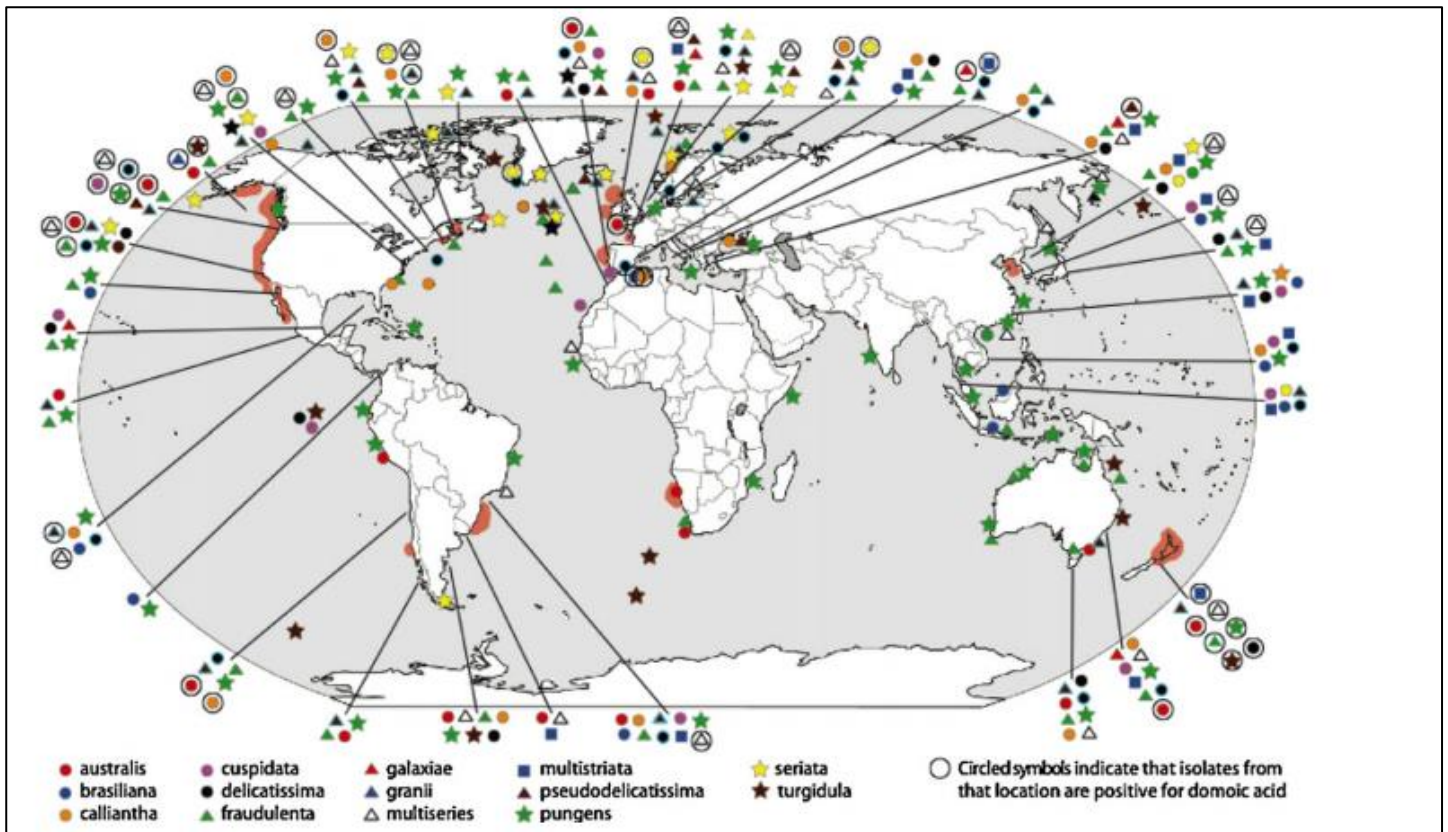
### ANEXO 1: SÍNDROMES OCASIONADOS POR MICROALGAS TÓXICAS (Fuente: Mancera *et al.*, 2013)

| SÍNDROME                                | PRINCIPALES ESPECIES   | TOXINAS   | SÍNTOMAS  | VECTORES                                      |
|---|--|---|---|---|
| Intoxicación Por veneno Amnésico (ASP)  | <i>Pseudo-nitzschia spp.</i><br>(Diatomeas)  | Ácido Domoico y sus derivados                         | Pérdida de memoria que puede durar más de un año.<br>Vomito, calambres abdominales, diarrea y nauseas.<br>Aparecen en las 24 horas siguientes a la ingestión de las toxinas.                      | Moluscos<br>Cangrejos                         |
| Ciguatera                               | <i>Gambierdiscus toxicu.</i><br><i>Prorocentrum spp.</i><br><i>Ostreopsis lenticulares.</i><br><i>Coolia monotis</i> | Ciguatoxinas<br>Maitotoxinas                          | Vómito, calambres abdominales, diarrea y nauseas.<br>Aparecen entre 3 y 24 horas siguientes a la ingestión de la toxina.<br>Convulsiones, parálisis muscular, alucinaciones visuales y auditivas. | Barracuda, medregal, jurel bonito             |
| Intoxicación Por veneno Diarreico (DSP) | <i>Dinophysis spp.</i>   | Ácido Okadaico<br>Pectenotoxinas<br>Dinophysistoxinas | Vómito, calambres abdominales, diarrea, nauseas, resfriado. Los síntomas desaparecen a los tres días.   | Glandulas Digestivas de mejillones y almejas. |

|  |  |                                 |  |  |
|--|--|---------------------------------|--|--|
| <p>Intoxicación por Veneno Neurotóxico (NSP)</p> | <p><i>Gymnodinium breve</i></p>                                      | <p>Brevetoxinas y derivados</p> | <p>Hormigueo, entumecimiento e insensibilidad en la lengua, labios y garganta. Dolores musculares, gastrointestinal, los síntomas desaparecen a los pocos días</p>   | <p>Almejas<br/>Mejillones<br/>Ostras</p>               |
| <p>Intoxicación por Veneno Paralítico (PSP)</p>  | <p><i>Gymnodinium Catenatum</i><br/><i>Alexandrium catenella</i></p> | <p>Saxitoxina y derivados</p>   | <p>Parestesia, entumecimiento alrededor de la boca y punta de los dedos, pérdida de coordinación muscular, mareo, sensación de sueño, resequedad de garganta y piel. Generalmente los síntomas desaparecen a los pocos días.</p> | <p>Almejas<br/>Mejillones<br/>Ostras<br/>Langostas</p> |

## ANEXO 2: DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia*

(Fuente: Trainer *et al.*, 2012).



**ANEXO 3: LISTA DE ESPECIES TÓXICAS DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia*.**

| <b>ESPECIES</b>               | <b>LUGARES REPORTADOS</b>   |
|-------------------------------|---|
| <i>P. australis</i>           | Mexico, EE.UU, Nueva Zelanda, España, Australia, Escocia, Irlanda, Chile                                    |
| <i>P. brasiliana</i>          | Túnez   |
| <i>P. cuspidata</i>           | E.E.UU  |
| <i>P. calliantha</i>          | Canadá, Chile, EE.UU, Dinamarca   |
| <i>P. delicatissima</i>       | Canadá, Nueva Zelanda, EE.UU  |
| <i>P. fraudulenta</i>         | Nueva Zelanda, EE.UU  |
| <i>P. galaxiae</i>            | Golfo de Nápoles  |
| <i>P. granii</i>              | Pacífico Norte  |
| <i>P. multiseriis</i>         | Canadá, Holanda, Corea del Sur, Francia, EE.UU, Japón, Brasil, Rusia, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, Portugal |
| <i>P. multistriata</i>        | Golfo de Nápoles, Nueva Zelanda   |
| <i>P. pseudodelicatissima</i> | México, Grecia  |
| <i>P. pungens</i>             | EE.UU, Nueva Zelanda, Francia   |
| <i>P. seriata</i>             | Dinamarca, Canadá, Escocia  |
| <i>P. turgidula</i>           | Nueva Zelanda   |

**ANEXO 4: EPISODIOS CON MAYOR TRASCENDIA EN LA PRODUCCION  
DE MOLUSCOS BIVALVOS OCASIONADOS POR LA PRESENCIA DE ASP**

| <b>AÑO</b> | <b>LUGAR DEL EVENTO</b> | <b>ORGANISMO AFECTADO</b> | <b>ESPECIE CAUSANTE</b>   | <b>IMPACTO GENERADO</b>                            |
|------------|-------------------------|---------------------------|---|--|
| 2010       | Argentina               | concha de abanico         | <i>P. nitzschia pungens</i><br><i>P. nitzschia calliantha</i><br><i>P. nitzschia fraudulentia</i> | Suspensión de cosecha hasta la depuración.         |
| 2002       | Nueva Zelanda           | mejillones                | <i>P. nitzschia australis</i>   | Suspensión de cosecha hasta la depuración.         |
| 2000       | Escocia                 | concha de abanico         | <i>P. nitzschia australis</i>   | Cierre de las empresas hasta depuración            |
| 2000       | Chile                   | ostiones                  | <i>P. nitzschia australis</i>   | Suspensión de cosecha hasta la depuración.         |
| 2000       | Portugal                | mejillones                | <i>P. nitzschia australis</i>   | Suspensión de cosecha hasta la depuración.         |
| 1999       | Irlanda                 | mejillones                | <i>P. nitzschia australis</i><br><i>P. nitzschia maxims</i>                                       | Prohibido las ventas en áreas de cultivo y cosecha |
| 1998       | USA                     | almejas                   | <i>P. nitzschia pseudodelicatissima</i>   | Suspensión de extracción por 1 año                 |
| 1998       | Chile                   | mejillones                | <i>P. nitzschia australis</i>   | Cierre de la bahía hasta depuración                |
| 1997       | Chile                   | concha de abanico         | <i>P. nitzschia australis</i>   | Cierre de la bahía hasta depuración                |
| 1991       | USA                     | navaja                    | <i>P. nitzschia australis</i>   | cierre del área indefinida                         |
| 1994       | España                  | mejillones                | <i>P. nitzschia australis</i>   | 1º cierre temporal                                 |

(Fuente: Elaboración propia).

**ANEXO 5: TRABAJO REALIZADO EN EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN.**

