

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRÍA EN ACUICULTURA



**“VENENO AMNÉSICO EN ESPECIES DE
Pseudo-nitzschia EN LA
COSTA CENTRAL DEL PERÚ Y SU RIESGO PARA
LA ACUICULTURA DE PECTÍNIDOS ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN ACUICULTURA**

LIZ CECIL TENORIO GARCÍA BLÁSQUEZ

LIMA - PERÚ

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN ACUICULTURA**

**“VENENO AMNÉSICO EN ESPECIES DE *Pseudo-nitzschia* EN LA
COSTA CENTRAL DEL PERÚ Y SU RIESGO PARA
LA ACUICULTURA DE PECTÍNIDOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE**

Presentado por:

LIZ CECIL TENORIO GARCÍA BLÁSQUEZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

M. Sc Aníbal Verástegui Maita
PRESIDENTE

Dra. Patricia Gil Kodaka
PATROCINADOR

M. Eng. María Cristina Miglio Toledo
MIEMBRO

M. Sc. Beatriz Elena Ángeles Escobar
MIEMBRO

A mis maravillosos padres y a
todas las personas que amo, que
nunca dejaron de creer en mí.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Eduardo Uribe Tapia por su enorme paciencia, por confiar en mí, ayudarme con la guía de esta tesis y a su maravilloso grupo de trabajo: al Dr. Gonzalo Álvarez, por su ayuda y correcciones; a la Ing. Rosario Díaz y al Dr. José Rangel por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mi asesora de tesis la Dra. Patricia Gil Kodaka, por su apoyo y paciencia hacia mi persona.

Al Dr. Juan Blanco por su apoyo en el análisis de las toxinas en este trabajo.

A la Dra. Martha Ferrario y al Dr. Gastón Almandoz por el apoyo con la clasificación taxonómica.

Al Tec. Cristian Santos y Blgo. Oscar Galindo por su colaboración con la toma de muestras.

Al Instituto del Mar del Perú por permitirme realizar este proyecto, a la Dirección de Acuicultura, a la MSc. Carla Aguilar por su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Jorge Tam y M. Eng María Miglio por su ayuda y a todos los profesores de la maestría por su apoyo en mi formación como investigador.

A mis queridos amigos por preocuparse por mí y estar conmigo, en las buenas y malas.

A mi familia por apoyarme en todos mis proyectos.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Problemática.....	3
1.2	Objetivo e hipótesis.....	4
1.2.1	Objetivo general.....	4
1.2.2	Objetivo específico.....	4
1.3	Justificación.....	5
II.	REVISIÓN LITERARIA	6
2.1	Antecedentes.....	6
2.2	Descripción del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	7
2.3	Métodos para la determinación de ácido domoico.....	9
2.3.1	Bioensayos.....	9
2.3.2	Ensayos bioquímicos.....	10
2.3.3	Ensayos químicos.....	10
2.4	Evaluación de riesgo del ácido domoico en <i>Argopecten purpuratus</i>	12
2.4.1	Identificación del riesgo.....	12
2.4.2	Caracterización del peligro... ..	14
2.4.3	Evaluación de la exposición.....	16
2.4.4	Caracterización del riesgo.....	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Lugar de ejecución.....	19
3.2	Materia prima.....	19
3.3	Materiales y equipo.....	17
3.3.1	Materiales.....	19
3.3.2	Equipos.....	20

3.4	Área de estudio.....	21
3.5	Obtención y aislamiento de las cepas del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	22
3.6	Cultivo de las cepas de del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	23
3.7	Método para el análisis taxonómico.....	24
3.8	Determinación de ácido domoico.....	25
3.9	Evaluación de riesgo de la toxina amnésica en la producción de <i>Argopecten purpuratus</i>	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1	Resultados.....	28
4.1.1	Área de estudio.....	28
4.1.2	Obtención de cepas	29
4.1.3	Cultivo de las cepas de del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	29
4.1.4	Análisis taxonómico.....	31
4.1.5	Determinación de AD en cultivo de microalgas seleccionadas.....	36
4.1.6.	Evaluación de riesgo	38
4.2	Discusiones.....	43
V.	CONCLUSIONES.....	49
VI.	RECOMENDACIONES.....	50
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
VIII.	ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Datos de los nueve muestreos realizados para la obtención de <i>Pseudo-nitzschia</i> y parámetros ambientales; pH, Temperatura.....	28
TABLA 2.	Comparación taxonómica de <i>P. pungens</i>	32
TABLA 3.	Comparación taxonómica de <i>P. subpacific</i> a.....	34
TABLA 4.	Estimación de Riesgo en áreas de cultivo y extracción de moluscos.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución Mundial de especies toxigénicas del género <i>Pseudo-nitzschia</i>	9
Figura 2	Acumulación de ácido domoico en Pectínidos	12
Figura 3	Estructura del ácido domoico.	14
Figura 4	Mecanismo de acción del ácido domoico.	15
Figura 5	Mapa de ubicación de las zonas de muestreo.	22
Figura 6	<i>Pseudo-nitzschia</i> (vista del frustulo).	25
Figura 7	Partes de la valva de microalga <i>Pseudo-nitzschia</i>	25
Figura 8	Curva de crecimiento de la cepa IMP-LBA-035(<i>P. subpacifica</i>).	30
Figura 9	Curva de crecimiento de la cepa IMP-LBA-042(<i>P. pungens</i>).	30
Figura 10	Curva de crecimiento de la cepa IMP-LBA-048(<i>P. pungens</i>).	31
Figura 11	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (M.E).	33
Figura 12	<i>Pseudo-nitzschia subpacifica</i> (ME).	35
Figura 13	Cromatogramas de LC MS/MS y espectro de fragmentación para patron de ácido domoico.	36
Figura 14	Cromatogramas de LC-MS/MS de las especies encontradas.	37
Figura 15	Espectro de fragmentación de los cromatogramas de LC-MS/MS de las especies encontradas.	38
Figura 16	Registro de <i>P.delicatissima</i> de los muestreos del 2003 al 2013 (fuente IMARPE)	40
Figura 17	Registro de <i>P. pungenes</i> de los muestreos del 2003 al 2013 (fuente IMARPE)	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Especies de Pseudo-nitzschia toxicas.....	65
Anexo 2	Resultados de Veneno amnésico de los muestreos realizados por el SANIPES (2008), bahía Paracas, Atenas.	68
Anexo 3	Resultados de Veneno amnésico de los muestreos realizados por el SANIPES(2009) bahía de Paracas, Atenas.....	69
Anexo 4	Resultados de veneno amnésico de los muestreos realizados por el SANIPES (2010) bahía de Paracas, Atenas.	70
Anexo 5	Resultados de veneno amnésico de los muestreos realizados por el SANIPES (2011) bahía de Paracas, Atenas.	72
Anexo 6	Resultados de veneno amnésico de los muestreos realizados por el SANIPES (2012) bahía de Paracas, Atenas.....	74

RESUMEN

Se evaluó la presencia del veneno amnésico (intoxicación por ácido domoico) en la costa central del Perú, causante de problemas gastrointestinales, amnesia parcial y en algunos casos la muerte del ser humano, por la ingestión de moluscos contaminados por algunas microalgas del género *Pseudo-nitzschia* productora de esta toxina. En nuestro país se tiene registro de estas especies al igual que en otros países, donde se reportaron como productoras de la toxina Ácido Domoico. Se buscaron estas especies del género *Pseudo-nitzschia* en tres zonas de la costa central peruana: isla San Lorenzo, Pucusana y bahía de Paracas.

Las diferentes especies obtenidas del género *Pseudo-nitzschia*, fueron cultivadas para realizar el estudio morfológico y toxicológico, logrando identificar con ayuda de microscopía electrónica de barrido la especie *P. pungens* y una especie no reportada para Perú, *P. subpacificá*.

Ambas especies no presentaron ácido domoico bajo las técnicas de HPLC/MS indicando que el riesgo de veneno amnésico en esta zona sería bajo, lo cual es muy beneficioso para la pectinicultura de la zona.

Sin embargo, esto no asegura que estas especies bajo otras condiciones ambientales puedan presentar toxina, como ocurre en otros océanos. Por lo tanto, es necesario el cumplimiento riguroso del plan de monitoreo desde la zona norte a sur del país para evitar problemas de intoxicación por veneno amnésico en el futuro.

ABSTRACT

The presence of amnesic shellfish poisoning (Domoic acid intoxication) was evaluated in the central coast of Peru. The ingestion of shellfish contaminated by some strains of *Pseudo-nitzschia* cause's gastric problems, partial amnesia and death in some cases.

In our country we have some records of *Pseudo-nitzschia* strains which have toxins problems. That was the reason why we started testing in the central coast of Peru, in three areas: Pucusana, Paracas bay and San Lorenzo Island. The strains isolated from samplings were cultured and classified with the help of scanning electron microscope. We found two species, *P. pungens* and *P. subpacifica*. This is the first time we report *P. subpacifica* in Peruvian waters. Also, these two species did not present acid domoico under the techniques of HPLC/MS. Therefore, the risk of amnesic shellfish poisoning in this area would be low, which is convenient for the pectiniculture of the area. However, this does not rule out that these two species identified, under other environmental conditions, can be able to present toxin. Since it happens in other oceans, it is necessary the rigorous planning and monitoring from the North to the South of the country to prevent future problems.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) ha venido desarrollando un programa de conservación de especies de microalgas en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos. Una línea necesaria de investigación es identificar las especies nocivas de las costas peruanas que puedan poner en riesgo la actividad acuícola y la salud humana.

Dentro de estas especies se encuentran las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, (definida originalmente por Peragallo y Peragallo, 1900), del género *Nitzschia* que ha sido objeto de muchos cambios taxonómicos durante el siglo pasado sobre la base de la morfología del frústulo. Actualmente, existen 37 especies del género de *Pseudo-nitzschia* que forman cadenas de longitud variable (Hasle et al., 1996; Lundholm et al., 2002; Lundholm et al., 2003; Trainer et al., 2012; Lelong et al., 2012). Sin embargo, 15 especies del género *Pseudo-nitzschia* son capaces de producir la neurotoxina ácido domoico (AD) en condiciones de cultivo (Anexo 1), que se asocia a la intoxicación amnésica (ASP) en humanos (Trainer et al., 2012).

El ácido domoico fue identificado por primera vez en la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá, en 1987 durante un episodio de intoxicación por el consumo del mejillón *Mytilus edulis*. Se registró tres muertos y más de 100 personas enfermas que presentaron síntomas como calambres abdominales, vómitos, desorientación y pérdida de memoria (amnesia). Este evento fue asociado posteriormente a la presencia de la diatomea pennada *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates et al., 1989; Wright et al., 1989). Desde este reporte esta toxina ha sido encontrada en diferentes grupos de organismos como zooplancton, moluscos, crustáceos (Bargu et al., 2002), equinodermos, gusanos, peces, aves y mamíferos marinos, registrándose mortalidades de estos últimos tres grupos taxonómicos con mucha frecuencia en los Estados Unidos de América (EUA) (Lefebvre y Robertson 2010; Lefebvre et al., 2012).

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* se encuentran ampliamente distribuidas en las costas del Mundo, mientras que la presencia de su toxina es más persistente y perjudicial en los sistemas de surgencia (Trainer et al., 2010). Este proceso oceanográfico que está asociado a la corriente de Humboldt es muy frecuente e intenso en las costas del Perú, considerado entre los sistemas más productivos del Mundo, ya que alcanzan valores entre 3 y 4 g m⁻² d⁻¹ en la franja costera de 100 km (Calienes et al., 1985), y se extiende a lo largo del Pacífico Sur Oriental hasta Chile (Graco et al., 2007). Estos procesos de surgencia con una intensa fertilización de nutrientes en las aguas costeras promueven el desarrollo de las floraciones de especies de *Pseudo-nitzschia* (Scholin et al., 2000; Trainer et al., 2000; Trainer, 2002; Anderson et al., 2006). Otra variable determinante en el crecimiento de especies de *Pseudo-nitzschia* es la temperatura, su mayor abundancia ha sido encontrada a 14°C (Buck et al., 1992; Trainer et al., 2000; Anderson et al., 2006; García et al., 2009), mientras que Santiago y García (2011) registraron una alta tasa de crecimiento de *P. australis* entre 12° y 15°C. Estas temperaturas se presentan en la zona costera del Perú a nivel de 10m de profundidad, en especial durante los eventos de surgencia en los meses de invierno y primavera (Guillen et al., 1969). Con estos parámetros ambientales como temperatura y nutrientes Anderson et al. (2010) proponen un modelo de predicción del potencial toxigénico de una floración de *Pseudo-nitzschia* en Bahía Chesapeake.

En la revisión mundial del género *Pseudo-nitzschia* realizada por Trainer et al. (2012), mencionan a *Pseudo-nitzschia pungens* y *P. australis* presentes en las costas del Perú. Esta última especie presenta un alto potencial para producir ácido domoico (AD) en otros mares del Pacífico y Atlántico (Bates, 2000; Cusack et al., 2002).

Actualmente, en el Perú no existen reportes de toxicidad por AD en los análisis realizados por el Servicio de Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES), sin embargo en los reportes técnicos de IMARPE del periodo 2003-2013 señalan la presencia de *P. pungens*, *P.cf delicatissima* y *P. seriata*, en las áreas geográficas entre Pisco y Sechura.

En algunas ocasiones, la presencia de especies tóxicas del género *Pseudo-nitzschia* puede obligar al cierre de la zona de extracción de *Argopecten purpuratus*, tanto en áreas de recolección y de cultivo, dado que los moluscos filtradores son altamente susceptibles a los

impactos de toxicidad de AD (Suarez-Isla et al., 2002). Los cierres más frecuentes en zonas de recolección en EUA se localizan en Oregón y en el Estado de Washington (Horner et al., 1993), en el Golfo de San Lorenzo en Canadá (Bates et al., 2002), en Chile: las bahías Tongoy, Guanaqueros y Bahía Inglesa (Suárez-Isla et al., 2002), en aguas del Reino Unido (Bogan et al., 2007; Campbell et al., 2001; Gallacher et al., 2001), y cuando los periodos de cierre son largos, las pérdidas son inevitables. En España, en diversas zonas de Galicia y Andalucía, los largos periodos de cuarentena originados por la presencia de toxinas y en especial por AD, han impedido la cosecha del bivalvo *Pecten maximus* durante largos periodos de tiempo, incluso años completos, debido a su fisiología y por su lenta depuración de toxinas. (Vale y Sampayo, 2001; Campbell et al., 2001; Blanco et al., 2002; Blanco et al., 2006).

La producción del molusco *Argopecten purpuratus* denominado “concha de abanico” es una de las principales actividades económicas en las costas peruanas, que se ve influenciada por variables biológicas como la presencia de toxinas marinas, las cuales representan un alto riesgo en la producción. Una clase de toxinas marinas es el AD producido por las microalgas del género *Pseudo-nitzschia*, por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo identificar las diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* existentes en la costa central peruana y conocer el potencial toxigénico de cada especie de este género, mediante las mejores técnicas empleadas en los laboratorios de referencia mundial para prevenir riesgos en la industria acuícola y la salud humana.

1.1. PROBLEMÁTICA

A lo largo del litoral peruano se explota o extrae a nivel industrial el recurso “concha de abanico” *Argopecten purpuratus*, que es exportado principalmente al mercado europeo. Con el objetivo de asegurar el flujo normal de exportación del mencionado molusco, la industria debe cumplir con las exigencias del Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), (antes Instituto Tecnológico Pesquero (ITP)).

La Comunidad Europea mediante el Reglamento (CE) N° 853/2004 estipula que el límite de esta toxina en los moluscos para consumo humano debe ser inferior a 20 mg kg⁻¹, además es

necesario tener claridad científica sobre el grupo taxonómico *Pseudo-nitzschia* y su potencial producción de ácido domoico AD. Este tema es muy importante debido a que el Parlamento Europeo solicitó a la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2009) realizar un análisis de riesgo sobre los actuales límites regulatorios sugiriendo que este debe ser reducido a 4.5 mg.kg⁻¹.

Estas consideraciones y la frecuente presencia de *P. pungens*, *P. cf. delicatissima* y *P.cf. seriata* en las principales áreas de explotación y cultivo de moluscos en las costas peruanas, ameritan una revisión taxonómica de estas especies y una evaluación de su potencialidad tóxica. El presente estudio permitirá determinar el potencial de la toxicidad de las especies de *Pseudo-nitzschia* presentes en las aguas de la costa central del Perú y el análisis de riesgo de la posible presencia de AD.

1.2. OBJETIVOS:

Dentro de este contexto se establecen los siguientes objetivos:

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de ácido domoico en las especies del género *Pseudo-nitzschia* en la costa central del Perú.

1.2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Identificar taxonómicamente las especies *Pseudo-nitzschia* detectadas en la costa central del Perú.
- Cultivar las especies de *Pseudo-nitzschia* clasificadas en la costa central del Perú.
- Evaluar la producción de ácido domoico en las especies de *Pseudo-nitzschia* cultivadas en laboratorio.
- Evaluar el riesgo sobre la presencia del ácido domoico para la producción de *Argopecten purpuratus* “Concha de Abanico”.

1.3. JUSTIFICACIÓN

El Perú es el principal país productor de *Argopecten purpuratus* “Concha de Abanico” a nivel mundial, actividad que genera un ingreso de divisas al país. La presentación principal de comercialización de este recurso es el Individual Quick Freezing (IQF) que es exportado mayoritariamente a los países europeos (Proyecto UE-Perú/PENX. 2004). Para su comercialización las empresas deben cumplir un estricto control sanitario entre los cuales destacan la certificación de sus aguas sin agentes productores de toxinas marinas y la ausencia de este tipo de compuestos en los tejidos comestibles de este molusco.

Una de las variables a analizar es la presencia de toxina amnésica (ASP) que puede ser producida por las diatomeas *P. pungens*, *P. cf. delicatissima* y *P. cf. seriata* que han sido reportadas por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y *P. australis* por Hasle (1965) en las aguas costeras del Perú y cuya presencia podría afectar de manera negativa nuestras exportaciones al generar cierres de áreas de cultivo por el tiempo que dure el evento nocivo.

Es importante destacar que hasta la fecha no se han desarrollado estudios científicos que permitan por una parte identificar de manera inequívoca las especies del género *Pseudo-nitzschia* presentes en la costa central del Perú y por otra, evaluar su capacidad para producir la toxina amnésica

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1. ANTECEDENTES:

Las Floraciones Algales Nocivas (FANs) son las apariciones de un grupo heterogéneo de microorganismos que son percibidas como dañinas por el hombre por sus efectos adversos a la salud humana, a la acuicultura, al turismo y a las poblaciones naturales de organismos marinos, según la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO (Reguera et al., 2011).

Muchas veces las FANs no presentan cambios de color del agua del mar y con frecuencia una baja cantidad de células puede envenenar los moluscos filtradores, los cuales presentarían un riesgo para la salud humana y la actividad acuícola (Okaichi, 2003).

El evento de intoxicación por AD ocurrido en 1987, en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá, que ocasionó los primeros problemas en la salud humana como la muerte de tres personas (Bates et al., 1989), también afectó a las especies marinas. A principios de setiembre de 1991, el AD producido por *P. australis* fue responsable de la muerte o la enfermedad de pelícanos y cormoranes en la Bahía de Monterey, California, ocasionada por ingerir anchoas (Buck et al., 1992; Fritz et al., 1992; Garrison et al., 1992; Trainer et al., 1998). A lo largo de la costa de California se ha registrado la muerte de mamíferos marinos debido a la intoxicación por AD, encontrándose en zooplancton, moluscos, crustáceos, equinodermos, gusanos, peces, aves y mamíferos marinos (Lefebvre et al., 1999; Scholin et al., 2000; Vos, 2003; Van Dolah et al., 2003; Lefebvre y Robertson, 2010; Bosart, 2011; Trainer et al., 2012).

Los primeros reportes de AD en cultivos de *A. purpuratus* se presentaron al norte de Chile, donde los niveles regulatorios (20mg.kg⁻¹, HPLC) fueron excedidos, en las bahías Tongoy, Guanaqueros y Bahía Inglesa (López-Rivera et al., 2009). En esas áreas de cultivo de *A.*

purpuratus se han registrado varias floraciones de especies de *Pseudo-nitzschia*, las cuales han sido aisladas, identificadas, cultivadas para su posterior análisis de toxicidad usando cromatografía líquida y espectrofotometría de masas (LC-MS) confirmando que algunas cepas de *P. australis* y *P. calliantha* presentan AD y otras como *P. sub-fraudulenta* no presentaron la toxina (Álvarez et al., 2009).

2.2. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia* (H. Peragallo, 1900).

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* son un componente menor del fitoplancton, lo que contribuye cerca del 17% del carbono de la biomasa total, incluso en la floración más intensa, (Trainer et al., 2009). Estas especies solo pueden ser encontradas en el plancton marino y son muy importantes porque algunas de ellas tienen la capacidad de producir ácido domoico, se caracterizan por su motilidad, formar colonias escaliformes con superposición de los extremos de las células continuas, la localización del rafe a nivel de la superficie valvar. Las células son alargadas, de fusiformes a estrechamente lanceoladas y con dos cloroplastos situados en su parte central (Ferrario et al., 2002; Hoppenrath et al., 2009).

La presencia de especies del género *Pseudo-nitzschia* son frecuentes en la mayoría de océanos, aunque en pequeñas cantidades (Walz et al., 1994). La primera especie reportada por causar problemas por veneno amnésico en mariscos (VAM), internacionalmente conocido como “Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)”, fue *P. multiseriata* la cual contiene altas concentraciones de AD. Esta toxina también está presente en altas concentraciones en *P. australis* y *P. seriata* (aprox. > 10pg de AD/cél.), mientras que para *P. delicatissima* y *P. pseudodelicatissima* la toxina se presenta en menores concentraciones (<1 pg AD/cél) en pruebas realizadas en cultivo (Botana, 2008).

De las 12 especies de *Pseudo-nitzschia* reportadas como productoras de ácido domoico en todo el mundo (Trainer, 2012), se ha registrado 10 especies en las aguas de la costa Oeste de EUA (Anderson et al., 2008). *P. australis* y *P. multiseriata* son comúnmente las más asociadas con eventos tóxicos en Alaska y son las más problemáticas en California (Trainer et al., 2012).

(Figura 3). *P. pseudodelicatissima* y *P. cuspidata* presentan eventos tóxicos en las aguas del Estado de Washington (Adams et al., 2000; Trainer et al. 2002).

En América del Sur, *P. australis* reportada en 1939 por Joaquín Frenguelli en el Golfo de San Matías, Argentina (Sar et al., 1998), fue una de las primeras especies conocidas del género *Pseudo-nitzschia*. Desde entonces, ha sido encontrada no sólo en el hemisferio sur, sino también en la mayoría de las zonas costeras, con excepción del Atlántico Oriental y Asia. Por esta razón es considerada como cosmopolita (Hasle, 2002), y su toxicidad es más común en América del Sur.

Para el litoral peruano Trainer et al. (2012) mencionan solo dos especies basándose en el único trabajo realizado por Hasle (1965), en el cual emplearon microscopía electrónica para la identificación de *P. pungens* y *P. australis*. Mientras que Guillen et al. (1969) reporta *P. pungens* a lo largo de la costa peruana (Latitud 4° al 12° S), durante 1964 basados en trabajos con microscopía óptica. Strickland et al. (1969) mencionan las especies: *P. pungens*, *P. americana*, *P. delicatissima*, *P. pacífica* y *P. seriata* entre las latitudes 13° 40' S y 16° 27' S del litoral peruano. Rojas de Mendiola (1978) al estudiar el contenido estomacal de la anchoveta capturada en zonas de surgencia (15° 04 S y 15° 56 S), identifica la especie *P. pungens* en las distintas estaciones del año con excepción del invierno del año 1974, mientras que Tarazona (2003) menciona a *P. delicatissima* como especie dominante entre la zona de Ancón y bahía Independencia, y finalmente el programa de monitoreo de microalgas nocivas que ejecuta el IMARPE desde el año 2003 a la fecha menciona las siguientes especies: *P. cf. delicatissima*, *P. pungens* y *P. cf. seriata*.

En la Figura 1, se muestran las especies de *Pseudo-nitzschia* en cultivo que han demostrado producir ácido domoico y están simbolizadas y encerradas en un círculo, las áreas a lo largo de las costas marcadas con rojo son los lugares donde ocurrió el cierre de extracción de moluscos o la mortalidad de los animales debido a niveles elevados de ácido domoico ($> 20 \mu\text{g AD g}^{-1}$, peso húmedo de tejidos de los moluscos) (Fuente: Trainer 2012).

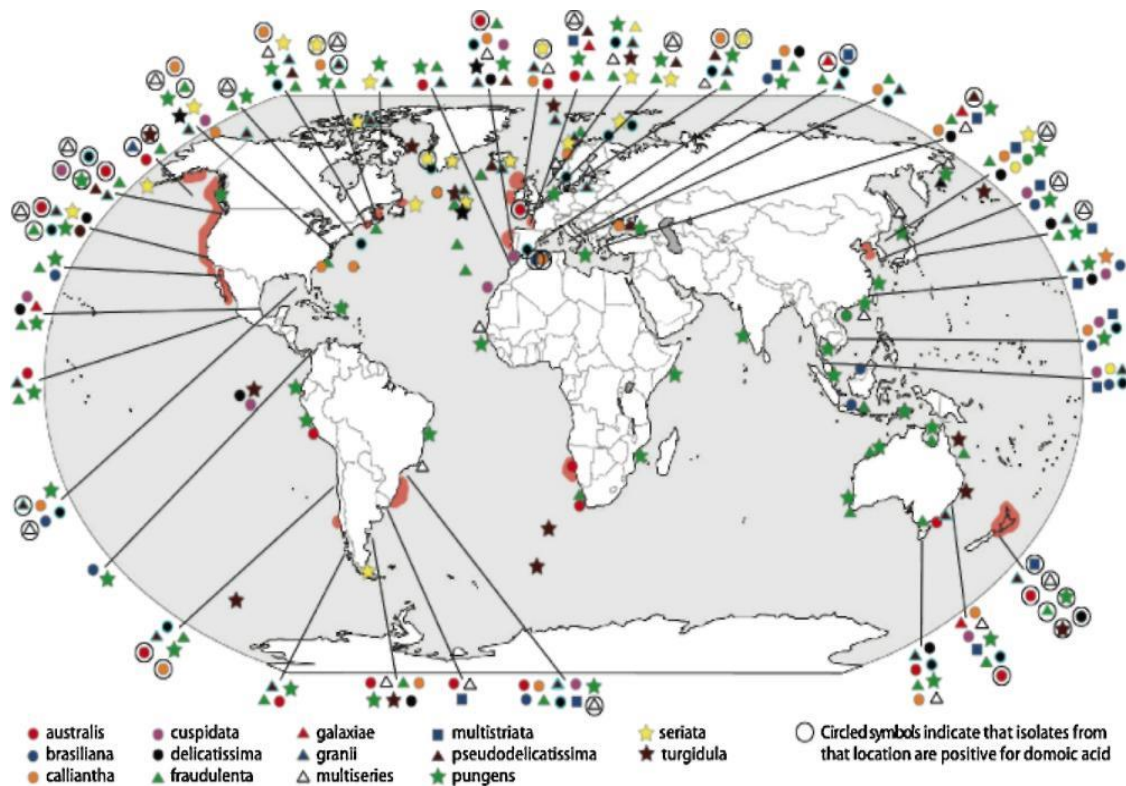


Figura 1. Distribución mundial de especies toxigénicas de *Pseudo-nitzschia*. (Fuente: Trainer et al. 2012)

2.3. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO

2.3.1. BIOENSAYOS.

a. Bioensayo en ratón: permite detectar AD en concentraciones de aproximadamente 40mg/kg carne de molusco, este ensayo consiste en la extracción con agua en medio ácido del tejido (animal entero u órganos seleccionados) seguido de la inyección peritoneal de 1mL del extracto al ratón. Los síntomas de esta toxina se inicia con el rascado de hombros con la patas traseras, seguido de convulsiones, el periodo de observación es de 15 min a 4 horas, No hay validación entre laboratorios de este método. Aspectos éticos, relacionados con el uso de animales vivos, afectan a la aceptación y el uso de bioensayo ratón en algunos países. Su límite de detección no es lo suficientemente bajo como para emplearse con confianza en la cuantificación de esta toxina con fines reglamentarios (FAO, 2005).

2.3.2. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

a. 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 de 40 ng.ml⁻¹. Los niveles de AD en plasma de rata y mono no se pudieron determinar con precisión con este anti suero en el ELISA. Este sistema de detección no ha sido sometido a ensayos extensos para su uso como técnica de rutina (FAO, 2005)

2.3.3. ENSAYOS QUÍMICOS

a. Cromatografía de capa fina

El AD se puede analizar semicuantitativamente utilizando cromatografía en capa fina (TLC). El compuesto se detecta en placas de gel de sílice con un débil punto de UV que se vuelve de color amarillo con una solución al 1 por ciento de ninhidrina. Sin embargo, En el caso de muestras biológicas hay interferencia con otros aminoácidos interfiriendo, un procedimiento previo de limpieza permite obtener fracciones directamente utilizables o concentrarlas al vacío antes de aplicar sobre la capa de gel.

El límite de detección por este método, es de alrededor de 0,5 µg, lo que permite la detección en tejidos de marisco a alrededor de 10 mg.kg⁻¹. (FAO, 2005).

El AD puede ser detectado en placas de TLC empleando dos reactivos pulverizados, por ejemplo la pulverización de una placa con vainilla, formándose el color amarillo que cambia a rosa con el tiempo en presencia de AD(Quilliam, 2003).

b. Análisis de amino ácidos

El extracto de plancton de muestras líquidas pueden ser analizadas directamente por un sistema de analizador de aminoácidos utilizando las soluciones tampón y columnas de intercambio iónico. Este método se emplea para el análisis de hidrolizados de proteínas, elutos de AD similares a la metionina. Las medidas de absorbancia a 440 nm permiten detectar amino ácidos con grupos amina primarios, en tanto que a 570 nm se detectan selectivamente iminoácidos como la prolina y el AD. El límite de detección por este método es de aproximadamente 1 mg. mL⁻¹.

La sensibilidad de este método es similar a la del método de HPLC-UV, sin embargo no

es tan eficaz para muestras que contienen una alta concentración de aminoácidos libres y un análisis más prolongado. (Quilliam, 2003)

c. Cromatografía líquida (CL)

La cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV), es el método químico analítico para la determinación ácido domoico, se produce por el nivel de absorbancia de 242 nm. Este procedimiento se basa en lo descrito por Quilliam *et al.* (1995), para la determinación cuantitativa del ácido domoico en productos marinos, se realiza con condición isocrática y ultravioleta, (FAO, 2005)

d. Electroforesis capilar (EC)

Es una nueva técnica que tiene un enorme potencial para el análisis de toxinas marinas. Este método permite rápidos análisis, separaciones de alta resolución de compuestos complejos, polares. Se conecta un tubo capilar de sílice fundido conteniendo una solución tampón entre dos depósitos de líquido. Luego se inyecta en el capilar un volumen de extracto de muestra (típicamente 1-10 nL) se aplica una diferencia de voltaje de 20- 30 kVa los extremos capilares, las sustancias iónicas migran como bandas estrechas por el capilar, pasando por un detector (absorbancia UV, fluorescencia, etc.) (Quilliam, 2003).

f. Espectrometría de masas

Método de alta sensibilidad, alta resolución, cuantificación de isómeros, puede analizar de forma simultánea otros grupos de toxinas.

La electro nebulización se ha convertido en la técnica predominante para las interfaces entre CL y EM, volviendo obsoletos métodos mencionados anteriormente, como (flujo continuo) Bombardeo Atómico Rápido (FAB por sus siglas en inglés) y termospray. Quizás sea, el retiro del contenido de lípidos en los homogenatos, el punto más importante para resolver el problema de la supresión de la señal tan a menudo encontrada en los análisis de extractos de mariscos empleando CL-ESI-EM (ESI= ionización electro nebulización)(FAO, 2005).

2.4. EVALUACIÓN DE RIESGO DEL ÁCIDO DOMOICO EN *Argopecten purpuratus* PARA SU COMERCIALIZACIÓN Y CONSUMO HUMANO.

La evaluación de riesgo o PHA por sus siglas en inglés *Process Hazards Analysis*, es el estudio de las causas de las posibles amenazas y probables eventos no deseados, los daños y consecuencias que éstas puedan producir. Realiza una predicción del futuro, en base al pasado histórico y un análisis de los eventos.

La evaluación de riesgo se divide en 4 pasos: Identificación del riesgo, Caracterización del peligro, Evaluación de la exposición y Caracterización del riesgo (Botana, 2008).

2.4.1. IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO:

Las toxinas marinas son tan potentes que incluso a bajas concentraciones de microalgas (10^3 - 10^4 cél. L^{-1}) y sin que se formen manchas visibles en el mar pueden convertir a los bivalvos en no aptos para el consumo. Estas proliferaciones, que raras veces van acompañadas de producción de elevada biomasa, producen las intoxicaciones por consumo de Bivalvos (*Shellfish Poisoning*), que en casos extremos pueden causar hospitalizaciones e incluso pérdida de vidas humanas (Reguera et al., 2011).

- a. **Veneno amnésico:** La intoxicación amnésica por mariscos (ASP o VAM) es conocida también como intoxicación por ácido domoico. ($C_{15}H_{21}NO_6$); peso molecular 311,33 g/mol; ácido tricarbóxico similar a un sólido blanco cristalino, soluble en agua y ligeramente soluble en metanol y etanol. (AESAN, 2009).

El AD es relativamente estable y no se degrada a temperatura ambiente (Quilliam, 2003). Sin embargo, se detectó una alteración considerable tras la exposición a temperaturas elevadas (> 50 °C), así como en condiciones extremadamente ácidas ($pH < 2$) o alcalinas ($pH > 12$).

McCarron y Hess (2006) realizaron experimentos en los tejidos de moluscos contaminados, demostrando que la cocción normal (100 °C) o en autoclave (121 °C) del

tejido de mejillón sólo reduce la concentración total de la toxina aproximadamente en un 3%. En base a estos datos es evidente que la cocción no disminuirá la toxicidad de los mariscos si están contaminados con esta toxina. Los animales marinos que se alimentan de este fitoplancton, o de otros organismos que lo hayan ingerido, pueden acumular el AD mediante bioconcentración. De manera especial lo acumulan los moluscos bivalvos (ostras, mejillones, vieiras, almejas) que se alimentan por filtración. (AESAN, 2009) La tasa de acumulación varía entre las diferentes especies de moluscos, en *Pecten spp.* (*Pecten maximus* y *Pecten jacobaeus*), debido a que la velocidad de eliminación o depuración es muy baja en relación a las otras especies, puede permanecer en el molusco durante meses e incluso años (Blanco et al., 2002). La distribución de acumulación de AD en los distintos órganos de los pectínido se muestra en la Figura 2.

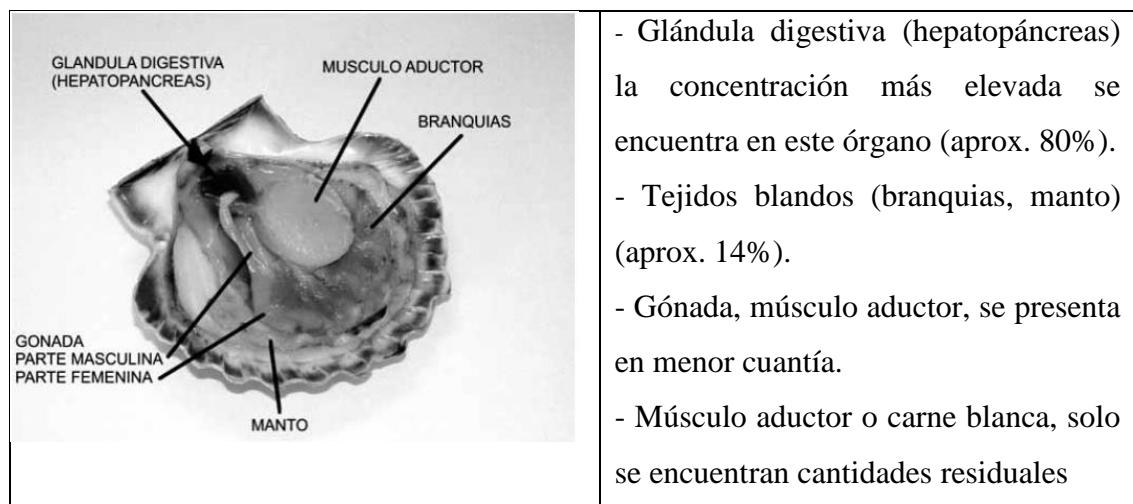


Figura 2. Acumulación de ácido domoico en Pectínidos (Fuente: AESAN, 2009).

b. Estructura y mecanismo de acción del ácido domoico

El Ácido domoico es un aminoácido tricarboxílico de bajo peso molecular que está estructuralmente relacionado con el ácido kaínico (Figura 3). Está clasificado como un neuroexcitante que interfiere con los mecanismos de neurotransmisión en el cerebro (Pérez, 2002; Mos, 2001). Fue aislado por primera vez de la macroalga Rhodophyta, *Chondria armata* a raíz de las investigaciones sobre la actividad antihelmíntica e insecticida de extractos de algas marinas (Takemoto y Daigo, 1958).

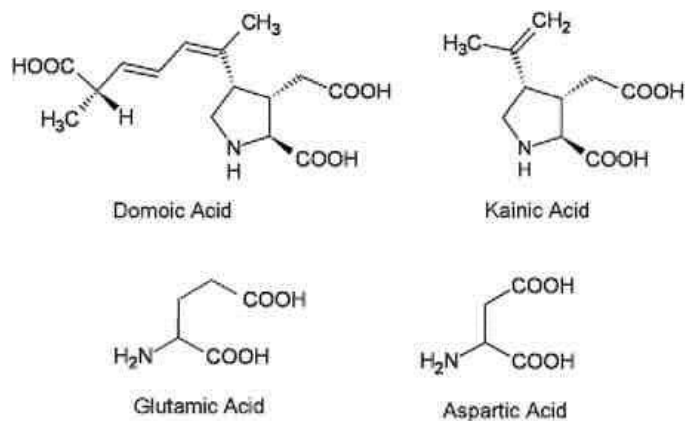


Figura 3. Estructura del ácido domoico (Fuente: Lefebvre, 2010)

Las características químicas del compuesto son importantes para entender las interacciones de los receptores y los efectos tóxicos en los vertebrados. El ácido domoico se compone de un anillo de prolina con tres grupos carboxilo y un grupo imino.

2.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO:

Debido a la similitud estructural con el ácido kaínico (KA), ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), el AD interactúa con los receptores de glutamato (GluR) en los terminales de las células nerviosas (Fig. 4). El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro y un componente crítico para toda la transmisión sináptica. Se ha atribuido la neurodegradación celular a la excesiva cantidad de Glu en estas áreas generando convulsiones y apoptosis celular (Dakshinamurti et al., 1991; Tood, 1993; Cendes et al., 1995; Nijjar y Nijjar, 2000; Ananth et al., 2001; Colman et al., 2005); La sobre activación de GluR por Glu o Asp se inicia con una cascada de eventos bioquímicos que puede conducir a la lesión neuronal o muerte celular. Esto se debe en gran medida al flujo excesivo de los iones Ca^{2+} en las neuronas a través de los canales iónicos que se desencadenan por la activación del GluR (Fig. 4) (Lefebvre, 2010). La entrada de calcio a las neuronas del hipocampo produce su destrucción y la pérdida de memoria de corta duración en los sujetos intoxicados, esta neurodegradación puede ser irreversible y ocasionar discapacidad de por vida en los casos más graves (Suarez, 2005).

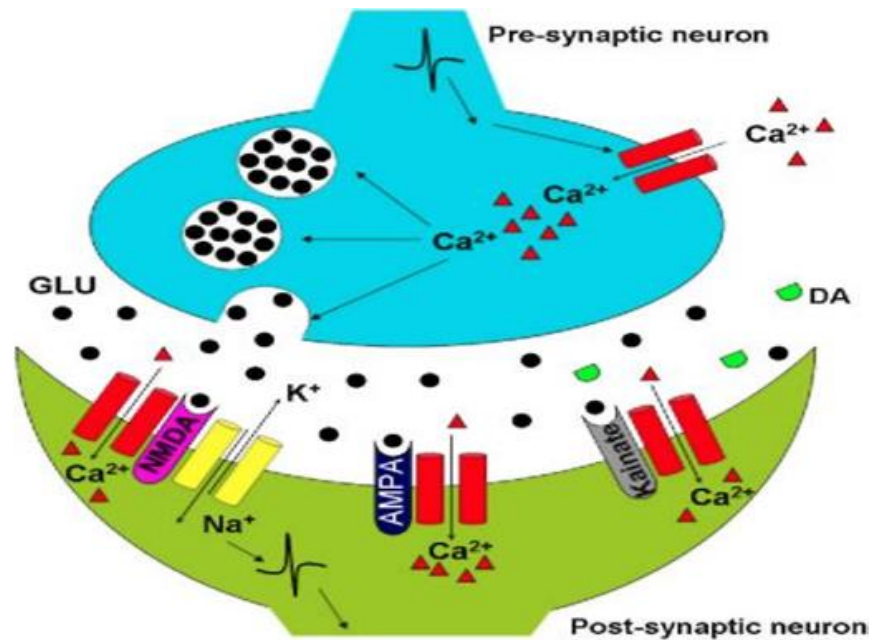


Figura 4. Mecanismo de acción del ácido domoico (Fuente: Lefebvre, 2010)

En la Figura 4, se observa la neurotoxicidad inducida en las células nerviosas que ocurre por la despolarización de la célula presináptica que activa la liberación de Ca^{2+} endógeno, que posteriormente moviliza vesículas que contienen GLU a la superficie de la membrana. El GLU se libera en la hendidura sináptica por exocitosis, donde es capaz de interactuar con receptores de superficie celular. El AD exógeno puede interactuar en la hendidura sináptica con cada uno de los tres subtipos de receptores ionotrópicos incluyendo el kainato, AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de NMDA (N-metil D-aspartato) en membranas celulares. La activación del kainato y AMPA liberan Ca^{2+} a través de los canales de iones acoplados en la célula post-sináptica. El AD es también capaz de unirse a los receptores de NMDA que están vinculados a ambos canales de iones Ca^{2+} y Na^+/K^+ , resultando en la afluencia celular de Na^+ y Ca^{2+} , a diferencia del GLU, el AD induce la activación prolongada del receptor, provoca una afluencia constante de cationes en la célula y las señales químicas apropiadas para la desensibilización se bloquean. El exceso intracelular de Ca^{2+} provoca la interrupción de la función celular, inflamación celular y finalmente, la muerte celular (Lefebvre, 2010).

2.4.3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN:

a. Exposición a la dosis.

El valor de referencia de AD es 20 mg /kg de carne de molusco, basado del incidente de ASP en Canadá (Isla Príncipe Eduardo) y ha sido adoptado por varios países, el que resulta de una ingesta de 0,03 a 0,1 mg AD/kg pc por persona con un peso corporal de 60 kg y para un consumo de molusco de entre 100 y 300 g/carne de molusco (FAO, 2005).

b. Síntomas por intoxicación del veneno amnésico.

En el evento de 1987, se registraron daños ocasionados por la intoxicación de AD, de los 107 casos de intoxicación, los síntomas se manifestaron entre los 15 minutos y 38 horas de la ingesta de molusco contaminado. 12 de estos casos fueron tratados en la unidad de cuidados intensivos, 8 de ellos tenían 65 años y los 4 restantes tenían enfermedades preexistentes como diabetes, insuficiencia renal, o hipertensión. Los síntomas presentados fueron los siguientes: náuseas (77%), vómitos (76%), dolor abdominal (51%), cefalea (43%), diarrea (42%), y pérdida de memoria (25%) notándose una relación en la pérdida de memoria y la edad. Los menores de 40 años presentaron diarreas y en mayores de 50 años, pérdida de memoria (Tood, 1993; Botana, 2008).

El tratamiento por intoxicación de AD es sintomático, no hay antídotos. En caso de producirse convulsiones podría emplearse difenilhidantoína, fenobarbital o diazepam, en tales condiciones no debería inducirse el vómito. Tal vez en períodos cortos, desde la ingesta, podría inducirse el vómito. El lavado gástrico con sonda requiere la administración previa de algún anticonvulsivante. Un adsorbente como carbón activado podría utilizarse en niños. En el caso de posible colapso cardiovascular, hemorragia digestiva, depresión del sistema nervioso central e incluso convulsiones. Estos síntomas indican que la persona debe ser trasladada al hospital (Álvarez, 2009).

2.4.4. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO:

La evaluación cualitativa del riesgo se basa en la experiencia adquirida con un alimento específico, el grado de conocimiento del organismo, los datos epidemiológicos y la opinión de los expertos sobre los peligros asociados a la manera de producir, elaborar, almacenar y preparar los alimentos para el consumo (FAO, 1995).

La estimación de riesgos pueden ser cualitativa, por ejemplo, niveles de clasificación altos, medios o bajos de un patógeno, o presentarse en términos cuantitativos, como distribuciones acumulativas de frecuencia del riesgo por porción, riesgos anuales para las poblaciones seleccionadas o riesgos relativos de los diferentes animales o distintos patógenos.

La Unión Europea (UE) estableció en 1997 La Directiva 97/61/CE modificando la Directiva 91/492/CEE (UE, 1991), en el menciona “El contenido de Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) en las partes comestibles de los moluscos (el cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado) no deberá sobrepasar los 20 mg de AD por kilogramo de carne de molusco según el procedimiento de análisis HPLC” (UE, 1997). Este límite se fijó en base a la concentración guía usada por Canadá, tras los episodios tóxicos de 1987 y fue calculado en base a la exposición a la toxina por el consumo de una ración tipo de “mejillones” *Mytilus edulis*. Las autoridades canadienses establecieron el límite en base a que la dosis de referencia aguda es 0,1 mg/kg pc, estimando que una persona de 60 kg de peso corporal consume una ración de 250 g de mejillones y se calcula el Límite Máximo de Residuo de AD en 24 µg AD/g molusco. Finalmente, este valor fue redondeado a 20 µg/g, equivalente a la ingesta de una ración de 300 g de moluscos (AESAN, 2009).

El Instituto Tecnológico pesquero (ITP) y Servicio Nacional de Pesquería (SANIPES), 2009, según el comunicado N° 012-2009-ITP/SANIPES sobre adecuación de las metodologías de ensayo a las exigencias reglamentarias establecidas por la Comunidad Europea, menciona que la técnica sugerida para el análisis del ASP: Determinación de AD en moluscos bivalvos, sea por Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

En el Artículo 10° del DS. 007-2004 de la Autoridad de Inspección Sanitaria sobre la ocurrencia de emergencias o eventos inusitados de contaminación en las áreas de producción de moluscos bivalvos, referidos especialmente a la presencia de biotoxinas marinas u otras contaminaciones con incidencia en salud pública, plantea lo siguiente.

1. Cerrar temporalmente las áreas de producción a las actividades de extracción o recolección.
2. Inmovilizar los productos afectados.
3. Iniciar acciones de emergencia para el muestreo y ensayo de los moluscos bivalvos bajo sospecha.
4. Reabrir las áreas afectadas después de la desaparición de las causas y efectos que provocaron el cierre.
5. Un Informe con los resultados de las evaluaciones de las aguas y los moluscos soportará la reapertura de las áreas o la continuación de la suspensión y el destino de los productos afectados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El periodo experimental comprendió muestreos realizados en Pucusana, bahía Paracas y la isla San Lorenzo; desde julio de 2012 a febrero de 2013. Los aislamientos de las cepas del género *Pseudo-nitzschia* y su posterior cultivo se realizaron en el Laboratorio del Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú y en el Laboratorio de Producción Primaria y Fitoplancton de la Universidad Católica del Norte, Chile. Los análisis para la determinación de ácido domoico se realizaron en las dependencias del Departamento de Oceanografía del Centro de Investigación Mariñas-Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, España.

3.2. MATERIA PRIMA

- Muestras de fitoplancton marino
- Microalga del género *Pseudo-nitzschia*

3.3. MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1. MATERIALES:

- **Vidrio**
 - Pipetas Pasteur
 - Pipetas volumétricas
 - Cámara de sedimentación Uthermöhl 0.002 L.
 - Matraces de 0.05, 0.10, 0.50 y 1 L.
 - Botellas autoclavables de 1 y 2 L.
 - Probeta de 0.05 y 0.10 L.
 - Cubreobjetos de 18 x 18 mm.
 - Portaobjetos de 22 x 22 mm.

- **Otros**

- Red de muestreo (20 μm)
- Filtros de membrana de nitrocelulosa.

- **Reactivos**

- Ácido clorhídrico
- Agua destilada
- Agua de mar
- Metanol
- Estándar de ácido domoico 5mg

- **Medio Guillard f/2** (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975).

- Nitrato de sodio: 0.75 kg.L^{-1}
- Fosfato de Sodio: 0.5 kg.L^{-1}
- Silicato de Sodio: 0.30 kg.L^{-1}

Solución de metales trazas:

- Cloruro Férrico 3.15 g.L^{-1}
- $\text{Na}_2\text{EDTA } 2\text{H}_2\text{O}$ 4.36 g.L^{-1}
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $3.93 \times 10^{-8} \text{ M}$
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2.60 \times 10^{-8} \text{ M}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $7.65 \times 10^{-8} \text{ M}$
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $4.20 \times 10^{-8} \text{ M}$
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $9.10 \times 10^{-7} \text{ M}$

Solución de Vitaminas:

- Tiamina HCl (vit B₁) 200 mg.L^{-1}
- Biotina (vit. H) $2.05 \times 10^{-9} \text{ M}$
- Cianocobalamina (vit. B₁₂) $3.69 \times 10^{-10} \text{ M}$

3.3.2 EQUIPOS:

- Agitador orbital
- Autoclave (YAMATO)

- Balanza analítica (Sartorius)
- Cámara bioclimática (Binder)
- Centrifuga refrigerada Eppendorf
- Espectrómetro de masas (LC/MS) LCQ Deca XP Plus
- Estufa de convección forzada (Solfarma)
- Liofilizador Ilchin modelo Bondiro.
- Microscopio compuesto (Nikon eclipse 510)
- Microscopio ESEM FEI Quanta 200
- Microscopio invertido (Olympus CKX31)
- Multiparámetro de campo (ORION).
- Refractómetro (ATAGO)

3.4 ÁREA DE ESTUDIO:

La colecta del fitoplancton se realizó en las áreas de estudio que corresponden a la isla San Lorenzo (12° 03' 57'' S; 77° 13'43'' O); bahía de Pucusana (12° 28'13'' S; 76°47'45'' O) y bahía de Paracas (13°49'01'' S; 76°17'34'' O) desde julio de 2012 a febrero de 2013 (Figura 5). Se utilizó una red de fitoplancton cónica de 20 µm de abertura de malla, realizando tres lances verticales entre los 10m a superficie. El material fitoplanctónico se guardó en un frasco de 0.25 L previamente esterilizado, el cual fue trasladado en una caja de frío al Laboratorio del Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), para el aislamiento de las especies del género de *Pseudo-nitzschia* antes de las 12 horas de tomada la muestra.

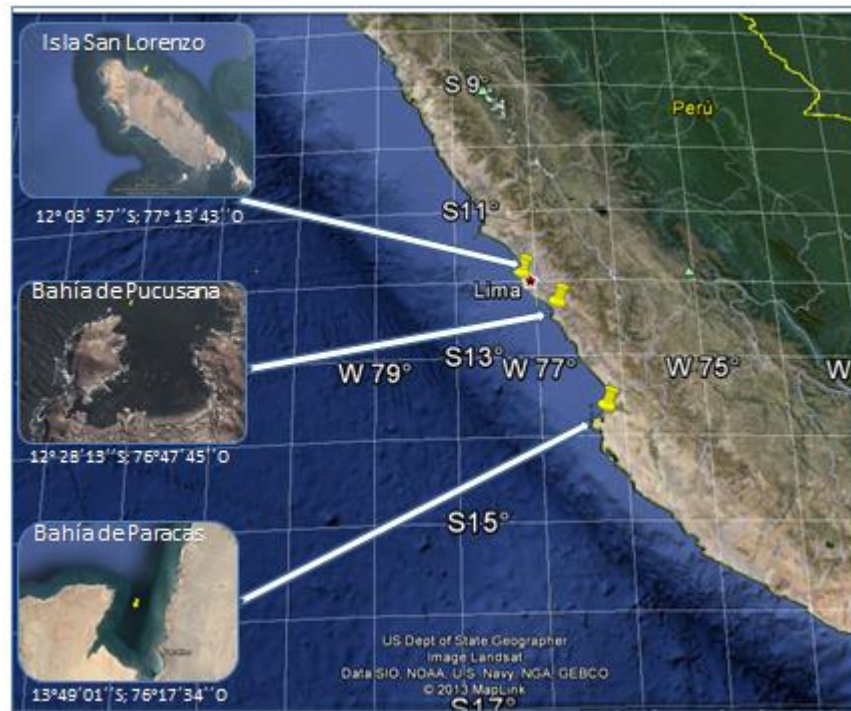


Figura 5. Mapa de ubicación de las zonas de muestreo (Fuente: Google Earth, 2014)

3.5. OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia*:

Para el aislamiento de las especies del género *Pseudo-nitzschia*, las muestras de fitoplancton en vivo fueron observadas usando un microscopio fotónico Nikon (Eclipse 510). Una vez seleccionada la especie se procedió a su separación mediante la técnica de pipeteo y lavados sucesivos descrita por Anderson (2005). Esta técnica consistió en la preparación de unas pipetas Pasteur, que fueron fundidas sobre la llama de un mechero Bunsen y posteriormente estiradas, para conseguir una micropipeta con un diámetro de entrada de un tamaño ligeramente superior a la célula de *Pseudo-nitzschia* por aislar. Posteriormente, en un portaobjeto estéril se colocó una gota de la muestra y dos gotas del medio de cultivo (*f*/2) esterilizadas. El primer paso bajo el microscopio fotónico fue capturar con la micropipeta una célula o cadena de una especie de *Pseudo-nitzschia*. En seguida, se vació el contenido capturado en la micropipeta en una gota de medio de cultivo, y se observó si la célula objetivo se encontraba en esta nueva gota, si había células de otras especies se volvía a capturar y se ponía en la segunda gota. El procedimiento se volvía a repetir hasta lograr obtener solo una célula o cadena de una sola especie.

Posteriormente, se colocó estas células aisladas en matraces de 0.050 L con 0.010 L de medio de cultivo (*f*/2) con una salinidad de 35 psu y se dejó en una incubadora a una temperatura de

14 °C con un régimen de fotoperiodo: 12 horas luz y 12 horas oscuridad con una irradiancia de 60 a 80 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$, según la metodología empleada por Álvarez et al.(2009). Estas células lograron aclimatarse a las condiciones ambientales de la incubadora, entre 3 y 5 días después se vieron pequeños filamentos en el matraz que corresponden a cortas cadenas de la especie del género *Pseudo-nitzschia*. Posteriormente, se procedió a su evaluación bajo microscopio para determinar si era una especie del género *Pseudo-nitzschia*, asignándole un código de identificación de la cepa.

3.6. CULTIVO DE CEPAS DEL GÉNERO *Pseudo-nitzschia*:

Una vez logrado el cultivo de la cepa del género *Pseudo-nitzschia* en matraces de 0.050 L, se transfirió el cultivo a matraces de 0.150 L con medio de cultivo *f/2* a una salinidad de 35 psu, con fotoperiodo de 12:12, ciclo luz-oscuridad, a 80 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$, en cámaras climáticas a 14 °C (Sanyo), con el objetivo de determinar la tasa de crecimiento de cada célula.

Se determinó la curva de crecimiento con muestras tomadas diariamente de los matraces de 0.15 L, los conteos se realizaron en la cámara de sedimentación de 0.002 L, bajo la tecnología de Utermöhl, en un microscopio invertido Olympus CKX31 con contraste de fase, por un periodo de 7 días para poder determinar la fase exponencial. Se calculó la tasa de crecimiento (μ) con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\text{Log}_2 D_2/D_1}{T_2 - T_1}$$

μ : tasa de crecimiento

D_2 : densidad final del cultivo

D_1 : densidad inicial del cultivo

T_2 : tiempo final de cultivo (días)

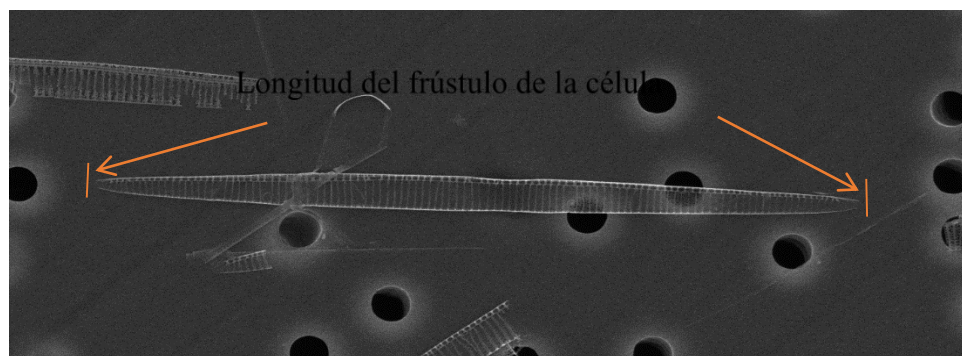
T_1 : tiempo inicial de cultivo (días)

La curva de crecimiento se ajustó a un modelo de crecimiento *Curve Expert Professional* 1.6.8. Para obtener biomasa suficiente para determinar la presencia de ácido domoico en las cepas de *Pseudo-nitzschia*, se realizó cultivos de cada especie clasificada en botellas de 10 L con aireación en cámaras bioclimáticas, fotoperiodos de 12:12, a 14°C. Se determinó la

concentración celular (cél. mL⁻¹) con el mismo método descrito anteriormente. Los cultivos, fueron cosechados al inicio de su fase estacionaria de crecimiento y fueron concentrados en decantadores y posteriormente centrifugados a 4000 rpm, temperatura de 4 °C en una centrifuga Eppendorf; se pesó la biomasa húmeda que posteriormente fue congelada a -80 °C antes de su liofilización.

3.7. MÉTODO PARA EL ANÁLISIS TAXONÓMICO.

Se realizó el análisis taxonómico de las especies de *Pseudo-nitzschia* de las muestras provenientes de los cultivos que fueron tratadas previamente con el propósito de eliminar la materia orgánica usando el método descrito por Lundholm *et al.* (2002). Se filtró la solución de agua destilada que contenía los frústulos resultantes, utilizando filtros isopore (RTPP) 1,2 µm para posteriormente unirlos a un portaobjeto de plata coloidal. El producto obtenido fue sometido a evaporación por punto crítico y pulverización catódica con recubrimiento de paladio y oro. Finalmente, las muestras fueron analizadas y microfotografiadas usando un microscopio ESEM FEI Quanta 200, para observar estructuras de carácter taxonómico y clasificar las especies. Se tomó en cuenta las características mostradas en la Figura 6 y 7. como la forma y longitud del frústulo, el número de poroides, el número de fíbulas y estrías.



3.8 DETERMINACIÓN DE ACIDO DOMOICO

La preparación de los extractos para determinar la presencia de ácido domoico se realizó con las muestras liofilizadas de los cultivos de *Pseudo-nitzschia*, resuspendidas en agua en

Partes de la valva :

1. Estria: hilera de poroides
2. Interespacio central: espacio aumentado
3. Fibula: punto silíceo sobre

Figura 6. Vista del frustulo de *Pseudo-nitzschia* (Fuente: Elaboración propia, 2014)

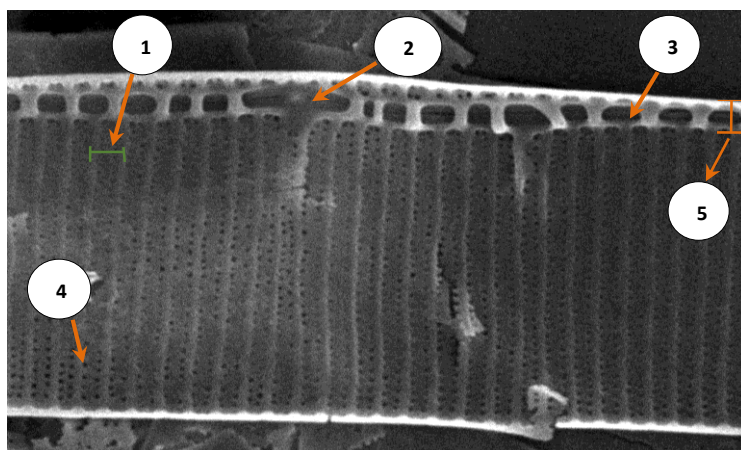


Figura 7: Partes de la Valva de *Pseudo-nitzschia* (Fuente: Elaboración propia 2014).

proporción 20:80 liofilizado: agua. Se mezcló la emulsión resultante con metano acuoso 50% y se sometió a ultrasonidos con un disruptor de ultrasonidos Branson Sonic Power 250. Posteriormente se filtró a 1,2 μm con filtro Isopore (RTTP) y se lavó con formiato de amonio 0,6 M. El extracto obtenido fue centrifugado a 20.000 rpm por 20 minutos y filtrado nuevamente a 0,45 μm con filtro de jeringa de 13 mm de diámetro (Technokroma). Se determinó el contenido de ácido domoico en cultivos de *Pseudo-nitzschia* por Cromatografía Líquida de Alto rendimiento con detección por Espectrometría de Masa/Masa (LC-MS/MS) en el Departamento de Oceanografía del Centro de Investigación Marinas de la Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, España. La muestra fue enviada a este laboratorio de referencia debido a que en el Perú no cuenta con equipamiento de alta precisión.

La determinación de ácido domoico se realizó mediante el procedimiento descrito por Quilliam (2004). Para esto, la separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 Kinetex (50 x 2.1 mm, 2,6 μm) (Phenomenex; Torrance, California, EUA.), mantenida a 35° C. La elución se realizó mediante gradiente utilizando dos fases móviles. La fase A consistente de ácido fórmico 0,2% en agua y la fase B constituida por ácido fórmico 0,2% en metanol acuoso al 50%.

El espectrómetro de masas (LC/MS) LCQ Deca XP Plus (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE.UU) equipado con fuente de ionización electro spray (ESI) fue operado en modo positivo con un voltaje de spray de 3500 V. La transferencia de iones se realizó a temperatura del tubo en 300 °C utilizando nitrógeno (> 99,98%) como gas impulsor y gas auxiliar a flujos de 45 y 15 unidades LCQ, respectivamente. La lectura se llevó a cabo en modo MS/MS usando helio (> 99,999%) para inducir la disociación por colisión (CID) con una presión de gas entre 1,45 y 1,5 Torr. La optimización del espectro de MS/MS se realizó mediante infusión post-columna de una solución estándar de ácido domoico. Para la fragmentación de ión parental 312,15 m/z $[M + H]^+$ se utilizó una energía de colisión del 30% para posteriormente realizar un escaneo de los iones producto en un rango entre 160 a 320 m/z , detectando tres iones producto que correspondieron a m/z 294,1 $[M + H - H_2O]^+$, m/z 266,1 $[M + H - HCOOH]^+$ y m/z 248,1 $[M + H - H_2O - HCOOH]^+$. El ion producto más abundante (m/z 266) fue empleado para la cuantificación de la toxina, mientras que la confirmación se basó en la proporción de iones producto de MS/ MS (m/z 294,1, 248,1, y 193,1) con un intervalo de tolerancia del 20%. El control del LC/MS y la adquisición de datos se realizaron con el software Xcalibur 1,3 (Thermo Fisher Scientific). El límite de detección de la técnica fue del 0,5 ng/mL.

3.9 EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA TOXINA AMNÉSICA EN LA PRODUCCIÓN DE *Argopecten purpuratus*.

Se recopiló datos históricos del plan de monitoreo de floraciones algales nocivas del 2003 al 2012 de la zona de Atenas (Perú) en un periodo de 10 años, publicados por el Instituto del Mar del Perú de la Zona 21C-PAR.

Se tomó los datos de los monitoreos para análisis de toxinas del SANIPES de la zona de Atenas (21C-PAR) de 2008 al 2012.

Se realizó la estimación del peligro en base a episodios tóxicos de AD de otros países, así como a planes de monitoreos de otros países y de esta manera tomar medidas precautorias en caso de eventos futuros.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. ÁREA DE ESTUDIO

Los parámetros ambientales con pH, temperatura, y salinidad registrados en las tres estaciones de muestreo (isla San Lorenzo, bahía de Pucusana y bahía de Paracas, se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1: Datos de los nueve muestreos realizados para la obtención de *Pseudo-nitzschia* y parámetros ambientales; pH, Temperatura (°C) y Salinidad psu

Lugares / Coordenadas	Fecha	pH	Prof.(m)	Temp. °C	Salinidad psu
Isla San Lorenzo	11/05/2012	7.8	5.2	17	35
12°04' 10.6''	14/07/2012	7.4	5.0	18	35
77°13'14.3''	30/09/2012	7.6	5.0	18	35
Pucusana	12/05/2012	7.5	5.0	14	35
12° 28'13'' S;	26/05/2012	7.3	5.0	16	35
76°47'45'' O	03/03/2013	7.6	5.0	18	35
Atenas, Paracas	23/06/2012	7.2	0-5	17	35
13°49'01'' S;	08/09/2012	7.8	0-5	16	35
76°17'34'' O	14/11/2012	7.8	0-5	17	35

El pH fluctuó entre 7.2 registrado en Atenas el 23 de julio de 2012 y 7.8 en los dos muestreos realizados en Atenas, Paracas y uno en la isla San Lorenzo (Tabla 1). En cambio los valores de

temperatura presentaron una variación entre los 14 y 18 °C en los muestreos realizados en Pucusana, mientras que la salinidad se mantuvo alrededor de los 35 psu en todos los muestreos realizados (Tabla 1).

4.1.2. OBTENCIÓN DE CEPA

Se obtuvieron cuatro cepas del área de la isla San Lorenzo y una cepa del área de Paracas, mientras que en la zona de Pucusana no se llegó a encontrar cepas de *Pseudo-nitzschia*.

La nomenclatura designada fue la siguiente:

- Cepa: IMP-BG-035 isla. San Lorenzo (*P. subpacifica*)
- Cepa: IMP-BG-042 isla San Lorenzo (*P. pungens*)
- Cepa: IMP-BG-043 isla San Lorenzo (*P. pungens*)
- Cepa: IMP-BG-044 isla San Lorenzo (*P. pungens*)
- Cepa: IMP-BG-048 bahía Paracas (*P. pungens*)

4.1.3. CULTIVO DE CEPAS DEL GENERO *Pseudo-nitzschia*

Cultivo de la cepa IMP-BG-035 (*P. subpacifica*).

De los tres cultivos paralelos de esta cepa solo dos presentaron crecimiento (n=2). Los promedios de las densidades diarias de cultivo se ajustaron a la curva de crecimiento “Rational Model” con un r^2 de 0,88. Esta población alcanzó su mayor densidad (107 863 cél. mL⁻¹) al sexto día de cultivo. Posteriormente la población entró en una fase de muerte, sin lograr la fase estacionaria del cultivo como se observa en la Figura 8. La mayor tasa de crecimiento de esta población ($\mu = 0,91$) se registró entre los días 5 y 6, en cambio la menor tasa de crecimiento ($\mu = 0.05$) se observó entre los días 1 y 2, indicando una fuerte fase de latencia del cultivo.

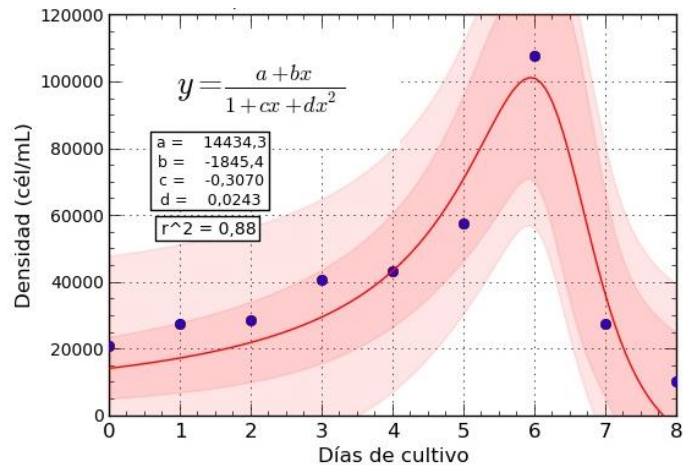


Figura 8. Curva de crecimiento poblacional de la cepa IMP-BG-035 (*P. subpacificus*).

Reciprocal Quadratic n=2

Cultivo de la cepa IMP-BG-042 (*P. pungens*).

Se realizó dos cultivos de la cepa IMP-LBA-042 (n=2), los cuales presentaron una similar tasa de crecimiento y cuyos promedios de densidades diarias se ajustaron a la curva de crecimiento “Reciprocal Quadratic” con un r^2 de 0.99. La población alcanzó su mayor densidad (745 220 cél. mL^{-1}) al quinto día de cultivo, su mayor tasa de crecimiento ($\mu=1.08$) se registró entre el segundo y tercer día de cultivo, en cambio la menor tasa de crecimiento ($\mu=0.2$) se observó entre los días 4 y 5 de cultivo, lo que indica la llegada a una fase estacionaria de cultivo (Figura. 9).

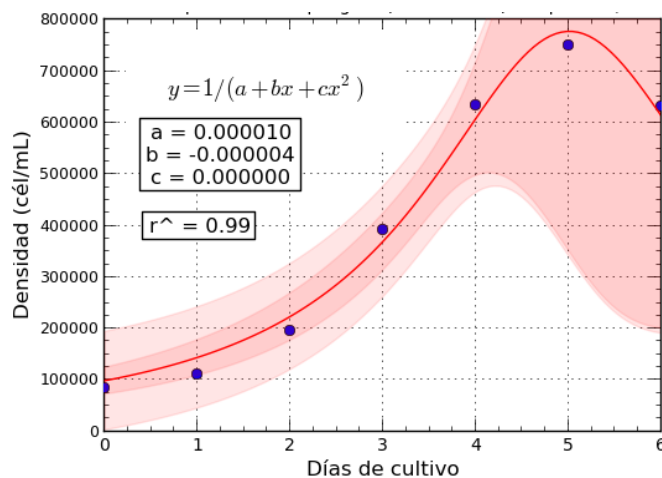


Figura 9. Curva de crecimiento poblacional de la cepa IMP-BG-042 (*P. pungens*) Reciprocal

Quadratic n=2

Cultivo de la cepa IMP-BG-048 (*P. pungens*).

Se realizó dos cultivos de la cepa IMP-BG-048 (n=2), los cuales presentaron una similar tasa de crecimiento y cuyos promedios de densidades diarias se ajustaron a la curva de crecimiento “Rational Model” con un r^2 de 0.99. La población alcanzó su mayor densidad (960,869 cél. mL⁻¹) al sexto día de cultivo, su mayor tasa de crecimiento ($\mu = 1.02$) se registró entre el tercer y cuarto día de cultivo. En cambio la menor tasa de crecimiento ($\mu = 0.28$) se observó entre el quinto y sexto día de cultivo, lo que indica la fase estacionaria de cultivo (Fig. 10).

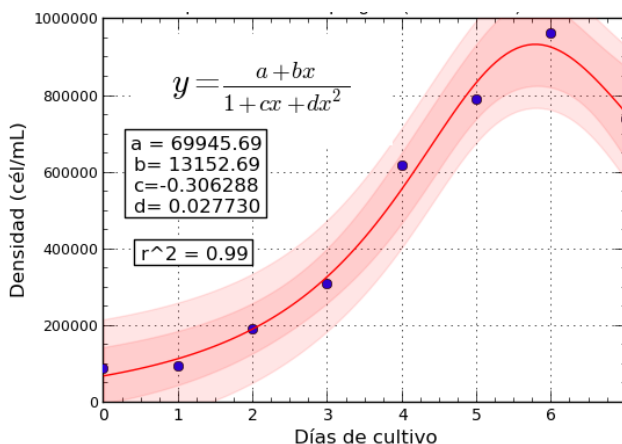


Figura 10: Curva de crecimiento de la cepa IMP-BG-048 (*P. pungens*) n=2, Reciprocal Quadratic

Se realizó cultivos en volúmenes de 9 litros para acumular biomasa de las cepas IMP-BG-035 (*P. subpacificus*), IMP-BG-042 y IMP-BG-048 (*P. pungens*), con la finalidad de realizar los análisis de toxinas. Las cepas presentaron un buen crecimiento con aireación y fueron cosechadas y liofilizadas al sexto día de cultivo con los siguientes resultados:

- IMP-BG-035 (*P. subpacificus*), 245 455 cél/mL; 4 g/0,4 g (BH/BS)
- IMP-BGA-042 (*P. pungens*), 264 064 cél/mL; 3,8 g/ 0,36 g (BH/BS)
- IMP-BG-048 (*P. pungens*), 127 945 cél/mL; 2,4 g/0,22 g (BH/BS).

4.1.4. ANÁLISIS TAXONÓMICO

a. *Pseudo-nitzschia pungens*

Los estudios taxonómicos realizados permitieron identificar las cepas IMP-BG-042, IMP-BG-048 como *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) G. R. Hasle, 1993 (Fig. 11). Las células forman colonias por superposición de sus extremos valvares aproximadamente en 1/3 de su

largo total. El frústulo se observa fuertemente silificado, tienen forma lineal, lanceolada con los extremos valvares aguzados. Las valvas presentan un contorno simétrico medido desde el eje apical. El eje apical es de 80-130 μm , mientras que el eje transapical es de 2-7 μm . La superficie valvar presenta el mismo número de fíbulas e interestrías 12-5 en 10 μm . Las estrías están formadas por dos hileras de poroides cuya densidad es de 4-5 en 1 μm (Tabla 2). Las estrías de ambos extremos difieren en estructura por número y posición de poroides. El rafe es continuo y carece de interespacio central.

Tabla 2: Comparación taxonómica de *P. pungens* (Fuente: Elaborado con datos de Sar, 2006).

Caracteres	El presente estudio	Sar (2006)	Ferrario <i>et al.</i> (1999)	Takano y Furoki (1977)	Rivera (1985)	Hallegraeff (1994)	Larsen y Nguyen (2004)	Fryxell y Hasle (2004)
Contorno de la valva	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada	Linear lanceolada
Eje Apical μm	80-130	73-110	86-145	81-151	74-142	90-130	80-116	74-174
Eje transapical μm	2,1-4,0	2-3,8	2,8-4,5	2,6-5,3	3-4,5	2,6-4,5	2-3,8(4)	2,4-5,3
Fíbulas /10 μm	12-15	10-14	12-18	9-16	9-15	10-15	(8)9-12 (13)	9-16
Interestrías /10 μm	12-15	10-13	10-18	9-16	9-15	10-15	(8)9-12 (13)	9-16
Hileras de poroides	2	2-3	2	2	2-3	2	2	2-3
Poroide / 1 μm	3-4	(2) 3(5)	3-4	3-4	3-4	3-4	2-3(4)	3-3,5
Región geográfica	bahía Paracas (Ica), Isla San Lorenzo (Callao)	Golfo de San Matías	Aguas costeras de Argentina	Aguas costeras de Japón	Aguas costeras de Chile	Aguas de Australia	Aguas costeras de Vietnam	Varias regiones

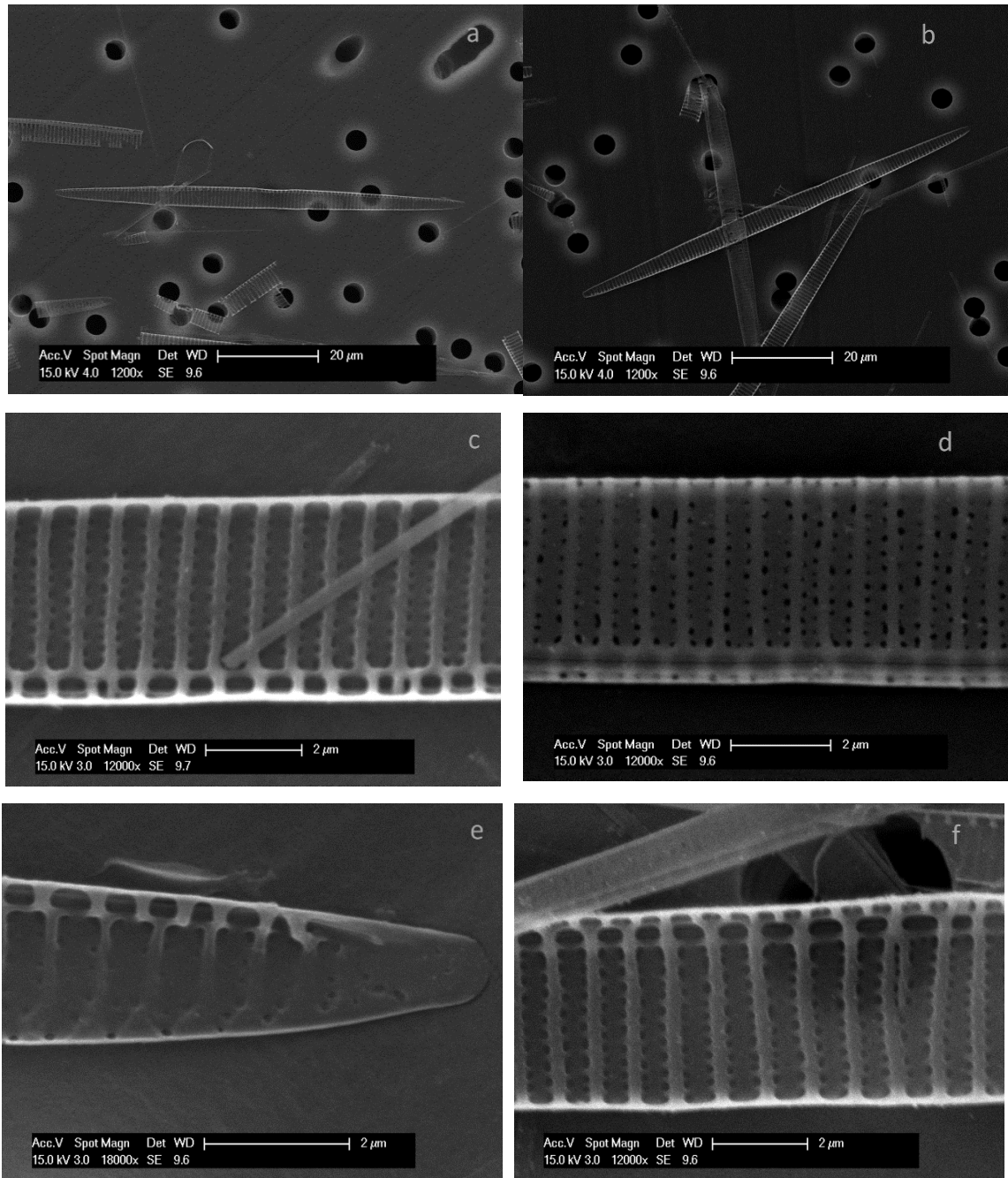


Figura 11: *Pseudo-nitzschia pungens* (M.E): a y b Aspecto general de la valva, c, d, e y f Vista interna de la valva, c, d, e y f vista interna de las estrías y líneas de poroides, e) vista interna de uno de los extremos valvares. (Fuente: elaboración propia, 2014).

b. *Pseudo-nitzschia subpacifica*.

Los estudios taxonómicos determinaron que la cepa IMP-BG-035 corresponde a *Pseudo-nitzschia subpacifica* (Hasle) Hasle, (Fig. 12). En esta especie, las colonias están formadas por la superposición de las células en 1/6. Los frústulos están débilmente silicificados, tienen forma lanceolada con los extremos valvares aguzados (Ferrario et al., 2002), un lado de la valva convexa, el otro recto. El eje apical es de 47 a 52 μm , mientras que el eje transapical es de 4,7 a 5,3 μm . La superficie valvar estriada (Fernández et al., 2013) presenta el mismo número de fíbulas e interestrías, 17 en 10 μm . Las estrías están formadas por dos hileras de poroides cuyo número es de 8–9 en 1 μm ; el rafe presenta nódulo central y un gran interespacio central (Tabla 3).

Tabla 3: Comparación taxonómica de *P. subpacifica* (Fuente: elaboración propia, 2014).

Caracteres	El presente estudio	Hasle (1965) Hasle y Syvertsen (1997)	Rivera, 1985	Hallegraeff (1994)	Kaczmarek et al. (2005)	Fernandes et al (2014)
Contorno de la valva	Linear, asimétrico	asimétrico	asimétrico	asimétrico	asimétrico	asimétrico
Eje apical (μm)	42-52	33-70	21-32	50-119	72-88	36-68
Eje Transapical (μm)	4.7-5.3	5-7	2.7-4.2	4.5-7	5.7-7.2	3.8-5.8
Fíbulas/10 μm	17	15-20	15-21	15-17	15-20	17-21
Estrías/10 μm	30	28-32	29-36	26-31	27-30	29-33
Hileras de poroides	2	2	1	2	2	2
Poroide/1 μm	8-9	9-10	5-7	6-8	7.5-10	8-9
Nódulo central	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Región geográfica	Isla San Lorenzo, Callao	Skagerrak, Atlántico Norte	Arica hasta Chiloé, Chile	Australia	Bahía Fundy, Canadá	Golfo de Maine

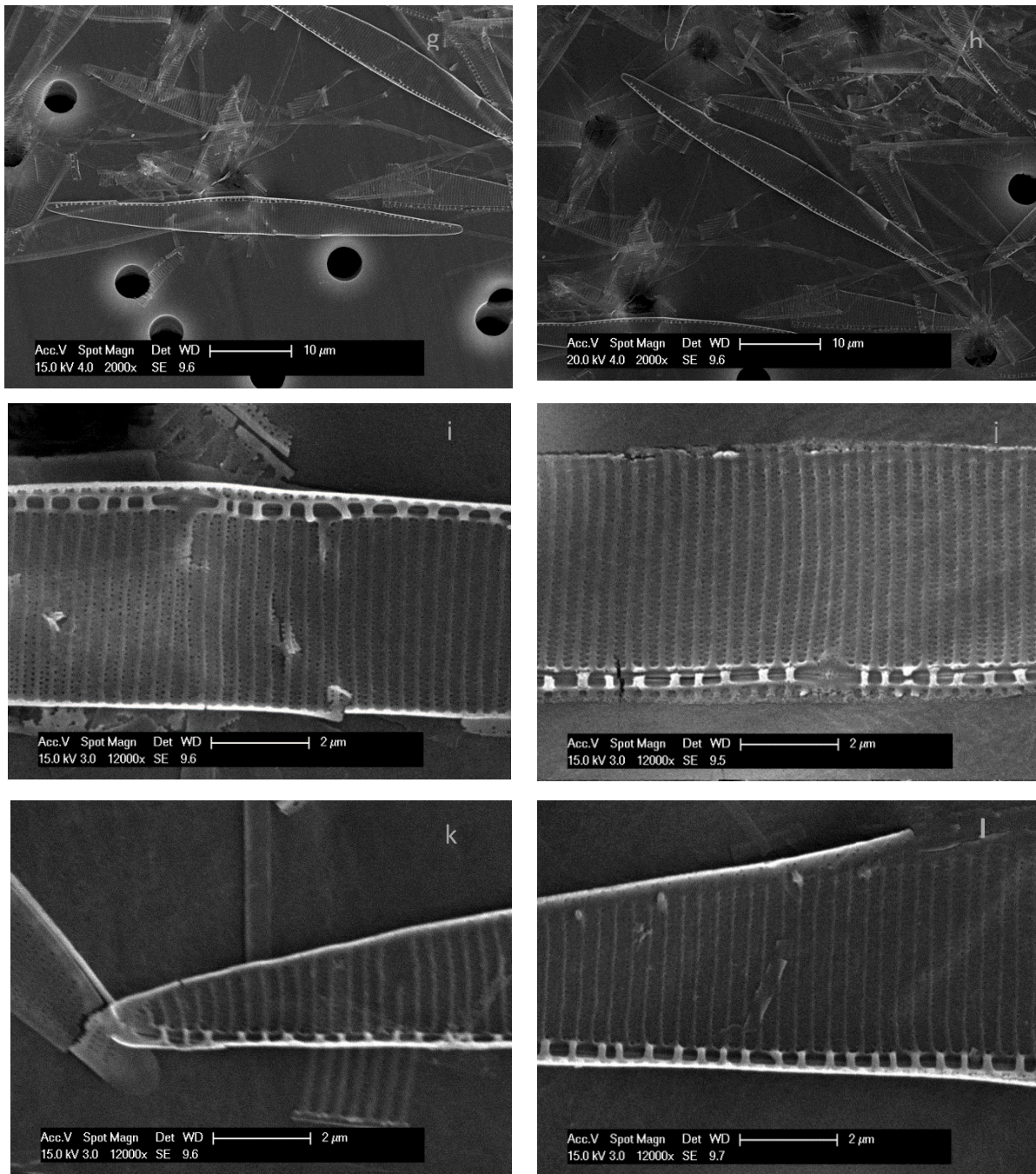


Figura 12. *Pseudo-nitzschia subpacificca* (ME): g y h: aspecto general de la valva; i y j: detalle de la valva donde se aprecia el nódulo central, estrías y fíbulas; k: vista interna de uno de los extremos de la valva; i, j y l: vistas internas de las estrías. (Fuente: elaboración propia, 2014).

4.1.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO EN CULTIVO DE MICROALGAS SELECCIONADAS.

Los análisis para la determinación de ácido domoico en los extractos celulares *P. subpacifica* (IMP-BG-035) y *P. pungens* (IMP-BG-043 y IMP-BG-048) demostraron que en ninguna de estas cepas se detectó la presencia de esta toxina con un límite de detección de 0,5 ng mL⁻¹.

Para corroborar el correcto funcionamiento de la técnica y el equipo, en la figura 13, corrió el estándar del AD, donde se observa un cromatograma de un patrón de ácido domoico (50 ng mL⁻¹) con un pico cromatográfico característicos para el ion molecular 312 m/z en el minuto 4.85, tanto en el modo Full Scan como en el modo MS/MS. Adicionalmente, la fragmentación de este ión muestra los iones producto característicos, generados en una trampa iónica que corresponden a 294, 266 y 248 m/z.

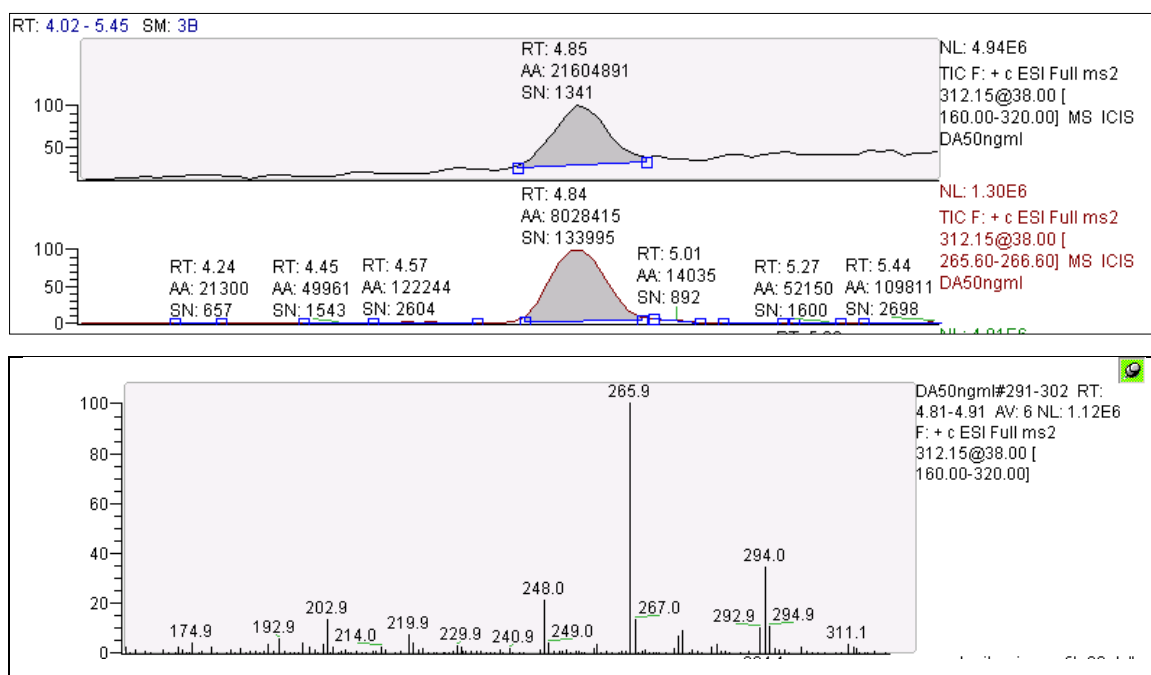


Figura 13. Cromatogramas de LC MS/MS y espectro de fragmentación para patrón de ácido domoico. (50 ng mL⁻¹)(Fuente: elaboración propia, 2014).

Los cromatogramas de las cepas cultivadas mostraron que en ninguno de los casos se detectó el pico cromatográfico característico para esta toxina en el minuto 4.85 (Fig. 14 A, B, C), ni el espectro de fragmentación característico del AD para las cepas *P. subpacificica* (IMP-BG-035) (Fig. 15 A), *P. pungens* (IMP-BG-043) (Fig. 15 B) y *P. pungens* (IMP-BG-048) (Fig. 15 C).

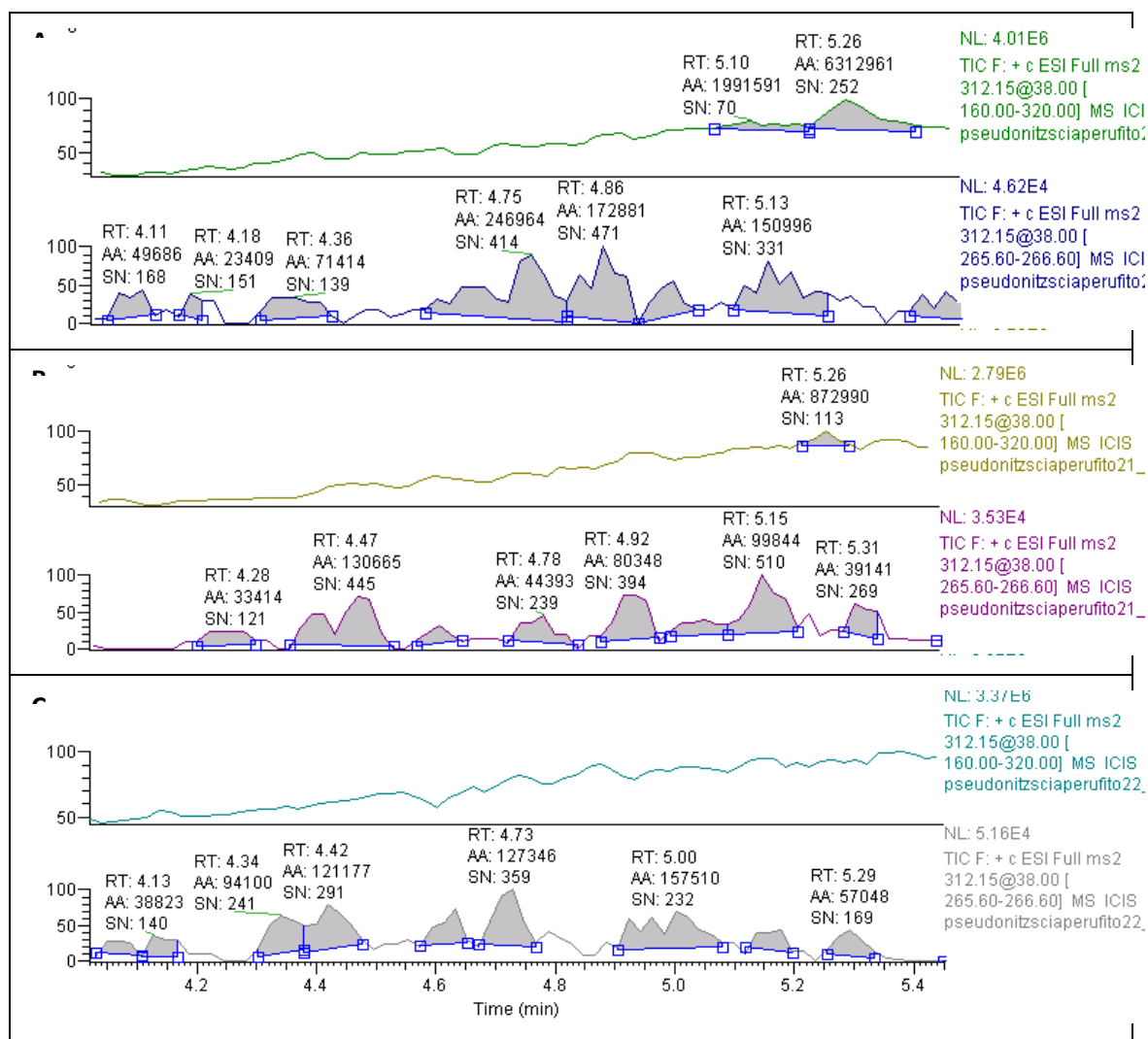


Figura 14. Cromatogramas de LC-MS/MS para: (A) *Pseudo-nitzschia subpacificica* (IMP-BG-035); (B.) *Pseudo-nitzschia pungens* (IMP-BG-043); (C): *Pseudo-nitzschia pungens* (IMP-BG-048) (Fuente: elaboración propia, 2014).

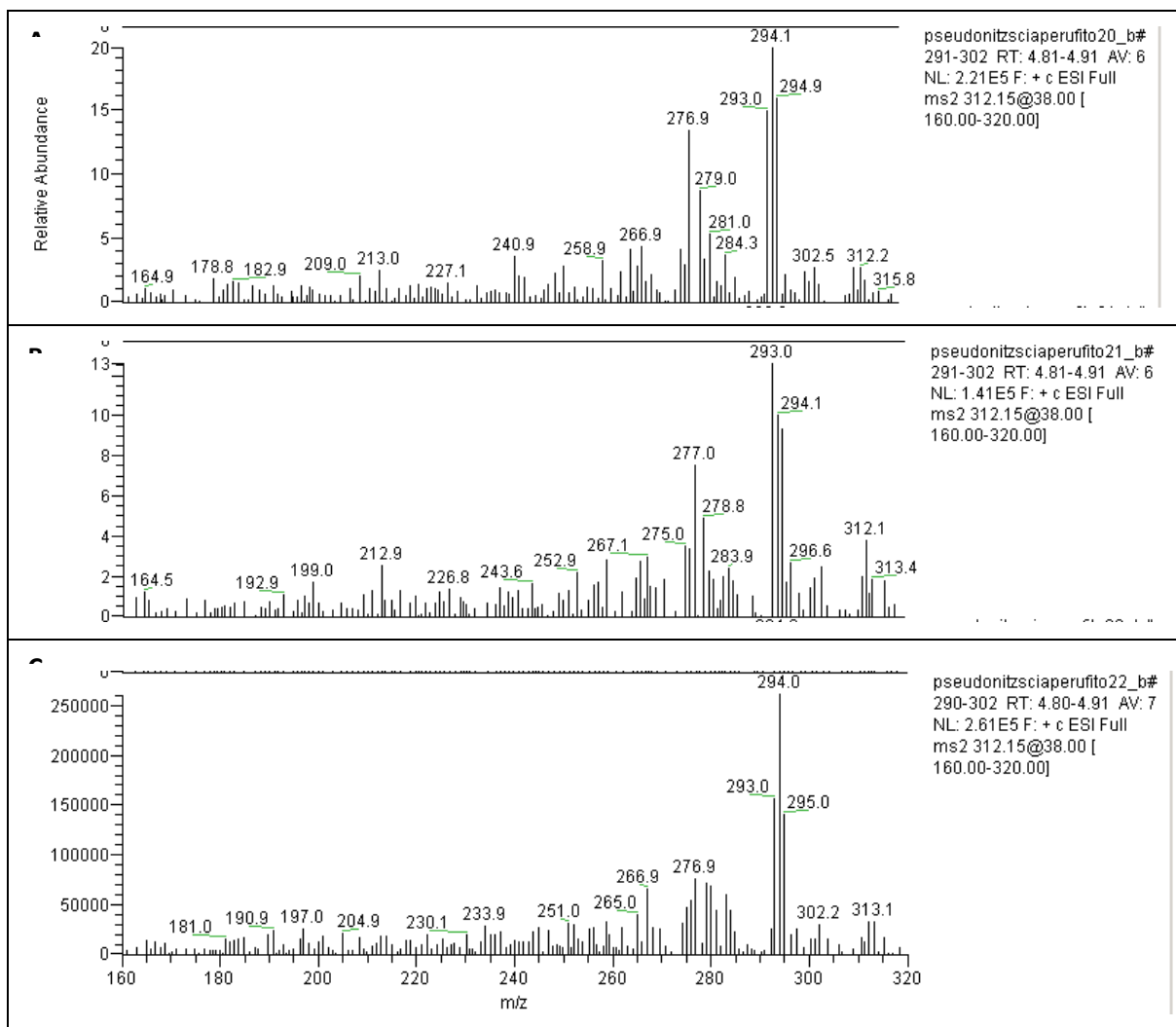


Figura 15. Espectro de fragmentación de los cromatogramas de LC-MS/MS para: A: *Pseudo-nitzschia subpacificica* (IMP-BG-035), B: *Pseudo-nitzschia pungens* (IMP-BG-043) y C: *Pseudo-nitzschia pungens* (IMP-BG-048) (Fuente: elaboración propia, 2014).

4.1.6 EVALUACIÓN DE RIESGO

Para realizar la evaluación de riesgo o presencia del veneno amnésico en zonas de producción de pectínidos, se hizo un registro histórico de 10 años de muestreo de la zona 21C PAR (13°49'01'' S; 76°17'34'' O) Atenas, bahía de Paracas de los monitoreos realizados por el IMARPE. De la misma manera, se compiló la información del SANIPES del año 2008 al 2012 para ver la presencia de la toxina de ácido domoico de la misma zona (13°49'01'' S; 76°17'34''

O). Por falta de data no se pudo hacer históricos de la bahía de Pucusana ni de la Isla San Lorenzo.

En la recopilación de la data para el monitoreo de microalgas (Figura N° 16 y 17), así como también en el programa de determinación de toxinas de la zona 21C PAR(Anexo N° 2 al N° 6), se detectó que existen muestreos que no se realizaron quincenalmente como dice el programa. Los cuadros se elaboraron con datos publicados en la página web del SANIPES.

En la bahía Paracas (21C-PAR) (Figuras 16 y 17), solo se observa el registro de dos especies *P. delicatissima* y *P. pungens*. La primera especie presentó una alta frecuencia de presencia (89%) en los muestreos superficiales durante esta década, sin embargo en el estrato de 3,5 a 4,5 m de profundidad su registro fue de un 13%. En general, la densidad de esta *P. delicatissima* es baja y fluctuó entre 100 más de 16 000 cél /L (Figura 16). La presencia de *P. pungens* en los muestreos a superficie fue superior a un 85% y en el estrato de 3,5 a 4,5 m de profundidad solo fue de un 50% (Figura 17). La densidad de esta especie durante una década fue baja (< 30000 cél/L), excepto el “bloom” registrado el 2004 donde superó los 150 000 cél/L en el estrato de 3,5 m de profundidad.

Los muestreos realizados para detectar AD reportados por SANIPES entre el 2008 al 2012 (anexo del 2 al 6), registran ausencia de ácido domoico para los límites de detección de los equipos que fueron empleados para sus análisis.

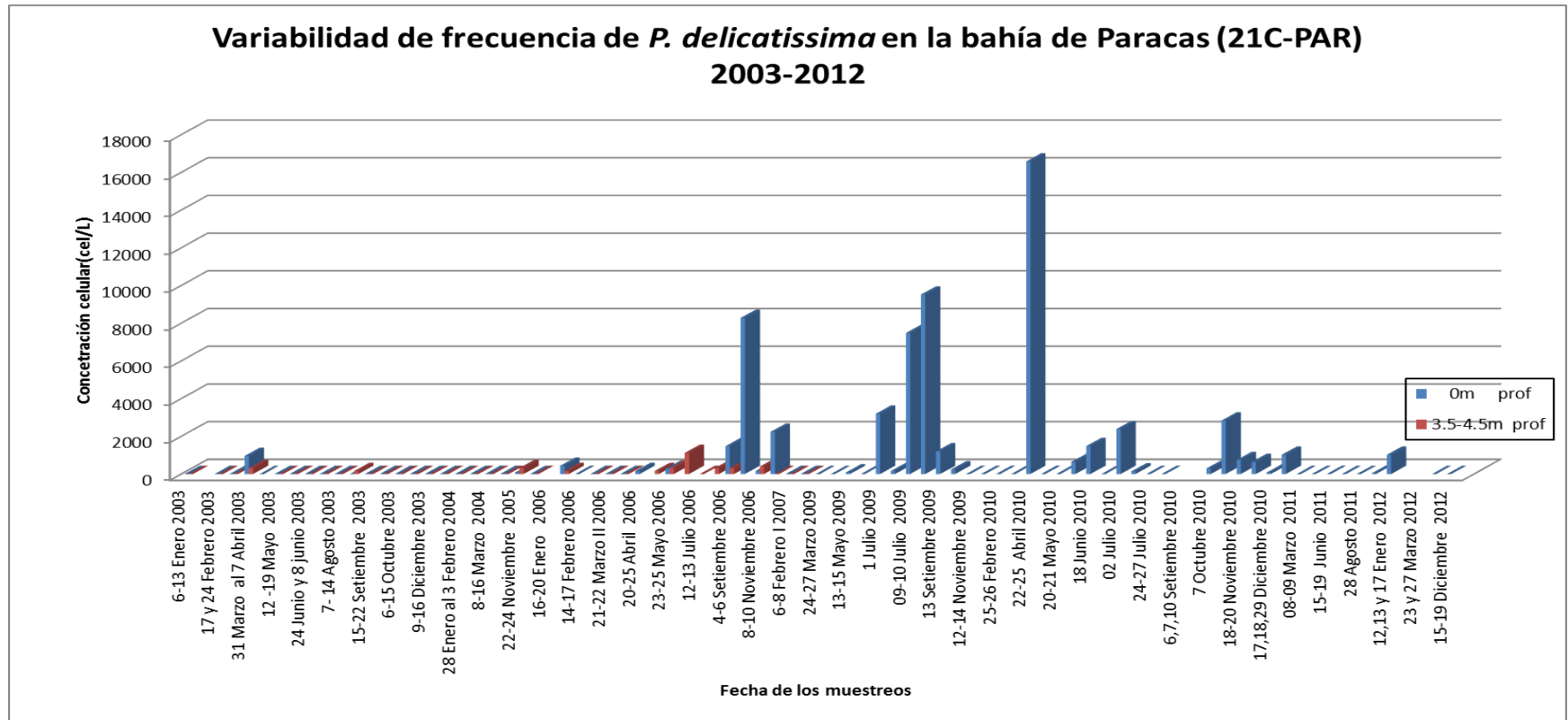


Figura 16. Registro *P.delicatissima* de los muestreos realizados por el IMARPE entre los años 2003 a 2012 (Fuente: página web del IMARPE del monitoreo de fitoplancton potencialmente tóxico).

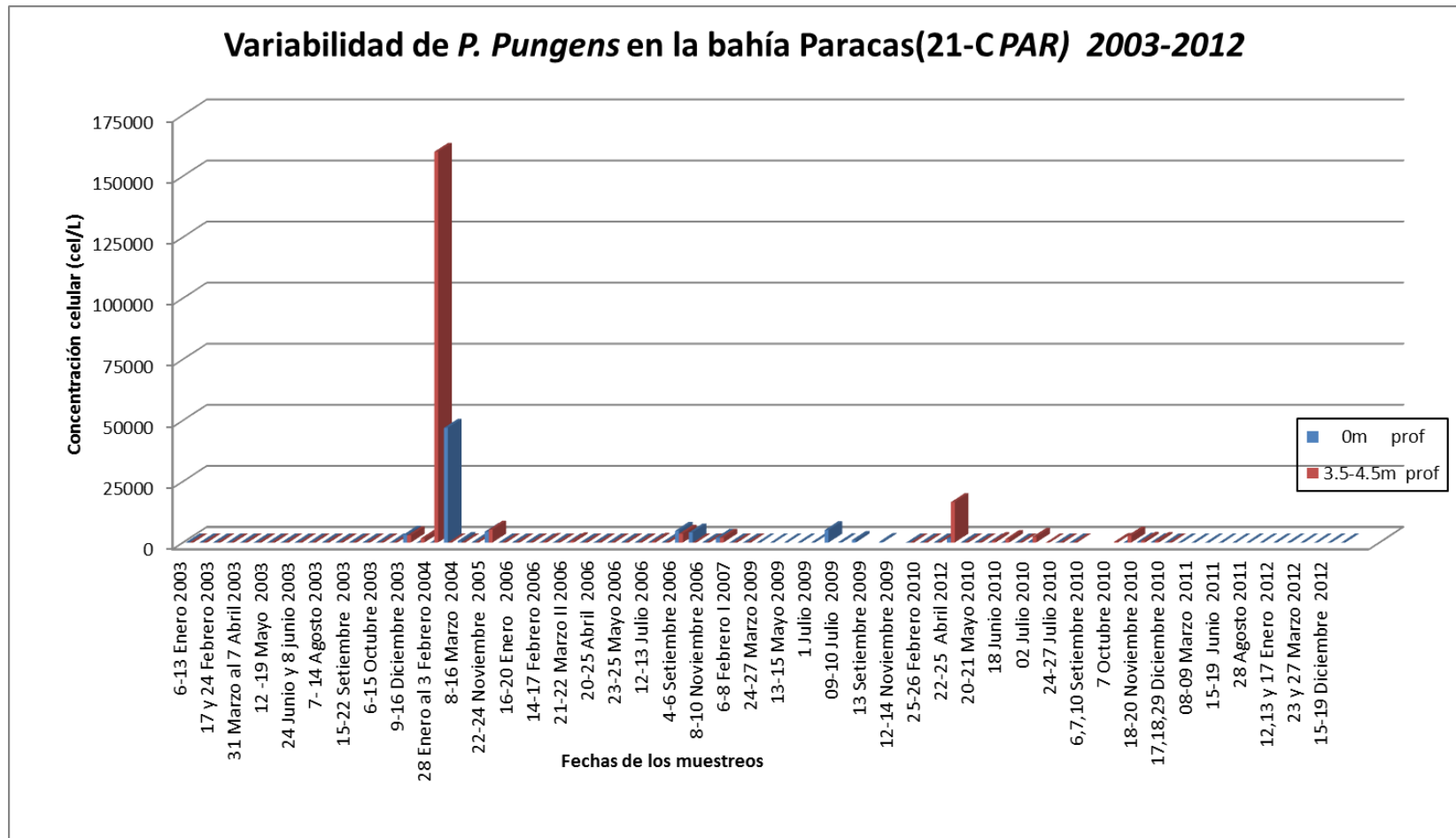


Figura 17: Registro *P. pungens* de los muestreos realizados por el IMARPE entre los años 2003 a 2012
(Fuente: página web del IMARPE del monitoreo de fitoplancton potencialmente tóxico)

- a. **Estimación del riesgo:** La tabla 4 se elaboró con datos de planes de monitoreos de otros países y por parte de la reglamentación de SANIPES.

Tabla 4: Estimación de Riesgo en áreas de cultivo y extracción de moluscos.

CONDICIONES		Nivel del riesgo
Microalga <i>P. Australis</i> (Hasle, 1965); <i>P. pungens</i> , <i>P. seriata</i> , <i>P. Pseudodelicatissima</i> (IMARPE); <i>P. subpacifica</i> (este trabajo 2014)	Superior al 65% de dominancia de otras especies ⁽¹⁾ <i>Pseudo-nitzschia spp</i> : concentración celular máxima permitida 5×10^5 cel/L	Alto monitoreo intenso y cierre del área de extracción del molusco
	<i>P. seriata</i> : concentración celular de 2×10^5 cel/L <i>P. delicatissima</i> : concentración celular de 2×10^5 cel/L <i>P. pungens</i> : concentración celular $> 10^3$ ⁽⁵⁾	Medio monitoreo frecuente
	Ausencia de la microalgas del genero <i>Pseudo-nitzschia</i>	Bajo
Frecuencia de muestreo de áreas de cultivo y análisis para ácido domoico	Muestreos Irregulares	Alto probabilidad de que el molusco extraído este contaminado con AD
	Quincenal	Medio
	Semanal en Caso de ser necesario.	Bajo
Frecuencia de muestreo para fitoplancton: Áreas de cultivo y extracción de moluscos	Irregular	Alto probabilidad de presencia de microalgas toxicas y presencia de AD
	Quincenal ⁽³⁾ ; Muestreo cualitativo ⁽²⁾	Medio
	Semanal ⁽³⁾ , Muestreo cualitativo ⁽²⁾	Bajo
Molusco contaminado con AD	Superior a 15 mg/kg (ppm) de carne del molusco ⁽¹⁾	Alto Cierre cautelar del área y suspensión de extracción de los moluscos ⁽⁴⁾⁽³⁾
	Menor o igual 0.9-2 mg/kg carne del molusco ⁽⁶⁾⁽⁷⁾	Medio
	Libre de la toxina	Bajo
Sintomatología: en caso de ingestión de moluscos contaminados	Hemorragia digestiva, Convulsiones, Depresión del sistema nervioso central ⁽⁸⁾	Alto Unidad de cuidados intensivos ⁽⁸⁾
	Problemas gastrointestinales Nauseas, vómitos, Pérdida de memoria	Medio Hospitalización
	Ausencia de sintomatología	Bajo

(1): SMB/NT3/Julio 2012; (2): COFEPRIS 2005; (3): NSW 2011; (4) SANIPES 2004; (5): Anderson et al., 2001. (6) Lefebre and Roberston, 2010; (7): Kumar et al., 2009; (8): Álvarez., 2009.

4.2. DISCUSIONES

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* son de naturaleza cosmopolita, habitan en aguas tropicales y polares, así como costeras y oceánicas (Hasle 1965; Skov *et al.* 1999; Hasle 2002). Los cultivos de *Pseudo-nitzschia* spp pueden crecer a salinidades bajas como a 6 psu y altas como 48 psu, y a temperaturas bajas como a 4°C y altas como 30°C, con una amplia gama de crecimientos óptimos (Miller y Kamykowski, 1986; Jackson *et al.*, 1992; Lundholm *et al.*, 1997, Thessen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2011). Las dos especies detectadas en el presente estudio *P. pungens* y *P. subpacific*, se encontraron en aguas con salinidades alrededor de los 35 psu y a temperaturas que fluctuaron entre los 14-18°C, valores que están dentro de los rangos registrados por Trainer *et al* (2012).

P. pungens fue colectada en los meses de invierno en la Isla San Lorenzo y en septiembre en la bahía Paracas. Esta especie fue reportada en aguas peruanas por Hasle (1965) junto a *P. australis*, y por Strickland *et al.* (1969) con las especies *P. americana*, *P. delicatissima*, *P. pacifica* y *P. seriata*, para la zona sur del litoral peruano. Guillen *et al.* (1969) registran a *P. pungens* durante el fenómeno El Niño del 1965 en los meses de otoño a lo largo de la costa Peruana (Latitud 4° al 12°S), a una temperatura superficial del mar que fluctuó entre los 15° a 24°C, mientras que Rojas de Mendiola (1978) al estudiar el contenido estomacal de la anchoveta identificó a *P. pungens* como alimento de este recurso pelágico.

Las características taxonómicas que se encontraron para *P. pungens* son similares a la longitud de las células reportadas en Australia por Hallegraeff (1994), en cambio las dimensiones del ancho (eje transapical), están más cercanas a las observadas en el Golfo San Matías- Argentina por Sar *et al.* (2004), cabe señalar que ambas dimensiones están sujetas al ciclo reproductivo de la población en su medio ambiente. Sin embargo, una característica taxonómica importante de la especie es la cantidad de hileras de poroides (2) y el número de poroides en un micrón (3 y 4), igual al número descrito por Ferrario *et al.* (1999); Takano y Kuroky (1977); Rivera (1985); Hallegraeff (1994); Larsen y Nguyen (2004); Fryxelli y Hasle (2004).

Pseudo-nitzschia subpacific no había sido reportada anteriormente para las aguas del Perú, fue colectada en el presente estudio en Isla San Lorenzo-Callao en febrero de 2013 con una

temperatura superficial del mar de 17°C. Esta especie ha sido reportada en: Australia, Bahía Fundy, California, Bahía de Chesapeake, China, Francia(Atlántico), Golfo de México, Golfo de Panamá, Irlanda, Corea, Bahía de Monterrey, Noroeste de África, Portugal, España(Atlántico), Washington (Lelong et al, 2012); en Chile, desde 18° 20´S(Arica) hasta 41° 46´ S (Chiloe) (Rivera, 1985).

Las características taxonómicas de *P. subpacific*a, así como el rango de longitud, que se encuentra dentro del rango registrado por diversos autores (Hasle, 1965, Hasle y Syvertsen, 1997, Fernández et al., 2014) y las dimensiones del ancho (eje transapical), son similares a las reportadas por Fernandes et al., (2014); ambas dimensiones están sujetas al ciclo reproductivo de la población en su medio ambiente. Una característica taxonómica importante de la especie es la presencia del nódulo central (Hasle, 1965; Rivera, 1985; Hallegareff, Kacsmarska et al., 2005), y el número de poroides en un micrón (8-9) es similar a lo descrito por Fernández et al., (2014)

Las cuatro cepas aisladas de *P. pungens* y una de *P. subpacific*a fueron cultivadas bajo condiciones ambientales de acuerdo a la metodología empleada por Álvarez et al.(2009); Trainer et al., (2000); Anderson et al. (2006); García y Mendoza et al. (2009), parámetros que fueron conseguidos en una cámara bioclimática (14°C) con fotoperiodo (12L: 12O). *P. pungens* se adaptó rápidamente a estas condiciones ambientales, alcanzando una tasa de crecimiento de 1.02 y una alta densidad (> 900000 cél/mL) al 6° día de cultivo, concentración muy superior a las 90000 cél/mL obtenidas por Calu et al. (2009), en un cultivo realizado en fotobiorreactor de 2,3 L a 14°C, cuya mayor tasa de crecimiento fue de 0.89.

*P. subpacific*a no presentó la misma adaptación al cultivo que *P. pungens*, sus células se pegaban y formaban una pequeña mucosidad, sin embargo, en un momento se logró una alta tasa de crecimiento ($\mu= 0,91$), esta marcada diferencia en la tasa de crecimiento y máxima densidad alcanzada por ambas especies de *Pseudo-nitzschia*, refleja el carácter de cosmopolita de *P. pungens*, que se puede adaptar a cualquier condición de cultivo (Hasle, 2002).

El análisis toxicológico con el espectrómetro de masas (LC/MS) de dos cepas aisladas y cultivadas de *P. pungens* (IMP-BG-042 y IMP-BG-048) y de la cepa *P. subpacific*a (IMP-BG-

035), dio como resultado la ausencia de ácido domoico. Sin embargo, esto no indica que estas especies siempre sean atóxicas, ya que pueden haber condiciones ambientales o de caracteres fisiológicos de estas dos especies que puedan dar eventos tóxicos, (Bates et al., 1991, 1993; Lewis et al., 1993; Lundholm et al., 2004; Anderson et al., 2006). Trainer et al., (2012) señalan que la especie cosmopolita *P. pungens* generalmente no presenta toxina amnésica en la mayoría de los océanos, sin embargo, se ha registrado como tóxica en cultivo para Marlborough Sounds, New Zealand (Rhodes et al., 1996); Offshore Washington State, EUA (Trainer et al., 1998); Coastal Washington State, EUA (Baugh et al., 2006); mientras que Fernandes et al., (2014) realizaron pruebas de cultivo en laboratorio con esta especie y obtuvo una concentración muy baja de AD ($0.06 - 1.1 \text{ ng mL}^{-1}$) siendo el primer reporte de toxicidad de esta especie.

Un plan de monitoreo bien realizado ayudara a la detección temprana de la presencia de especies potencialmente tóxicas y de las toxinas en los productos marinos que permita proteger la salud pública e implementar estrategias de manejo (Reguera, 2011).

Los monitoreos quincenales para ácido domoico realizado por SANIPES del 2008 a la fecha no reportaron AD a niveles precautorios; sin embargo estos resultados encierran gran incertidumbre ya que se ha citado para las aguas del Perú y con mucha frecuencia *P. seriata* (IMARPE), especie que ha presentado muchos eventos tóxicos en gran parte de los océanos (Trainer et al., 2012). Así como también queda la duda de los muestreos no realizados quincenalmente como manda el programa, implicando un riesgo alto al no cumplirse los monitoreos programados.

P. seriata, no fue registrada en el presente estudio, ni Trainer et al. (2012) la reportan en su revisión mundial del género para el Perú. Esta especie es encontrada generalmente para aguas muy frías $-0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ como aguas árticas, subárticas y subantárticas (Hasle, 1965, 2002; Almandoz et al., 2009 y Trainer et al., 2012). Hansen et al. (2011) la cultivaron exitosamente a 4°C . Por las condiciones térmicas de esta especie y por la distribución biogeográfica de *P. seriata* señalada por estos autores, no correspondería encontrarla en aguas peruanas. Es posible que esta especie esté siendo confundida con *P. australis*, como ha ocurrido en California (Hasle y Lundholm, 2005), ya que ambas presentan una gran similitud morfológica. Cabe señalar, que Hansen et al. (2011) cultivaron *P. seriata* a 15°C en laboratorio y notaron cambios morfológicos casi imposibles de diferenciarla con *P. australis*, ambas especies presentan una estrecha cercanía

filogenética (Hansen et al., 2011). Además, *P. seriata* también pudo ser confundida con *P. fraudulenta* la cual tiene gran similitud morfológica, con *subpacifica* un análisis detallado por microscopia electrónica de barrido podría discriminar entre ambas especies, al observar estructuras como el pseudonodulus, forma de la valva y el número de estrías en 10 micrones (Hasle 1965; Hasle et al. 1996).

Pseudo-nitzschia australis que fue reportada para aguas peruanas por Hasle (1965), no fue detectada en el presente trabajo, tampoco ha sido reportada por IMARPE pero si *P. seriata* en su programa de monitoreo de algas nocivas en las zonas de extracción de *Argopecten purpuratus*. Sin embargo, *P. australis* ha sido registrada a lo largo de la costa chilena por Rivera (1985). En esta última década Álvarez et al. (2009) y López-Rivera et al. (2009), la han detectado frecuentemente en la costa norte de ese país con niveles subtóxicos de veneno amnésico y con cierres cautelares de extracción de *A. purpuratus*, información que nos llevaría a suponer que también la podríamos tener en ciertas épocas en aguas peruanas.

La anchoveta almacena ácido domoico en sus intestinos al alimentarse de *Pseudo-nitzschia* spp, toxina que afecta su comportamiento y supervivencia (Lefebvre et al., 1999). Los efectos también son registrados en mamíferos marinos (Schollin et al., 2000), y en los seres humanos que consumen mariscos contaminados, afectando principalmente a los ancianos o enfermos (Todd, 1993). El litoral peruano parece estar libre de episodios nocivos de ácido domoico, sin embargo, se ha reportado muertes de aves y mamíferos en estos últimos años en la costa norte del Perú (El Comercio 2009, 2010, 2012), sin tener la certeza de la causa de estos sucesos. Es posible que ciertas especies del género *Pseudo-nitzschia* pudieran haber causado estas muertes, incertidumbre que nos indica la necesidad de seguir investigando la complejidad taxonómica del género *Pseudo-nitzschia*, su fisiología, desarrollo de sus poblaciones bajo un sistema de surgencia y su producción de toxina. Estos estudios son casi nulos para el litoral peruano, como se refleja en la revisión mundial de este género por Trainer et al. (2012).

La intensa investigación a nivel mundial del ácido domoico, por sus efectos negativos sobre el ecosistema marino, nos indica que esta toxina puede ser metabolizada por bacterias (géneros *Alteromonas* y *Pseudomonas*), presente en *Mytilus edulis* (Stewart et al., 1998).

Al analizar los resultados del presente trabajo, surgen nuevas interrogantes, como: ¿Por qué *P. pungens*, *P. subpacifica* u otras especies de *Pseudo-nitzschia* detectadas por IMARPE no han presentado toxina amnésica en el litoral peruano?, ¿Qué factores biológicos y ambientales están determinado esta atoxicidad? Sería muy favorable que todas las especies de *Pseudo-nitzschia* presentes en las aguas del Perú sean de carácter genético atóxico y no tengan el potencial de sintetizar ácido domoico en las aguas del Perú, ya que estas mismas especies son tóxicas en otros lugares (Bates, 1998 y Mos, 2001).

Por otra parte, es posible que *P. pungens* y *P. subpacifica* no estén asociadas a clases de bacterias que inducen la síntesis de ácido domoico, ya que hay experiencias que al introducir bacterias a cultivos axénicos de *Pseudo-nitzschia* spp, aumenta la producción de ácido domoico dependiendo de la cepa bacteriana utilizada (Bates, 1998; Bates et al., 1995; Stewart et al., 1998; Kotaki et al., 2000) lamentablemente en el presente estudio no se realizó análisis bacterianos asociados con el desarrollo de los cultivos en laboratorio, ni tampoco en el mar.

Es posible que *P. pungens* y *P. subpacifica* no sean tóxicas, por las condiciones ambientales en bahía Paracas e Isla San Lorenzo, ya que las especies de *Pseudo-nitzschia*, como las demás especies del fitoplancton crecen muy bien en zonas de surgencia por sus altos contenidos de nutrientes, como los rangos promedio superficiales de nutrientes publicados para la costa de Perú que son: 0,2–4,0 $\mu\text{M PO}_4^{2-}$; 0,0–35,0 $\mu\text{M NO}_3^-$; 0, 0–30,0 $\mu\text{M SiO}_2^{4+}$ (Zuta & Guillén, 1970; Guillén e Izaguirre, 1969; Calienes et al., 1985; Graco et al., 2007). Sin embargo, la producción de ácido domoico en la población de *Pseudo-nitzschia* aumenta en su fase estacionaria de crecimiento y cuando se presenta un estrés limitante de SiO_2^{4+} y PO_4^{2-} (Bates et al., 1991; Bates y Léger, 1992; Terseleer et al., 2013). El déficit de nutrientes no se daría durante un proceso de surgencia en el Perú, en especial en las épocas de invierno y primavera donde estos eventos oceanográficos son más intensos (Graco et al., 2007). Sin embargo, la regeneración del SiO_2^{4+} en las capas superficiales es mínima, siendo el primer nutriente en agotarse, pudiendo ser limitantes para el fitoplancton en la costa del Perú (Nelson et al., 1981), y muy positivo para la síntesis de ácido domoico por las poblaciones de *Pseudo-nitzschia* spp.

El régimen de luz también puede incrementar la síntesis de ácido domoico en especies del género *Pseudo-nitzschia*, en especial en la época de primavera y verano cuando hay una mayor intensidad de luz y mayor cantidad de luz día (Bates, 1998; Cusack et al., 2002; Terseleer et al., 2013). Sin embargo, la temperatura en estas estaciones del año es superior a los 18°C (Graco et al., 2007) y no es apropiada para crecimiento de *P. pungens* y *P. subpacífica*, por esta razón, siempre existirá la incertidumbre de si las poblaciones de *Pseudo-nitzschia* que se presenten en el litoral peruano puedan o no sintetizar ácido domoico, lo que se traduce en un riesgo latente para la extracción de concha de abanico y la salud humana.

Los monitoreos del fitoplancton y ácido domoico realizados por SANIPES e IMARPE, en las áreas de cultivo y extracción de *A. purpuratus* sola han reportado la existencia de especies del género *Pseudo-nitzschia* y la estimación del riesgo de esta actividad será “Alto”, “Medio” y “Bajo”, la cual dependerá de las especies de *Pseudo-nitzschia* que están presente, su densidad, su dominancia. Además en función a la frecuencia del muestreo de ácido domoico y de fitoplancton en el área de trabajo. Finalmente al grado de contaminación de la carne del molusco por ácido domoico, que permitirá decretar los cierres cautelares del área de extracción por las autoridades competentes, y si no se cumplen estas normativas, podrían aparecer los casos clínicos de gente intoxicada con sintomatología propia del veneno amnésico por intoxicación de ácido domoico SMB/NT3/Julio 2012; COFEPRIS 2005; NSW 2011; SANIPES, 2004; Anderson et al., 2001; Lefebvre and Roberston, 2010; Kumar et al., 2009; Álvarez et al, 2009.

Por esta razón, se hace necesario realizar monitoreos para obtener mayor información sobre la biología de las algas nocivas, abundancia, distribución, dinámica poblacional y fisiología de las especies más tóxicas. Es esencial el seguimiento rutinario y de largo plazo al fitoplancton y al medio ambiente para obtener los datos necesarios que permitan determinar la ecología más elemental de las especies nocivas, para evitar riesgos de intoxicación amnésica en las aguas peruanas.

V. CONCLUSIONES

1. Se identificaron un total de dos especies de *Pseudo nitzschia*, *P. pungens* y *P. subpacifica*.
2. La especie *P. subpacifica* es reportada por primera vez para el litoral Peruano.
3. *P. pungens* presenta mayor adaptación en cultivo en condiciones de laboratorio y presento mayores concentraciones celulares.
4. Las especies de *P. subpacifica* y *P. pungens* analizadas con Espectrometría de Masa/Masa (LC-MS/MS) para ácido domoico nos dieron resultados no detectables para un límite de detección del equipo de 0,005 ug/mL.

VI. RECOMENDACIONES

- estudios de cultivo de *Pseudo-nitzschia* con bacterias del género *Alteromonas* y *Pseudomonas* para determinar si esto influye en la producción de ácido domoico.
- Realizar un estudio genético de las cepas de *Pseudo-nitzschia* clasificadas.
- Replicar este estudio para zonas de cultivo de *Argopecten purpuratus* en el norte y sur del país.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, NG; Mitch, L; Trainer, V. 2000. Environmental conditions associated with domoic acid in razor clams on the Washington Coast. Journal of shellfish research. Vol. 19, N° 2, 1007-1015.

AESAN (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.

Almandoz, GO; Hernando, M; Ferrario, ME; 2009. SEM observations of *Pseudo-nitzschia* from Beagle channel: *P. seriata* in the southern hemisphere? Harmful. Algae News 39, 6–7.

Álvarez, G; Uribe, E; Quijano-Scheggia, S; López-Rivera, A; Mariño, C; Blanco, J. 2009. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. Harmful Algae 8: 938-945.

Álvarez-Falconi, PP. 2009. Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 26(4): 505-516.

Ananth, C; Dheen, ST; Gopalakrishnakone, P; Kaur, C. 2001. Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (Bcl-2, Bax, Caspase-3) and microglial response. J. Neurosci. Res. 66: 177-190.

Anderson R. A. 2005. Algal culturing techniques. London, UK: Elsevier Science and Technology Books, Academic Press 117-132.

Anderson, DM; Andersen, P; Bricelj, VM; Cullen, JJ; Rensel, JEJ. 2001. Monitoring and

management strategies for harmful algal blooms in Coastal waters. PEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris.

Anderson, DM; Burkholder, JM; Cochlan, WP; Glibert, PM; Gobler, CJ; Heil, CA; Kudela, RM; Parsons, ML; Rensel, JEJ; Townsend, DW; Trainer, VL; Vargo, GA. 2008. Harmful algal blooms and eutrophication: Examining linkages from selected coastal regions of the United States Harmful Algae 8: 39–53.

Anderson, CR; Brzezinski, M; Washburn, L; Kudela, R. 2006. Circulation and environmental condition during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in Santa Barbara Channel, California. Mar Ecol Prog Ser. Vol 327:119-133.

Anderson, CR; Sapiano, MRP; Krishna Prasad, MB; Long, W; Tango, PJ; Brown, CW; Murtugudde, R. 2010. Predicting potentially toxigenic *Pseudo-nitzschia* blooms in the Chesapeake Bay. Journal of Marine Systems, Vol. 83, Issues 3–4, Nov. 127-140.

Bargu, S; Powell, CL; Coale, SL; Busman, M; Doucette, GC; Silver, MW. 2002. Krill: a potential vector for domoic acid in marine food webs. Mar Ecol. Prog. Ser. Vol. 237:209-216.

Bates, SS; Bird, CJ; de Freitas, ASW; Foxall, R; Gilgan, M; Hanic, L; Johnson, GR; McCulloch, AW; Odense, P; Pocklington, R; Quilliam, M A; Sim, PG; Smith, J C; Subba Rao, DV; Todd; ECD; Walter, JA; Wright; JLC. 1989. Pennate Diatom *Nitzschia pungens* as the Primary Source of Domoic Acid, a Toxin in Shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46: 1203-1215.

Bates SS; De Freitas, ASW; Milley, JE; Pocklington, R; Quilliam, MA; Smith, JC; Worms, J. 1991. Control on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in culture: nutrients and irradiance. Can. J. fish. Aquat. Sci. vol. 48, 1136-1144.

Bates, SS y Léger, C. 1992. Response of *Nitzschia pungens f. multiseriis* to irradiance: growth and domoic acid production. In: Therriault, JC; Levasseur, M. (eds.) Proceedings of the third Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1893, pp. 9-10.

Bates, SS; Douglas, DJ; Doucette, GJ; Léger, C. 1995. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis*. Nat. Toxins 3: 428-435.

Bates, SS. 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Heidelberg: Springer-Verlag. 405-426.

Bates, SS. 2000. Domoic acid producing diatoms: another genus added!. J. Phycol. 36, 978-983.

Bates, SS; Leger, C; White, JM; MacNair, N; Ehrman, JM; Levasseur, M; Couture, JY; Gagnon, R; Bonneau, E; Michaud, S; Sauve, G; Chasse, J. 2002. Domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* causes spring closures of shellfish harvesting for the first time in the Gulf of St. Lawrence, eastern Canada. In: 10th International Conference on Harmful Algae. St. Pete Beach, Florida, October 21–25.

Baugh, KA; Bush JM; Bill BD; Lefebvre, KA; Trainer, VL. 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. African Journal of Marine Science. 28, 403-407.

Blanco, J; Acosta, CP; Bermudez De La Puente, M; Salgado, C. 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poison (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. Aquatic toxicology. 60: 111-121.

Blanco, J; Acosta, CP; Mariño, C; Muñoz, S; Martín, H; Morono, A; Correa, J; Arévalo, F. and Salgado, C. 2006. Depuration of domoic acid from different body compartments of the king

scallop *Pecten maximus* grown in raft culture and natural bed. *Aquat. Living Resour.* 19: 257–265.

Bogan, YM; Harkin, AL; Gillespie, J; Kennedy, DJ; Hess; Slater, P. 2007. The influence of size on domoic acid in king scallop, *Pecten maximus* (L) Harmful algae, Vol. 6, 1: 15-28.

Bosart, GD. 2011. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary pathology*, 48(3) 676-690.

Botana, LM. 2008. Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology, and Detection, 2 ed, Botana, LM (Eds.) CRS Press. 381-429.

Buck, KR; Uttal L; Pilskaln, CH; Roelke, DL; Villac, MC; Fryxell, GA; Cifuentes, L; Chavez, FP. 1992. Ecology of the diatom *Pseudo-nitzschia australis*, a domoic acid producer, from Montorrey Bay, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 84: 293-302.

Calienes, R; O. Guillén; Lostaunau, N. 1985. Variabilidad espacio-temporal de clorofila, producción primaria y nutrientes frente a la costa peruana. *Bol. Inst. Mar Perú* (10): 6-12.

Calu, G., V. Martin-Jezequel, E. Lefau, V. Sechet, P. Lassus, P. Weigel; Amzil, Z. 2009. The influence of nitrogen speciation on growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *P. pungens* in batch and continuous cultures. In: P. Lassus (ed.) 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Nantes, France, 7 p

Campbell, D; Kelly, M.; Busman, M; Bolch, C; Wiggins, E; Moeller, P; Morton, S; Hess, P; Shumway, S. 2001. Amnesic shellfish poisoning in the King Scallop, *Pecten Max/Mus*, from the West Coast of Scotland. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 20, No.1, 75-84.

Casteleyn, G; Chepurnov, VA. 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* 7. 241–257.

Cendes, F; Andermann, F; Carpenter, S; Zatorre, RJ; Cashman, NR. 1995. Temporal lobe epilepsy caused by domoic acid intoxication: evidence for glutamate receptor-mediated excitotoxicity in humans. *Annals Neurology* 37: 123-126.

Colman, JR.; Nowocin, KJ; Switzer, RC; Trusk, TC; Ramsdell, JS. 2005. Mapping and reconstruction of domoic acid-induced neurodegeneration in the mouse brain. *Neurotoxicol Teratol.* 27: 753-767.

Comisión Federal para la protección contra Riesgo Sanitario (COFEPRIS) 2005. Instrucción de trabajo para el muestreo de fitoplancton y detección de biotoxinas marinas. Secretaría de Salud, Mexico. 1-21.

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

Dakshinamurti, K; Sharma, SK; Sundaram, M. 1991. Domoic acid induced seizure activity in rats. *Neurosci. Lett.* 127: 193-197.

European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Alexander, J.; Benford, D.; Boobis, A.; Ceccatelli, S.; Cravedi, JP.; Di Domenico, A.; Doerge, D.; Dogliotti, E.; Edler, L.; Farmer, P; Filipič, M.; Fink-Gremmels, J.; Fürst, P.; Guerin, T.; Knutsen, HK.; Livesey, C; Machala, M.; Mutti, A.; Schlatter, J.; van Leeuwen, R.; Verger, P. SCIENTIFIC OPINION, Marine biotoxins in shellfish-domoic acid, *THE EFSA Journal* (2009)1181,1-61.

El Comercio, 2010. Hallan más de 25 lobos marinos muertos en playa de Lambayeque, miércoles 29 de septiembre de 2010, Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible:

<http://elcomercio.pe/planeta/646694/noticia-hallan-mas-25-lobos-marinos-muertos-playa-lambayeque>

El comercio, 2012. Muerte de aves marinas continuará hasta agosto, informó el Minam, sábado 26 de mayo de 2012, Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible. <http://elcomercio.pe/peru/1419767/noticia-muerte-aves-marinas-continuara-hasta-agosto-informo-minam>.

El comercio. 2009. Aparecen cientos de lobos de mar muertos en Colán, Consultado 07 de diciembre 2013 y disponible en: <http://elcomercio.pe/peru/364633/noticia-aparecen-cientos-lobos-mar-muertos-colan>.

El comercio. 2012. Lee el informe final sobre la muerte de los delfines en el norte del país., 22 mayo 2012 Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible. <http://elcomercio.pe/lima/1418343/noticia-lee-informe-final-sobre-muerte-delfines-norte-pais>

FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1995. APPLICATION OF RISK ANALYSIS TO FOOD STANDARDS ISSUES Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation WHO/FNU/FOS/ 95.3. 20-24.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación), 2005. Biotoxinas Marinas: Alimentación y nutrición. Organización de las naciones Unidas para la agricultura y alimentación. 97-278.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación), Análisis de riesgos a la inocuidad de los alimentos, guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. 2009. Estudio FAO alimentación y nutrición 87. ISBN 978-92-5-305604-0. 43-107.

Fernandes, LF; Hubbard, KA; Richlen, ML; Smith, J; Bates, SS; Ehrman, J; Leger, C; Mafra, LL; Kulis, D; Quilliam, M; Libera, K; McCauley, L; Anderson, DM. 2014. Diversity and toxicity of the diatom *Pseudo-nitzschia* Pergallo in the Gulf of Maine, Northwestern Atlantic Ocean. Deep- sea Research II 103(2014)139-162.

Ferrario, ME; Sar, EA; Castaños, C; Hinz, F. 1999. Potentially toxic species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Argentinian coastal waters. *Nova Hedwigia* 68, 131–147.

Ferrario, ME; Sar, EA; Sala, SE. 2002. Diatomeas potencialmente toxígenas del Cono Sur Americano. En: Sar, EA.; Ferrario, ME. y Reguera, B. (Eds), *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*, Instituto Español de Oceanografía, Madrid. pp. 169-194.

Fritz, L; Quilliam, MA; Wright, JLC; Beale, AM; Work, TM. 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *J. Phycol.* 28, 439–442.

Fryxell, GA; Hasle, GR. 2004. Taxonomy of harmful diatoms. In: Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson y A.D. Cembella (eds.), *Manual on harmful marine microalgae*, UNESCO Publishing, Francia. pp. 465-510.

Gallacher, S; Howard, G; Hess, P; MacDonald, E; Kelly, MC; Bates, LA; Brown, N; Mackenzie, M; Gillibrand, P; Turrell, WR. 2001. The occurrence of Amnesic Shellfish Poisons in shellfish from Scottish waters, In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch, and Lewis R.J (eds). *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris. p. 30-33.

García-Mendoza, E; Rivas, D; Olivos-Ortiz, A; Almazan-Becerril, A; Castañeda-Vega, C. and Peña-Manjarrez, JL. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, Northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae* 8: 493–503.

Garrison, DL; Conrad, SM; Eilers, PP; Waldron, EM.1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28, 604–607.

Graco, M; Ledesma, J; Flores, G; Girón, M. 2007. Nutrientes, oxígeno y procesos biogeoquímicos en el sistema de surgencia de la corriente de Humboldt frente a Perú. *Rev. Perú biol.*, 14(1): 117-128.

Guillard, RRL. and Ryther, JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.

Guillard, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York, EUA. pp 26-60.

Guillen, O. 1969. El fenómeno del niño de 1965 y su relación con la productividad frente a las aguas costeras del Perú. Serie de informe especial N° IM-56.

Guillén, O; Izaguirre De Rondán, R. 1973. Nutrients in the Peruvian coastal current. En R. Fraser.ed., Oceanography of the South Pacific 1972. National commission for UNESCO. Wellington. New Zeland. p. 397-418.

Hallegraeff, GM., 1994. Species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Australian Waters. Bot. Mar. 37, 397–411.

Hansen, LR; Soylyu, SI; Kotaki, Y; Moestrup, O; Lundholm, N. 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. Harmful Algae 10: 689–696.

Hasle, GR, 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudo-nitzschia*. Skr. Nor. Vidensk.-Akad. Oslo I. Mat. Naturv. KL. NY Ser. 18:1- 45.

Hasle, GR; Lange, CB; Syvertsen, EE. 1996. A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. Helgolander Meeresuntersuchungen dxs 50, 131–175.

Hasle, GR. 2002. Are most of the domoico acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? Harmful algae 1 (2002) 137-146.

Hasle, G.R; Lundholm, N. 2005. *Pseudo-Nitzschia seriata* f. *obtusa* (Bacillariophyceae) raised in rank based on morphological, phylogenetic and distributional data. Phycologia: 44, N°6, 608-619.

Hoppenrath, M; Elbracher, M; Drebes, G, 2009. Marine phytoplankton. Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. 110-112.

Horner, RA; Kusske, MB; Moynhan, BP; Skinner, RN; Wekell, JC. 1993. Retention of domoico acid by pacific razor clams, *Siliqua patula* (Dixon, 1789) preliminary study. Journal of shellfish Research. Vol. 12. No 2, 451-456.

IMARPE (INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ). Monitoreo de fitoplancton potencialmente toxico, Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible: http://www.imarpe.pe/imarpe/index.php?id_seccion=I0108030100000000000000.

Jackson, AE; Ayer, SW; Laycock, MV. 1992. The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens*. Can. J. Bot. 70:2198–201.

Kaczmarska, I; Martin, JL; Legresley, MM; Ehrman, JM. 2005. Diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Quoddy Region of the Bay of Fundy, Canada. Harmful Algae 4, 1-19.

Kotaki, Y; Koike, K; Yoshida, M; Thuoc, CV; Huyen, NT; Hoi, NC; Fukuyo, Y; Kodama, M. 2000. Domoic acid production in *Nitzschia* sp (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in do son, Vietnam. J. Phycol. 36, 1057-1060.

Kumar, P; Kuma, SP; Nair, GA. 2009. Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans. J. of Environ Biol. May, 30(3) 319-325.

Larsen, J; Nguyen NL (eds). 2004. Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters. *Opera Botanica* 140: 5-216.

Lelong, A; Hegaret, H; Soudant, P; Bates, SS. 2012. Pseudo-nitzschia (bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms *Phycologia* (2012) Vol. 51 (2), 168–216.

Lefebvre, KA; Powell, CI; Busman, M; Doucette, GJ; Moeller, PDR; Silver JB.; Miller, PE.; Hughes, MP.; Singaram, S.; Silver, MW. A and RONALD, ST. 1999. Detection of domoic acid in Northern Anchovies and California Sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. Toxins* 7: 82-92.

Lefebvre, KA; Robertson, A. 2010. Domoic acid and human exposure risk: a review. *Toxicon* 56, 218-230.

Lefebvre, KA; Frame, ER; Kendrick, PS. 2012. Domoic acid fish behavior: a review. *Harmful algae* 13, 126-130.

Lewis, NI; Bates, SS; McLachlan, JL; Smith, JC.. 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries*, In: T.J. Smayda and Y. Shimizu (eds)] *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam. p. 601-606.

López-Rivera, A; Pinto, M; Insinilla, Suarez, B; Uribe, E; Álvarez, G; Lehane, M, Furey, A. and James, K. 2009. The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: The tunicate *Pyura chilensis* (piure). *Toxicon* 54: 754–762.

Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R. & Moestrup, O. 1997. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36:381–8.

Lundholm, N; Hasle, G.; Fryxell, G. and Hargraves, P. 2002, Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia Americana complex*(Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliana* and *Pseudo-nitzschia linea*. Phycology. Vol 41(5), 480-497.

Lundholm, N; Hasle, G. and Hoeff-Emden, K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata complex* (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? J. Phycol. 39, 797-813

Lundholm, N.; Hansen, PJ. and Kotaki, Y. 2004. Effect of pH on growth and domoic acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol. 273: 1-15.

McCarron, P. and Hess, P. 2006. Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. Toxicon 47: 473- 479.

Miller, RL. & Kamykowski, DL. 1986. Effects of temperature, salinity, irradiance, and diurnal periodicity of growth and photosynthesis in the diatom *Nitzschia Americana*: light-saturated growth. J. Phycol. 22: 339-348.

Ministerio de comercio exterior. PROYECTO UE-PERU/PENX ALA/2004/016-913 Proyecto de cooperación UE-PERÚ en materia de asistencia técnica relativa al comercio - apoyo al programa estratégico nacional de exportaciones (PENX 2003 – 2013). Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible <http://www.mincetur.gob.pe/Comercio/ueperu/licitacion/pdfs/Informes/152.pdf>

Ministerio de la producción, 2007. Plan de contingencia para biotoxinas marinas y otras emergencias de contaminación, Cap. II. Art. 10. Decreto supremo N° 007-PRODUCE, 8-36pp. Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible http://www.mincetur.gob.pe/comercio/ueperu/consultora/docs_taller/DS_07-2004-PRODUCE.pdf

Mos, L. 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 9, 79–85.

Nelson, DM; Goering, JJ. & Boisseau, DW.1981. Consumption and regeneration of silicic acid in three coastal upwelling systems. En F. A. Richards [Ed.], *Coastal Upwelling. Coastal and estuarine Science 1*. American Geophysical Union. Washington. p. 242-256.

NSW Food Authority. Safer food, Clearer choices. 2011. Marine Biotoxin Management Plan Australia. NSW/FA/FI115/1105.

Okaichi, T. (Ed), 2003. Red tides. Terra scientific publishing company, Tokyo: 7-60.

Pérez, R. 2002. Validación de la metodología para la determinación de ácido domoico (biotoxina ASP) en moluscos bivalvos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). *Rev. Perú. med. exp. Salud pública*, 19(3) ,142-145. ISSN 1726-4634.

Quijano-Scheggia, S; Garces, E; Sampedro, N; Van Lenning, K; Flo, E; Andree, K; For, JM. and CAMP, J. 2008. Identification and characterization of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *SCI. MAR.*, 72(2), Jun 2008, 343-359. ISSN 0214-8358.

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

Quilliam, MA. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson & A.D. Cembella (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology*, Vol. 11, Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, 247-266.

Reguera, B; Alonso, R; Moreira, A y Méndez, S. 2011. Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena 2011. Manuales y Guías de la COI, 59 (español solamente). Consultado el 8 noviembre del 2014 y disponible: <http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002145/214510s.pdf>.

Rhodes, L; White, D; Syhre, M; Atkison, M. 1996 *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity, in Yamamoto, T; Oshima, Y; Fukuyo, Y, Ed. Harmful and toxic algal blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 155-158.

Rhodes, L; Scholin, C; and Garthwaite, I. 1998. *Pseudo-nitzschia* in New Zealand and the role of DNA probes and immunoassays in refining marine biotoxin monitoring programs. Nat. toxins. 6(3-4) 105-111.

Rivera, P. 1985. Las especies del género *Nitzschia* Hassall. Sección *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae), en las aguas marinas chilenas. Gayana Bot. 42: 9-39.

Rojas de Mendiola, B. 1978. IMARPE, El alimento de la anchoveta (*Engraulis ringens* J. En un área de afloramiento (San Juan). N° IMP-49; 1-15.

Santiago-Morales, I; García-Mendoza, E. 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si: NO₃ ratios. Harmful algae, vol 12, December 2011, pp 82-94.

Sar, EA; Ferrario, ME; y Castaños, C. 1998. Authentication of the type material of *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli. Diatom Research. Vol. 13(1), 183-185.

Sar, EA. Andrinolo, D. y Sunesen I. 2006. Análisis morfológico y toxicológico de cultivos de *Pseudo-nitzschia pungens* var. *pungens* (Bacillariophyceae) ISSN 0373-580 X. Bol. Soc. Argent. Bot. 41 (3-4): 193 - 201.

Scholin, CA; Gulland, F; Doucette, GJ; Benson, S; Busman, M; Chavez, FP; Cordaro, J; Delong, R; Devogelaere, A; Harvey, J; Haulena, M; Lefebvre, K; Lipscomb, T; Loscutoff, S; Lowenstine, LJ; Marin, R III; Miller, PE; McLellan, WA; Moeller, PDR; Powell, CL; Rowles, T; Silvagni, P; Silver, M; Spraker, T; Trainer, V; Vandolah, FM. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*; 403:80–84.

Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. (SANIPES) protocolo técnico sanitario, clasificación sanitaria temporal de áreas y condición operativa y resultado de monitoreo. Consultado 07 de diciembre 2013 y disponible: <http://www.itp.gob.pe/desarrollo-sanipes.php>

Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), 2012. Programa de sanidad de pesca, norma técnica, sección 3, plan de contingencia para biotoxinas marinas y otras emergencias de contaminación. Departamento de sanidad pesquera de Chile. SMB/NT3/Julio 2012.

Skov, J; Lundholm, N; Moestrup, Ø. and Larsen, J. 1999. Potentially toxic phytoplankton the diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae). In: ICES Identification Leaflets for Phytoplankton, ed. by J.A. Lindley. ICES, Copenhagen, Denmark. . p. 1-23.

Stewart, JE; Marks, LJ; Gilgan, MW; Pfeiffer, E. and Zwicke, BM. 1998. Microbial utilization of the neurotoxin domoico acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 44: 456-464.

Stonik, IV; Orlova, TY. and Lundholm, N. 2011. Diversity of *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from the western North Pacific. *Diatom Research*. Vol. 26, N 1, 121-134.

Strickland, JDH; Eppley, RW. and Rojas de Mendiola B. 1969. Phytoplankton populations, nutrientes and photosynthesis in Peruvian Coastal waters. *Bol. Inst. Mar, Perú Callao*, 2; N°1, 4-45.

Suárez Isla, BA; López, C; Hernández, A; Clément & L. Guzmán. 2002. Impacto económico de las floraciones de microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de veneno

Amnésico de los mariscos. En: Sar, E; Ferrario, ME. y Reguera, B (Eds). Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano, Inst. Esp. Oceanogr. Madrid, España. 257-268.

Suarez, B. y Guzmán, L. 2005. Floraciones de algas nocivas, Mareas rojas y Toxinas Marinas. Ed. Universitaria. 28-33.

Takano, H. & K. Kuroki. 1977. Some diatoms in the section *Pseudo-nitzschia* found in coastal waters of Japan. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 91: 41-51.

Takemoto, T. and Daigo, K. 1958. Constituents of *Chondria armata*. Chem. Pharm. Bull. 6, 578-580.

Tarazona, J; Guitierrez, D; Paredes, C y Indacochea, A. 2003. Una revisión y desafíos para la investigación en biodiversidad marina en Perú. ISSN 0717-652X. Gayana 67(2): 206-231.

Terseleer, N; Gypens, N; Lancelot, C. 2013. Factors controlling the production of domoic acid by *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae): A model study. Harmful Algae 24: 45–53.

Thessen, A; Dortch, Q; Parsons, ML; Morrison, W. 2005. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. J Phycol. 41, 21-29.

Thessen, AE; Bowers, HA and Stoecker, DK. 2009. Intra and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. Harmful Algae 8: 792–810.

Tood, ECD. 1993. Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning. A Review. Journal of Food Protection, Vol. 56, No. 1, PP. 69-83.

Trainer, V; Adams, NG; Bill, BD; Anulacion, BF; Wekell, JC. 1998. Concentration and dispersal of a *Pseudo-nitzschia* bloom in Penn Cove, Washington, EUA. Nat. Toxins 6, 113–126.

Trainer, VL; Adams, NG; Bill, BD; Stehr, CM; Wekell, JC; Moeller, P; Busman, M; Woodruff, D. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1818-1833.

Trainer, VL; Barbara, M; Hickey, BM; Horner, RA. 2002. Biological and physical dynamics of domoic acid production off the Washington coast. *Limnol. Oceanogr.* 47(5), 1438–1446.

Trainer, VL; Hickey, BM; Lessard, EJ; Cochlan, WP; Trick, CG; Wells, ML; MacFadyen, A; Moore, SK. 2009. Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnol. Oceanogr.* 54(1), 289–308.

Trainer, VL; Pitcher, GC; Reguera, B; Smayda, TJ. 2010. The distribution and impacts of harmful algal Bloom species in Eastern boundary upwelling systems. *Progress in Oceanography* 85: 33-52.

Trainer, VL; Bates, SS; Lundholm, N; Thessen, A; Cochlan, WP; Adams, NG; Trick CG. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological, ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae.* 14, 271-300.

Vale, P. and Sampayo, MA. 2001. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish. *Toxicon* 39: 893-904.

Van Dolah, FM; Doucette, GJ; Gulland, FMD; Rowles, TLR; Bossart, GD. Impacts of algal toxins on marine mammals' en Vos, JG; Bossart, GD; Fournier, M and O'Shea, TJ. 2003. *Toxicology of Marine Mammals.* (3). 247-256.

Vos, JG; Bossart, GD; Fournier, M; O'shea, TJ. 2003. New perspective toxicology and the environment, *Toxicology of Marine Mammals.* Taylor & Francis. Ed. Vol 3.248-264.

Walz, PM; Garrison, DL; Graham, WM; Cattey, MA; Tjeerdema, RS; Silver, M.1994. Domoic acid-producing diatom blooms in Monterey Bay, California: 1991–1993. *Nat. Toxins* 2, 271–279.

Wells, M; Trick, CG; Cohan, WP; Hughes M; Trainer, VL. 2005. Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 50(6), 1908–1917.

Wright, JLC; Boyd, RK; de Freitas, ASW; Falk, M; Foxall, RA; Laycock, MV; Mc Culloch AW; Mc Innes, AG; Odense, P; Pathak, VP; Ragan, M.A; Sim, PG; Thibault, P; and Walter JA. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* Vol. 67. pp 481-490.

Zuta, S. y OG. Guillén. 1970. Oceanografía de las aguas costeras del Perú. *Bol. Inst. Mar Perú* (2): 157-324.

VIII ANEXOS

Anexo 1: Especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas (Fuente: Trainer 2012)

ESPECIE	ORIGEN	REFERENCIA
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	Monterey Bay, CA, EUA Bream Bay, New Zealand Ria de Vigo, España Australia Colonsay, Escosia Waterford Harbour, Ireland Bay of Plenty, New Zealand Lynn of Lorne, Scotland Monterey Bay, CA, EUA Offshore Washington State, EUA Bahía La Herradura, Chile Point Reyes, California, EUA. Monterey Wharf, CA,EUA Todos Santos Bay, México	Garrison <i>et al.</i> 1992 Rhodes <i>et al.</i> 1996 Fraga <i>et al.</i> 1998 Lapworth <i>et al.</i> 2001 Campbell <i>et al.</i> 2001 Cusack <i>et al.</i> 2002 Rhodes <i>et al.</i> 2004 Fehling <i>et al.</i> 2004 Wells <i>et al.</i> 2005 Baugh <i>et al.</i> 2006 Álvarez <i>et al.</i> 2009 Bill 2011 Guannel <i>et al.</i> 2011 Santiago-Morales y García-Mendoza 2011
<i>P. brasiliiana</i>	Bizerte Lagoon, Tunisia	Saharaoui <i>et al.</i> , 2011
<i>P. calliantha</i>	Bay of Fundy, Canada Limfjord, Denmark Bahía Tongoy, Chile Bizerte Lagoon, Tunisia Chesapeake Bay, Maryland, EUA	Martin <i>et al.</i> 1990 Lundholm <i>et al.</i> (1997) Álvarez <i>et al.</i> (2009) Sahraoui <i>et al.</i> (2009) Thessen <i>et al.</i> (2009)
<i>P. cuspidata</i>	Offshore Washington State, EUA Offshore Washington State, EUA Offshore Washington State, EUA	Auro, 2007 Trainer <i>et al.</i> 2009 Lundholm <i>et al.</i> 2012
<i>P. fraudulenta</i>	Bay of Plenty, New Zealand Monterey Bay, California, EUA Chesapeake Bay, Maryland, EUA	Rhodes <i>et al.</i> 1998 Wells <i>et al.</i> 2005 Thessen <i>et al.</i> 2009
<i>P. galaxiae</i>	Gulf of Naples	Cerino <i>et al.</i> 2005

Continuación del Anexo 1: Especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas

(Fuente: Trainer 2012).

ESPECIE	ORIGEN	REFERENCIA
<i>P. granii</i>	Ocean Station Papa, North Pacific	Trick <i>et al.</i> 2010
<i>P. multiseriis</i>	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 1989
	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 1991
	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 1993
	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 1996
	Wadden Sea, Holland	Vrieling <i>et al.</i> 1996
	Jinhae Bay, South Korea Lee and	Lee and Baik, 1997
	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 1999
	Prince Edward Island, Canada	Bates <i>et al.</i> 2001
	Les Glenan, Brittany, France	Amzil <i>et al.</i> 2001
	Chinhae Bay, South Korea	Cho <i>et al.</i> 2001
	Monterey Bay, California, EUA	Maldonado <i>et al.</i> 2002
	Okkiray Bay, Japan	Lundholm <i>et al.</i> 2004
	Bay of Fundy, Canada	Lundholm <i>et al.</i> 2004
	Offshore Washington State, EUA	Wells <i>et al.</i> 2005
	Offshore Washington State, EUA.	Baugh <i>et al.</i> 2006
	Paranagua State, Brazil	Mafra <i>et al.</i> 2006
	Sequim Bay, WA	Radan, 2008
	Okkiray Bay, Japan	Trimborn <i>et al.</i> 2008
	Peter the Great Bay, Russia	Orlova <i>et al.</i> 2008
	Monterey Bay, California, EUA.	Doucette <i>et al.</i> 2008
Northland, New Zealand	Rhodes <i>et al.</i> 1998	
Thames Estuary, UK	Calu <i>et al.</i> 2009	
Chesapeake Bay, Maryland, EUA.	Thessen <i>et al.</i> 2009	
Lisbon Bay, Portugal	Amorim <i>et al.</i> 2009	
<i>P. multiseriis</i>	Coastal Brazil	Hagstrom <i>et al.</i> 2011
	Eastern Canada	Sun <i>et al.</i> 2011
	Eastern Canada	Guannel <i>et al.</i> 2011

Continuación del Anexo 1. Especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas (Fuente: Trainer 2012)

ESPECIE	ORIGEN	REFERENCIA
<i>P. multistriata</i>	Gulf of Naples Gulf of Naples Gulf of Naples New Zealand	Sarno and Dahlmann, 2000 Orsini <i>et al.</i> 2002 Amato <i>et al.</i> 2010 L. Rhodes
<i>P. pseudodelicatissima</i>	Northern Gulf of Mexico Thermaikos Gulf, Greece	Parsons <i>et al.</i> 1999 Moschandreu <i>et al.</i> 2010
<i>P. pungens</i>	Marlborough Sounds Offshore Washington State, EUA Coastal Washington State, EUA Bay of Crozon, France	NZ Rhodes <i>et al.</i> 1996 Trainer <i>et al.</i> 1998 Baugh <i>et al.</i> 2006 Calu <i>et al.</i> 2009
<i>P. seriata</i>	Niva Bugt, Denmark St. Lawrence Estuary, Canada Gulf of St. Lawrence, Canada Lynn of Lorne, Scotland Nuuk(Godthbsfjord)Greenland	Lundholm <i>et al.</i> 1994 Couture <i>et al.</i> 2001 Bates <i>et al.</i> 2002 Fehling <i>et al.</i> 2004b Hansen <i>et al.</i> 2011
<i>P. turgidula</i>	Tauranga Harbour, New Zealand Ocean Station PAPA(NE Pacific) Ocean Station PAPA(NE Pacific)	Rhodes <i>et al.</i> 1996 Trick <i>et al.</i> 2010 Bill 2011
<i>P. sp233</i>	Sequim Bay, WA, EUA.	Guannel <i>et al.</i> 2011

Anexo 2: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2008),
bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01''S; 76°17'34''O).

NÚMERO DE INFORME(2008)	FECHA	ASP ug AD/g
N CMAA-M-002-08-ICA-SANIPES	24 y 25 Enero 2008	S/M
N CMAA-M-003-08-ICA-SANIPES	04, 07, 08, 10 Febrero 2008	<1,06 *
N CMAA-M-004-08-ICA-SANIPES	21, 22, 26 Febrero 2008	<1,06 *
N CMAA-M-005-08-ICA-SANIPES	04, 05 y 12 Marzo 2008	N/M
N CMAA-M-006-08-ICA-SANIPES	25, 26 Y 27 Marzo 2008	<1,06 *
N CMAA-M-007-08-ICA-SANIPES	10 y 11 Abril 2008	N/M
N CMAA-M-008-08-ICA-SANIPES	23, 24 y 25 Abril 2008	<1,06 *
N CMAA-M-009-08-ICA-SANIPES	08, 13 Y 14 Mayo 2008	N/M
N CMAA-M-010-08-ICA-SANIPES	21, 22, 23 y 28 Mayo 2008	<1,06 *
N CMAA-M-012-08-ICA-SANIPES	26 y 27 Junio 2008	<1,06 *
N CMAA-M-013-08-ICA-SANIPES	10 y 11 Julio 2008	N/M
N CMAA-M-014-08-ICA-SANIPES	21, 24 y 25 Julio 2008	<1,06 *
N CMAA-M-015-08-ICA-SANIPES	06, 07 y 08 Agosto 2008	<1,06 *
N CMAA-M-016-08-ICA-SANIPES	21, 22 y 28 Agosto 2008	<1,06 *
N CMAA-M-017-08-ICA-SANIPES	4, 5, 9 y 13 Agosto 2008	<1,06 *
N CMAA-M-018-08-ICA-SANIPES	18, 19 y 23 Setiembre 2008	<1,06 *
N CMAA-M-019-08-ICA-SANIPES	02 y 03 Octubre 2008	N/M
N CMAA-M-020-08-ICA-SANIPES	16 y 17 Octubre 2008	N/M
N CMAA-M-021-08-ICA-SANIPES	21, 30 y 31 Octubre 2008	<1,06 *
N CMAA-M-022-08-ICA-SANIPES	6, 13 y 14 Noviembre 2008	N/M
N CMAA-M-024-08-ICA-SANIPES	11, 12 y 16 Diciembre 2008	N/M
N CMAA-M-025-08-ICA-SANIPES	22, 23 y 30 Diciembre 2008	N/M

N/M y NC; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Anexo 3. Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2009),

Bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01''S; 76°17'34''O).

NUMERO DE INFORME(2009)	FECHA	ASP ug AD/g
N CMAA-M-001-09-ICA-SANIPES	08, 09 Y 13 Enero 2009	<3.35 *
N CMAA-M-003-09-ICA-SANIPES	5, 6 Y 10 Febrero 2009	<3.35 *
CSMAA-M-004-09-ICA-SANIPES	19, 20 y 25 Febrero 2009	<3.35 *
CSMAA-M-05-09-ICA-SANIPES	05 y 6 Marzo 2009	<3.35 *
CSMAA-M-06-09-ICA-SANIPES	19 y 20 Marzo 2009	<3.35 *
CSMAA-M-07-09-ICA-SANIPES	02 y 03 Abril 2009	NC
CSMAA-M-08-09-ICA-SANIPES	16 y 17 Abril 2009	NC
CSMAA-M-09-11-ICA-SANIPES	29 y 30 Abril 2009	NC
CSMAA-M-10-09-ICA-SANIPES	13, 14 y 15 Mayo 2009	<3.35 *
CSMAA-M-11-09-ICA-SANIPES	28, 29 Mayo 2009	<3.35 *
CSMAA-M-13- 09-ICA-SANIPES	25 y 26 Junio 2009	<3.35 *
CSMAA-M-14-09-ICA-SANIPES	09, 10, 13 Julio 2009	<3.35 *
CSMAA-M-15-09-ICA-SANIPES	22 y 23 Julio 2009	<3.35 *
CSMAA-M-16-09-ICA-SANIPES	04, 05, 06 Agosto 2009	<3.35 *
CSMAA-M-17-09-ICA-SANIPES	20, 21, 22 y 25 Agosto 2009	<3.35*
CSMAA-M-18-09-ICA-SANIPES	03, 04 y 13 Setiembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-19-09-ICA-SANIPES	16, 17, 18 y 25 Setiembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-20-09-ICA-SANIPES	01, 02 y 10 Setiembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-21-09-ICA-SANIPES	14, 15 y 16 Octubre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-23-09-ICA-SANIPES	12, 13 y 14 Noviembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-24-09-ICA-SANIPES	25 Noviembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-025-09-ICA-SANIPES	05 Diciembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-26-09-ICA-SANIPES	11 Diciembre 2009	<3.35 *
CSMAA-M-028-09-ICA-SANIPES	31 Diciembre 2009	NC

N/M y NC; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Anexo 4: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2010),
 bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01" S; 76°17'34" O).

Numero de informe (2010)	Fecha	ASP ug AD/g
CSMAA-M-01-10-ICA-SANIPES	22 Enero 2010	NC
CSMAA-M-02-10-ICA-SANIPES	20,22 Enero 2010	NC
CSMAA-M-03-10-ICA-SANIPES	28 y 30 Enero 2010	NC
CSMAA-M-04-10-ICA-SANIPES	04 Febrero 2010	NC
CSMAA-M-05-10-ICA-SANIPES	11 y 12 Febrero 2010	NC
CSMAA-M-06-10-ICA-SANIPES	18 Febrero 2010	NC
CSMAA-M-07-10-ICA-SANIPES	24, 25 y 26 Febrero 2010	NC
CSMAA-M-08-10-ICA-SANIPES	05-Marzo 2010	NC
CSMAA-M-09-11-ICA-SANIPES	11 Marzo 2010	NC
CSMAA-M-10-10-ICA-SANIPES	17 y 18 Marzo 2010	NC
CSMAA-M-11-10-ICA-SANIPES	25 al 26 Marzo 2010	NC
CSMAA-M-12-10-ICA-SANIPES	30 Marzo 2010	NC
CSMAA-M-13-10-ICA-SANIPES	06, 07 y 09 Abril 2011	NC
CSMAA-M-14-10-ICA-SANIPES	16 Abril 10	NC
CSMAA-M-15-10-ICA-SANIPES	22 y 25 Abril 2010	NC
CSMAA-M-16-11-ICA-SANIPES	26 Abril 2010	NC
CSMAA-M-17-10-ICA-SANIPES	05, 06 y 07 Mayo 2010	N/M
CSMAA-M-18-10-ICA-SANIPES	14 Mayo 2010	NC
CSMAA-M-19-10-ICA-SANIPES	20 y 21 Mayo 2010	N/M
CSMAA-M-20-10-ICA-SANIPES	28 Mayo 2010	NC
CSMAA-M-21-10-ICA-SANIPES	03, 04 Y 07 Junio 2010	NC
CSMAA-M-22-10-ICA-SANIPES	11 Junio 2010	N/M
CSMAA-M-23-10-ICA-SANIPES	18 de Junio 2010	N/M
CSMAA-M-24-10-ICA-SANIPES	25 Junio 2010	N/M
CSMAA-M-25-10-ICA-SANIPES	02 Julio 2010	N/M
CSMAA-M-26-10-ICA-SANIPES	09 Julio 2010	N/M

N/M y NC; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

continuación del Anexo 4: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2010) . bahía Paracas, Atenas, PAR (13°49'01" S; 76°17'34" O)

Numero de informe (2010)	Fecha	ASP ug AD/g
CSMAA-M-27-10-ICA-SANIPES	16 y 17 Julio 2010	N/M
CSMAA-M-28-10-ICA-SANIPES	23 y 24 Julio 2010	NC
CSMAA-M-29-10-ICA-SANIPES	27 y 28 Julio 2010	N/M
CSMAA-M-30-10-ICA-SANIPES	02 y 07 Agosto 2010	N/M
CSMAA-M-31-12-ICA-SANIPES	10 y 12 Agosto 2010	N/M
CSMAA-M-32-10-ICA-SANIPES	16 y 17 Agosto 2010	N/M
CSMAA-M-33-10-ICA-SANIPES	23 Agosto 2010	N/M
CSMAA-M-34-12-ICA-SANIPES	01 Setiembre 2010	N/M
CSMAA-M-35-10-ICA-SANIPES	06, 07 y 11 Setiembre 2010	N/M
CSMAA-M-36-10-ICA-SANIPES	16 Setiembre 2010	N/M
CSMAA-M-37-12-ICA-SANIPES	24 setiembre 2010	N/M
CSMAA-M-38-10-ICA-SANIPES	01 Octubre 2010	N/M
CSMAA-M-39-10-ICA-SANIPES	07 Octubre 2010	N/M
CSMAA-M-40-10-ICA-SANIPES	15 y 16 Octubre 2010	N/M
CSMAA-M-41-10-ICA-SANIPES	19,20 y 21 Octubre 2010	N/M
CSMAA-M-42-10-ICA-SANIPES	26 y 29 Octubre 2010	N/M
CSMAA-M-43-10-ICA-SANIPES	05 Noviembre 2010	N/M
CSMAA-M-44-12-ICA-SANIPES	11 y 12 Noviembre 2010	N/M
CSMAA-M-45-10-ICA-SANIPES	18 y 19 Noviembre 2010	N/M
CSMAA-M-46-12-ICA-SANIPES	22, 23 y 26 Noviembre 2010	N/M
CSMAA-M-47-10-ICA-SANIPES	03 y 04 Diciembre 2010	N/M
CSMAA-M-48-10-ICA-SANIPES	7,8 y 11 Diciembre 2010	N/M
CSMAA-M-49-10-ICA-SANIPES	15,17 y 18 Diciembre 2010	N/M
CSMAA-M-50-10-ICA-SANIPES	23 Diciembre 2010	N/M
CSMAA-M-51-10-ICA-SANIPES	29 Diciembre 2010	N/M

N/M y *NC*; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Anexo 5: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2011),
bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01'' S; 76°17'34'' O).

NUMERO DE INFORME(2011)	FECHA	ASP ug AD/g
CSMAA-M-01-11-ICA-SANIPES	10, 13, 14 Enero 2011	NM
CSMAA-M-02-11-ICA-SANIPES	20, 22 Enero 2011	NM
CSMAA-M-03-11-ICA-SANIPES	27, 28 Enero 2011	NM
CSMAA-M-04-11-ICA-SANIPES	30 Enero y 5 Febrero 2011	NM
CSMAA-M-05-11-ICA-SANIPES	06 al 12 Febrero 2011	NM
CSMAA-M-06-11-ICA-SANIPES	13 al 19 Febrero 2011	NC
CSMAA-M-07-11-ICA-SANIPES	20 al 26 Febrero 2011	NM
CSMAA-M-08-11-ICA-SANIPES	27 Febrero al 05 Marzo 2011	NM
CSMAA-M-09-11-ICA-SANIPES	11 Marzo 2011	NM
CSMAA-M-10-11-ICA-SANIPES	15 al 19 Marzo 2011	<1.13 *
CSMAA-M-11-11-ICA-SANIPES	22 al 26 Marzo 2011	NM
CSMAA-M-12-11-ICA-SANIPES	31 Marzo al 01 de Abril 2011	NC
CSMAA-M-13-11-ICA-SANIPES	05 al 07 Abril 2011	<1.13 *
CSMAA-M-14-11-ICA-SANIPES	13,14 y 15 Abril 2011	NM
CSMAA-M-15-11-ICA-SANIPES	19 al 20 Abril 2011	NM
CSMAA-M-16-11-ICA-SANIPES	28 al 29 Abril 2011	NC
CSMAA-M-17-11-ICA-SANIPES	05 al 06 Mayo 2011	NM
CSMAA-M-18-11-ICA-SANIPES	17 y 18 Mayo 2011	NM
CSMAA-M-19-11-ICA-SANIPES	24 y 27 Mayo 2011	NC
CSMAA-M-20-11-ICA-SANIPES	30 Mayo, 03 y 04 Junio 2011	NM
CSMAA-M-21-11-ICA-SANIPES	10 Junio 2011	<1.13*
CSMAA-M-22-11-ICA-SANIPES	17 y 18 Junio 2011	<1.13 *
CSMAA-M-23-11-ICA-SANIPES	23 y 24 de Junio 2011	<1.13 *
CSMAA-M-24-11-ICA-SANIPES	26 Junio 2011	NC

N/M y *NC*; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Continuación del Anexo 5: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2011), bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01'' S; 76°17'34'' O).

NUMERO DE INFORME(2011)	FECHA	ASP ug AD/g
CSMAA-M-25-11-ICA-SANIPES	05 al 09 Julio 2011	NC
CSMAA-M-26-11-ICA-SANIPES	14 y 15 Julio 2011	NC
CSMAA-M-27-11-ICA-SANIPES	22 Julio 2011	NC
CSMAA-M-28-11-ICA-SANIPES	26 Julio 2011	NM
CSMAA-M-29-11-ICA-SANIPES	02 Agosto 2011	NC
CSMAA-M-30-11-ICA-SANIPES	10 y 12 Agosto 2011	NC
CSMAA-M-31-11-ICA-SANIPES	15 y 19 Agosto 2011	<1.13 *
CSMAA-M-32-11-ICA-SANIPES	25 y 26 Agosto 2011	NC
CSMAA-M-33-11-ICA-SANIPES	2 Setiembre 2011	NC
CSMAA-M-34-11-ICA-SANIPES	09 Setiembre 2011	NM
CSMAA-M-35-11-ICA-SANIPES	14 y 16 setiembre 2011	NC
CSMAA-M-36-11-ICA-SANIPES	23 Setiembre 2011	NC
CSMAA-M-37-11-ICA-SANIPES	26, 29 y 30 setiembre 2011	NC
CSMAA-M-38-11-ICA-SANIPES	06 y 07 Octubre 2011	NC
CSMAA-M-39-11-ICA-SANIPES	14 Octubre 2011	NC
CSMAA-M-40-11-ICA-SANIPES	21 Octubre 2011	NC
CSMAA-M-41-11-ICA-SANIPES	04 Noviembre 2011	NC
CSMAA-M-42-11-ICA-SANIPES	09 y 11 Noviembre 2011	NC
CSMAA-M-43-11-ICA-SANIPES	13 Noviembre 2011	NC
CSMAA-M-44-11-ICA-SANIPES	23 y 25 Noviembre 2011	NC
CSMAA-M-45-11-ICA-SANIPES	28 Nov y 01 Dic. 2011	NC
CSMAA-M-46-11-ICA-SANIPES	05 y 06 Diciembre 2011	NC
CSMAA-M-47-11-ICA-SANIPES	15 Diciembre 2011	NC
CSMAA-M-48-11-ICA-SANIPES	19 y 21 Diciembre 2011	NC
CSMAA-M-49-11-ICA-SANIPES	26 y 28 Diciembre 2011	NC

N/M y *NC*; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Anexo 6: .Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES (2012)
Bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01''S; 76°17'34''O).

Numero de informe(2012)	Fecha	ASP ug AD/g
CSMAA-M-02-12-ICA-SANIPES	06 Enero 2012	NC
CSMAA-M-03-12-ICA-SANIPES	17 y 20 Enero 2012	NC
CSMAA-M-04-12-ICA-SANIPES	27 Febrero 2012	NC
CSMAA-M-05-12-ICA-SANIPES	01 y 02 Febrero 2012	NC
CSMAA-M-06-12-ICA-SANIPES	06, 09 y 10 Febrero 2012	NC
CSMAA-M-07-12-ICA-SANIPES	16 y 17 Febrero 2012	NC
CSMAA-M-08-12-ICA-SANIPES	23 y 24 de Febrero 2012	NC
CSMAA-M-09-12-ICA-SANIPES	27 Febrero y 02 Marzo 2012	NC
CSMAA-M-10-12-ICA-SANIPES	06, 08 y 09 Marzo 2012	NC
CSMAA-M-11-12-ICA-SANIPES	16 Marzo 2012	NC
CSMAA-M-12-12-ICA-SANIPES	23 Marzo 2012	NC
CSMAA-M-13-12-ICA-SANIPES	27 y 30 Marzo 2012	NC
CSMAA-M-14-12-ICA-SANIPES	03 Abril 2012	NC
CSMAA-M-15-12-ICA-SANIPES	13 Abril 2012	NC
CSMAA-M-16-12-ICA-SANIPES	18 y 20 de Abril 2012	NC
CSMAA-M-17-12-ICA-SANIPES	22 y 26 Abril 2012	NC
CSMAA-M-18-12-ICA-SANIPES	03 Mayo 2012	NC
CSMAA-M-19-12-ICA-SANIPES	11 Mayo 2012	NC
CSMAA-M-20-12-ICA-SANIPES	18 Mayo 2012	NC
CSMAA-M-21-12-ICA-SANIPES	22 y 25 de Mayo2012	NC
CSMAA-M-22-12-ICA-SANIPES	29 y 31 Mayo, 01 Junio 2012	NC
CSMAA-M-23-12-ICA-SANIPES	8 Junio 2012	NC

N/M y *NC*; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.

Continuación del Anexo 6: Resultados de los muestreos realizados por el SANIPES
(2012), bahía Paracas, Atenas, 21C-PAR (13°49'01'' S; 76°17'34'' O).

NUMERO DE INFORME(2012)	FECHA	ASP ug AD/g
CSMAA-M-24-12-ICA-SANIPES	15 Junio 2012	NM
CSMAA-M-25-12-ICA-SANIPES	19 y 22 Junio 2012	NM
CSMAA-M-26-12-ICA-SANIPES	28 Junio 2012	NM
CSMAA-M-27-12-ICA-SANIPES	12 Julio 2012	NM
CSMAA-M-28-12-ICA-SANIPES	30 y 31 de Julio 2012	NM
CSMAA-M-29-12-ICA-SANIPES	8 y 9 Agosto 2012	NM
CSMAA-M-30-12-ICA-SANIPES	22 Agosto 2012	N/S
CSMAA-M-31-12-ICA-SANIPES	28 Agosto 2012	N/S
CSMAA-M-32-12-ICA-SANIPES	5 y 6 Setiembre 2012	N/S
CSMAA-M-33-12-ICA-SANIPES	14 Setiembre 2012	NM
CSMAA-M-34-12-ICA-SANIPES	18 y 21 de Setiembre	NM
CSMAA-M-35-12-ICA-SANIPES	27 Setiembre 2012	NM
CSMAA-M-36-12-ICA-SANIPES	5 Octubre 2012	NM
CSMAA-M-37-12-ICA-SANIPES	12 Octubre 2012	NM
CSMAA-M-38-12-ICA-SANIPES	16 y 19 Octubre 2012	NM
CSMAA-M-39-12-ICA-SANIPES	25 y 26 Octubre 2012	NM
CSMAA-M-40-12-ICA-SANIPES	31 Octubre 2012	NM
CSMAA-M-41-12-ICA-SANIPES	21 Noviembre 2012	NM
CSMAA-M-42-12-ICA-SANIPES	13 y 16 Noviembre 2012	NM
CSMAA-M-44-12-ICA-SANIPES	30 Noviembre 2012	NM
CSMAA-M-45-12-ICA-SANIPES	06 Diciembre 2012	NM
CSMAA-M-46-12-ICA-SANIPES	27 Diciembre 2012	NM

N/M Y NC; áreas no muestreadas.

(*): Valores numéricos de AD inferiores al límite de detección del equipo.