

**DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE DINOPHYSIS SPP. Y DETECCIÓN DE TOXINAS
DSP EN EL AGUA MEDIANTE RESINAS DIAION
(VERANO 2006, REGIÓN DE LOS LAGOS, CHILE)**

**SPATIAL DISTRIBUTION OF DINOPHYSIS SPP. AND DETECTION
IN WATER OF DSP TOXINS THROUGH DIAION RESINS
(SUMMER 2006, LOS LAGOS REGION, CHILE)**

GEMITA PIZARRO^{1*}
CÉSAR ALARCÓN¹
JOSÉ M. FRANCO²
MAURICIO PALMA⁴
LAURA ESCALERA³
BEATRIZ REGUERA³
GASTÓN VIDAL⁴
LEONARDO GUZMÁN⁴

^{1*} IFOP-CEQUA * Enrique Abello 0552, Punta Arenas, Chile, e-mail gemita.pizarro@ifop.cl

² Unidad Asociada CSIC-IEO de Fitoplancton Tóxico

³ Instituto Español de Oceanografía (IEO),
Subida a Radiofaro 50-52, Cabo Estay, Canido 36390, Vigo, España

⁴ IFOP, Balmaceda 252, Puerto Montt, Chile.

Recepción: 20 de julio 2010 – Versión corregida aceptada: 30 de mayo 2011

RESUMEN

En Chile, la ocurrencia de episodios tóxicos diarregénicos causados por dinoflagelados ha sido señalada en reiteradas oportunidades desde 1970 a la fecha con una mayor frecuencia de eventos en la zona sur-austral. *Dinophysis acuta*, *D. acuminata*, *D. rotundata* y *D. caudata* son las especies que se encuentran durante primavera y verano. Estos taxones han sido citados como productores de toxinas diarreas en Europa a excepción de *D. rotundata*. Sin embargo, en nuestro país aún se desconoce la mayor parte de los perfiles y contenido de toxinas de las poblaciones que se encuentran presentes en nuestras costas.

Debido a que las toxinas diarreas son parcialmente liberadas al agua por las microalgas, ha sido posible realizar un seguimiento *in situ* de éstas en la columna de agua en varias partes del mundo mediante el uso de bolsitas conteniendo resinas sintéticas.

Durante este estudio, se desplegaron bolsitas con resinas en diez estaciones ubicadas en la costa este de la isla de Chiloé, entre diciembre de 2005 y febrero de 2006. Los resultados mostraron que las toxinas predominantes en la columna de agua fueron PTX2 y DTX1 en ocho y tres de las estaciones, respectivamente, de un total de diez. El método fue suficientemente sensible para ser utilizado en la descripción de perfiles de toxinas lipofílicas. Sin embargo, para establecer una asociación entre las toxinas encontradas y la presencia de dinoflagelados nocivos en el agua, se requiere realizar un seguimiento de ambas variables durante un período estacional en el que suelen ocurrir las floraciones de algas nocivas.

Palabras claves: Ácido okadaico, pectenotoxinas, yesotoxinas, toxinas lipofílicas, toxinas VDM, *Dinophysis*, SPATT.

ABSTRACT

In Chile, the occurrence of diarrhoeogenic toxic episodes caused by dinoflagellates has been indicated in repeated opportunities from 1970 to date with a greater events frequency in the south-austral zone of the country. *Dinophysis acuta*, *D. acuminata*, *D. rotundata* and *D. caudata* are the dinoflagellates present during spring and summer. These species have been reported to produce diarrhoeogenic toxins in Europe with exception *D. rotundata*. Nevertheless it is not known with certainty the profiles and toxin content of the majority of the populations present in our coasts is unknown.

Because diarrhoeogenic toxins are partially released into water bodies has been possible to track them *in situ* in several parts of the world through the use of bags containing synthetic resins.

During this study, synthetic resins contained into bags were suspended in the water column in 10 stations located in the East coast of Chiloé Island between December 2005 and February 2006. The results showed that the predominant toxins in the water column were PTX2 and DTX1 in eight and three of the stations, respectively. The method is sufficiently sensible to be used in the description of lipophilic toxin profiles and to associate them with the producing dinoflagellates of these toxins that are present in the water. Nevertheless, to establish an association between the toxins found and the harmful dinoflagellates present in the water, are required to track both variables during a seasonal period when usually the harmful algae blooms happen.

Key words: Okadaic acid, pectenotoxins, yessotoxins, lipophilic toxins, DSP toxins, *Dinophysis*, SPATT.

INTRODUCCIÓN

Las especies de dinoflagelados del género *Dinophysis* constituyen un serio problema para la salud pública y la actividad económica de recursos marinos de importancia comercial en Chile y en el mundo. Estas especies están asociadas a la producción de toxinas diarreas como el ácido okadaico (AO) (Fig. 1) y sus derivados, las dinofisitoxinas (DTXs) (Yasumoto *et al.*, 1985), también denominados okadaatos en la literatura científica. En Chile el grupo de toxinas diarreas se conoce como veneno diarrea de los mariscos (VDM, en inglés Diarrhetic Shellfish Poison, DSP) por sus efectos sintomáticos en las personas (Yasumoto *et al.*, 1978,1980) que ingieren mariscos contaminados con especies de dinoflagelados que producen estas toxinas.

Las *Dinophysis* spp. también están asociadas a la producción de pectenotoxinas (PTXs) (Fig.2) cuyo efecto es hepatotóxico (Terao *et al.*, 1986) y no diarrea. Otro grupo de toxinas importante de considerar al extraer toxinas del tipo VDM, son las yesotoxinas (YTXs) (Fig. 3) cuyos efectos son cardiotoxicos (Terao *et al.*, 1990). Las YTXs son producidas por los dinoflagelados del género *Prorocentrum reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera* (Satake *et al.*, 1997; Tubaro *et*

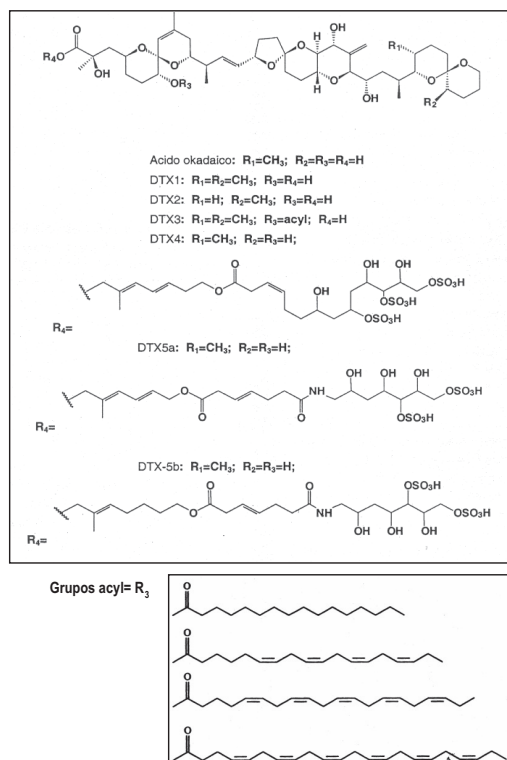


Figura 1. Estructura del ácido okadaico (OA) y sus derivados dinofisistoxinas (DTXs) y acyl derivados.

Figure 1. Structure of okadaic acid (OA) and derived dinophysistoxins (DTXs) and acyl derivatives.

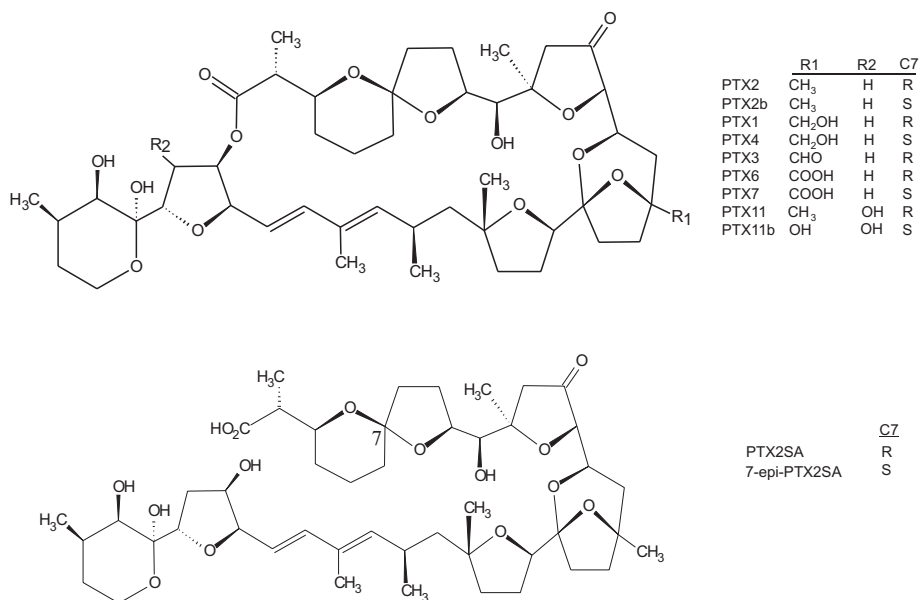


Figura 2. Estructura de las Pectenotoxinas (PTXs) y pectenotoxina-2 seco ácido (PTX2SA).
 Figure 2. Structure of pectenotoxins (PTXs) and pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA).

al., 1998; Rhodes *et al.*, 2006). *P. reticulatum* se encuentra presente en la región de Los Lagos y Aysén, mientras que *L. polyedrum* no ha sido citada para el área de estudio y *Gonyaulax spinifera* aparece ocasionalmente (i.e. Guzmán *et al.* 2010).

Los tres tipos de toxinas antes descritos pueden co-extraerse en solventes orgánicos por tratarse de toxinas lipofílicas, característica que debe ser considerada al aplicar el bioensayo de ratón. La razón es que tanto las PTXs como YTXs producen falsos positivos al ser inyectadas intraperitonealmente, pero no al ser administrada por vía oral (Miles *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, las tres toxinas antes descritas, se incluían dentro del mismo complejo VDM. Hoy día se ha hecho una nueva clasificación y se han excluido las yesotoxinas y las pectenotoxinas del citado complejo por no producir efectos diarreogénicos (Ogino *et al.*, 1997).

En Chile, la ocurrencia de episodios tóxicos diarreogénicos ha sido señalada en reiteradas oportunidades. Desde 1970 en el área de Seno Reloncaví, región de Los Lagos (Guzmán & Campodonico, 1975; Lembeye *et al.*, 1993) y desde 1991 en la región de Aysén (Anónimo, 1995). Durante 1999 y 2000 fue detectada en

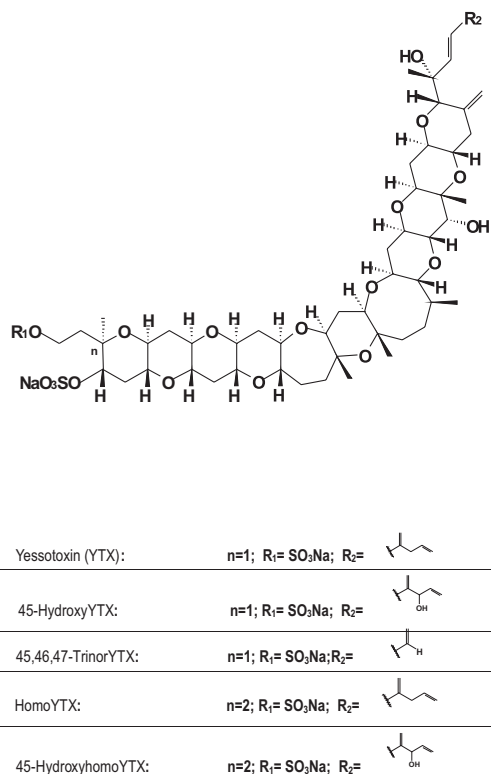


Figura 3. Estructura de las yesotoxinas (YTXs).
 Figure 3. Structure of yessotoxins (YTXs).

el extremo norte de la región de Magallanes en niveles muy por debajo de la normativa por lo que no representaban peligro para las personas (Guzmán *et al.*, 2000, 2001).

Durante el año 2005, los episodios de intoxicación de personas con síntomas de VDM fueron críticos durante los meses de verano en la región de Los Lagos. Además, ha habido casos de confusión en cuanto a la identificación del agente causante al coincidir la presencia de especies de *Dinophysis* en la columna de agua con brotes de *Vibrio parahaemolyticus*. Esta bacteria patógena produce los mismos síntomas del VDM al ingerir mariscos contaminados por ella. En la práctica, la diferencia radica en que las toxinas diarreicas de origen fitoplanctónico son termo-resistentes mientras que las del *Vibrio* son termo-lábiles.

Los recurrentes eventos de VDM en el seno Reloncaví (1970, 1979, 1986), fiordo Jacaf (1980, 1984), archipiélago Chonos (1991), estos dos últimos en la región de Aysén, estuvieron asociados a la presencia de *D. acuta* (Lembeye *et al.*, 1993) y aunque no fue confirmada como el organismo causante de la toxina éste ha sido el organismo más probable de producirla pues en 1991 fue encontrado en el tracto digestivo de mariscos contaminados con AO y dinofisistoxina-1 (DTX1, como predominante) (Zhao *et al.*, 1993). En 1999, ambas toxinas fueron detectadas en mariscos de la región de Aysén pero en niveles trazas (Villarroel, 2004), y en el 2000, en la misma región, sólo fue detectada DTX1 (García *et al.*, 2003).

Dinophysis acuta, *D. acuminata*, *D. rotundata* y *D. caudata*, son dinoflagelados recurrentes en zonas templadas a nivel mundial incluyendo algunas regiones de Chile. *Dinophysis* spp. aparecen principalmente durante los meses de primavera y verano en las regiones sur-austral de Chile (Uribe *et al.*, 1998). Todas ellas son productoras de VDM en Europa (e.g. Lee *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2001; Marcaillou *et al.*, 2001; Fernández-Puente *et al.*, 2004), Japón (e.g. Lee *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 2001) y Nueva Zelanda (e.g. Suzuki *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2005) de modo que constituyen potenciales agentes causantes de eventos tóxicos de VDM en Chile. Sin embargo, a la fecha los perfiles de toxinas de estas

especies son desconocidos en nuestro país. Por esta razón se requiere conocer cuáles son las especies causantes de los eventos tóxicos de VDM en Chile (*Dinophysis* spp, *Protoceratium reticulatum*, *Prorocentrum* spp.) y la contribución de cada especie a estos episodios.

A nivel mundial, se ha encontrado que las mismas especies de *Dinophysis* presentan perfiles de toxinas diferentes de acuerdo a su procedencia. Tal es el caso de *D. acuta*, que en Irlanda presenta un perfil de toxinas con predominancia de dinofisistoxina-2 (DTX2), seguida de AO y PTX2 (James *et al.*, 1999; Fernández-Puente *et al.*, 2004), mientras que la misma especie en Nueva Zelanda presenta un perfil con predominio de PTX2, PTX11 y pequeñas cantidades de AO (Mackenzie *et al.*, 2005). *D. acuta* de Nueva Zelanda no presenta DTX2, pero sí en España (Fernández *et al.*, 2001) y Portugal (Vale, 2004). *D. acuta* en los países escandinavos presenta DTX1, toxina que ha sido detectada en los mariscos de la región de Aysén asociado a las proliferaciones de esta especie.

En el caso de Chile, el monitoreo para VPM está restringido a *D. acuta* y *D. acuminata*, debido a la falta de estudios del contenido y composición de las toxinas en otras especies. En este caso *D. acuminata* ha sido asociada a la producción de DTX1 en la región de Magallanes (Uribe *et al.*, 2001). Y sólo a PTX2 en la zona norte de Chile (Blanco *et al.*, 2006). Las diferencias de perfiles de toxinas entre las especies, e incluso entre poblaciones de la misma especie en distintas localidades tienen una gran repercusión en la regulación y manejo de los recursos marisqueros susceptibles de ser contaminados por estas toxinas.

Recientemente se ha reportado que las toxinas lipofílicas son parcialmente liberadas al medio por los organismos en cultivos (Paz *et al.*, 2004) y en el medio natural (MacKenzie *et al.*, 2004). Ante esta evidencia, la aplicación de novedosas técnicas, como las resinas sintéticas, contenidas en pequeñas bolsitas (denominados SPATT = Solid Phase Adsorption Toxin Tracking) para seguimiento de toxinas mediante adsorción en fase sólida (Mackenzie *et al.*, 2004), desplegadas en la columna de agua, adsorben pasivamente las toxinas lipofílicas presentes

en el agua. Esta herramienta podría resultar de gran utilidad en la detección precoz de ficotoxinas en Chile tal como lo están experimentando en otros países (i.e. Fux *et al.*, 2008). Utilizadas a modo de bivalvo artificial (Mackenzie *et al.*, 2004), permitirían predecir estimativamente la acumulación de toxinas VDM, PTXs y YTXs en los mariscos cuando sus concentraciones distan aún de los niveles de regulación no aptos para el consumo humano. La resina es inocua para el medio ambiente y tras permanecer unos días en la columna de agua, son recuperados y conservados en el refrigerador hasta su análisis. Este modelo ha demostrado ser sensible y de muy bajo costo, ideal para ser probado durante periodos prolongados en regiones geográficas remotas del sur austral de Chile.

El objetivo de este estudio fue: a) evaluar la potencialidad de la resina DIAION en la descripción de perfiles de toxinas VDM a lo largo de Chile y b) asociar la presencia de toxinas lipofílicas con las proliferaciones de microalgas nocivas—citadas en la literatura científica como productores de toxinas lipofílicas—en la costa este de la isla grande de Chiloé durante diciembre-febrero de 2005-2006.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de muestreo

La recolección de fitoplancton cuali y cuantitativo así como la permanencia de los contenedores con resina en la columna de agua por un periodo de 5-7 días, fue realizada en 10 estaciones (Fig. 4). Las estaciones seleccionadas pertenecen a la Sección CP (estaciones 4, 5, 6 y 7); sección DH (estaciones 2, 3 y 5); Sección QL (estaciones 3, 5 y 6) y fueron seleccionadas básicamente por dos razones. La primera en referencia a la información existente que señala que la región de Los Lagos, entre el sector de Chiloé y estuario de Reloncaví, es la que presenta una alta frecuencia de especies de *Dinophysis* y toxinas diarreicas (i.e. Guzmán *et al.*, 2010). De este modo 10 estaciones fue un número suficiente para cubrir el sector. La segunda razón obedece a motivos logísticos. El muestreo hubo que realizarlo independientemente de la ruta del buque pues su ruta de ida no era la misma que de regreso y las resinas debían ser retiradas luego de un corto tiempo en el agua. Por lo tanto el fondeo y rescate de las resinas fue realizado con un bote y motor fuera de borda.

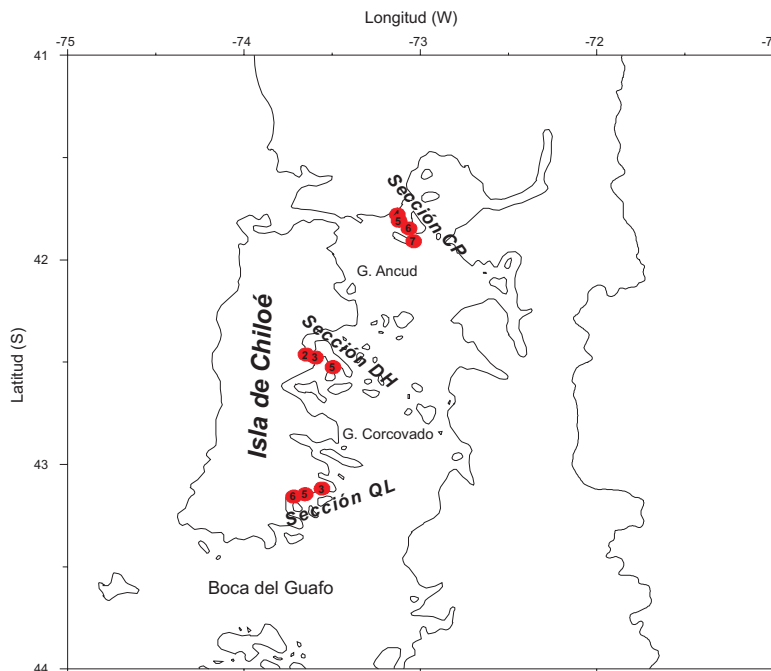


Figura 4. Localidad de muestreo de fitoplancton y posición de las bolsitas con resina en la columna de agua durante 5-7 días.

Figure 4. Phytoplankton sampling place and position of the resin-holders in the water column during 5-7 days.

El fitoplancton fue recolectado durante diciembre de 2005 y enero-febrero de 2006, periodo en que también se colocaron las resinas en la columna de agua. Los contendedores de resina colocados en diciembre no lograron ser recuperados debido a las condiciones climáticas, razón por la que no fueron analizados.

Recolección del fitoplancton

El fitoplancton cualitativo fue recolectado entre 0-30 m de profundidad con una red de arrastre con apertura de malla de 20 μm . Una alícuota de esta muestra fue fijada en lugol para el análisis microscópico cualitativo del fitoplancton. El fitoplancton cuantitativo fue recolectado en superficie-5-10-20-30 m de profundidad con una botella oceanográfica Niskin. Una alícuota de 50 mL de estas muestras fue fijada con formalina para su posterior análisis en un microscopio invertido según método de Utermöhl, (1931).

Adsorción in situ de toxinas lipofílicas disueltas en el agua mediante resina DIAION

Activación de la resina

La resina DIAION (HP-20, Supelco) es sintética, porosa, con un tamaño de partícula entre 250-850 μm y adsorbente poliaromático. Previo a ser utilizada, la resina fue activada de acuerdo al protocolo de Mackenzie *et al.*, (2004) que se resume a continuación: 300 g de resina, se depositaron en un vaso de 4 L y se añadió 3 L de MeOH y se agitó a baja velocidad durante toda la noche. Se eliminó el MeOH en un embudo Buchner con papel filtro y presión de vacío suave, se lavó la resina con MQ y traspasó al vaso de 4 L. Se añadió aproximadamente 3 L de agua MQ, se agitó suavemente durante 30 min y se filtró a presión de vacío suave. Esta operación de lavado se repitió una vez más. Finalmente se recogió la resina en 2 L de agua MQ y se almacenó en botellas plásticas a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

La cantidad así como el tipo de resina utilizada durante este estudio han sido reportadas como óptimas en estudios experimentales de saturación (Fux *et al.*, 2008). Previamente también han sido probadas *et al* en áreas con gran cantidad de toxina disuelta en el agua (i.e. Pizarro *et al.*, 2008, 2009).



Figura 5. Contenedor de resina utilizado en los experimentos in situ para la adsorción de toxinas lipofílicas disueltas en el agua de mar: Bolsita confeccionada con red de 70 μm de tamaño de trama y dimensiones de 60x60 mm.

Figure 5. Resin-holder used in the in situ experiments for the adsorption of lipophilic toxins dissolved in seawater: Holder-resin made with 20 μm mesh plankton net and dimensions of 60x60 mm.

Es así que aproximadamente 3 g (peso seco) de resina activa húmeda fueron colocadas en el interior de las bolsitas o contenedores de resina (60x60 mm app.) (Fig. 5). Las bolsitas fueron confeccionadas con una red de 77 μm de apertura de malla y cocidas con hilo de poliéster. Estos contenedores se expusieron durante 5-7 días a 3 m de profundidad en el mar (Fig. 4) próximos a las líneas de cultivo de choritos. Una vez recuperados los contenedores fueron almacenados a 4° C en oscuridad hasta el momento de extraer las toxinas.

Extracción de toxinas adsorbidas por la resina

La extracción de las toxinas adsorbidas por las resinas se realizó siguiendo la metodología de Mackenzie *et al.*, (2004) con algunas modificaciones. Una vez recuperados los contenedores de resina, la resina fue traspasada a un tubo provisto con una red de 20 μm de apertura de malla en uno de sus extremos, donde fue lavada con abundante agua MQ (50-100mL). Después de escurrir el exceso de agua, la resina fue traspasada a un vial de 20 mL con al menos 10-15 mL metanol 100%, donde permaneció al menos

dos días a 4° C en oscuridad. El sobrenadante metanólico más la resina fueron vaciados a un tubo de elución, en cuyo extremo inferior se colocó un tubo de silicona provisto con un filtro de algodón hidrofílico para retener las partículas de resina. El flujo fue regulado con una llave de paso en el tubo de silicona. La resina se lavó con 10 mL de metanol cada vez hasta completar 50 mL de metanol.

Los extractos metabólicos se conservaron refrigerados hasta el momento del análisis. Previo a inyectar la muestra en el LC-MS (20 µL), una alícuota de 4 mL se evaporó a baja presión a 40° C (Speed Vac Savant) durante 3 h, se resuspendió en 500 µL de metanol y se filtró por 0.45 µm.

Análisis de toxinas por LC-MS

Los análisis de toxinas se realizaron en un cromatógrafo líquido THERMO FINNIGAN acoplado a un espectrómetro de masas THERMO FINNIGAN LCQ-ADVANTAGE equipado con trampa iónica y una interfase de electro-spray iónico (ESI). El ESI fue operado en modo positivo y negativo (3.0 y 4.5 kV voltaje del spray, temperatura del capilar de 250° C, flujo de gas de arrastre de 20 mL min⁻¹ y flujo de gas auxiliar 10 mL min⁻¹). Las condiciones óptimas de ionización fueron establecidas en modo positivo y negativo con un estándar de ácido okadaico y fase móvil de acetato amónico 2 mM, pH 5.8 (A) y metanol (B) (30:70, respectivamente).

Así, la separación cromatográfica de las toxinas se realizó con una columna XTerra C18 (2.1 x 150 mm, 5 µm), con flujo de la fase móvil de 0.2 mL min⁻¹ en el siguiente gradiente: 60% a 100% de B entre los 0 y 20 min, sostenido a 100% hasta el minuto 22, disminuyendo al 60% de B en el minuto 25 y sostenido hasta el minuto 30. 50 µL del eluyente proveniente del LC se dirigieron a la interfase de pulverización iónica a través de un microcapilar.

Los cromatogramas se registraron en un rango de *m/z* entre 200 y 2000, en modo positivo y negativo. Los *m/z* de los iones para cada toxina fueron: 827.5 [M+Na]⁺ y 803.5 [M-H]⁻ para el AO y DTX2; 841.5 [M+Na]⁺ y 817.5 [M-H]⁻

para el DTX1; 881 [M+Na]⁺ y 857.5 [M-H]⁻ para la PTX2; 892 [M+NH₄]⁺ y 897 [M+Na]⁺ para la PTX1; 899 [M+Na]⁺ y 875.0 [M-H]⁻ para la PTX2SA y 1141 [M-2NA+H]⁻ para la YTX.

La PTX2SA y PTX1 son dos toxinas derivadas de la transformación enzimática del PTX2 por parte de los moluscos (Lee *et al.*, 1989; Suzuki *et al.* 1998, 2001). La PTX2SA también es muy abundante en el agua cuando PTX2 está presente (i.e. Pizarro *et al.* 2008).

La calibración del sistema de LC-MS y la cuantificación de las toxinas se realizaron con estándares de AO y PTX2 certificados por el National Research Council de Canadá. La solución estándar de PTX1 fue donada por el Dr. T. Yasumoto (laboratorio de Investigación de los Alimentos de Japón), el patrón de DTX2 (1 µg mL⁻¹) por el Dr. P. Hess (Marine Institute, Galway, Irlanda), y los de PTX2SA y DTX1 (1 µg mL⁻¹) por el Dr. C. Miles (National Veterinary Institute, Oslo, Norway). La solución estándar de YTXs fue provista por el Dr. M. Satake, de la Universidad de Tohoku (Sendai, Japón).

Las curvas de calibración se elaboraron con una solución de trabajo consistente en 0.60 ng µL⁻¹ de AO, 0.59 ng µL⁻¹ de DTX2 y 0.70 ng µL⁻¹ de PTX2. Cada 15-20 muestras inyectadas, se generó una curva con 4 puntos obtenidos por una inyección de volumen variable de la solución de trabajo. La linealidad de las concentraciones de calibración usadas se confirmó estadísticamente siguiendo el método de van-Trijp & Roos, (1991). Se utilizó una solución cualitativa de trabajo con PTX2SA, PTX1 y DTX1 (0.25, 0.25 y 0.50 ng µL⁻¹ respectivamente) para la detección de estas toxinas en las resinas.

RESULTADOS

Estándares

Los cromatogramas de estándares de OA, DTX2, PTX2 y sus respectivos espectros *m/z* obtenidos por LC-MS se muestran en la Figura 6. Así mismo se muestran los cromatogramas de estándares de PTX2SA, PTX1. Los cromatogramas y espectros de las toxinas DTX1 y YTX, se presentan en la Figura 7.

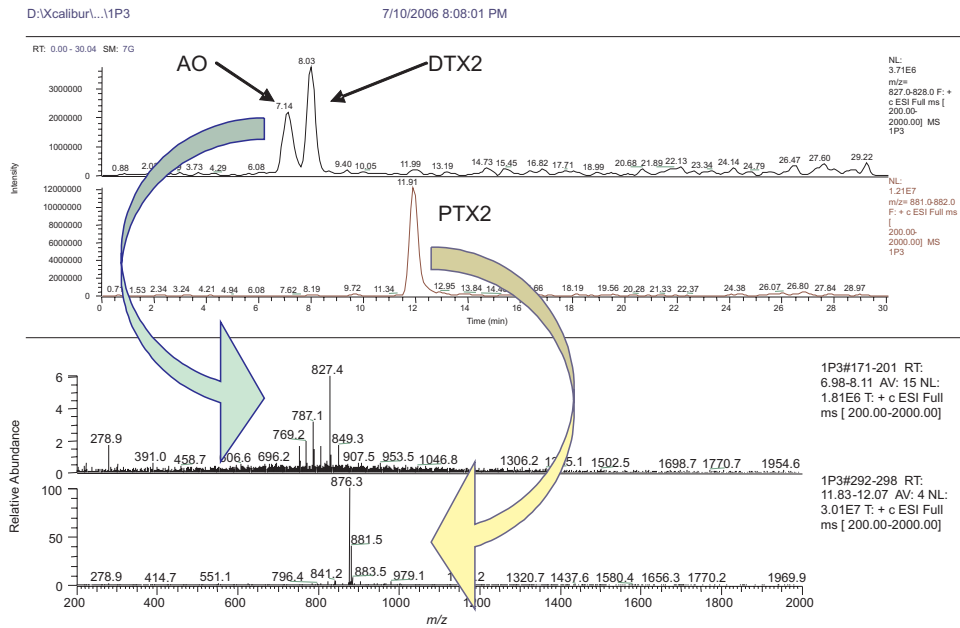


Figura 6. Cromatogramas de estándares de OA, DTX2, PTX2 en modo de ionización positivo (arriba) y los respectivos espectros de masas (abajo, indicados con flechas) para los iones $[M+Na]^+$ y/o $[M+NH_4]^+$.
 Figure 6. LC-MS chromatograms in positive ionization mode of OA, DTX2 and PTX2 standards (above) and respective mass spectra for $[M+Na]^+$ and/or $[M+NH_4]^+$ ions (down, indicated with arrows).

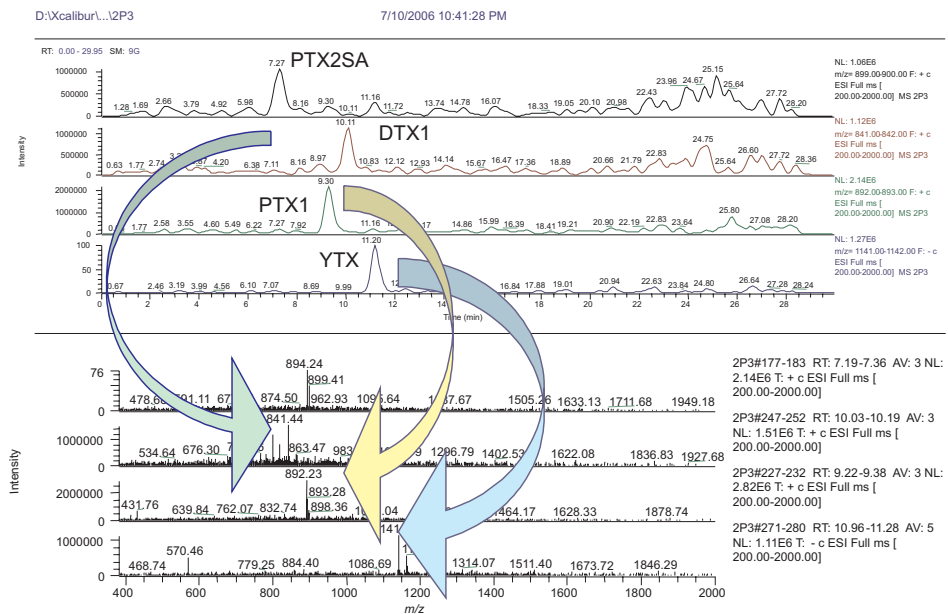


Figura 7. Cromatogramas de estándares en modo de ionización positivo de PTX2SA, DTX1 y PTX1, en modo de ionización negativo de YTX (arriba), y los respectivos espectros de masas para los iones $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M-2Na+H]^-$ (abajo).
 Figure 7. LC-MS chromatograms of standards in positive ionization mode of PTX2SA, DTX1 and PTX1, in negative ionization mode of YTX (above), and respective mass spectra for $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ and $[M-2+H]^-$ ions (down).

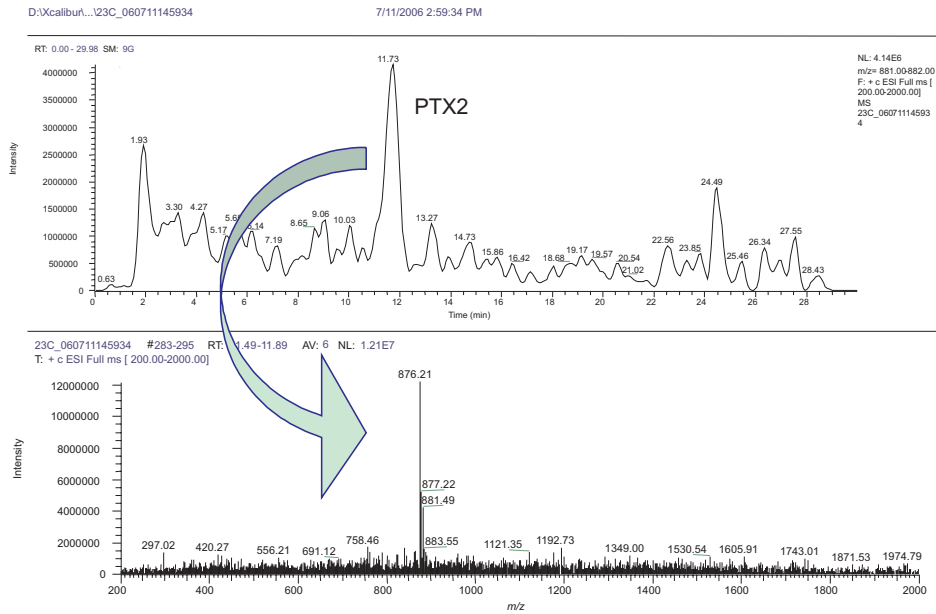


Figura 8. Ejemplo de cromatograma de PTX2 (arriba) y el respectivo espectro de masas en modo positivo para los iones $[M+NH_4]^+$ y $[M+Na]^+$ (abajo) del extracto metanólico de resina, luego que la resina permaneciera durante una semana (del 21 enero 2006) en la columna de agua en la localidad de San Antonio.

Figure 8. Selected LC-MS chromatograms (above) and respective mass spectra for $[M+NH_4]^+$ and $[M+Na]^+$ ions (down) for PTX2 obtained in positive ionization mode, from methanol extracts of resin extracted after the resin remained during one week in the water column at San Antonio.

Toxinas adsorbidas por las resinas

La toxina presente con una mayor frecuencia en el área de estudio fue la PTX2 (Tabla I). Ejemplo de cromatograma y espectro m/z del extracto metanólico de la resina con PTX2, adsorbida después de permanecer una semana—la del 21 enero 2006— en la columna de agua en la localidad de San Antonio (CP4) se presenta en la Figura 8.

PTX2SA (Fig. 9) fue encontrada en las resinas después de permanecer una semana—semana del 21 enero y del 26 enero de 2006— en la columna de agua de la localidad de Toralla (DH3) y San Antonio (QL3), respectivamente.

DTX1 fue otra de las toxinas del VDM, encontrada en LIN (CP7), Puluqui A (CP5) y en Calbuco (CP4). Un ejemplo del cromatograma para DTX1 del extracto metanólico de toxina adsorbida después de permanecer una semana—la del 14 de febrero 2006—en la columna de agua en LIN así como el espectro m/z respectivo obtenido por LC-MS, se presenta en la Figura 10.

Puluqui A (CP5) fue la localidad en la que se encontró trazas YTX (Fig. 11). La toxina fue adsorbida por la resina tras permanecer en la columna de agua durante la semana del 14 de febrero 2006.

Fitoplancton cuali y cuantitativo

Durante el periodo de muestreo predominaron fuertemente las diatomeas (Tabla II) respecto de los dinoflagelados. En las muestras cuantitativas sólo se observó 200 cél L^{-1} de la especie potencialmente tóxica *D. acuminata*, en Yaldad (QL6). No obstante las nuestras cualitativas de fitoplancton (Tabla III) revelaron la presencia de otras especies de *Dinophysis*: *D. acuta*, *D. rotundata* y *Dinophysis* sp. (Fig. 12).

DISCUSIÓN

La toxina predominante encontrada fue PTX2, encontrándose trazas de AO y YTX. La PTX2Sa, producto de transformación enzimática del PTX2, también fue encontrada en dos de las estaciones, sin embargo no es posible esta-

Tabla I. Toxinas adsorbidas (ng bolsita-1) por las resinas que permanecieron durante una semana en la columna de agua en distintas localidades de la región de Los Lagos. Se indica la cantidad en peso seco (después de la extracción de toxina) de resina utilizada por bolsita.

Table I. Toxins adsorbed (ng bag-1) by the resins that remained during a week in the water column in different sampling stations of the Los Lagos region. The amount in dry weigh is indicated (after the toxin extraction) of resin used by bag.

Lugar	Sección	Fecha	OA	DTX2	PTX2	PTX2SA	YTX	DTX1	peso seco resina (g)
Calbuco	CP4	14-Feb-06			10				0.37
Calbuco	CP4	14-Feb-06	trazas		71			59	0.36
Puluqui A	CP5	14-Feb-06	trazas				trazas	64	0.36
Puluqui B	CP6	14-Feb-06							0.47
LIN	CP7	14-Feb-06			19			65	0.33
Huenao	DH2	26-ene-06			34				0.46
Toralla	DH3	26-ene-06				60			0.38
Coña B	DH5	26-ene-06			7				0.09
San Antonio	QL3	21-ene-06			164	15			0.15
Quellón Viejo	QL5	21-ene-06	trazas		22				0.08
Yaldad	QL6	21-ene-06			31				0.10

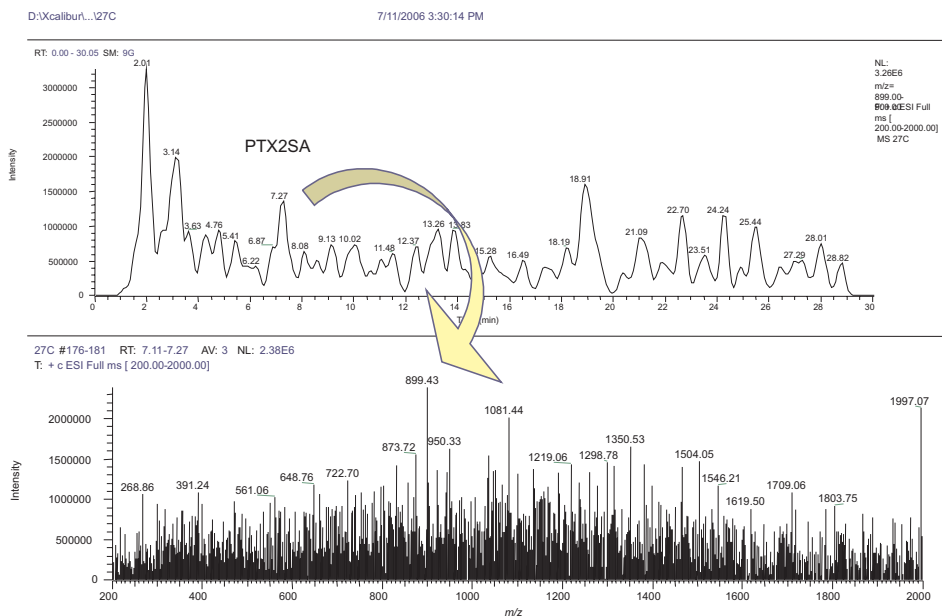


Figura 9. Ejemplo de cromatograma de PTX2SA (arriba) y el respectivo espectro de masas en modo positivo para el ión $[M+Na]^+$ (abajo) del extracto metanólico de resina, luego que la resina permaneciera durante una semana (noviembre 2005) en la columna de agua en la localidad de Toralla.

Figure 9. Selected LC-MS chromatograms (above) and respective mass spectra for $[M+Na]^+$ ion (down) for PTX2SA obtained in positive ionization mode, from methanol extracts of resin extracted after it remained during one week (November 2005) in the water column at Toralla.

Tabla II. Resumen del fitoplancton cuantitativo presente en las estaciones de muestreo de la región de Los Lagos durante los meses de verano.

Table II. Summary of quantitative phytoplankton present in the sampling stations of the Los Lagos region during the months of summer.

Localidad	Fecha	Profundidad	Total Diatomeas	Total Dinoflagelados	<i>D. acuminata</i>
1. CALBUCO	dic-05	0m	75,800	0	0
		5m	99,800	0	0
		10m	189,300	0	0
		20m	61,400	0	0
		30m	26,920	0	0
2. CALBUCO	14-feb-06	0m	18,700	0	0
		5m	163,000	0	0
		10m	49,500	0	0
		20m	56,800	0	0
		30m	74,100	0	0
3. PULUQUIA	14-feb-06	0m	367,900	0	0
		5m	817,900	70	0
		10m	220,300	0	0
		20m	1,514,000	0	0
		30m	416,600	0	0
4. PULUQUI B	14-feb-06	0m	83,000	0	0
		5m	132,500	0	0
		10m	1,291,800	0	0
		20m	664,600	0	0
		30m	977,000	0	0
5. LIN	dic-05	0m	587,920	2600	0
		5m	413,240	800	0
		10m	3,379,360	400	0
		20m	72,000	0	0
		30m	5,700	0	0
6. LIN	14-feb-06	0m	581,020	0	0
		5m	623,780	0	0
		10m	944,960	0	0
		20m	84,200	0	0
		30m	8,400	0	0
7. HUENAO	dic-05	0m	171,300	0	0
		5m	121,100	0	0
		10m	140,600	0	0
		20m	75,800	0	0
		30m	101,200	0	0
8. HUENAO	26-ene-06	0m	137,000	200	0
		5m	172,600	600	0
		10m	133,300	0	0
		20m	33,800	0	0
		30m	51,200	0	0
9. TORALLA	dic-05	0m	1,276,100	0	0
		5m	1,568,700	700	0
		10m	128,300	100	0
		20m	158,500	0	0
		30m	497,300	0	0
10. TORALLA	26-ene-06	0m	503,300	0	0
		5m	368,100	0	0
		10m	279,600	0	0
		20m	433,800	0	0
		30m	306,100	0	0
11. COÑA A	dic-05	0m	1,498,000	0	0
		5m	725,800	3400	0
		10m	800,600	0	0
		20m	694,500	0	0
		30m	296,000	0	0
12. COÑA B	26-ene-06	0m	1,789,960	0	0
		5m	2,625,760	0	0
		10m	1,373,400	0	0
		20m	812,000	0	0
		30m	300,300	0	0
13. SAN ANTONIO	dic-05	0m	66,900	0	0
		5m	225,900	0	0
		10m	75,100	0	0
		20m	66,600	0	0
		30m	89,400	0	0
14. SAN ANTONIO	21-ene-06	0m	985,900	0	0
		5m	137,700	0	0
		10m	171,600	0	0
		20m	253,600	0	0
		30m	465,800	0	0
15. Q VIEJO	dic-05	0m	227,600	0	0
		5m	823,900	0	0
		10m	179,700	0	0
		20m	547,000	0	0
		30m	54,100	0	0
16. Q VIEJO	21-ene-06	0m	1,116,500	0	0
		5m	236,500	0	0
		10m	811,500	0	0
		20m	214,900	0	0
		30m	106,400	0	0
17. YALDAD	dic-05	0m	128,200	0	0
		5m	118,100	0	0
		10m	134,100	0	0
		20m	20,100	0	0
		30m	10,300	0	0
18. YALDAD	21-ene-06	0m	148,800	200	0
		5m	38,000	400	0
		10m	85,400	400	200
		20m	24,400	500	0
		30m	20,000	0	0

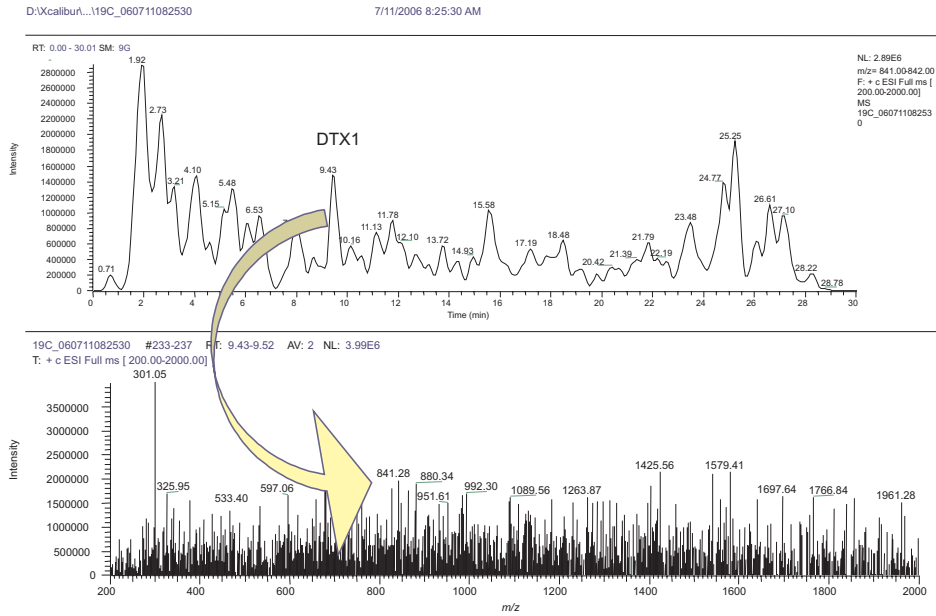


Figura 10. Ejemplo de cromatograma de DTX1 (arriba) y el respectivo espectro de masas en modo positivo para el ión $[M+Na]^+$ (abajo) del extracto metanólico de resina, luego que la resina permaneciera durante una semana (del 14 de febrero 2006) en la columna de agua en la estación LIN.

Figure 10. Selected LC-MS chromatograms (above) and respective mass spectra for $[M+Na]^+$ ion (down) for DTX1 obtained in positive ionization mode, from methanol extracts of resin extracted after it remained during one week (on 14-21 February 2006) in the water column of station LIN.

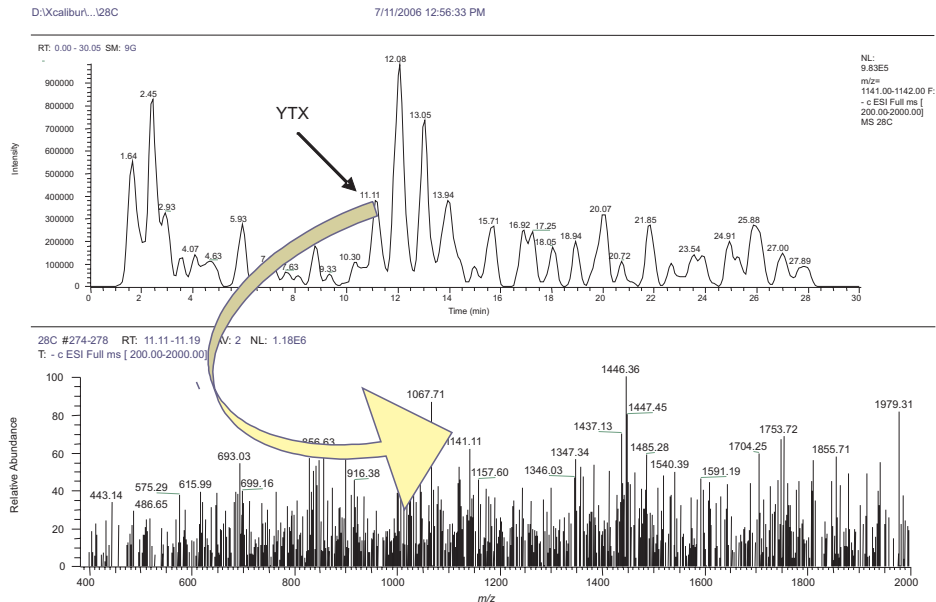


Figura 11. Ejemplo de cromatograma de YTX (arriba) y el respectivo espectro de masas en modo negativo para el ión $[M-2Na+H]^-$ (abajo) del extracto metanólico de resina, luego que la resina permaneciera durante una semana (noviembre 2005) en la columna de agua en la localidad de Puluqui.

Figure 11. Selected LC-MS chromatograms (above) and respective mass spectra for $[M-2Na+H]^-$ ion (down) for YTX obtained in negative ionization mode, from methanol extracts of resin extracted after it remained during one week (November 2005) in the water column at Puluqui.

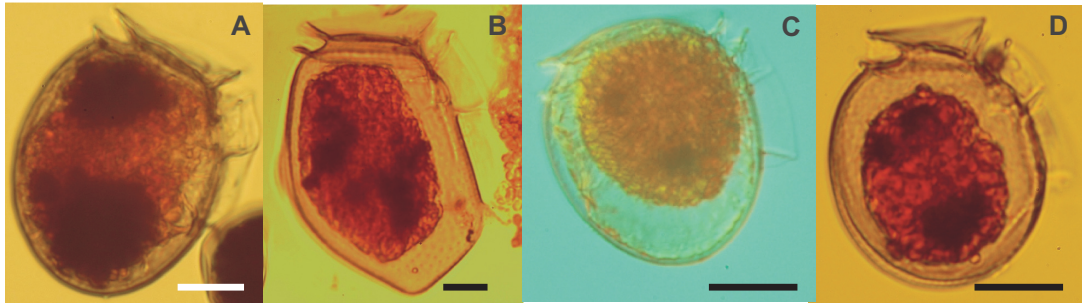


Figura 12. Fotomicrografías de A. *Dinophysis acuminata*; B. *D. acuta*; C. *D. rotundata*; D. *Dinophysis* sp., en muestras cualitativas recolectadas en la localidad de San Antonio (QL3) el 21 de enero de 2006. Barra: 10 μ m.

Figure 12. Micrographs of A. *Dinophysis acuminata*; B. *D. acuta*; C. *D. rotundata*; D. *Dinophysis* sp., in qualitative samples collected from San Antonio (QL3) on 21 January 2006. Bar: 10 μ m.

blecer su procedencia por cuanto su presencia en el agua puede ser debida al metabolismo de mariscos contaminados, zooplankton o incluso por mortalidad de las propias células fitoplanctónicas que la producen. No obstante, de acuerdo al perfil establecido por Blanco *et al.*, (2007) para *D. acuminata* como productora de solo de PTX2 en la región de Coquimbo, esta especie es la principal sospechosa como productora de PTX2 en la región de Los Lagos debido a que históricamente se ha presentado frecuente y abundantemente en la última región (e.g. Guzmán *et al.*, 2007, 2008, 2010).

Como segunda toxina importante se encontró DTX1 en las muestras de resina y concuerda con resultados anteriormente reportados para Chile. No se encontró ninguna señal que indicara la presencia de DTX2 en el área de estudio.

Las concentraciones de PTX2, PTX2SA y DTX1 encontradas en el agua durante este estudio son similares en orden de magnitud a las encontradas por MacKenzie *et al.*, (2004) en Nueva Zelanda.

Las concentraciones trazas de YTXs encontradas en el agua responden a su rápida desnaturalización cuando es expuesta a la luz (Mitrovic *et al.*, 2005) mientras que las trazas de AO en el agua puede deberse a que son producidas por las microalgas en menor concentración respecto

de otras toxinas y/o responden a una mayor desnaturalización ambiental comparada con toxinas como las PTXs (i.e. Pizarro *et al.* 2009).

De acuerdo a las células fitoplanctónicas observadas en las muestras, existe una mejor representación de las especies de *Dinophysis* en las muestras cualitativas que en las muestras cuantitativas lo que indica que se encontraban en capas de alta densidad celular en una profundidad determinada. Sólo fue posible encontrar 200 cél L⁻¹ de *D. acuminata* en la estación de Yaldad (QL6). Sin embargo, la lista cualitativa de especies incluye además *D. acuta*, *D. rotundata* —aunque esta especie es sospechosa de no producir toxinas de novo (González-Gil *et al.*, 2010)— y *Dinophysis* sp. La presencia de YTXs en trazas indica la presencia del dinoflagelado *Protoceratium reticulatum*, especie cuya presencia ha sido reportada en el área de estudio (Guzmán *et al.*, 2007, 2008) aunque se requiere establecer cultivos de esta especie para confirmar la producción de YTXs.

El método de los SPATTs es suficientemente sensible para ser utilizado para describir perfiles de toxinas en la columna de agua. Sin embargo, para establecer una asociación entre el perfil de toxinas presentes en el agua y los dinoflagelados nocivos, se requiere realizar un seguimiento de ambas variables durante un periodo estacional en el suelen ocurrir las floraciones de microal-

gas nocivas. Este modelo también puede ser utilizado como alerta temprana de toxinas del tipo VDM presentes en mariscos. Sin embargo, como en el caso anterior, se requiere establecer una relación entre la cantidad de toxinas adsorbidas por las resinas y el contenido estimado de toxina en los mariscos (bioensayo de ratón) de acuerdo a la normativa vigente durante al menos un periodo estacional con alta probabilidad de ocurrencia de floraciones de microalgas nocivas productoras de toxinas lipofílicas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue cofinanciado por el Centro de Estudios del Cuaternario, CEQUA (con sede en Punta Arenas, región de Magallanes), que ha hecho posible una estada en el Centro Español de Oceanografía de Vigo, para realizar la investigación y análisis de toxinas lipofílicas mediante Cromatografía Líquida acoplada a un Espectrómetro de Masas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, P., B. HALD & H. EMSHOLM. 1996. Toxicity of *Dinophysis* in Danish coastal waters. *En*: T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Senadi, Japan, pp. 281-284.
- ANÓNIMO. 1995. COI-Segundo Taller Regional de Planificación Científica sobre Floraciones de Algas Nocivas en Sudamérica. Informes de reuniones de trabajo 123. Anexo IV: 19-20.
- BLANCO, J., G. ÁLVAREZ & E. URIBE. 2006. Identification of pectenotoxins in plankton, filterfeeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon*: 710-716.
- FERNÁNDEZ, M.L., B. REGUERA, I. RAMILLO & A. MARTÍNEZ. 2001. Toxin content of *Dinophysis acuminata*, *D. acuta* and *D. caudata* from Galician Rias Bajas. *En*: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch & R.J. Lewis (eds.). Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001, pp. 360-363.
- FERNÁNDEZ, M.L., B. REGUERA, S. GONZÁLEZ-GIL & A. MÍGUEZ. 2006. Pectenotoxin-2 in single cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rías (NW Spain). *Toxicon* 48:477-490.
- FERNÁNDEZ-PUENTE, P., M.J. FIDALGO, B. HAMILTON, A. FUREY & K. JAMES. 2004. Studies of polyether toxins in the marine phytoplankton, *Dinophysis acuta*, in Ireland using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 44: 919-926.
- FUX, E., C. MARCAILLOU, F. MONDEGUER, R. BIRE & P. HESS. 2008. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae* 7:574-583
- GARCÍA, C., P. PEREIRA, L. VALLE & N. LAGOS. 2003. Quantitation of diarrhetic shellfish poisoning toxins in Chilean Mussell using pyrenyldiazomethane as fluorescent labelling reagent. *Biol. Res.* 36: 171-183.
- GONZÁLEZ-GIL, S., G. PIZARRO, B. PAZ, L. VELO-SUÁREZ & B. REGUERA. 2010. Is *Dinophysis rotundata* a toxigenic species? In: Ho, K.C., M. Zhou and Y. Qi (eds.). Harmful Algae 2008. Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Environmental Publications House Hong Kong, Copenhagen, pp. 128-131.
- GUZMÁN, L. & I. CAMPODONICO. 1975. Marea roja en la región de Magallanes. *Publ. Inst. Pat. Ser. Mon.* 9: 44.
- GUZMÁN, L., G. PIZARRO, R. IGOR, A. ATALAH, O. OYARZO, E. BARTICEVIC, C. ALARCÓN, J. FOPPIANO, N. BUTOROVIC, E. ALMONACID & M. RUIZ. 2000. Difusión Programa Marea Roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, Cuarta Etapa. Tomos I, II, III, IV. 274 pp. + figuras + fotografías + anexos.
- GUZMÁN, L., G. PIZARRO, M.I. BANCIELLA, R. IGOR, C. ALARCÓN, H. PACHECO, O. OYARZO, M.T. FAURÉ, N. BUTO-

- ROVIC. 2001. Informe Final Subprograma de Monitoreo. Tomo I. 129 pág. + figuras y anexos. En: Difusión Programa Marea Roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, IV Etapa.
- GUZMÁN, L., G. VIDAL, X. VIVANCO, M. PALMA, C. ESPINOZA, P. MEJÍAS, R. ULLOA, L. IRIARTE, V. ARENAS, S. MERCADO, E. FERNÁNDEZ-NIÑO, J. MONSALVE, C. ALARCÓN, P. SALGADO, N. BUTOROVIC, P. HINOJOSA & C. ZAMORA. 2007. Manejo y Monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Informe Final. 141 p. + Figuras + Tablas + Anexos. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción-Subsecretaría de Pesca.
- GUZMÁN, L., G. VIDAL, X. VIVANCO, V. ARENAS, L. IRIARTE, S. MERCADO, C. ALARCÓN, H. PACHECO, M. PALMA, C. ESPINOZA, P. MEJÍAS, E. FERNÁNDEZ-NIÑO, J. MONSALVE, G. PIZARRO, P. HINOJOSA, C. ZAMORA, P. ZAMORA & N. PESSE. 2008. Manejo y Monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Informe Final. 146 p. + Figuras + Tablas + Anexos. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción-Subsecretaría de Pesca.
- GUZMÁN, L., G. VIDAL, X. VIVANCO, M. PALMA, C. ESPINOZA, P. MEJÍAS, R. ULLOA, L. IRIARTE, V. ARENAS, S. MERCADO, E. FERNÁNDEZ-NIÑO, J. MONSALVE, C. ALARCÓN, G. PIZARRO, H. PACHECO, P. HINOJOSA & C. ZAMORA. 2010. Manejo y monitoreo de las mareas rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes periodo 2008-2009. Informe final SUBPESCA, septiembre 2010.
- JAMES, K.J., A.G. BISHOP, R. DRAISCI, L. PALLESHI, C. MARCHIAFAVA, E. FERRETTI, M. SATAKE & T. YASUMOTO. 1999. Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J. Chromatogr. A* 844: 53-65.
- LEE, J. S., T.T. IGARASHI, S. FRAGA, E. DAHL, P. HOVGAARD & T. YASUMOTO. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1:147-152.
- LEMBEYE, G., T. YASUMOTO, J. ZHAO & R. FERNÁNDEZ. 1993. DSP outbreak in Chilean Fiords. En: T.J. Smayda & Y. Shimizu (eds.). *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 525-529.
- MACKENZIE, L., V. BEUZENBERG, P. HOLLAND, P. MCNABB & A. SELWOOD. 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon* 44: 901-918.
- MACKENZIE, L., V. BEUZENBERG, P. HOLLAND, P. MCNABB P., T. SZUKI & A. SELWOOD. 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4:75-85.
- MARCAILLOU, C., P. GENTEN, M. LUNVEN, J. LE GRAND, F. MONDEGUER, M.M. DANILOU, M.P. CRASSOUS & A. YOUNOU. 2001. *Dinophysis acuminata* distribution and specific toxin content in relation to mussel contamination. En: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch & R.J. Lewis (eds.). *Harmful Algal Blooms* 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 356-359.
- MILES, C.O., A.L. WILKINS, R. MUNDAY, M.H. DINES, A.D. HAWKES, L.R. BRIGGS, M. SANDVIK, D.J. JENSEN, J.M. COONEY, P.T. HOLLAND, M.A. QUILLIAM, A.L. MACKENZIE & V. BEUZENBERG. 2004. Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities. *Toxicon* 43: 1-9.
- MITROVIC, SM., B. HAMILTON, L. MCKENZIE, A. FUREY & K.J. JAMES. 2005. Persistence of yessotoxin under light and dark conditions. *Mar. Environ. Res.* 60 (3): 397-401.
- OGINO, H., M. KUMAGAI & T. YASUMOTO. 1997. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins* 5: 255-259.

- PAZ, B., P. RIOBÓ, M.L. FERNÁNDEZ, S. FRAGA & J.M. FRANCO. 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicol.* 44:251-258.
- PIZARRO, G., L. ESCALERA, S. GONZÁLEZ-GIL, J.M. FRANCO & B. REGUERA. 2008. Growth, behaviour and cell toxin quota of *Dinophysis acuta* Ehrenberg during a daily cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 353: 89-1.
- PIZARRO, G., B. PAZ, S. GONZÁLEZ, J.M. FRANCO & B. REGUERA. 2009. Seasonal variability of lipophilic toxins during a *Dinophysis acuta* bloom in Western Iberia: differences between picked cells and plankton concentrates. *Harmful Algae* 8: 926-937.
- RHODES, L., P. MCNABB, M. DE SALAS, L. BRIGGS, V. BEUZENBERG & M. GLADSTONE. 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera*. *Harmful Algae* 5: 148-155.
- SATAKE, M., A.L. MACKENZIE & T. YASUMOTO. 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins*. 5: 164-167.
- SUZUKI, T., T. MITSUYA, H. MATSUBARA & M. YAMASAKI. 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallop. *J. Chromatogr. A* 815:155-160
- SUZUKI, T., A.L. MACKENZIE, D. STIRLING & J. ADAMSON. 2001. Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicol.* 39:507-514.
- SUZUKI, T., V. BEUZENBERG, A.L. MACKENZIE & M.A. QUILLIAM. 2004. Discovery of okadaic acid esters in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 18. 1131-1138.
- SUZUKI, T., J.A. WALTER, P. LEBLANC, S. MACKINNON, C.O. MILES, A.L. WILKINS, R. MUNDAY, V. BEUZENBERG, A.L. V. MACKENZIE, D. JENSEN, J.M. COONEY & M.A. QUILLIAM. 2006. Identification of Pectenotoxin-11 as 34S-Hydroxypectenotoxin-2, a new pectenotoxin analogue in the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* from New Zealand. *Chem. Res. Toxicol.* 19: 310-318.
- TERAO, K., E. ITO, T. YANAGI & T. YASUMOTO. 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. Part I: Ultrastructural changes in the small intestine and liver of sucking mice induced by dinophysis toxin-1 and pectenotoxine-1. *Toxicol.* 24: 1141-1151.
- TERAO, K., E. ITO, M. OARADA, M. MURATA & T. YASUMOTO. 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning-5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivate. *Toxicol.* 28: 1095- 1104.
- TUBARO, A., L. SIDARI, R. DELLA LOGGIA & T. YASUMOTO. 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from the Northern Adriatic Sea. *En: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt (eds.). Harmful Algae. Xunta de Galicia & Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO. Santiago de Compostela, pp. 470-472.*
- URIBE, J.C., L. GUZMÁN, H. PACHECO, R. IGOR, G. PIZARRO, E. BARTICEVIC, M. FRANGOPULOS, C. ALARCÓN, T. HROMIC, C. LABBE., A. ATALAH & P. CHANG. 1998. Informe Final Difusión Programa Marea Roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, Primera Etapa Informe Presentado al Gobierno Regional.
- URIBE, J.C., C. GARCÍA, M. RIVA & N. LANGOS. 2001. First Report Diarrhetic Shellfish Toxins in Magellanic Fiords, Southern Chile. *J. Shellfish Res.* 20: 69-74

- UTERMÖHL, H. 1931. Neue wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). Verh.Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 5: 567-596.
- VALE, P. 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle : a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. Toxicon 44:123:134.
- VAN-TRIJP, J.M.P.& A.H. ROOS. 1991. Model for the calculation of calibration curves. Taken from the RIKILT Report 91.02, January 1991. RIKILT-DLO, Wageningen, NL.
- VILLARROEL, O. 2004. Detección de toxinas paralizante, diarreica y amnésica en mariscos de la región de Aysén por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayo en ratones. Cienc. Tecnol. Mar. 27: 33-42.
- YASUMOTO, T., Y. OSHIMA & M. YAMAGUCHI. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44: 1249-1255.
- YASUMOTO, T., W. SUGAWARA, Y. FUKUYO, H. OGURI, T. IGARASHI & N. FUJITA. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46: 1405-1411.
- YASUMOTO, T., M. MURATA, Y. OSHIMA, M. SANO, G. MATSUMOTO & J. CLARDY. 1985. Diarrhetic Shellfish Toxins. Tetrahedron 41: 1019-1025
- ZHAO, J., G. LEMBEYE, G. CENCI, B. WALL, T. YASUMOTO. 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. *En*: T.J. Smayda & Y. Shimizu (eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam: 587-592.