



INFORME FINAL

“Análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS/MS en muestras de fitoplancton y moluscos recolectadas durante la floración estival 2013 de *Dinophysis* spp. en Magallanes”

SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y EMT / Abril 2014



INFORME FINAL

“Análisis de toxinas lipofílicas mediante LC-MS/MS en muestras de fitoplancton y moluscos recolectadas durante la floración estival 2013 de *Dinophysis* spp. en Magallanes”

SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y EMT / Abril 2014

REQUIRENTE

**SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y EMPRESAS DE
MENOR TAMAÑO**

Subsecretaria de Economía y Empresas de Menor Tamaño
Katia Trusich Ortiz

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Director Ejecutivo (I)
Jorge Castillo Pizarro

Jefe División Investigación en Acuicultura
Leonardo Guzmán Méndez

JEFE DEL PROYECTO

Gemita Pizarro Nova

AUTORA

Gemita Pizarro Nova

COLABORADORES

Claudia Zamora Amstein
Jorge Toro Mancilla
Roberto Raimapo Raimapo
César Alarcón Zapata
Hernán Pacheco Valles

RESUMEN EJECUTIVO

Este informe final incluye los resultados de los análisis de toxinas lipofílicas en muestras de agua (fitoplancton y microalgas) y moluscos recolectados entre enero y febrero de 2013 en la región de Magallanes, cuando ocurrió una floración de dinoflagelados entre los que destacaron *Dinophysis acuminata* y *Protoceratium reticulatum*. Ambas especies eran sospechosas de producir toxinas lipofílicas: DTX1 y PTXs en el primer caso, y YTXs en el segundo. Tal floración se mantuvo intensa entre diciembre 2012 y febrero 2013.

Las muestras de moluscos, fitoplancton (agua) y microalgas aisladas por micromanipulación fueron recolectados en diferentes sectores de Magallanes durante el monitoreo regular de marea roja VII etapa 2013-14 que se realiza anualmente.

Los análisis de toxinas en las muestras fueron realizados por LC-MS/MS en un laboratorio extranjero por tratarse de una técnica aún no implementada en Chile para la detección de toxinas marinas lipofílicas certificada a nivel comercial ni tampoco para investigación básica rutinaria.

Los resultados indican que en los moluscos se encontraban presentes pectenotoxina-2 (PTX2), yesotoxinas (YTXs), 45-hidroxi-yesotoxina (45OHYTX), dinofisistoxina-1 (DTX1) y espirólidos (SPXs). La mayor concentración la presentó el grupo de las YTXs (40-294 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de choritos provenientes del sector de Seno Otway. Igualmente la PTX2 se presentó en mayor concentración (3-45 $\mu\text{g kg}^{-1}$) en este mismo sector y en los mismos transvectores. Para el caso de contenido gástrico de ostiones procedentes del área norte de Magallanes (estero Peel) se detectó tanto PTX2 como YTXs mientras que en cuerpo entero de chorito de la misma estación se detectó PTX2 y SPX1.

El DTX1 fue detectado en choritos (1-18 $\mu\text{g kg}^{-1}$, considerando DTX1 libre y total) procedentes del área centro de Magallanes (sector Seno Otway y sectores adyacentes a Punta Arenas). El AO no fue detectado en ninguna las áreas monitoreadas de la región.

Los SPXs fueron principalmente detectados en choritos de las áreas centro y sur de Magallanes, y en una estación del área norte de la región (estero Peel).

De las cinco toxinas detectadas en los moluscos, solo DTX1 mostró estar localizada en el área centro de Magallanes, mientras que las restantes fueron detectadas en las tres áreas de monitoreo: Norte, centro y sur de Magallanes.

No se encontró pectenotoxina-1 (PTX1), dinofisistoxina-2 (DTX2) ni azaspirácidos (AZPs) en las muestras de moluscos.

Los resultados muestran que de los cuatro grupos de toxinas; PTXs, YTXs, DTXs y SPXs, tres de ellas estuvieron presentes simultáneamente en los moluscos, vale decir, PTX2, YTXs y DTX1, o bien PTXs, YTXs y SPXs.

La presencia de PTX2 y DTX1 en moluscos fue coincidente con la mayor abundancia relativa de *Dinophysis acuminata* en el ambiente, y no con *D. acuta* que estuvo ausente. Las YTXs fueron detectadas en los mismos transvectores y coincidió con una alta abundancia relativa de *Protoceratium reticulatum*. En este último caso fue posible confirmar la producción de YTXs por *P. reticulatum* en microalgas aisladas por micromanipulación y en cultivos establecidos a partir de aislamientos de esta especie desde muestras de agua procedentes del área norte y centro de Magallanes.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN EJECUTIVO | i |
| ÍNDICE GENERAL | iii |
| ÍNDICE DE FIGURA | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | v |
| | |
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 2 |
| 2.1. Objetivo general | 3 |
| 2.2. Objetivo específico | 3 |
| 3. METODOLOGÍA | 3 |
| 3.1. Obtención del extracto | 3 |
| 3.2. Laboratorio de análisis dotado con LC-MS/MS..... | 3 |
| 3.3. Análisis de toxinas lipofílicas por LC-MS/MS..... | 4 |
| 3.4. Extracción de toxinas..... | 6 |
| 4. RESULTADOS | 9 |
| 4.1. Toxinas en moluscos..... | 9 |
| 4.2. Toxinas en microalgas..... | 9 |
| 5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 11 |
| 5.1. Toxinas en moluscos..... | 11 |
| 5.2. Toxinas en microalgas..... | 12 |
| 6. CONCLUSIONES | 13 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 14 |

FIGURA

TABLAS

ANEXOS:

- Anexo 1.** Certificación laboratorio INTECMAR.
- Anexo 2.** Lista de análisis que realiza INTECMAR y sus costos (en euros) 2013.
- Anexo 3.** Resultados de análisis en muestras de microalgas, anteriormente enviadas procedentes de Magallanes, por el equipo de espectrometría de masas utilizado por INTECMAR. Trabajo presentado a las XXXII Congreso de Ciencias del Mar realizado en Punta Arenas, 22-25 octubre de 2012.
- Anexo 4.** Contrato de ensayo propuesto por IFOP y aceptado por INTECMAR para facturación.
- Anexo 5.** Costos del análisis de 58 muestras enviadas a INTECMAR, procedentes de Magallanes.
- Anexo 6.** Resolución n° 2614 de 17 julio 2012 emitido por la SEREMI Salud Magallanes para cierre de área para la extracción de caracol piquilhue.

ÍNDICE DE FIGURA

- Figura 1.** Estaciones y sectores muestreados (círculo rojo) y sector Fortuna donde fue recolectado el caracol piquilhue (círculo amarillo).

ÍNDICE TABLAS

- Tabla 1.** Condiciones cromatográficas para el análisis de toxinas lipofílicas usando una columna de UPLC C18 en fase reversa y medio básico.
- Tabla 2.** Parámetros de la fuente de ionización para el Xevo TQMS (Waters) en la determinación de toxinas lipofílicas.
- Tabla 3.** Resumen de las condiciones de espectrometría de masas empleadas con el Xevo TQMS (Waters) en el análisis de toxinas lipofílicas.
- Tabla 4.** TRR y valores de tolerancia para las toxinas analizadas.
- Tabla 5.** Toxinas lipofílicas detectadas en las muestras de moluscos.
- Tabla 6.** Toxinas lipofílicas detectadas en las muestras de microalgas.
- Tabla 7.** Niveles actualmente permitidos por la legislación europea (bioensayo) y los niveles propuestos por la autoridad europea para la seguridad alimentaria (EFSA*) (Gerssen *et al.* 2010). * European Food Safety Authority.
- Tabla 8.** Abundancia relativa ambiental de las microalgas al momento de recolectar las muestras de moluscos. En rojo se indica la detección de toxina positiva en los moluscos: PTXs (*D. acuminata*), YTXs (*P. reticulatum*), SPXs (*A. ostefeldii*), DTX1 (*A. acuta*). (Tabla modificada de Guzmán *et al.* 2014).

ÍNDICE ANEXOS

- Anexo 1.** Certificación laboratorio INTECMAR.
- Anexo 2.** Lista de análisis que realiza INTECMAR y sus costos (en euros) 2013.
- Anexo 3.** Resultados de análisis en muestras de microalgas, anteriormente enviadas procedentes de Magallanes, por el equipo de espectrometría de masas utilizado por INTECMAR. Trabajo presentado a las XXXII Congreso de Ciencias del Mar realizado en Punta Arenas, 22-25 octubre de 2012.
- Anexo 4.** Contrato de ensayo propuesto por IFOP y aceptado por INTECMAR para facturación.
- Anexo 5.** Costos del análisis de 58 muestras enviadas a INTECMAR, procedentes de Magallanes.
- Anexo 6.** Resolución n° 2614 de 17 julio 2012 emitido por la SEREMI Salud Magallanes para cierre de área para la extracción de caracol piquilhue.

1. ANTECEDENTES

En Chile aún existen escasos antecedentes acerca de las toxinas lipofílicas presentes en nuestros moluscos, así como la fuente microalgal asociada a su producción y la variabilidad espacio-temporal de las mismas. Tal situación es también un problema en el sur austral de Chile y particularmente en Magallanes, donde el historial de este tipo de toxinas ha sido opacado por la fuerte incidencia de toxina paralizante asociada a la presencia de *Alexandrium catenella*. No obstante, en los dos últimos años los niveles de toxicidad por toxinas lipofílicas en la región se han constituido en un problema para la autoridad de Salud pues han determinado el cierre de grandes extensiones de áreas a la extracción de moluscos, hecho no acontecido anteriormente, salvo muy local y esporádicamente (e.g. Uribe *et al.* 2001), además del efecto económico y social.

Dentro de las toxinas lipofílicas las más conocidas y frecuentes a nivel mundial por sus efectos diarreicos (veneno diarreico de los mariscos, VDM) en humanos son el ácido okadaico y sus derivados las dinofisistoxinas (AO y DTXs) (e.g. Yasumoto *et al.* 1978) también conocidas como okadaatos. Por lo mismo poseen un mayor historial de citas en la literatura científica. Los okadaatos son fuertes inhibidores de las proteínas fosfatasa 1 y 2A, y potenciales promotores de tumores (Yasumoto *et al.* 1989, Fujiki *et al.* 1989) con efectos crónicos desconocidos, por lo que su efecto es más lento. Por esta razón representan un riesgo para la salud pública y dan lugar a prolongadas vedas de extracción de bivalvos tanto de bancos naturales como centros de cultivo con las consiguientes pérdidas económicas para el sector pesquero y acuicultor en otras partes del mundo.

Actualmente, en Chile las toxinas lipofílicas son detectadas por el bioensayo del ratón, una metodología semicuantitativa e inespecífica. Por lo mismo suelen ocurrir falsos positivos debido a la interferencia de otras toxinas lipofílicas, diferentes al VDM, inocuas o no para el hombre pero que pueden estar presentes en las muestras inyectadas pues son co-extraídas con los okadaatos.

Gracias al uso de tecnologías de alta sensibilidad, últimamente ha sido posible detectar junto a los okadaatos, otras toxinas lipofílicas de diverso efecto tóxico tales como las yesotoxinas, pectenotoxinas, azaspirácidos, espirólidos y gimnodimina (Zhao *et al.* 1993, Yasumoto & Takizawa, 1997, Uribe *et al.* 2001, García *et al.* 2005, Blanco *et al.* 2007, Krock *et al.* 2009, Álvarez *et al.* 2010, 2011, López *et al.* 2010, Pizarro *et al.* 2011, Fux *et al.* 2011, Trefault *et al.* 2011).

En Magallanes, ha sido reportada la presencia de okadaatos (AO y DTXs) asociadas a la presencia de *Dinophysis acuminata* (Uribe *et al.* 2001). También se ha reportado la presencia de yesotoxinas (YTXs) en moluscos. Esta última se sospecha estar asociada a la presencia de la especie *Protoceratium reticulatum*, comprobada fuente primaria en Aysén (Pizarro *et al.* 2012), norte de Chile (Álvarez *et al.* 2011) y ampliamente conocida como tal a nivel mundial.

Durante el periodo estival de 2013 en la región de Magallanes, ocurrió una floración de dinoflagelados entre los que destacaron *Dinophysis acuminata* y *Protoceratium reticulatum*. Tal floración se mantuvo intensa entre diciembre 2012 y febrero 2013, lo que permitió recolectar muestras de transvectores y microalgas para establecer y/o confirmar los perfiles de toxinas lipofílicas respectivas mediante LC-MS/MS, particularmente en una región con muy poca información al respecto.

2. OBJETIVOS

2.1. General del proyecto

Establecer mediante LC-MS/MS los perfiles de toxinas lipofílicas en muestras de moluscos y de plancton, recolectadas durante la floración de dinoflagelados, ocurrida durante el verano 2013 en la región de Magallanes.

2.2. Objetivo específico

Establecer los perfiles de toxinas lipofílicas en transvectores centinelas, fitoplancton y microalgas aisladas por micromanipulación, recolectados en diferentes sectores de Magallanes durante el monitoreo regular realizados durante una floración de *Dinophysis* spp. y *Protoceratium reticulatum*.

3. METODOLOGÍA

En esta sección se describen las metodologías asociadas a las actividades realizadas, para el logro de los objetivos así como también los conceptos e ideas que la fundamentan.

3.1. Obtención del extracto

- Carne de mariscos. Dependiendo de la cantidad de material, se procesó sólo el hepatopáncreas o carne total. Se maceró y pesó el material. Se realizó extracción con metanol en una de 1:1 p/v. Los extractos fueron centrifugados y el sobrenadante filtrado por filtros de nylon de 0.45 μm y vaciado a un vial.
- Extracto en metanol de muestras de fitoplancton (i.e. el ensamble total de microalgas, sin separar especies): Alícuotas de agua, previamente filtradas por malla de 250 μm para eliminar el zooplancton de tamaño mayor, fueron filtradas en filtros de fibra de vidrio muflados de 13 mm de diámetro (tamaño de poro nominal de 0.7 μm). Los filtros fueron puestos por separado según sitio de recolecta y fecha, en ependorfs de 1.5 ml y congelados hasta ser extraídos con 1 mL de metanol, centrifugados. El sobrenadante fue filtrado por filtros de nylon de 0.45 μm y vaciado a un vial.
- Extracto en metanol de *D. acuminata* y *P. reticulatum*. La microalgas aisladas por micromanipulación bajo un microscopio invertido (siempre y cuando el número de *D. acuminata* y de *P. reticulatum* fuera suficiente como para lograr reunir un número cercano a las 30 células por cada especie) fueron puestas en un ependorf de 1.5 ml con 1 ml de metanol. Para obtener el extracto de toxina, las muestras fueron mezcladas en vortex y filtradas por filtros de nylon de 0.45 μm . El extracto filtrado fue puesto en un vial. Solo en una ocasión fue posible acumular un número suficiente de células de *D. acuta* por ello fue posible obtener solo una muestra para esta especie.
- Todos los extractos fueron secados con nitrógeno gas a 38°C. Este proceso evita los problemas de traslado de extractos en solventes orgánicos y y/o evitar eventuales pérdidas de líquidos en las muestras durante el trayecto.

3.2. Laboratorio de análisis dotado de LC-MS/MS

La metodología para el análisis de toxinas lipofílicas se realizó mediante espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo líquido (LC-MS/MS). Por tratarse de una técnica aún no implementada en Chile en aspectos de determinación de toxinas marinas a nivel comercial y certificada, ni tampoco para realizar investigación básica de rutina, fue necesario enviar las muestras a un laboratorio extranjero certificado. Tal laboratorio pertenece al Instituto Tecnológico del Mar (INTECMAR), Galicia, España.

El contacto se realizó a través de grupos de investigación extranjeros de vasta y reconocida experiencia en el tema, para prospectar la factibilidad de donde realizar los análisis. Los mismos aconsejaron al laboratorio perteneciente a INTECMAR.

INTECMAR es una entidad de investigación estatal, encargada de realizar los monitoreos semanales en Galicia, donde también se encuentra físicamente su sede. Actualmente está certificada para la detección de toxinas lipofílicas en moluscos entre otros análisis que realiza (Anexo 1 y 2). El Anexo 2 contiene el costo del análisis de toxinas lipofílicas (equivalente a cotización).

El laboratorio seleccionado posee un cromatógrafo UPLC Acquity Waters acoplado a un triple cuadrupolo Waters Xevo TQ, con la suficiente sensibilidad en la detección de toxinas en microalgas aisladas por micromanipulación, sensibilidad que fuera confirmada anteriormente al establecer cuantitativamente el perfil de toxinas lipofílicas en muestras de microalgas aisladas desde muestras de sedimentos de Magallanes (ver Anexo 3).

Previo al envío de extractos de moluscos y contrato de ensayo de análisis exigido por INTECMAR, se realizó la consulta acerca de nuestro interés también por analizar toxinas en microalgas aun cuando no estuviesen certificados en esta matriz en particular. La solicitud de análisis fue aceptada por parte de INTECMAR.

Una vez aceptado el contrato de ensayo por parte de INTECMAR (Anexo 4), se procedió entonces a enviar las muestras de 29 extractos de microalgas y 29 extractos de moluscos, mientras INTECMAR facturó por costos de análisis solicitados por IFOP en el contrato de ensayo (Anexo 5).

Si bien el número de extractos obtenidos fue cercano a las 140 muestras, el número de muestras enviadas se ajustó al presupuesto otorgado para este proyecto, al mismo tiempo que la información obtenida fuera suficiente como para tener una visión regional de los perfiles de toxinas que estuvieron presentes durante la floración estival de 2013.

3.3. Análisis de toxinas lipofílicas por LC-MS/MS

Las toxinas lipofílicas a determinar en las muestras fueron: ácido okadaico (AO), dinofisistoxina-2 (DTX2), dinofisistoxina-1 (DTX1), pectenotoxinas (PTX1, PTX2), azaspirácidos, (AZA1, AZA2, AZA3), yesotoxinas (YTX, homoYTX, 45OHYTX, 45OHhomoYTX) y espirólidos (SPX1). El análisis se realizó con los siguientes elementos:

Equipos

- Sistema cromatográfico Acquity Ultra Performance (Código B191C)
- Espectrómetro de masas equipado con interfase ESI y tándem MS/MS. Xevo TQMS (Código B192C)
- Software del programa TargetLynx (Código 196)
- Columna cromatográfica de fase reversa C18, 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, Acquity UPLC BEH.

Reactivos y disolventes

- Metanol grado HPLC gradiente
- H₂O Milli-Q Ellix
- Acetonitrilo grado HPLC o Hipergrado para LC-MS
- Ácido fórmico 98-100 %
- Hidróxido amónico 25 %
- MeOH/Agua 50 %
- Acetonitrilo/Agua 90 %
- Ácido clorhídrico 37 %
- Disolución de ácido clorhídrico 2,5 M Hidróxido Sódico (≤ 99 % pureza).
- Disolución de hidróxido sódico 2,5 M.

Disolventes cromatográficos

- Disolución tampón: hidróxido amónico al 0.125 %.
- Fase móvil A: Agua conteniendo 6,7 mM de NH₄OH.
- Fase móvil B: Acetonitrilo conteniendo 6,7 mM de NH₄OH.
- Cada fase móvil se filtra a vacío a través de filtros de membrana de nylon de 0,22 μm .

Toxinas de Referencia

- Disolución certificada de ácido ocaidaico en metanol (NRC CRM-OA-c). Cod. PB015.
- Disolución certificada de Yessotoxina. Yessotoxin di-sodium salt en metanol (CRM-00-YTX) Cod. PB018.

- Disolución certificada de Homo-yessotoxina. 1a Homoyessotoxin di-sodium salt en metanol (CRM-00-hYTX). Cod. PB019.
- Disolución certificada de calibración de Azaspirácido 1 en metanol (NRC CRM-AZA1). Cod. PB020.
- Disolución certificada de calibración de Azaspirácido 2 en metanol (NRC CRM-AZA2). Cod. PB021.
- Disolución certificada de calibración de Azaspirácido 3 en metanol (NRC CRM-AZA3). Cod. PB022.
- Disolución de calibración de Dinofisistoxina 2 en metanol (00-DTX2). Cod. PB026.
- Disolución de calibración de Dinofisistoxina 1 en metanol (CRM-00-DTX1). Cod. PB032.
- Disolución de calibración de Pectenotoxina 2 en metanol (00-PTX2). Cod. PB031.
- Material de Referencia Certificado (Mussel Tissue Reference Material for DSP Toxins, NRC CRM-DSP-Mus-b) con AO y DTX1, $10,1 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ y $1,3 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$ respectivamente. Homogeneizado de mejillón (*Mytilus edulis*). Cod. PB014.
- Material de Referencia Certificado (Mussel Tissue Reference Material for AZA Toxins, NRC CRM-AZA-Mus) con AZA1, $1,16 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$, AZA2 $0,273 \pm 0,023 \mu\text{g/g}$ y AZA3 $0,211 \pm 0,022 \mu\text{g/g}$. Homogeneizado de mejillón (*Mytilus edulis*). Cod. PB030
- Disolución certificada de calibración de 13-dimetil espirólido C, en metanol (NRC CRM-SPX1). Cod. PB027.

La Tabla 1 muestra las condiciones cromatográficas usando una columna de UPLC C18 en fase reversa y medio básico, mientras que los parámetros de la fuente de ionización para el Xevo TQMS (Waters) se muestran en la Tabla 2.

3.4. Extracción de toxinas

A los extractos metanólicos en seco de las 29 muestras de moluscos y 29 muestras de microalgas se le adicionaron hasta un total de 2,5 mL de metanol dispensadas en pequeñas alícuotas, agitando el vial con un vortex durante 30 segundos.

Análisis de las formas libres del AO, DTX1 y DTX2 y de las toxinas de los grupos PTXs, AZAs y YTXs.

Para la determinación de las formas libres del AO, DTX1 y DTX2 y de las toxinas de los grupos PTXs, AZAs y YTXs se filtró un volumen de aproximadamente 1,2 ml del extracto metanólico a través de filtros

de jeringa de 0,45 µm para su posterior hidrólisis (sección siguiente). Otra alícuota del mismo extracto, filtrada a través de filtro de jeringa compatible con el disolvente de 0,22 µm se diluyó a la mitad con MeOH 100% y se inyectó 5 µl en el sistema LC-MS/MS.

Hidrólisis y cuantificación del contenido total de AO, DTX1 y DTX2

Para detectar y cuantificar el contenido total de AO, DTX1 y DTX2 se requiere una hidrólisis básica previa a la inyección de los extractos en el sistema de LC-MS/MS.

Procedimiento: En un vial que contiene 1 ml de extracto metanólico previamente filtrado por filtros de jeringa de 0,45 µm, se añaden 125 µl de NaOH 2,5 M, se agita manualmente 10 segundos y la mezcla fue sometida a 76 ± 4 °C durante 40 minutos en un baño. Se enfrió a temperatura ambiente, se pesó y luego neutralizó con 125 µl de HCl 2,5 M. Finalmente se homogenizó nuevamente con el vortex durante 30 segundos. Una alícuota del extracto resultante se filtró con filtros de jeringa de 0,22 µm, y diluyó 5/8 con MeOH 100%. Una alícuota de 5 µl fue inyectada en el sistema de LC-MS/MS.

Durante el proceso de hidrólisis el vial debe estar bien cerrado para evitar pérdidas por evaporación (la temperatura de ebullición del MeOH es 65 °C). Las pérdidas se pueden detectar mediante pesada del vial antes y después de la hidrólisis, en caso de confirmarse se completará el peso con metanol.

La detección con el espectrómetro de masas se realizó usando dos transiciones por toxina, la de mayor intensidad se utilizó para cuantificar y la de menor intensidad para confirmar (Tabla 3).

Identificación y Confirmación

La identificación de la presencia de toxinas, se realizará por comparación del tiempo de retención de cada una de las toxinas en la muestra con el tiempo de retención obtenido en las disoluciones de calibrado estándar inyectadas en un mismo día de análisis. Se permite una desviación máxima entre ambos tiempos del 2,5 %.

Para las toxinas que se cuantifican con la recta de calibrado del análogo correspondiente se establece un TRR con una tolerancia según se indica en la Tabla 4.

Para una correcta identificación se exige una separación entre picos calculada mediante aplicación de la expresión:

$$R_s = \frac{2 \times (RT_2 - RT_1)}{(W_1 + W_2)}$$

En donde RT_1 y RT_2 y W_1 y W_2 son respectivamente los tiempos de retención y las anchuras en la línea base de dos picos adyacentes $RT_2 > RT_1$. La resolución será aceptable cuando $R_s > 1,0$ y la resolución a línea base se considerará completa cuando $R_s > 1,5$.

La confirmación de la presencia de toxina según el criterio de la Decisión de la Comisión 2002/657/EC se basa en la relación entre las dos transiciones empleadas para la determinación, (cuantificación y confirmación).

4. RESULTADOS

4.1. Toxinas en moluscos

Las toxinas detectadas en moluscos fueron PTX2, YTX, 45OHYTX, DTX1 y SPX1 (Tabla 5). La mayor concentración la presentó el grupo de las YTXs ($40\text{-}294 \mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras de choritos provenientes del sector de Seno Otway (Fig. 1). En este mismo sector, las PTXs también presentaron las mayores concentraciones ($3\text{-}45 \mu\text{g kg}^{-1}$) en estos transvectores. En el caso del ostión, tanto el PTX2 como las YTXs fueron detectadas en el contenido gástrico.

El DTX1 fue detectado en choritos ($1\text{-}18 \mu\text{g kg}^{-1}$, considerando DTX1 libre y total) procedentes del sector Seno Otway y sectores adyacentes a Punta Arenas. El AO no fue detectado en ninguna área de la Región.

Los SPXs fueron principalmente detectados en choritos de las áreas centro y sur de Magallanes, y en una estación del estero Peel (M13) en el área norte de la región. No obstante que los niveles son muy bajos ($0.1\text{-}2.5 \mu\text{g kg}^{-1}$) incluso del nivel letal 50 en ratones inyectados intraperitonealmente, $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Richard *et al.* 2000), los valores encontrados son iguales o mayor al encontrado en el caracol piquilhue, recolectado en julio de 2012 y que en ese entonces produjo la muerte de ratones provocando el cierre de áreas de extracción por la autoridad de salud regional (Anexo 6).

De las cinco toxinas detectadas en los moluscos, solo DTX1 mostró estar localizada en el área centro de Magallanes, mientras que las restantes fueron detectadas en las tres áreas de monitoreo: Norte, centro y sur de Magallanes. No se encontraron PTX1, DTX2 ni AZPs en las muestras de moluscos.

Los resultados muestran que de los cuatro grupos de toxinas; PTX, YTXs, DTXs y SPXs, tres de ellas pueden estar presentes simultáneamente en los moluscos, vale decir, PTXs, YTXs y DTX1, o bien SPXs en vez de DTX1.

4.2. Toxinas en microalgas

En las microalgas se detectaron PTXs y YTXs (Tabla 6). Las PTXs fueron detectadas, aunque a nivel de trazas, en células de *D. acuminata* seleccionadas por micromanipulación desde muestras de agua procedentes de estero Silva Palma (M25), estero Wickham (M26) y Cutter Cove (M29) (Fig.1). También fue detectada en filtrados de agua (fitoplancton) de Pto. Fontaine (M21) e I. Engelfield (M29N1).

Las YTXs fueron detectadas en células de *P. reticulatum* seleccionadas por micromanipulación y en cultivos de esta microalga que se logró establecer a partir de muestras de agua provenientes de C. Adalberto (M04), Cutter Cove (M29) e I. Engelfield (M29N1). Solo en los cultivos se detectó

homoYTX y en uno de ellos también se detectó, aunque mínimamente, 45OHYTX, un derivado de la YTX que normalmente se encuentra en los moluscos como producto de bio-transformación. La presencia de 45OHYTX en el cultivo, pudo deberse a la presencia de células ya en fase de declinación de la curva de crecimiento.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS DATOS

5.1. Toxinas en moluscos

De las toxinas lipofílicas, se sabe que AO, DTXs y AZAs causan trastornos gastrointestinales en los seres humanos (Gerssen *et al.* 2010). Para las toxinas restantes (YTXs, PTXs y SPXs) aún cuando no se han reportado casos de intoxicación en los seres humanos, éstas son letales o altamente tóxicas, cuando los ratones son inyectados por vía intraperitoneal (Paz *et al.* 2008; Richard *et al.* 2000, Miles *et al.* 2004). Es el caso de los SPXs, la toxicidad en ratones inyectados por vía intraperitoneal supera a la del resto de las toxinas pues su dosis letal 50 es de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Richard *et al.* 2000). Tal es así, que como referencia (Tabla 5), el transvector caracol piquilhue recolectadas en Julio de 2012 y cuyos niveles de toxicidad provocaron la muerte de los ratones, solo presentó $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, detección que fue realizada durante este estudio en muestras de carne almacenadas durante no más de 1 año a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, no se puede descartar una pérdida de la actividad por transformación durante el periodo de conservación.

A excepción de los SPXs, el resto de las toxinas mencionadas, están reguladas por la legislación europea tanto para consumo interno como importación de moluscos y tunicados para garantizar la salud de las personas. Así también están reguladas por la legislación chilena a través del Instituto de Salud Pública (ISP), estableciendo los mismos niveles de referencia europeo en base al bioensayo ratón.

Aun cuando los niveles de toxinas detectadas en los moluscos durante este estudio están por debajo de lo exigido por las regulaciones e incluso de los niveles propuestos por el EFSA (Tabla 7), la presencia de dos y tres tipos de toxinas en los moluscos representa una complejidad en la determinación de los niveles de toxicidad, especialmente si se encuentran presentes toxinas altamente tóxicas para ratones inyectados intraperitonealmente como son los SPXs. Aunque se sospechaba la concurrencia de diferentes tipos de toxinas, tal hecho no había sido confirmado anteriormente.

Sin embargo, los SPXs siguen siendo una incógnita pues se desconoce la fuente de estas toxinas. *A. ostenfeldii*, la especie que podría ser candidata a confirmar, estuvo ausente (Tabla 8, modificado de Guzmán *et al.* 2014) durante el periodo en que se detectó en los moluscos. Los escasos antecedentes toxigénicos de esta especie en Chile, la han confirmado como productora de toxinas paralizantes en Aysén (Pizarro *et al.* 2012) pero no de SPXs. No obstante, la producción de SPXs por esta especie en la región de Magallanes aún no se puede descartar.

Las YTXs fueron las toxinas más abundantes en los moluscos analizados, condición que se corresponde con la alta abundancia relativa de esta especie en el ambiente (Tabla 8) en la mayoría de los casos (Tabla 5).

Los resultados sugieren que los falsos positivos por bioensayo ratón pudieran ser más frecuentes de lo que se piensa actualmente para la región de Magallanes.

5.2. Toxinas en microalgas

Los resultados indican que *P. reticulatum* encontrado en Magallanes, producen YTXs al igual que las especies reportadas en la región de Antofagasta y Aysén (Álvarez *et al.* 2011; Pizarro *et al.* 2012). Tal resultado hace altamente probable que esta especie es la fuente de YTXs detectadas en los moluscos durante el periodo de estudio.

De acuerdo a las toxinas detectadas en las muestras de *D. acuminata* aisladas, así como en el fitoplancton con gran abundancia de esta especie (Tabla 8), sugiere que esta microalga podría ser una fuente primaria de PTXs tal como ocurre en el norte y sur del país (Blanco *et al.* 2007; Fux *et al.* 2011). Aunque la especie también ha sido asociada a la presencia de DTX1 en moluscos en un evento tóxico ocurrido en 1998 en Magallanes (Uribe *et al.* 2001), el DTX1 no fue detectado en las muestras de *D. acuminata* durante este estudio. El no hallazgo de DTX1 en estas muestras pudo deberse a una fuente microalgal distinta como *D. acuta* y/o *P. lima*.

D. acuta ha sido asociada a DTX1 en moluscos de la región de Aysén (Lembeye *et al.* 1993 y Zhao *et al.* 1993) mientras que *P. lima* es productora solo de DTX1 en la región de Magallanes (Salgado *et al.* 2012). Sin embargo, cuando se detectó DTX1 en las muestras de moluscos durante este estudio, *D. acuta* estuvo ausente en las muestras de agua mientras que *D. acuminata* presentó una abundancia relativa alta.

Por otro lado, el volumen de resuspensión de los extractos pudo ser elevado al seguir el mismo procedimiento protocolar que se aplica a las muestras de moluscos de acuerdo a la normativa europea actual. Por tal razón el LC-MS/MS no logró detectar PTXs ni DTX1 en las muestras de microalgas. En estos casos, un protocolo para el análisis de las microalgas debiera incluir un volumen menor de resuspensión de los extractos secos en referencia al utilizado para los moluscos, o bien, seleccionar por micromanipulación un número mayor de microalgas (> 130 células). Sin embargo, esto último es más difícil de lograr en latitudes australes debido a la baja densidad de células en las que se presenta normalmente esta especie en condiciones naturales. Por tal motivo se recomienda realizar pruebas con un volumen de resuspensión menor a 1 mL aun cuando se trate de un LC-MS/MS triple cuadrupolo.

6. CONCLUSIONES

- a. Los moluscos de la región de Magallanes pueden presentar PTX2, YTX, 45OHYTX, DTX1 y SPX1.
- b. El hecho que los moluscos puedan presentar dos o más tipos de toxinas lipofílicas, dificulta establecer el nivel de toxicidad total.
- c. *P. reticulatum* en Magallanes produce YTXs al igual que la especie del norte y sur del país.
- d. La abundancia relativa ambiental de *P. reticulatum* durante el periodo de estudio coincidió con la presencia de YTXs en los moluscos.
- e. Los SPXs encontrados anteriormente en caracoles piquilhue, también fue posible detectarlos en choritos durante este estudio.
- f. Aún queda por confirmar el tipo de SPXs presentes y su eventual fuente primaria. La presencia de SPXs en los moluscos no siempre coincidió con la presencia de *A. ostentfeldii* en el ambiente y su abundancia relativa máxima fue solo de nivel 1 (raro) durante el periodo de estudio.
- g. La PTX2 detectada en los moluscos coincidió con una alta abundancia relativa ambiental de *D. acuminata*. No obstante, aún queda por confirmar si esta especie es la fuente primaria. Para ello se hace necesario ajustar (disminuir) el volumen de dilución de los extractos secos de microalgas aisladas por micromanipulación aun cuando se trata de un espectrómetro de masas como un triple cuadrupolo.
- h. La detección de DTX1 en los moluscos coincidió con la ausencia de *D. acuta* en el ambiente. La toxina tampoco fue detectada en los moluscos cuando esta microalga estuvo a niveles de 2 y 3 (escaso y regular). Queda por confirmar la producción de DTX1 por esta especie en Magallanes.
- i. No se encontraron PTX1, DTX2 ni AZPs en las muestras de moluscos durante el periodo de estudio.
- j. Los resultados demuestran la presencia de toxinas en los moluscos que se hace necesario identificar y cuantificar utilizando técnicas distintas al bioensayo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, G., Uribe, E., Ávalos, P., Mariño, C. & Blanco, J. 2010. First identification of azaspiracid and spirolides in *Mesodesma donacium* and *Mulinia edulis* from Northern Chile. *Toxicon* 55: 638–641.
- Álvarez, G., Uribe, E., Díaz, R., Braun, M., Mariño, C. & Blanco, J. 2011. Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile. *Journal of Sea Research* 65: 427–434.
- Blanco, J., Álvarez, G. & Uribe, E. 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filterfeeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile from Chile. *Toxicon*: 710-716.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, S., Yoshizawa, S., Takagi, K., Sassa, T., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Yasumoto, T., Kato, Y., Fusetani, N., Hashimoto, K. & Sugimura, T. 1989. New tumor promoters from marine sources: The okadaic acid class. In: Natori, S., Hashimoto, K. & Ueno, Y. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Amsterdam, pp. 453- 460.
- Fux, E., Smith J.L., Tong, T., Guzmán L. & Anderson D.M. 2011. Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon* 57(2): 275-287.
- García, C., Truan, D., Lagos, M. Santelices, J.P., Díaz, J.C. & Lagos N. 2005. Metabolic transformation of dinophysistoxin-3 into dinophysistoxin-1 causes human intoxication by consumption of O-acyl-derivatives dinophysistoxins contaminated shellfish. *Journal Toxicological Sciences* 30: 287-296.
- Gerssen, A., van Olst, E.H.W, Mulder, P.P.J. & de Boer, J. 2010. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3079-3088.
- Guzmán *et al.* 2014. Manejo y monitoreo de toxinas marinas y fitoplancton nocivo en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes VII etapa (2013-114). Proyecto SUBPESCA. Informe Final Base de Datos.
- Krock, B., Seguel, C.G., Valderrama K. & Tillmann U. 2009. Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, North Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 54: 364-367.

- Lembeye, G., Yasumoto, Y., Zhao, J. & Fernández, R. 1993. DSP outbreak in Chilean fiords. In: Smayda, T. J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic phytoplankton blooms in the sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 525-529.
- López-Rivera, A., O'Callaghan, K., Moriarty, M., O'Driscoll, D., Hamilton B., Lehane, M., James, K.J. & Furey, A. 2010. First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55: 692-701.
- Miles, C.O, Wilkins, A.L, Munday, R., Dines, M.H, Hawkes, A.D., Briggs, L.R., Sandvik, M., Jensen, D.J., Cooney, J.M., Holland, P.T., Quilliam, M.A., MacKenzie, A.L., Beuzenberg, V. & Towers, N.R. 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.
- Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M. & Fernández, J.J. 2008. Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar. Drugs* 6:73-102.
- Pizarro G, Alarcón C, Franco JM, Escalera L, Reguera B, Vidal G, Palma M & Guzmán L. 2011. Distribución espacial de *Dinophysis* spp. y detección de toxinas DSP en el agua mediante resinas DIAION (verano 2006, X región de Chile). *Cienc.Tecnol.* 34(1):25-50.
- Pizarro, G., Paz, B., Salgado, P., Álvarez-Chaver, P., Garrido C. & Guzmán L. 2012. Perfil de toxinas de *Protoceratium reticulatum* aislados de la región de Aysén. XXXII Congreso de Ciencias del Mar, 22-25 octubre 2012. Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile. Libro de resúmenes, p. 83.
- Richard, D.J.A., Arsenault, E., Cembella, A.D., Quilliam, M.A. 2000. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. In: Hallegraef, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (eds) Proceedings of the 9th conference on harmful algal blooms, Hobart, Australia, pp 383-386.
- Salgado, P.; Pizarro, G.; Franco, J.M.; Riobó, P.; Bravo, I. Perfil de toxinas de *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) aislado desde la costa de Magallanes, sur de Chile. In Proceedings of Libro de resúmenes del XXXII Congreso de Ciencias del Mar, Punta Arenas, Chile, 22-26 de Octubre 2012; p. 228.
- Trefault, N., B. Krock, N. Delherbe, A. Cembella, & M. Vásquez. 2011. Latitudinal transects in the southeastern Pacific Ocean reveal a diverse but patchy distribution of phycotoxins. *Toxicon* 58(5): 389-397.

- Uribe, J. C., García, C., Rivas, M. and Lagos, N. 2001. First report of diarrhetic shellfish toxins in Magellanic fjords, southern Chile. *J. Shellfish Res.* 20:69-74.
- Yasumoto, T., Oshima, Y. & Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44: 1249-1255.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J.-S. & Torigoe, K.T.D. 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Amsterdam, pp. 375–382.
- Yasumoto, T. & Takizawa, A. 1997. Fluorometric measurements of yessotoxins in shellfish high-pressure liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:1775-1777.
- Zhao, J., Lembeye, G., Cenci, G., Wall, B. & Yasumoto, T. 1993. Determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in mussels from Chile, Italy and Ireland. In: Smayda, T. J. & Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 587-592.

FIGURA

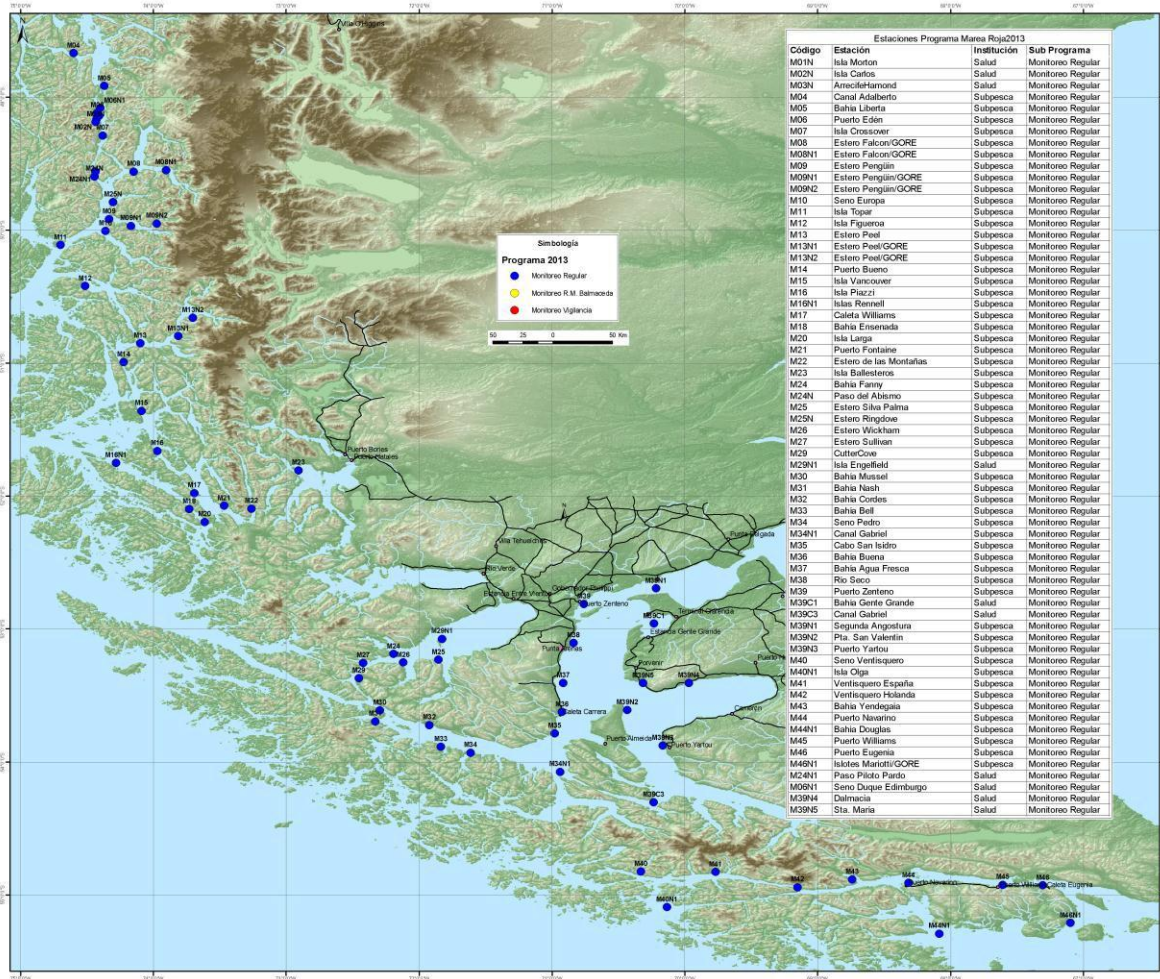


Figura 1. Estaciones y sectores muestreados (círculo rojo) y sector Fortuna donde fue recolectado el caracol piquilhue (círculo amarillo).

T A B L A S

Tabla 1.

Condiciones cromatográficas para el análisis de toxinas lipofílicas usando una columna de UPLC C18 en fase reversa y medio básico.

| | | | |
|-----------------------------|--|------------|------------|
| Columna | Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1x100 mm | | |
| Temperatura columna | 45 °C | | |
| Flujo | 0,4 ml/min | | |
| Volumen inyección | 5 µl | | |
| Temperatura muestras | 10 ± 5 °C | | |
| Gradiente | Tiempo (min) | Fase A (%) | Fase B (%) |
| | 0 | 75 | 25 |
| | 0,66 | 75 | 25 |
| | 3,30 | 5 | 95 |
| | 5,28 | 5 | 95 |
| | 7,26 | 75 | 25 |
| | 9,00 | 75 | 25 |

Tabla 2.

Parámetros de la fuente de ionización para el Xevo TQMS (Waters) en la determinación de toxinas lipofílicas.

| PARÁMETROS DE LA FUENTE | ESI- | ESI+ |
|---------------------------------|-------------|---|
| | | AO, DTX2, DTX1, YTX, homoYTX, 45OH YTX y 45OH homoYTX |
| Voltaje de capilar (V) | 1,00 | 2,00 |
| Temperatura de solvatación (°C) | 450 | 450 |
| Flujo gas de solvatación (l/h) | 850 | 850 |
| Flujo gas cono (l/h) | 50 | 50 |

Tabla 3.

Resumen de las condiciones de espectrometría de masas empleadas con el Xevo TQMS (Waters) en el análisis de toxinas lipofílicas.

| Compuesto | t _R (min.) | ESI | Ión Precursor (m/z) | Ión Producto (m/z) | Dwell time (s) | Energía colisión (eV) | Voltaje cono (V) |
|--------------|-----------------------|-----|---------------------|--------------------|----------------|-----------------------|------------------|
| AO | 1,89 | NEG | 803,5 | 255,2 * | 0,010 | 46 | 86 |
| | | | | 113 | 0,010 | 56 | 86 |
| DTX2 | 2,10 | NEG | 803,5 | 255,2 * | 0,010 | 46 | 86 |
| | | | | 113 | 0,010 | 56 | 86 |
| DTX1 | 2,14 | NEG | 817,5 | 563,4 | 0,010 | 43 | 86 |
| | | | | 255,2 * | 0,010 | 48 | 86 |
| YTX | 2,02 | NEG | 570,4 | 467,4 * | 0,010 | 30 | 45 |
| | | | | 396,3 | 0,010 | 35 | 45 |
| 45OH-YTX | 1,82 | NEG | 578,4 | 467,4 * | 0,010 | 30 | 45 |
| | | | | 396,4 | 0,010 | 30 | 45 |
| HomoYTX | 2,03 | NEG | 577,5 | 474,4 * | 0,010 | 30 | 48 |
| | | | | 403,4 | 0,010 | 30 | 48 |
| 45OH-homoYTX | 1,82 | NEG | 585,5 | 403,4 | 0,010 | 30 | 45 |
| | | | | 474,4* | 0,010 | 30 | 45 |
| PTX1 | 3,06 | POS | 892,5 | 839,5 | 0,015 | 25 | 36 |
| | | | | 821,5* | 0,015 | 25 | 36 |
| PTX2 | 3,62 | POS | 876,5 | 841,5 | 0,015 | 20 | 36 |
| | | | | 823,5* | 0,015 | 25 | 36 |
| AZA1 | 2,63 | POS | 842,5 | 654,5 * | 0,015 | 55 | 50 |
| | | | | 362,2 | 0,015 | 50 | 50 |
| AZA2 | 2,70 | POS | 856,5 | 672,5 * | 0,015 | 45 | 27 |
| | | | | 654,5 | 0,015 | 45 | 27 |
| AZA3 | 2,36 | POS | 828,5 | 640,4 | 0,015 | 55 | 47 |
| | | | | 362,2* | 0,015 | 55 | 47 |
| SPX1 | 3,68 | POS | 692,5 | 674,4 | 0,015 | 27 | 60 |
| | | | | 164,3* | 0,015 | 42 | 60 |

*Transición cuantificadora.

Tabla 4.
TRR y valores de tolerancia para las toxinas analizadas.

| TOXINA | TRR | TOLERANCIA |
|---------------------------------|-------|-------------|
| Toxinas del grupo de AO | | |
| AO | 1,000 | 0,990-1,010 |
| DTX2 | 1,040 | 1,014-1,066 |
| DTX1 | 1,140 | 1,111-1,168 |
| Toxinas del grupo de PTX | | |
| PTX2 | 1,000 | 0,990-1,010 |
| PTX1 | 0,850 | 0,829-0,871 |
| Toxinas del grupo de YTX | | |
| YTX | 1,000 | 0,990-1,010 |
| 45OH-YTX | 0,894 | 0,871-0,916 |
| Homo YTX | 1,000 | 0,990-1,010 |
| 45OH-homoYTX | 0,899 | 0,876-0,921 |

Tabla 5.
Toxinas lipofílicas detectadas en las muestras de moluscos.

| Nº est. | Mes recolecta | Localidad | Molusco | cuerpo entero | hepat. | gramos carne | toxicidad VDM ratón | PTX2 (ug/Kg) | YTX (ug/Kg) | 45OHYTX (ug/Kg) | DTX1 libre (ug/Kg) | DTX1 total (ug/kg) | SPX 1 (ug/Kg) |
|----------------|---------------|--------------------|-------------------|---------------|--------|--------------|---------------------|--------------|-------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------|
| M13 | ene-13 | E. Peel | chorito | x | | 5.086 | + | 0.1 | | | | | 0.2 |
| M13 | ene-13 | E. Peel | ostión | | x | 5.155 | No realizado | 1.6 | 2.1 | | | | |
| M33 | ene-13 | B. Bell | chorito | x | | 5.253 | + | 0.4 | | | | | |
| M37 | ene-13 | B. Agua Fresca | chorito | x | | 5.039 | + | 0.5 | | | | | 0.1 |
| M35 | ene-13 | C. San Isidro | chorito | x | | 5.289 | + | 0.00 | | | | | 0.1 |
| M42 | ene-13 | V. Holanda | chorito | x | | 5.231 | + | 0.6 | | | | | 1.3 |
| M43 | ene-13 | B. Yendegaia | chorito | x | | 5.193 | + | 0.4 | | | | | 2.5 |
| M45 | ene-13 | Pto. Williams | chorito | x | | 5.161 | - | 2.8 | | | | | 0.7 |
| M08 | feb-13 | E. Falcon | cholga | x | | 5.027 | - | | 1.4 | | | | |
| M09 | feb-13 | E. Penguín | cholga | x | | 5.103 | + | | 1.4 | | | | |
| M22 | feb-13 | E. de las Montañas | cholga | x | | 5.052 | - | | 2.6 | | | | |
| M23 | feb-13 | I. Ballesteros | cholga | x | | 5.204 | - | | 8.7 | | | | |
| M24 | feb-13 | B. Fanny | chorito | | x | 2.016 | - | 3.8 | 107.1 | 47.9 | | | 1.2 |
| M25 | feb-13 | E. Silva Palma | chorito | | x | 1.447 | - | 5.9 | 107.7 | 89.8 | 0.9 | | |
| M26 | feb-13 | E. Wickham | chorito | | x | 1.093 | - | 19.4 | 294.0 | 223.2 | 6.6 | 6.6 | |
| M27 | feb-13 | E. Sullivan | chorito | | x | 1.137 | - | 45.0 | 194.4 | 147.8 | | | |
| M28 | feb-13 | E. Nuñez | chorito | | x | 1.179 | + | 3.3 | 72.1 | 40.7 | | | |
| M29 | feb-13 | Cutter Cove | chorito | | x | 1.003 | - | 6.5 | 50.1 | 30.9 | | | |
| M29N1 | feb-13 | I. Engelfield | chorito | | x | 1.116 | - | 29.7 | 200.7 | 148.3 | | | |
| M31 | feb-13 | B. Nash | chorito | | x | 2.231 | + | | | | | | |
| M33 | feb-13 | B. Bell | chorito | | x | 1.181 | - | | 9.3 | | | | |
| M34 | feb-13 | S. Pedro | chorito | | x | 0.726 | - | | | | | | |
| M35 | feb-13 | C. San Isidro | chorito | | x | 1.178 | + | | 11.0 | | | | |
| M36 | feb-13 | B. Buena | chorito | | x | 1.367 | + | | | | | | |
| M37 | feb-13 | B. Agua Fresca | chorito | | x | 0.850 | + | 4.5 | | | 10.0 | 8.0 | |
| M39 | feb-13 | Pto. Zenteno | chorito | | x | 3.241 | + | | | | 2.8 | | |
| M39N2 | feb-13 | Pta. San Valentin | chorito | | x | 1.712 | - | | | | | | 1.1 |
| M39N3 | feb-13 | Pto. Yartou | chorito | | x | 2.035 | - | | | | | | 1.1 |
| sector Fortuna | jul-12 | B. Inútil | caracol piquilhue | x | | 107.000 | + | | | | | | 0.1 |

Tabla 6.
Toxinas lipofílicas detectadas en las muestras de microalgas.

| Nº est. | Fecha recolecta | Localidad | Microalga | Nº cél | PTX2 (ng/vial) | YTX (ng/vial) | 450HYTX (ng/vial) | homoYTX (ng/vial) |
|---------|-----------------|----------------|------------------------|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|-------------------|
| M25 | 16-ene-13 | E. Silva Palma | <i>D. acuminata</i> | 129 | trazas | | | |
| M25 | 16-ene-13 | E. Silva Palma | <i>D. acuminata</i> | 106 | | | | |
| M25 | 15-ene-13 | E. Silva Palma | <i>P. reticulatum</i> | 33 | | 2.55 | | |
| M26 | 18-ene-13 | E. Wickham | <i>D. acuminata</i> | 72 | trazas | | | |
| M26 | 18-ene-13 | E. Wickham | <i>P. reticulatum</i> | 50 | | 4.55 | | |
| M29 | 16-ene-13 | Cutter Cove | <i>D. acuminata</i> | 69 | trazas | | | |
| M29 | ene-13 | Cutter Cove | <i>P. reticulatum</i> | cultivo | | 2265 | | 46 |
| M04 | 13-feb-13 | C. Adalberto | <i>D. acuminata</i> | 18 | | | | |
| M04 | 13-feb-13 | C. Adalberto | <i>D. acuminata</i> | 11 | | | | |
| M04 | feb-13 | C. Adalberto | <i>P. reticulatum</i> | cultivo | | 586 | | trazas |
| M04 | 13-feb-13 | C. Adalberto | Fitoplancton | filtrado de 20 ml red | | | | |
| M08 | 19-feb-13 | E. Falcon | <i>D. acuta</i> | 14 | | | | |
| M08 | 19-feb-13 | E. Falcon | Fitoplancton | filtrado de 15 ml red | | | | |
| M21 | 19-feb-13 | Pto. Fontaine | <i>D. acuminata</i> | 73 | | | | |
| M21 | 19-feb-13 | Pto. Fontaine | Fitoplancton | filtrado de 15 ml red | 1.7 | | | |
| M23 | 13-feb-13 | I. Ballesteros | <i>D. acuminata</i> | 36 | | | | |
| M23 | 13-feb-13 | I. Ballesteros | <i>D. acuminata</i> | 57 | | | | |
| M23 | 13-feb-13 | I. Ballesteros | <i>D. acuminata</i> | 24 | | | | |
| M29N1 | 05-feb-13 | I. Engelfield | <i>D. acuminata</i> | 82 | | | | |
| M29N1 | 05-feb-13 | I. Engelfield | <i>D. acuminata</i> | 88 | | | | |
| M29N1 | 07-feb-13 | I. Engelfield | <i>D. acuminata</i> | 39 | | | | |
| M29N1 | 05-feb-13 | I. Engelfield | <i>P. reticulatum</i> | 88 | | | | |
| M29N1 | 05-feb-13 | I. Engelfield | Fitoplancton | filtrado de 15 ml red | 9.5 | 1.7 | | |
| M29N1 | feb-13 | I. Engelfield | <i>P. reticulatum</i> | cultivo | | 1870 | 2.5 | 16.5 |
| M39N2 | 26-mar-13 | San Valentín | <i>D. truncata</i> | 26 | | | | |
| M39N2 | 26-mar-13 | San Valentín | <i>D. acuminata</i> | 62 | | | | |
| M39N2 | 26-mar-13 | San Valentín | <i>Prorocentrum</i> sp | 40 | | | | |

Tabla 7.

Niveles actualmente permitidos por la legislación europea (bioensayo) y los niveles propuestos por la autoridad europea para la seguridad alimentaria (EFSA*) (Gerssen *et al.* 2010).

| Toxin | Legislación ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^{1)**} | Proposición EFSA ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Validación LC-MS/MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|-------------|---|--|---|
| OA and DTXs | 160*** | 45 | |
| PTXs | | 120 | |
| YTXs | 1000 | 3750 | |
| AZAs | 160 | 32 | |
| SPXs | | | 400 (Gerssen et al.2010) |

* European Food Safety Authority

** Decisión 2002/657 de la Unión Europea / EC

*** Incluye PTXs

Tabla 8.

Abundancia relativa ambiental de las microalgas al momento de recolectar las muestras de moluscos. En rojo se indica la detección de toxina positiva en los moluscos asociada a la supuesta microalga fuente: PTXs (*D. acuminata*), YTXs (*P. reticulatum*), SPXs (*A. ostenfeldii*), DTX1 (*A. acuta*).

| Nº Estación | Estación | Fecha Muestreo | <i>D. acuminata</i> | <i>P. reticulatum</i> | <i>A. ostenfeldii</i> | <i>D. acuta</i> |
|-------------|--------------------|----------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| M13 | E. Peel | 12/ene/13 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| M33 | B. Bell | 6/ene/13 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| M35 | Cabo Sn. Isidro | 7/ene/13 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| M37 | B. Agua Fresca | 7/ene/13 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| M42 | V. Holanda | 21/ene/13 | 7 | 0 | 0 | 1 |
| M43 | B. Yendegaia | 20/ene/13 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| M45 | Pto. Williams | 19/ene/13 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| M08 | E. Falcon | 8/feb/13 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| M09 | E. Pengüin | 7/feb/13 | 5 | 2 | 1 | 3 |
| M22 | E. de las Montañas | 4/feb/13 | 6 | 1 | 1 | 0 |
| M23 | I. Ballesteros | 2/feb/13 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| M24 | B. Fanny | 31/ene/13 | 4 | 2 | 0 | 0 |
| M25 | E. Silva Palma | 01/feb/13 | 9 | 6 | 0 | 0 |
| M26 | E. Wickham | 01/feb/13 | 9 | 5 | 0 | 0 |
| M27 | E. Sullivan | 31/ene/13 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| M28 | E. Nuñez | 31/ene/13 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| M29 | Cutter Cove | 31/ene/13 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| M29N1 | I. Engelfield | 01/feb/13 | 6 | 4 | 0 | 0 |
| M31 | B. Nash | 01/feb/13 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| M33 | B. Bell | 01/feb/13 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| M34 | S. Pedro | 01/feb/13 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| M35 | Cabo Sn. Isidro | 30/ene/13 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| M36 | B. Buena | 30/ene/13 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| M37 | B. Agua Fresca | 02/feb/13 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| M39 | Pto. Zenteno | 04/feb/13 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| M39N2 | Punta San Valentín | 02/feb/13 | 8 | 1 | 1 | 0 |
| M39N3 | Pto. Yartou | 02/feb/13 | 4 | 0 | 1 | 0 |

Escalas de abundancia relativa:

(1) *Dinophysis acuta*, *Dinophysis acuminata* y *Alexandrium ostenfeldii*

(2) *Protoceratium reticulatum*

| | ESCALA | <i>D. acuta</i> (1) | <i>P. reticulatum</i> (2) |
|--------------------------|--------|---------------------|---------------------------|
| AUSENTE | 0 | 0 | 0 |
| RARO | 1 | 1 - 5 | 1 - 2 |
| ESCASO | 2 | 6 - 15 | 3 - 10 |
| REGULAR | 3 | 16 - 35 | 11 - 42 |
| ABUNDANTE | 4 | 36 - 75 | 43 - 170 |
| MUY ABUNDANTE | 5 | 76 - 155 | 171 - 682 |
| EXTREMADAMENTE ABUNDANTE | 6 | 156 - 315 | 683 - 2730 |
| HIPER ABUNDANTE | 7 | 316 - 635 | 2731 - 10922 |
| ULTRA ABUNDANTE | 8 | 636 - 1275 | 10923 - 43690 |
| MEGA ABUNDANTE | 9 | 1276 - 2555 | 43691 - 174762 |

Número de células promedio bajo un cubre objeto de 18x18 mm en 3 alícuotas de 0,1 ml cada una.

(Tabla modificada de Guzmán et al. 2014)

A N E X O S

ANEXO 1

Certificación laboratorio INTECMAR.

ANEXO TÉCNICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO PARA O CONTROL DO MEDIO MARIÑO DE GALICIA

Dirección: Peirao de Vilaxoán, s/n; 36611 Vilagarcía de Arousa (Pontevedra)

Está acreditado por la **ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN**, conforme a los criterios recogidos en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025: 2005 (CGA-ENAC-LEC), para la realización de:

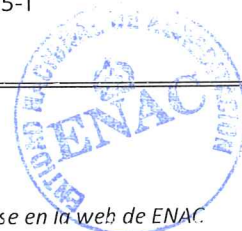
Ensayos en productos agroalimentarios y aguas

Categoría 0 (Ensayos en el laboratorio permanente)

UNIDAD DE METALES PESADOS

Análisis mediante métodos basados en técnicas de espectrometría atómica

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|-----------------------------|---|---|
| Mejillones | Elementos por espectrometría de absorción atómica (atomización electrotérmica) Plata ($\geq 0,011$ mg/kg) | Procedimiento interno PNT-C-13-T |
| Moluscos bivalvos | Elementos por espectrometría de absorción atómica (atomización electrotérmica) Arsénico ($\geq 0,73$ mg/kg) Cadmio ($\geq 0,019$ mg/kg) Plomo ($\geq 0,062$ mg/kg) Cromo ($\geq 0,064$ mg/kg) Níquel ($\geq 0,044$ mg/kg) | Procedimientos internos PNT-C-08-T PNT-C-09-T PNT-C-10-T PNT-C-11-T PNT-C-12-T |
| | Mercurio por espectrometría de absorción atómica (vapor frío) ($\geq 0,0074$ mg/kg) | Procedimiento interno PNT-C-16-T |
| | Metales por espectrometría de absorción atómica (atomización por llama) Cobre ($\geq 0,50$ mg/kg) Zinc ($\geq 4,0$ mg/kg) | Procedimientos internos PNT-C-14-T PNT-C-15-T |



El presente anexo técnico está sujeto a posibles modificaciones. La vigencia de la acreditación puede confirmarse en la web de ENAC (<http://www.enac.es>)

9

UNIDAD DE BIOTOXINAS

Análisis mediante métodos basados en técnicas de cromatografía líquida

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|--|---|-------------------------------------|
| Moluscos bivalvos y otros productos procedentes de la pesca, marisqueo y acuicultura | Ácido domóico (ASP) por cromatografía líquida con detector de series de diodos (LC-DAD) ($\geq 2 \text{ mg ácido domoico/kg}$) | Procedimiento interno PNT-B-01-T |
| | Biotoxinas marinas lipofílicas mediante cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas (CL-MS/MS) | Procedimiento interno PNT-B-13-T |
| | Equivalentes Acido Ocadaico (AO) total (AO, DTX1, DTX2, DTX3) ($\geq 40 \mu\text{g AO equiv./kg}$)* | |
| | Equivalentes Pectenotoxina (PTX) (PTX1, PTX2) ($\geq 40 \mu\text{g PTX equiv./kg}$)* | |
| | Equivalentes Azaspirácido (AZA) (AZA1, AZA2, AZA3) ($\geq 40 \mu\text{g AZA equiv./kg}$)* | |
| Equivalentes Yesotoxina (YTX) (YTX, 45-OH YTX, HOMO-YTX, 45-OH HOMO-YTX) ($\geq 60 \mu\text{g YTX equiv./kg}$)* | | |

(*) Cálculo de los Equivalentes tóxicos según Factores Tóxicos Equivalentes (TEF) indicados en *Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. The EFSA Journal (2009) 1306, 1-23*

Análisis mediante métodos basados en técnicas de bioensayo con ratón

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|--|---|-------------------------------------|
| Moluscos bivalvos y otros productos procedentes de la pesca, marisqueo y acuicultura | Toxinas lipofílicas por bioensayo en ratón | Procedimiento interno PNT-B-03-T |
| | Toxinas paralizantes PSP por bioensayo en ratón | Procedimiento interno PNT-B-02-T |



UNIDAD DE PATOLOGÍA

Análisis mediante métodos basados en técnicas de histopatología

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| Ostra plana | Diagnóstico de <i>Bonamia spp.</i> mediante el análisis de preparaciones histológicas | Procedimiento interno: PNT-H-01-T |
| Moluscos bivalvos | Diagnóstico de <i>Marteilla spp.</i> mediante el análisis de preparaciones histológicas | Procedimiento interno: PNT-H-02-T |
| | Diagnóstico de <i>Perkinsus spp.</i> mediante el análisis de preparaciones histológicas | Procedimiento interno: PNT-H-03-T |

UNIDAD DE HIDROCARBUROS

Análisis mediante métodos basados en técnicas de cromatografía líquida

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|---|---|---------------------------------------|
| Moluscos bivalvos | Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por cromatografía líquida con detector de fluorescencia (LC-FLD) | Procedimiento interno: PNT-CH-04-T |
| | Criseno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Benzo[g,h,i]perileno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Benzo[a]antraceno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Benzo[b]fluoranteno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Benzo[k]fluoranteno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Benzo[a]pireno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Dibenzo[a,h]antraceno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| Indeno[1,2,3-cd]pireno ($\geq 0,9 \mu\text{g}/\text{kg}$) | | |



UNIDAD DE BIOGEOQUÍMICA MARINA

Análisis mediante métodos basados en técnicas espectroscopia molecular

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Aguas continentales Aguas marinas | Carbono orgánico disuelto (COD) y nitrógeno disuelto total (NDT) por espectrometría infrarroja (COD) y detección por quimioluminiscencia (NDT) COD $(\geq 45 \mu\text{mol/l})$ NDT $(\geq 5 \mu\text{mol/l})$ | Procedimiento interno PNT-BQ-01-T |
| | Nutrientes inorgánicos y Fósforo total por análisis en flujo continuo segmentado (SFA) y colorimetría Amonio $(\geq 0,25 \mu\text{mol/l})$ Fosfato $(\geq 0,05 \mu\text{mol/l})$ Nitrato+Nitrito $(\geq 0,07 \mu\text{mol/l})$ Nitrito $(\geq 0,05 \mu\text{mol/l})$ Silicato $(\geq 0,18 \mu\text{mol/l})$ Fósforo Total $(\geq 0,13 \mu\text{mol/l})$ | Procedimiento interno PNT-BQ-05-T |

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA Y VIROLOGÍA

Análisis de alimentos mediante métodos basados en técnicas de aislamiento en medio de cultivo

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| Moluscos bivalvos | Recuento de <i>Escherichia coli</i> β -glucuronidasa positiva (NMP) | Procedimiento interno PNT-M-58-T |
| | Enumeración de <i>Escherichia coli</i> por la técnica de la impedancia | Procedimiento interno PNT-M-60-T |

Análisis mediante métodos basados en técnicas de inmunofluorescencia (ELFA)

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| Moluscos bivalvos | Investigación de <i>Salmonella spp.</i> por inmunofluorescencia (ELFA) | Procedimiento interno PNT-M-50-T |



UNIDAD DE ORGANOCORADOS

Análisis mediante métodos basados en técnicas de cromatografía de gases

| PRODUCTO/MATERIAL A ENSAYAR | ENSAYO | NORMA/PROCEDIMIENTO DE ENSAYO |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| Mejillones | Policlorobifenilos (PCB's) por cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD) y espectrometría de masas (MS/MS) | Procedimiento interno PNT-CO-03-T |
| | PCB 28 ($\geq 0,30 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 118 ($\geq 0,60 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 31 ($\geq 0,20 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 138 ($\geq 0,84 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 52 ($\geq 0,78 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 153 ($\geq 0,98 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 101 ($\geq 0,70 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 180 ($\geq 0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$) PCB 105 ($\geq 0,20 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |
| | Pesticidas organoclorados por cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD) y espectrometría de masas (MS/MS) | Procedimiento interno PNT-CO-04-T |
| | pp'-DDD ($\geq 0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$) Dieldrin ($\geq 1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$) pp'-DDT ($\geq 0,26 \mu\text{g}/\text{kg}$) Hexaclorobenceno ($\geq 2,0 \mu\text{g}/\text{kg}$) op'-DDT ($\geq 0,49 \mu\text{g}/\text{kg}$) Lindano ($\geq 0,30 \mu\text{g}/\text{kg}$) pp'-DDE ($\geq 1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$) Transnonaol ($\geq 0,25 \mu\text{g}/\text{kg}$) | |

Esta revisión corrige las erratas detectadas en la revisión nº 12 de fecha 01/02/13



ANEXO 2

Lista de análisis que realiza INTECMAR y sus costos (en euros) 2013.

GUIA PARA LA AUTOLIQUIDACIÓN DE TASAS A FAVOR DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA 2013

Los aspectos financieros de los servicios prestados por Intecmar en el marco de su actividad e, vienen regulados en la Ley 6/2003, de 9 de diciembre, de tasas, precios y exenciones reguladoras de la Comunidad Autónoma de Galicia (DOG núm. 240 de 11/12/2003), y fueron actualizados posteriormente en la Ley 14/2010, de 27 de diciembre, de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para 2011 (DOG núm. 250 de 30/12/2010) y en la Ley 2/2013, de 27 de febrero de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para 2013 (DOG núm. 42, de 28/02/2013).

Existen dos maneras de liquidar las tasas correspondientes a los servicios prestados por Intecmar:

1. De forma manual: cubriendo el modelo A de autoliquidación que se descarga en la Web de la Consejería de Hacienda y que adjunto en pdf, y se lleva al banco para su pago:
<http://www.conselleriadefacenda.es/web/portal/confeccion-impresos>
2. De forma telemática: en la Web de la Consejería de Hacienda, vínculo <https://host.cixtec.es/XEITO/bin/lionwebXeito.dll/xmit>, a través del modelo 730.

Ambos modelos de liquidación de tasas, adjuntamos ejemplo al final de este documento, deben ser remitidos por mail a Intecmar, con el sello del banco físico o virtual, como paso previo a la emisión del certificado.

Los códigos generales necesarios son:

- Consejería de Medio Rural y de Mar; **Código: 09**
- Delegación de Pontevedra; **Código: 40**
- Servicio de Intecmar; **Código: 24**

Los códigos y descripción de las tasas, son los regulados en la legislación vigente, y los hemos resumido en los anexos siguientes.

Vilaxoán, 4 de marzo de 2013.

TARIFAS DE TASAS VIGENTES PARA 2013 - Ley 2/2013, de 27 de febrero de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para 2013 (DOG núm. 42, de 28/02/2013)

Estas tarifas son consecuencia de la actualización de las tarifas contenidas en los anexos 1, 2, 3, 4 y 5 de la Ley 6/2003, del 9 de diciembre, de tasas, precios y exacciones reguladoras de la Comunidad Autónoma de Galicia, por la Ley 2/2013, de 27 de febrero, de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para el 2013

Serán aplicables desde el día de la entrada en vigor de la Ley de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para el 2013

TASA POR SERVICIOS ADMINISTRATIVOS

No sujeción

No se exigirá la tasa por servicios administrativos cuando se trate de compulsas o cotejos de documentos que deban acompañar a solicitudes, escritos o comunicaciones presentadas por el ciudadano y realizadas en el ámbito de actuación de los registros según lo dispuesto en el artículo 38.5 de la Ley 30/1992, del 26 de noviembre, de régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común.

Excepciones.

Estarán exentos de la presente tasa:

- 1.- La expedición de certificados de retribuciones satisfechas por la Xunta de Galicia con el objeto de justificación en relación con el impuesto sobre la renta de las personas físicas.
- 2.- La expedición de certificados y compulsas que el personal de la Administración solicite respecto a las necesidades propias del puesto de trabajo o relación de servicios.
- 3.- Los alumnos por cualquier actuación en materia de enseñanzas no universitarias

4.- Las compulsas realizadas en las oficinas de empleo para los desempleados en la tramitación de expedientes que sean competencia de dichas oficinas.

5. La inscripción en las convocatorias para a selección de personal de la comunidad autónoma, después de justificación documental, solicitada por:

- Personas con discapacidad igual o superior al 33%.
- Personas que sean miembros de familias numerosas clasificadas en la categoría especial.

Se aplicará una bonificación del 50% a la inscripción solicitada por:

- Personas que sean miembros de familias numerosas de categoría general.

- Personas que figurasen como demandantes de empleo desde, por lo menos seis meses antes a la fecha de la convocatoria de pruebas selectivas de personal en las que soliciten su participación y no estén percibiendo prestación o subsidio por desempleo

6.- La expedición de certificados relativos a la situación fiscal.

7.- El Estado y los demás entes públicos territoriales o institucionales, siempre que los servicios o actividades de que sean beneficiarios se presten o se realicen en el marco del principio de colaboración entre administraciones.

8.- Las víctimas de actos terroristas así como sus cónyuges y sus hijos por cualquier actuación en materia educativa realizada en centros oficiales de estudios en todos los niveles de enseñanza.


9.- Los miembros de los organismos consultivos de la Administración pública gallega respecto de los certificados emitidos por dichos organismos.

| CÓDIGO TASAS | DESCRIPCIÓN | IMPORTE € |
|---------------------|---|----------------------|
| 31.44.00 | Prestación de servicios en el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia | |
| 31.44.01 | Análisis de biotoxinas marinas en moluscos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura: | |
| | -Análisis de toxinas lipofílicas por bioensayos en ratón según el método de Yasumoto 1978 | 47,52 |
| | -Análisis de toxinas lipofílicas por bioensayos en rato segundo o método de Yasumoto 1984 | 54,32 |
| | -Análisis de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS) | 95,20 |
| | -Análisis de toxicidad tipo PSP por bioensayos en ratón según el método de la AOAC: | 47,52 |




| | | |
|----------|---|--------|
| | -Análisis de toxicidad tipo ASP por cromatografía líquida de alta eficacia según el método da AOAC | 47,52 |
| | -Análisis combinado en una misma muestra de toxinas lipofílicas por bioensayos en ratón según el método Yasumoto 1978, análisis de toxicidad tipo PSP por bioensayos en ratón según el método de la AOAC y análisis de toxicidad tipo ASP por cromatografía líquida de alta eficacia, método de la AOAC: | 101,86 |
| | -Análisis combinado en una misma muestra de toxinas lipofílicas por bioensayos en ratón según el método Yasumoto 1984, análisis de toxicidad tipo PSP por bioensayos en ratón según el método de la AOAC y análisis de toxicidad tipo ASP por cromatografía líquida de alta eficacia, método de la AOAC: | 108,65 |
| | -Análisis combinada en una misma muestra de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS), análisis de toxicidad tipo PSP por bioensayos en ratón según el método AOAC y análisis de toxicidad de tipo ASP por cromatografía líquida de alta eficacia según el método de la AOAC: | 150,00 |
| 31.44.02 | Análisis de muestras en agua de mar: | |
| | -Identificación y recuento de fitoplancton marino mediante microscopía óptica | 151,33 |
| | -Identificación y recuento de fitoplancton tóxico marino mediante microscopía óptica | 133,33 |
| | - Análisis de carbono orgánico disuelto | 50,93 |
| | -Análisis de nutrientes inorgánicos disueltos | 35,00 |
| | -Análisis de pigmentos fotosintéticos (clorofila "a") por espectrofluorimetría | 16,98 |
| 31.44.03 | Análisis microbiológicos en moluscos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura: | |
| | - Cuantificación de <i>E. Coli</i> | 101,86 |
| | - Detección de <i>Salmonella spp.</i> | 169,75 |
| | -Enumeración de <i>Escherichia coli</i> en moluscos bivalvos vivos por la técnica de medida directa de impedancia con el sistema BacTrac 4300: | 68,00 |
| 31.44.04 | Análisis de contaminantes de origen química en moluscos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura: | |
| | - Determinación de metales pesados (Pb, Cd, Cu, Zn, As, Hg, Ni, Cr, Ag) mediante espectrofotometría de absorción atómica, por metal. | 67,90 |
| | -Determinación de compuestos bifenilos policlorados (PCB) mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. | 509,26 |

| | | |
|----------|--|----------|
| | -Determinación de pesticidas organoclorados mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas | 509,26 |
| | -Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) mediante cromatografía líquida con detección de fluorescencia | 282,00 |
| 31.44.05 | Análisis histopatológica de moluscos y otros organismos procedentes de la pesca, el marisqueo y la acuicultura: | |
| | - Estudio hispatológico. Determinación de Bonamia, Marteillia, Perkinsus y otras alteraciones patológicas | 1.018,52 |
| 31.44.06 | Emisión de certificaciones e informes técnicos y otras actuaciones a petición del interesado | |
| | Emisión de certificados a petición de los interesados, sobre las actuaciones llevadas a cabo por el Instituto | 10,00 |
| | Emisión de informes técnicos a petición del interesado (euros por hora o fracción) | 40,00 |

EXEMPLAR PARA O INTERESADO

|  XUNTA DE GALICIA <small>CONSELLERÍA DE FACENDA</small> | TAXAS da COMUNIDADE AUTÓNOMA DE GALICIA <small>Lei 6/2003, do 9 de decembro Decreto 61/2005, do 7 de abril</small> AUTOLIQUIDACIÓN | Modelo AI EUROS | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|----------------|--------------------|----------------------|---------|---|---|---|--|------|----|---|---|
| AI0300940 4 | | | | | | | | | | | | | | |
| códigos | Consellería de MEDIO RURAL E DO MAR Delegación de PONTEVEDRA Servizo de INTECMAR | Código: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">0</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">9</td></tr><tr><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">0</td></tr><tr><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">2</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td></tr></table> Código: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">3</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">1</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">0</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">1</td></tr></table> | 0 | 9 | 4 | 0 | 2 | 4 | 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 |
| 0 | 9 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 | | | | | | | | | |
| Taxa: denominación: ANÁLISES DE BIOTOXINAS MARIÑAS EN MOLUSCOS E OUTROS ORGANISMOS PROCEDENTES PESCA | | Código: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">3</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">1</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">4</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">0</td><td style="width: 20px; height: 20px; text-align: center;">1</td></tr></table> | 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 | | | | | | |
| 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 | | | | | | | | | |
| SUXEITO PASIVO | NIF <input type="text"/> APELIDOS E NOME OU RAZÓN SOCIAL <input type="text"/> MARE: <input type="text"/> | VIA PUBLICA <input type="text"/> NÚMERO <input type="text"/> ESCAL. <input type="text"/> PISO <input type="text"/> PORTA <input type="text"/> TELÉFONO <input type="text"/> CONCELLO <input type="text"/> PROVINCIA <input type="text"/> CÓDIGO POSTAL <input type="text"/> | | | | | | | | | | | | |
| LIQUIDACIÓN | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">BASE DE CALCULO OU BASE IM-POÑIBLE OU UNIDADES</th> <th style="width: 20%;">TIPO OU TARIFA</th> <th style="width: 40%;">IMPORTE A INGRESAR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>26 ANALISES AÑO 2012</td> <td>54,32 €</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: right;">TOTAL <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">1412</td><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">32</td></tr></table></td> </tr> </tbody> </table> | BASE DE CALCULO OU BASE IM-POÑIBLE OU UNIDADES | TIPO OU TARIFA | IMPORTE A INGRESAR | 26 ANALISES AÑO 2012 | 54,32 € | | | | TOTAL <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">1412</td><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">32</td></tr></table> | 1412 | 32 | | |
| BASE DE CALCULO OU BASE IM-POÑIBLE OU UNIDADES | TIPO OU TARIFA | IMPORTE A INGRESAR | | | | | | | | | | | | |
| 26 ANALISES AÑO 2012 | 54,32 € | | | | | | | | | | | | | |
| | | TOTAL <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">1412</td><td style="width: 40px; height: 20px; text-align: center;">32</td></tr></table> | 1412 | 32 | | | | | | | | | | |
| 1412 | 32 | | | | | | | | | | | | | |
| a de de 20..... Sinatura do declarante ou representante legal | | | | | | | | | | | | | | |
| Selo | Data | Número | | | | | | | | | | | | |
| IMPORTANTE: O ingreso deberá realizarse en calquera das sucursais das entidades financeiras colaboradoras na recadación. | | | | | | | | | | | | | | |

EXEMPLAR PARA A ADMINISTRACIÓN

| | | | | |
|---|--|---|----------------------|--------------|
|  XUNTA DE GALICIA CONSELLERÍA DE FACENDA  Avenca Tributaria de Galicia | | XUSTIFICANTE DE PAGO DE TAXAS, PREZOS, MULTAS E SANCIONS DA COMUNIDADE AUTÓNOMA DE GALICIA | | 730 |
| | | Nº Operación 730725110182 3 | Nº Taxa 725110182 | |
| Obrigado ó pago ou suxeito pasivo | | | | |
| NIF | | Nome ou Razón Social | | |
| Enderezo | | | | |
| Representante | | | | |
| NIF | | Nome ou Razón Social | | |
| Enderezo | | | | |
| Códigos | | | | |
| Consellería Medio Rural e do Mar | | | | 09 |
| Delegación Vilagarcía de Arousa | | | | 42 |
| Servizo Instituto Tecnolóxico para o control do Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) | | | | 024 |
| Taxa Análises de biotoxinas mariñas en moluscos e outros organismos procedentes da pesca, o marisqueo e a acuicultura | | | | 314401 |
| Datos do pago | | | | |
| | | | | |
| Total a ingresar | | | | 814,88 EUROS |
| Obxecto do pago | | | | |
| ANALITICA DSP,PSP Y ASP EN 8 MUESTRAS DE MOLUSCO | | | | |
| | | | | |
| Normativa aplicable | | | | |
| | | | | |
| Ingreso | | | | |
| Entidade: | | | | |
| Data ingreso: | | NRC: | | |
| Selo | | | | |
| A veracidade do contido deste documento pódese comprobar na dirección www.conselleriadefacenda.es (Oficina Virtual Tributaria). | | | | |
| Código seguro de verificación: | |  | | |
| 1AA6 BA9B A19A 2139 | | | | |

Exemplar para a Administración

ANEXO 3

Resultados de análisis en muestras de microalgas, anteriormente enviadas procedentes de Magallanes, por el equipo de espectrometría de masas utilizado por INTECMAR. Trabajo presentado a las XXXII Congreso de Ciencias del Mar realizado en Punta Arenas, 22-25 octubre de 2012.

PERFIL DE TOXINAS DE *PROROCENTRUM LIMA* (DINOPHYCEAE) AISLADO DESDE LA COSTA DE MAGALLANES, SUR DE CHILE

P. Salgado¹, G. Pizarro¹, J.M. Franco², P. Riobó² e I. Bravo³

¹Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Punta Arenas, Chile. gemita.pizarro@ifop.cl

²Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), Vigo, España

³Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), Vigo, España

Prorocentrum lima (Ehrenberg) es un dinoflagelado marino bentónico que se encuentra adherido, generalmente, sobre macroalgas, sedimentos y detrito flotante, y menos comúnmente en el plancton (Bravo et al., 2001). Es una especie nerítica y estuarina, y su rango de distribución geográfica varía desde aguas costeras tropicales a templadas (Faust, 1991). La importancia de *P. lima* se debe a que son productoras de toxinas diarreogénicas en las personas (veneno diarreico de los mariscos, VDM) al igual que algunas especies de *Dinophysis*, aunque raramente se le han asociado con episodios tóxicos por VDM por su carácter epífita y bentónico. El complejo VDM producido por *P. lima* incluye moléculas conocidas como el ácido okadaico (AO) y derivados, dinofisistoxinas (DTX-1, DTX-2) (Bravo et al., 2001, Vale et al., 2009). No obstante, existen casos citados para USA donde se detectó toxicidad por VDM en bivalvos de cultivos asociadas a *P. lima*, aunque en bajos niveles (Maranda et al., 2007a). En Canadá también se llevó a cabo un estudio en moluscos de cultivo cuya finalidad fue determinar el origen del VDM, en la que *P. lima* fue la principal especie sospechosa tras la ocurrencia de un evento tóxico humano por VDM ocurrido en 1998 (Levasseur et al., 2003) y en años anteriores (Quilliam et al., 1993). Aunque Levasseur et al., (2003) no logró probar la toxicidad de los mariscos en cultivo a causa de *P. lima*, cabe hacer notar que lo que buscaron fue OA y DTX1, no DTX 3, este último principal derivado de las anteriores tras su transformación en los moluscos (e.g. Suzuki et al., 1999, Vale & Sampayo, 2002).

En consecuencia, el rol de *P. lima* en eventos tóxicos por VDM aún no puede descartarse, por cuanto podrían llegar a ser importantes en ambientes turbulentos debido a la eventual remoción de microalgas adheridas en sustratos por efecto de vientos (Levasseur et al., 2003), factor de importancia si se trata de sedimentos, o contrariamente, en zonas someras y estables de cultivos de moluscos, que al mismo tiempo favorecen microambientes para sustratos en los que prolifera la epífita *P. lima* (Lawrence et al., 2000) quedando expuestas a re-suspensiones temporales que favorecen la filtración de estas microalgas por los bivalvos en cultivo (Maranda et al., 2007a).

Chile posee escaso conocimiento sobre esta especie en su medio natural incluido su perfil de toxinas y potencial rol en la toxicación de moluscos por VDM. Por tal razón, resultó interesante aportar al conocimiento de estos aspectos en muestras de sedimentos recolectadas en el estrecho de Magallanes en las que esta especie se encontró inhabitualmente abundante.

Las células utilizadas en este estudio fueron aisladas desde sedimentos superficiales (0-3 cm) recolectados en el invierno de 2010 en la localidad de cabo San Isidro, durante el muestreo regular del programa de monitoreo de marea roja en la región de Magallanes. En esa oportunidad se logró cuantificar hasta 1002 quistes tecados/cm³ de *Prorocentrum lima*, la mayor concentración respecto a otros sitios de recolecta (Fig. 1). Los sedimentos de esta localidad presentaron una coloración oscura y un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno (H₂S) producto de anoxia local.

Se aislaron entre 27 y 87 quistes tecados (Fig. 1, a) directamente desde los sedimentos, mientras otras 60 células vegetativas (Fig. 1, b) fueron aisladas luego de promover la actividad y división de los quistes en condiciones de 15 °C y un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas (Tabla 1). Para este fin, se aislaron quistes tecados y trasvasijaron a placas Petri de 5 cm de diámetro conteniendo 5 mL de medio de cultivo L1. Para el análisis de toxinas, las células aisladas fueron trasvasijadas a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y congelados a -80 °C. Una alícuota de sedimento húmedo (100 µL aproximados) también fue vaciada en un tubo Eppendorf y congelado. Para extraer la toxina, se añadió 500 µL de metanol 100% a cada tubo, se mezcló por 1 min y filtró por 0.45 µm trasvasijando a un vial. El extracto fue secado bajo nitrógeno gas a 40 °C y conservado a 4 °C hasta su análisis. Previo al análisis de toxinas, los extractos fueron resuspendidos en 150 µl de metanol.

La presencia de la toxina dinofisistoxina 1 (DTX-1) en las muestras (Fig.2) fue confirmada en modo negativo, a través de su ión precursor [M-H]⁻ m/z 817.5 y sus iones productos m/z 563.4 y 255.2, mediante un cromatógrafo UPLC Acquity Waters acoplado a un triple cuadrupolo Waters Xevo TQ (LC-MS). La columna utilizada fue una Acquity UPLC BEH C18 1.7µm 2.1 x 100 mm, a 45 °C. La fase móvil consistió en (A) hidróxido amónico a pH 11 y (B) hidróxido amónico en acetonitrilo (6.7 mM), con una tasa de flujo de 4 mL/min. El gradiente de elución utilizado fue el siguiente: mantención al 75% de A entre 0 y 0.66 min; cambio a 5% de A entre 0.66 y 3.30 min; mantener 5%

de A entre 3.30 y 5.28 min; recuperación del 75% de A entre 5.28 y 7.26 min; mantención al 75 % de A hasta 9 min. Se pinchó 5µL de muestra en el LC-MS. El contenido de DTX-1 en las muestras fue cuantificado en base al ion precursor.

Los tres tipos de muestras fueron positivas a la presencia de DTX-1, pero las células vegetativas fueron las que presentaron un mayor contenido de DTX-1 por célula. La detección de DTX-1 en los sedimentos (Tabla 2) reflejó la presencia de los quistes tecados en éstos.

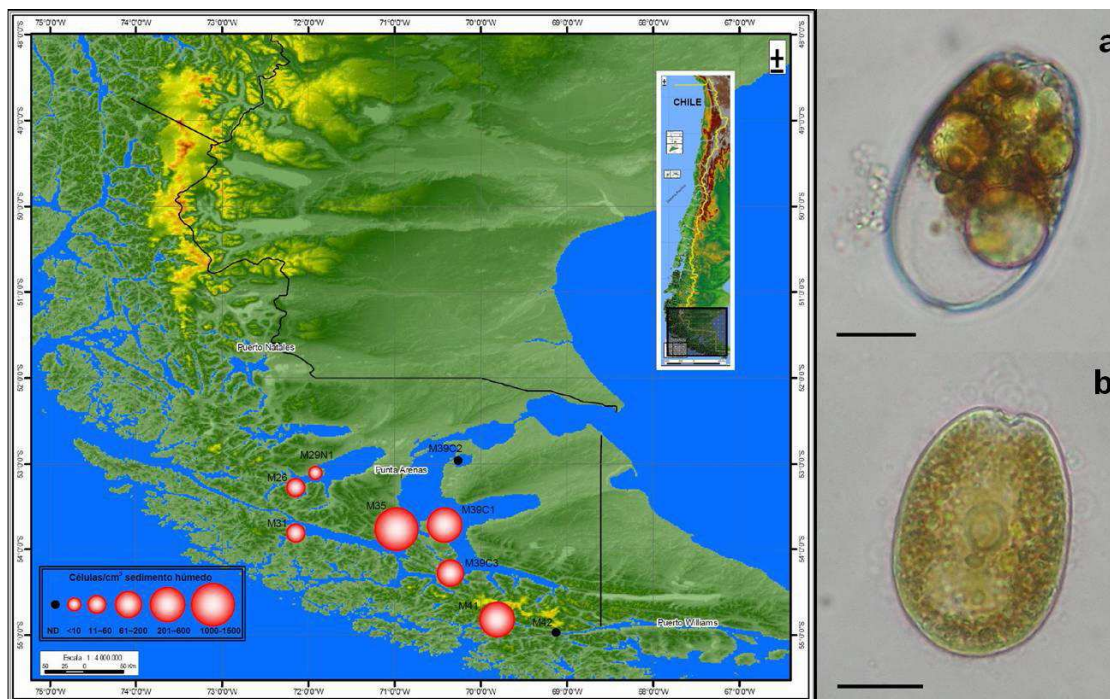


Figura 1. Concentraciones de quistes tecados de *Prorocentrum lima* (quistes/cm³ de sedimento húmedo) en estaciones de muestreo en el Estrecho de Magallanes (M26, Estero Wickham; M29N1, Isla Engenfield; M31, Bahía Nash; M35, Cabo San Isidro; M39C1, Bahía Gente Grande; M39C2, Bahía Inútil; M39C3, Canal Gabriel) y Canal Beagle (M41, Ventisquero España; M42, Ventisquero Holanda). (a) Quistes tecados, (b) células vegetativas obtenidas de germinación de quistes tecados bajo condiciones de laboratorio. Barra de escala: 20 µm.

Tabla 1. Sedimento y células de *Prorocentrum lima* aisladas para análisis de toxinas.

| Extracto metanólico | Nº de células | TR | ng/mL | pg DTX-1 / cél |
|------------------------|---------------|------|-------|-----------------|
| G1 quistes tecados | 27 | 2.13 | <2 | - |
| G2 quistes tecados | 67 | 2.14 | 0.5 | 1.1 |
| G3 quistes tecados | 87 | 2.15 | 1.2 | 2.1 |
| G4 células vegetativas | 60 | 2.15 | 3.4 | 8.7 |
| G6 sedimentos | alícuota | 2.13 | 1.3 | 1.9 pg /µL sed. |

TR: tiempo de retención.

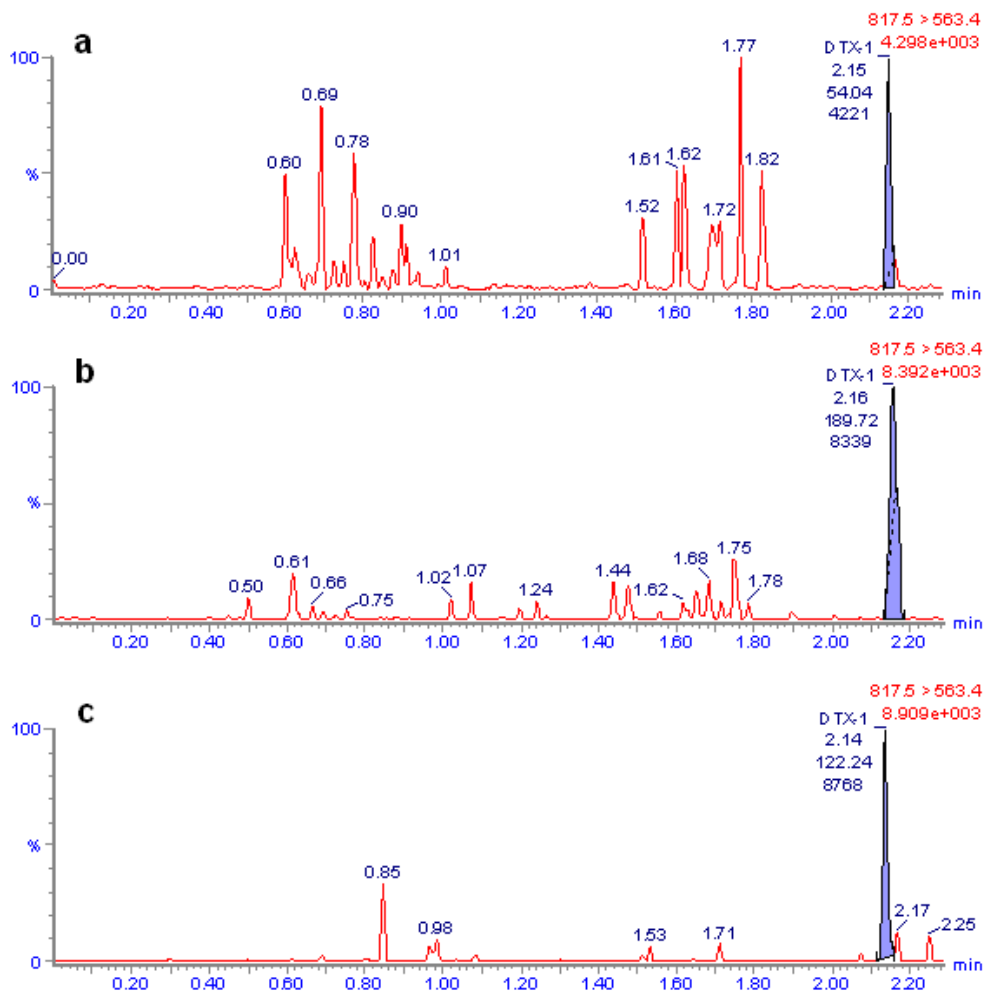


Figura 2. Cromatogramas de extractos metanólicos de *Prorocentrum lima*: quistes tecados (a), células vegetativas (b) y sedimentos (c).

Tabla 2. Características del sedimento con quistes tecados de *Prorocentrum lima*

| Tipo | Tamaño (mm) | % |
|----------------|---------------|----|
| Grava | 2 | 35 |
| Arena media | 0.25 - 0.5 | 32 |
| Arena muy fina | 0.063 - 0.125 | 2 |
| Limo-arcilla | < 0.063 | 1 |

Estos resultados constituyen otra eventual posibilidad de toxicidad en los moluscos por VDM, no sólo de aquellos con modalidad de vida bentónica superficial sino de aquellos que también viven enterrados en la arena (e.g. almeja, huevo). Más aún si se conoce que *P. lima* posee la capacidad de desarrollar poblaciones naturales en aguas templadas en números que podrían justificar una toxicidad por VDM en los mariscos (e.g. Maranda et al. 2007a, b).

Referencias

- Bravo, I., M.L. Fernández, I. Ramilo & A. Martínez. 2001. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). *Toxicon* 39: 1537–1545
- Faust, M.A.. 1991. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.* 27: 642-648
- Lawrence, J. E., Grant, J., Quilliam, M. A., Bauder, A. G. & Cembella, A. D. 2000. Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 147-154.
- Levasseur, M., Couture, J. Y., Weise, A. M., Michaud, S., Elbrachter, M., Sauv e, G. & Bonneau, E. 2003. Pelagic and epiphytic summer distributions of *Prorocentrum lima* and *P. mexicanum* at two mussel farms in the Gulf of St. Lawrence. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 30:283-293.
- Maranda, L., Corwin, S., Dover, S. & Morton, S. L. 2007a. *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in northeastern USA coastal waters: II. Toxin load in the epibiota and in shellfish. *Harmful Algae* 6: 632-641.
- Maranda, L., Corwin, S., Hargraves, P. E., 2007b. *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in 19 northeastern USA coastal waters: I. Abundance and distribution. *Harmful Algae* 6: 623–631
- Quilliam, M.A., Gilgan, M.W., & Pleasance, S. 1993. Confirmation of an incident of diarrhetic shellfish poisoning in eastern Canada. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, New York, pp. 547–552
- Suzuki, T., Ota, H. & Yamasaki, M. 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acetyl-dinophysistoxin-1 (Dinophysis-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.
- Vale, P. & Sampayo, M. A. 2002. First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton. *Toxicon* 40:989-996.
- Vale P., Veloso V. & Amorim A. 2009, Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 54:145–152.

Agradecimientos: Intecmar de la Xunta de Galicia, España, donde se realizaron los análisis de toxinas; proyecto SUBPESCA “Manejo y Monitoreo de Mareas Rojas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, IV etapa, 2010”.

ANEXO 4

Contrato de ensayo propuesto por IFOP y
aceptado por INTECMAR para facturación.

CONTRATO DE ENSAYO

Datos del solicitante:

Nombre ó Razón Social: *INSTITUTO de Fomento Pesquero*
 Dirección: *BLANCO 839, VALPARAÍSO, CHILE*
 Persona de Contacto: *GERITA PIZARRO*
 C.I.F. ó N.I.F: *61.310.000-8*
 Telf.: *56-32-2151500* Fax: *56-32-2151500* E-mail: *Gerita.Pizarro@IFOP.cl*

Condiciones del Servicio

| Tipo de Muestra / Especie | Ensayos solicitados | Procedimiento de Ensayo |
|---------------------------|--|--|
| Moluscos | Determinación de toxinas lipofílicas en moluscos | PNT-B-13-T: Análisis de toxinas lipofílicas: AO, DTX2, DTX1, AZA1, AZA2, AZA3, PTX2, PTX1, YTX, homoYTX, 45OH-YTX y 45OH-homoYTX mediante LC-MS/MS |




Frecuencia de los Ensayos: *1* Condiciones del Muestreo: *EN BANCOS NATURALES*

Envío de las muestras: *JUNIO 2013*

Coste de los Servicios: *Según Ley 2/2013 de la C.A de Galicia*

Duración del contrato: *1 año*

OBSERVACIONES: *Extractos metanólicos en seco de: 29 muestras de moluscos y 29 muestras de microalgas.*

| | | |
|--|---|---|
|  Elaborado por: <i>[Signature]</i> Jefe/a de Unidad Fecha: <i>08/03/2013</i> |  Aceptado por: <i>[Signature]</i> Solicitante Fecha: <i>29/5/2013</i> |  Aprobado por: <i>[Signature]</i> Director/a del INTECMAR Fecha: <i>31/05/2013</i> |
|--|---|---|

El INTECMAR está acreditado por ENAC. Nº de acreditación: 160/LE/394.
 El INTECMAR dispone de los recursos y medios suficientes para la realización de los ensayos solicitados.

ANEXO 5

Costos del análisis de 58 muestras enviadas a INTECMAR,
procedentes de Magallanes.



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE FACENDA

TASAS de la COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA

Ley 6/2003, del 9 de diciembre
Decreto 61/2005, del 7 de abril

AUTOLIQUIDACIÓN

Modelo

AI

EUROS

AI0337397 3

CÓDIGOS

Consellería de MEDIO RURAL E DO MAR

Código:

0 9

Delegación de PONTEVEDRA

Código:

4 0

Servicio de INTECMAR

Código:

2 4

Tasa: denominación: ANALISIS DE BIOTOXINAS MARINAS EN MOLUSCOS_
TOXINAS LIPOFÍLICAS LC-MS/MS

Código:

3 1 4 4 0 1

SUJETO PASIVO

NIF

APELLIDOS Y NOMBRE O RAZÓN SOCIAL

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

VÍA PÚBLICA

NÚMERO

ESCAL.

PISO

PUERTA

TELÉFONO

BLANCO 839, VALPARAISO; CHILE

AYUNTAMIENTO

PROVINCIA

CÓDIGO POSTAL

LIQUIDACIÓN

BASE DE CALCULO O BASE IMPONIBLE O UNIDADES

TIPO O TARIFA

IMPORTE A INGRESAR

58 análisis de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS)

95,20 euros



TOTAL

5521 60

..... a de de 20

Firma del declarante o representante legal

Sello

Fecha

Número

IMPORTANTE: El ingreso deberá realizarse en cualquiera de las sucursales de las entidades financieras colaboradoras en la recaudación.

EJEMPLAR PARA EL INTERESADO



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE FACENDA

TASAS de la COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA

Ley 6/2003, del 9 de diciembre
Decreto 61/2005, del 7 de abril

AUTOLIQUIDACIÓN

Modelo

AI

EUROS

AI0337397 3

CÓDIGOS

Consellería de MEDIO RURAL E DO MAR

Código:

| | |
|---|---|
| 0 | 9 |
|---|---|

Delegación de PONTEVEDRA

Código:

| | |
|---|---|
| 4 | 0 |
|---|---|

Servicio de INTECMAR

Código:

| | |
|---|---|
| 2 | 4 |
|---|---|

Tasa: denominación: ANALISIS DE BIOTOXINAS MARINAS EN MOLUSCOS_
TOXINAS LIPOFÍLICAS LC-MS/MS

Código:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|

SUJETO PASIVO

| | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------|------|---------------|----------|--|
| NIF | APELLIDOS Y NOMBRE O RAZÓN SOCIAL | | | | | |
| | INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO | | | | | |
| VÍA PÚBLICA | NÚMERO | ESCAL. | PISO | PUERTA | TELÉFONO | |
| BLANCO 839, VALPARAISO; CHILE | | | | | | |
| AYUNTAMIENTO | PROVINCIA | | | CÓDIGO POSTAL | | |
| | | | | | | |

LIQUIDACIÓN

| BASE DE CALCULO O BASE IMPONIBLE O UNIDADES | TIPO O TARIFA | IMPORTE A INGRESAR |
|--|---------------|--------------------|
| 58 análisis de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS) | 95,20 euros | |
| | | TOTAL |
| | | 5521 60 |

..... a de de 20.....

Firma del declarante o representante legal

Sello

Fecha

Número

IMPORTANTE: El ingreso deberá realizarse en cualquiera de las sucursales de las entidades financieras colaboradoras en la recaudación.



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE FACENDA

TASAS de la COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA

Ley 6/2003, del 9 de diciembre
Decreto 61/2005, del 7 de abril

AUTOLIQUIDACIÓN

Modelo

AI

EUROS

AI0337397 3

CÓDIGOS

Consellería de MEDIO RURAL E DO MAR

Código:

0 9

Delegación de PONTEVEDRA

Código:

4 0

Servicio de INTECMAR

Código:

2 4

Tasa: denominación: ANALISIS DE BIOTOXINAS MARINAS EN MOLUSCOS_
TOXINAS LIPOFÍLICAS LC-MS/MS

Código:

3 1 4 4 0 1

SUJETO PASIVO

NIF

APELLIDOS Y NOMBRE O RAZÓN SOCIAL

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

VÍA PÚBLICA

NÚMERO

ESCAL.

PISO

PUERTA

TELÉFONO

BLANCO 839, VALPARAISO; CHILE

AYUNTAMIENTO

PROVINCIA

CÓDIGO POSTAL

LIQUIDACIÓN

BASE DE CÁLCULO O BASE IMPONIBLE O UNIDADES

TIPO O TARIFA

IMPORTE A INGRESAR

58 análisis de toxinas lipofílicas por cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas (LC-MS/MS)

95,20 euros

TOTAL

5521 60

..... a de de 20

Firma del declarante o representante legal

Sello

Fecha

Número

IMPORTANTE: El ingreso deberá realizarse en cualquiera de las sucursales de las entidades financieras colaboradoras en la recaudación.

EJEMPLAR PARA LA ADMINISTRACIÓN

ANEXO 6

Resolución n° 2614 de 17 julio 2012 emitido
por la SEREMI Salud Magallanes para cierre
de área para la extracción de caracol piquilhue.



DEPARTAMENTO ACCIÓN SANITARIA
DRA.MIIL / CGM / SPV / PSR
Nº 66

[Handwritten signature]

PROHIBE LA EXTRACCIÓN DE CARACOL PIQUILHUE EN SECTORES DEL ESTRECHO DE MAGALLANES Y MODIFICA RESOLUCIÓN EXENTA Nº 166/2005 DE ESTA SEREMI DE SALUD.-

RESOLUCIÓN EXENTA Nº 2614

PUNTA ARENAS, 17 JUL 2012

VISTOS: Estos antecedentes: Informes de Laboratorio de Salud Pública de Punta Arenas Nº 765-1 de fecha 11.07.2012, informe Nº 756 de fecha 11.07.2012, informe Nº 538 de fecha 18.05.2012, Informe de Resultados Nº 37024 de fecha 15.05.2012 del Centro Regional de Análisis de Recursos y Medio Ambiente – CERAM, Informe de Ensayo Nº 27638-2012-41811 de fecha 22.06.2012, del Instituto de Salud Pública (ISP); la Resolución Nº 166 del 24 de Marzo de 2005, que refunde las Resoluciones anteriores sobre Marea Roja en la Región de Magallanes y Antártica Chilena; y demás antecedentes que obran en poder de esta SEREMI de Salud, que señalan un aumento de los niveles de Veneno Diarreico de los Moluscos (VDM) detectado en sectores de la Región en Caracol Piquilhue; y

CONSIDERANDO:

1º Que, los resultados obtenidos en los análisis toxicológicos de la especie Caracol Piquilhue han dado como resultado positivos a Veneno Diarreico de los Moluscos (VDM), siendo esto confirmado por el Instituto de Salud Pública (ISP).

2º Que esta SEREMI de Salud debe velar por la salud de la población y de acuerdo a la opinión técnica del Departamento de Acción Sanitaria de esta SEREMI de Salud, corresponde prohibir la extracción de Caracol Piquilhue, en los sectores denominados Bahía Gente Grande, Santa María, Puerto Yartou en Isla Tierra del Fuego y Punta Arenosa en el Estrecho de Magallanes Continental.

TENIENDO PRESENTE: lo dispuesto en el Código Sanitario; en los artículos 101 letra a), 102 y 333 del Reglamento Sanitario de los Alimentos, Decreto 977/96 del Ministerio de Salud; en la Ley 19.880; y las facultades que me otorga el DFL Nº 1, de 2005, del Ministerio de Salud; la Resolución Exenta Nº 1.600/2008 de la Contraloría General de la República; D.S. Nº 136/2004 que establece el Reglamento Orgánico del Ministerio de Salud; y Decreto de Nombramiento Nº 38 del 18 de Marzo de 2010 del Ministerio de Salud, dicto la siguiente:



DEPARTAMENTO ACCIÓN SANITARIA
DRA.MIIL / CGM / SPV / PSR
Nº 66

RESOLUCIÓN

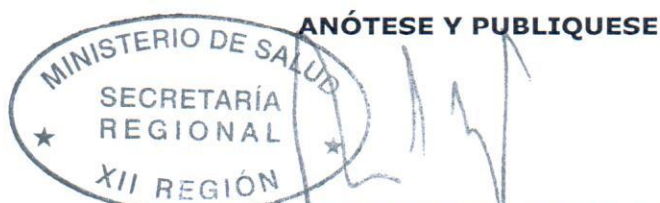
1.- MODIFICASE, la Resolución Exenta Nº 166 de fecha 24 de Marzo de 2005 de esta SEREMI de Salud, en su punto Nº 6, en el sentido de que se **PROHIBE** la **extracción, transporte, procesamiento, tenencia, comercialización, distribución, venta y consumo**, del recurso del mar susceptible de presentar toxina marea roja: **CARACOL PIQUILHUE** (*Adelomelon ancilla*), en los sectores denominados: **Bahía Gente Grande**, fijando como límite una línea imaginaria desde Punta Zegers a Punta Paulo; **Santa María**, fijando como límite norte Cabo Monmouth y como límite sur Cabo Boqueron; **Puerto Yartou**, fijando límite norte Cabo Nose y como límite sur Punta Carukinca, a través de toda la extensión del canal Whiteside, en la Isla de Tierra del Fuego; y sector de **Punta Arenosa**, fijando como límite norte desembocadura de Río Chabunco y como límite sur Agua Fresca, en el estrecho de Magallanes Continental.

2.- TÉNGASE PRESENTE, que en virtud de lo establecido en la Resolución Nº 166 de fecha 24 de Marzo de 2005, de esta Autoridad Sanitaria, **todo** producto extraído en las Zonas Autorizadas, previo a su proceso, venta, distribución y consumo, debe ser analizado por los Laboratorios de Salud Pública de esta SEREMI de Salud, a fin de determinar su aptitud para el consumo y prever cualquier aumento de los niveles de toxicidad.

3.- RIJA la presente Resolución a partir de esta fecha y manténgase plenamente en lo no modificado por este acto de la Resolución Exenta Nº 166 de fecha 24 de Marzo de 2005.

4.- DÉJESE ESTABLECIDO que la SEREMI de Salud realizará monitoreo permanente los sectores en cuestión, lo que implica toma de muestra y análisis de esta para controlar lo niveles de toxina que presente en área.

5.- TRANSCRÍBASE, la presente Resolución a todos los medios de comunicación de la Región para una amplia difusión y publíquese un extracto de ella en el Diario Oficial.



DRA. MARIA ISABEL IDUYA LANDA
SECRETARIA REGIONAL MINISTERIAL DE SALUD
MAGALLANES Y ANTÁRTICA CHILENA

DISTRIBUCION

- MINISTERIO DE SALUD
- INTENDENCIA REGION DE MAGALLANES
- Gobernación Provincial de Magallanes.
- Gobernación Provincial de U. Esperanza.



DEPARTAMENTO ACCIÓN SANITARIA
DRA.MIIL / CGM / SPV / PSR
Nº 66

- Gobernación Provincial de Tierra del Fuego.
- Gobernación Provincial Antártica.
- Prefectura de Carabineros.
- SEREMI Salud X - Región.
- SEREMI Salud XI - Región.
- SEREMI Salud XII - Región.
- Gobernación Marítima Punta Arenas.
- Gobernación Marítima Puerto Williams.
- Capitanía de Puerto de Punta Arenas.
- Capitanía de Puerto de Puerto Natales.
- Sernapesca XII - Región.
- IFOP. XII - Región.
- COMITE MAREA ROJA, XII - Región.
- Plantas Procesadoras de Productos del Mar.
- Asociación de Pescadores Artesanales.
- Pescaderías.
- TODOS LOS MEDIOS DE COMUNICACION.
- Oficina Provincial Natales
- Oficina Provincial Porvenir
- Asesoría Jurídica
- Archivo DAS
- Of. de Partes.



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Sección Ediciones y Producción
Almte. Manuel Blanco Encalada 839
Fono 56-32-2151500
Valparaíso, Chile
www.ifop.cl



www.ifop.cl