



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Análogos de la palitoxina generados por la microalga *Ostreopsis* cf. *ovata*: perspectiva analítica y biológica

Noemí-Inmaculada Medina Pérez



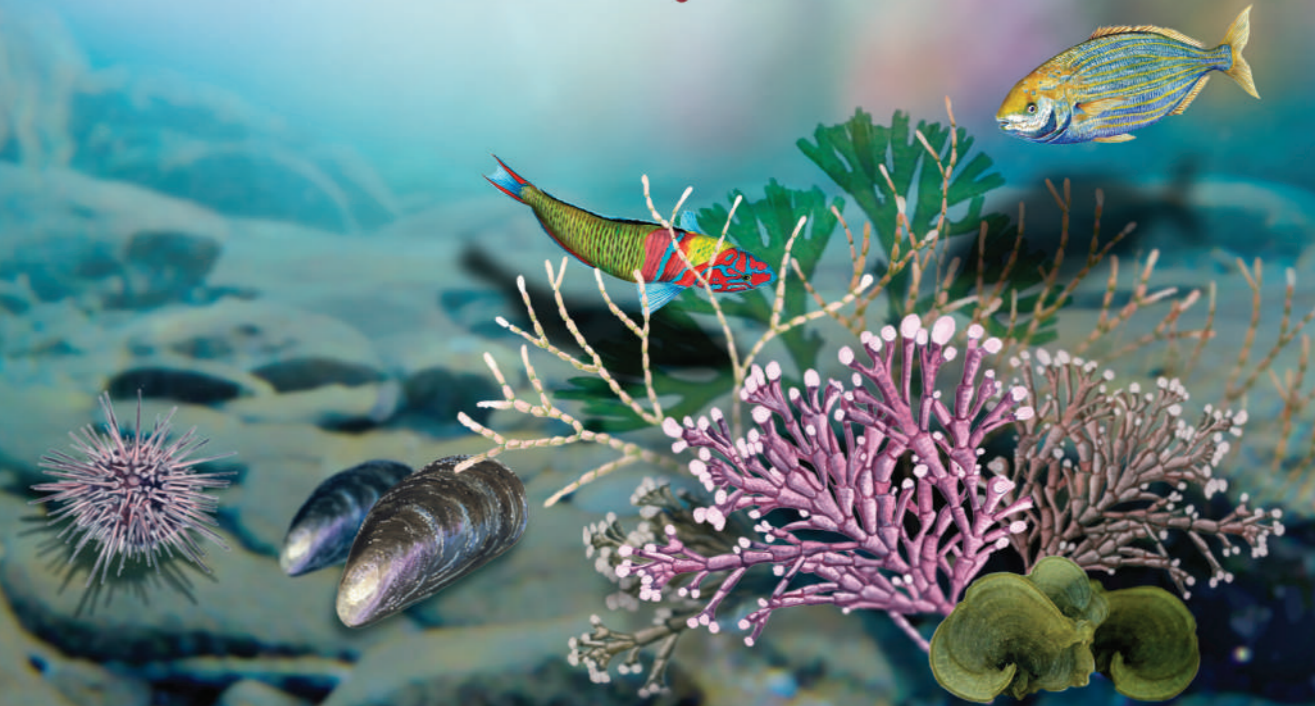
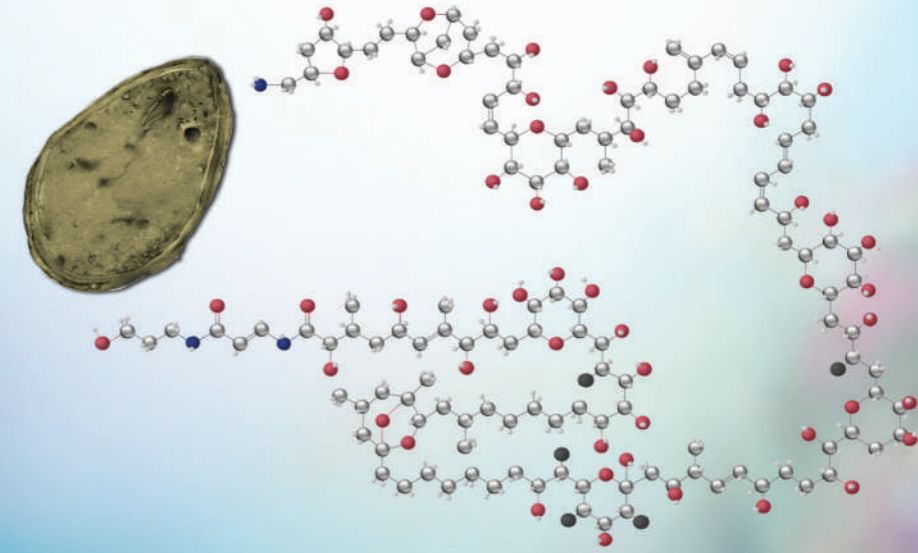
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

Análogos de la palitoxina generados por la microalga *Ostreopsis cf. ovata*: perspectiva analítica y biológica

Noemí-Inmaculada Medina Pérez





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Programa de doctorado

“Química Analítica y Medio Ambiente”

**Análogos de la palitoxina generados
por la microalga *Ostreopsis cf. ovata*:
perspectiva analítica y biológica**

Memoria presentada por

Noemí-Inmaculada Medina Pérez

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Directoras:

Dra. Encarnación Moyano Morcillo

Catedrática

Dep. Ingeniería Química y Química Analítica

Universidad de Barcelona

Dra. Elisa Berdalet Andrés

Investigadora científica

Departamento de Biología y Oceanografía

ICM-CSIC

Tutora académica:

Dra. Encarnación Moyano Morcillo

Catedrática

Dep. Ingeniería Química y Química Analítica

Universidad de Barcelona

La **Dra. Encarnación Moyano Morcillo**, catedrática del Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Universidad de Barcelona, y la **Dra. Elisa Berdalet Andrés**, investigadora científica del Instituto de Ciencias del Mar del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR,

Que la presente memoria presentada para optar al título de Doctora, titulada: “**Análogos de la palitoxina generados por la microalga *Ostreopsis cf. ovata*: perspectiva analítica y biológica**”, ha sido realizada por la Sra. **Noemí-Inmaculada Medina Pérez** bajo su dirección en el Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica de la Universidad de Barcelona, y que los resultados presentados son fruto de la investigación realizada por la mencionada doctoranda.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente certificado.

Barcelona, junio de 2023

Dra. Encarnación Moyano Morcillo

*Catedrática de Universidad del
Departamento de Ingeniería
Química y Química Analítica
Universidad de Barcelona*

Dra. Elisa Berdalet Andrés

*Investigadora científica del
Instituto de Ciencias del Mar
del Consejo Superior de
Investigaciones Científicas*

**“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro.
El esfuerzo total es la victoria completa.”**

Gandhi

*Por los que me han hecho brillar desde el cielo,
mis estrellas.*

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto esfuerzo, dedicación y constancia a lo largo de estos cinco años, he llegado al final de esta etapa, la cual ha sido dura, pero a la vez muy reconfortante tanto en mi vida profesional como personal. La presente Tesis no podría haber sido posible sin el apoyo de muchas personas a las que me gustaría agradecer con unas palabras. En primer lugar, a mi directora y tutora, la Dra. Encarnación Moyano, gracias por dejarme formar parte de tu equipo, con el cual he disfrutado y he aprendido muchísimo. Gracias por todo el apoyo durante el trabajo realizado, por tus ánimos, por enseñarme tanto sobre ciencia y por guiarme cuando estaba perdida. Gracias también a mi directora Dra. Elisa Berdalet, por dejarme descubrirte. Gracias por abrirme el mundo de la biología, por enseñarme tantas cosas, por animarme cuando estaba decaída y por las horas y horas de reuniones. Sin vuestra ayuda esto no habría sido posible. Gracias por todo.

I would also like to thank Dr. Kevin Pagel for giving me the opportunity to work with and learn from him and his great team during my PhD stay in Berlin. Thank you for all your advice, for trusting in me and obviously, for guiding me into the ion mobility.

También querría agradecer al Dr. Francisco Javier Santos por su ayuda y apoyo en todo momento. Gracias Laia por ser un pilar fundamental durante esta etapa. Gracias por tu ayuda durante todos los muestreos, por las intensas charlas y por tus ánimos cuando ya no podía más. Gracias Manuel y Marta por vuestra ayuda y por dejarme aprender tanto de vosotros y gracias Magda por tus palabras de ánimos. Por otro lado, gracias a Montse y Olga por su ayuda en la colaboración de los trabajos realizados con MALDI y LIT-Orbitrap. También, gracias a Núria y Jaime por su colaboración en los estudios de simulación de dinámica molecular.

Gracias a mis compañeros de trabajo y departamento con los que he podido coincidir: Alejandro, Alessandra, Ana, Braulio, Clara, Claudia, Daniel, Hiba, Irene, Jose, Laura, Lidia, Lorenzo, María, Mónica, Montse, Nerea, Nil, Oumaima, Raquel, Rocío, Roger, Rui, Sara y Sergio, con los cuales he desconectado riéndome entre horas, gracias por las minicharlas hasta que se acababa el café. En especial, gracias a mis amigos Ane y Juanfra, los cuales me ayudaron mucho en el inicio de esta etapa y de los que he aprendido tanto. Siempre dispuestos a apoyarme, animarme y a levantarme en mis momentos más duros tanto dentro como fuera de lo profesional. Quiero agradecer también a todos los componentes de la sección de Química Analítica, por su cariño y apoyo recibido y, en especial, a Carmen por sus buenos días con una sonrisa cada mañana. Gracias a mis compis del otro departamento del ICM, Ari, Carlota, Elena, Francesc y Jordina, que en algún momento u otro han hecho que consiga disfrutar de mi paso por allí.

Durante estos 5 años he tenido la suerte de tener amigos que me han acompañado en este proceso y me han hecho desconectar y reír de la mejor manera posible. En primer lugar, gracias Guillem por el apoyo incondicional durante estos años, por dejar que me desahogara contigo, por las intensas charlas, por nuestros cafés de cotilleo, por los viajes, cervezas y mil vivencias contigo. Gracias por estar ahí siempre. Gracias Adrià, Albert, Vega y Òscar (y respectivas parejas) por todos los momentos vividos, gracias amigos por los viajes, cenas y conciertos. La universidad me dio el mejor regalo, vosotros. Gracias Aida, Inés y Júlia por los cafés y largas conversaciones subiéndome los ánimos aun estando en la distancia.

A parte de esta gran familia que conocí durante todos estos años, tengo que dar las gracias a mis apoyos fundamentales fuera del ámbito académico. Gracias a mis “hermanas”, Aruca, Bego, Carlas, Irene y Laura por ser esas personas que me dais luz y vida. Gracias por los momentos de desconexión que me hacían coger fuerza. Gracias por entender que esto no ha sido fácil y no podía quedar cada vez que proponíais un plan, sobre todo en esta recta final. Gracias Kirian por saber calmarme y escucharme. Gracias también al grupo de amigos de mi pareja que son también los míos. Gracias por hacerme disfrutar de cada instante y por los mil juegos que he aprendido en paralelo a este doctorado. Gracias por vuestro apoyo con un “venga que tú puedes, ya te queda poco”, sois los mejores. Gracias Néstor por ayudarme con los problemas informáticos, no podía olvidarme de ti. Infinitas gracias a Laura que me ha ayudado a plasmar lo que quería transmitir en las portadas, capítulos e ilustraciones de esta Tesis (@adumbratio_ilustracion). Gracias por ser tan amable y cercana. ¡No puedo estar más orgullosa del trabajo final después de tantos meses de trabajo, eres pura luz!

I would also like to say thanks to my colleagues during the PhD stay, Alejandra, Andreas, Anna, Carla, Christian, Chun-Wei, Eunice, Gergo, Jerome, Katja, Leila, Lukasz, Marc Martín, Merve, Mesrop, Mery and Michael for guiding me when I was lost, for your advice, but above all for the moments where I disconnected during the coffee breaks and obviously thanks Amy, Chun-Wei, Eunice and Leila for the dinners outside work and for all the beers and concerts that we enjoyed together. And especially, thanks Amy and Eunice for taking care of me during the intense phases.

I also want to thank my big sister Maureen, who I met there and who took care of me like a sister. Thanks for picking me up from the lab and having long talks. Thank you for letting me discover part of Germany with you. Thanks for the audio messages giving me encouragement, and also for listening to my difficulties during the stressful moments. Also, thanks to David, for making me laugh and making me discover his authentic side. Thanks for cheering me up when I was tired. Thanks to them I enjoyed my PhD stay and I can say that it was one of the best times of my life (even though it was also the time I gained too much weight from all the German beer).

Por último, pero los más importantes, GRACIAS a mi familia. Gracias papá y mamá por ser un pilar fundamental en esta etapa y no dejar nunca que me hundiera y conseguir sacarme una sonrisa siempre. Gracias por no soltarme nunca de la mano y animarme a conseguir esto. Gracias por calmarme, cuidarme, y guiarme y porqué, a día de hoy, he llegado hasta aquí también gracias a vosotros. Gracias a mis hermanos por las videollamadas en la distancia animándome más que nunca, sois mi otra mitad, os amo con toda mi alma. Prometo que a partir de ahora tendremos muchísimo más tiempo para estar juntos. Gracias tía por alegrarme los días y escucharme siempre y por conseguir hacerme reír, aun en los peores momentos. INFINIDAD DE GRACIAS pollito por ser mi luz diaria, mi apoyo incondicional, mi mejor amigo. Gracias por levantarme cuando ya no podía más. Gracias por escuchar mis problemas y mis logros. Estoy segura de que sin ti esto no habría sido posible. Ocho años de los cuales cinco de Tesis me has visto crecer, aprender, llorar, sufrir y superarme cada día, gracias por estar siempre y por la enorme paciencia que has tenido conmigo. Gracias cuñi por acompañarme durante este camino y apoyarnos mutuamente. GRACIAS a mi otra familia (la de pollito) por cuidarme como una hija y hermana más, por animarme y por hacerme desconectar de la mejor manera posible. Sois imprescindibles. Por último, yaya, gracias por apoyarme en todo, aunque no entendieras nada de lo que te explicaba. Son las últimas líneas y las que más me está doliendo escribir. Sé que estás aquí conmigo, te siento más cerca que nunca. Estarías ahí sentada viéndome defender la Tesis, en la cual no dejaste de apoyarme y decirme “tranquila que todo saldrá bien, a ver si la acabas ya”. Pues esta etapa ya ha llegado a su fin. Yayo, yaya, sé que estáis orgullosos de mí, lo sé. Cuidadnos desde el cielo. Gracias a mis estrellas que hoy me alumbran y me han ayudado a brillar.

GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VIII
OBJETIVOS Y ESTRUCTURA	XIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Proliferaciones de algas nocivas	3
1.2. <i>Ostreopsis</i>	8
1.2.1. Morfología y ciclo celular	10
1.2.2. Proliferaciones de la especie <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	13
1.2.3. Perfil de toxinas	16
1.3. Efectos de los análogos de la palitoxina	21
1.3.1. Mecanismo de acción de la palitoxina, estudios toxicológicos y sus efectos	21
1.3.2. Efectos en organismos marinos	25
1.4. Problemática en Sant Andreu de Llavaneres	26
1.5. Factores implicados en las proliferaciones de <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	27
1.6. Métodos de análisis para la determinación de las toxinas producidas por <i>Ostreopsis</i>	30
1.6.1. Técnicas de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS)	32
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	35
2.1. Introducción	39
2.1.1. Extracción y aislamiento de las toxinas	41
2.1.2. Análisis LC-MS de la palitoxina y sus análogos	47
2.2. Experimental y resultados	63
2.2.1. Artículo #1: Multiply charged ion profiles in the UHPLC-HRMS analysis of palytoxin analogues from <i>Ostreopsis cf. ovata</i> blooms .65	
2.2.2. Artículo #2: Ion Mobility – Mass Spectrometry studies of palytoxin-like compounds produced by <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	87

2.3. Discusión	125
2.3.1. Toma y tratamiento de las muestras	125
2.3.2. Técnicas de ionización	133
2.3.3. Análisis cuantitativos por UHPLC-HRMS	139
2.3.4. Movilidad iónica.....	141
2.3.5. Defecto de masa de Kendrick.....	145
CAPÍTULO 3. ESTUDIOS DE LOS ANÁLOGOS DE LA PALITOXINA EN AGUA	153
3.1. Introducción	157
3.1.1. Proliferaciones de <i>Ostreopsis</i>	157
3.1.2. Proliferaciones en Sant Andreu de Llavaneres.....	165
3.1.3. Importancia de la disponibilidad de nutrientes en las proliferaciones de <i>Ostreopsis</i> y en la producción de toxinas	166
3.2. Experimental y resultados.....	169
3.2.1. Parámetros adicionales determinados durante las proliferaciones de <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	169
3.2.2. Artículo #3: Progress on the link between nutrient availability and toxin production by <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : field and laboratory experiments	171
3.3. Discusión	203
3.3.1. Proliferación anual de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (2018–2021).....	203
3.3.2. Factores medioambientales relacionados con la proliferación de <i>Ostreopsis cf. ovata</i> y la producción de toxinas	211
CAPÍTULO 4. ESTUDIOS DE LOS ANÁLOGOS DE LA PALITOXINA EN AEROSOLES.....	219
4.1. Introducción	223
4.1.1. Aerosoles marinos	223
4.1.2. Aerosolización de biotoxinas	225
4.2. Experimental y resultados.....	231
4.2.1. Parámetros adicionales determinados durante los experimentos de aerosolización.....	231

4.2.2. Artículo #4: Aerosol toxins emitted by harmful algal blooms susceptible to complex air – sea interactions	235
4.2.3. Artículo #5: Biological factors affecting aerosolization of toxins produced by <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	251
4.3. Discusión	291
4.3.1. Cámara experimental de incubación: diseño y proceso de muestreo de los aerosoles	291
4.3.2. Aerosolización de los análogos de la palitoxina en experimentos de incubación	294
4.3.3. Relación de los niveles de toxina en el aerosol con la sintomatología	298
CONCLUSIONES	303
REFERENCIAS	311
ANEXOS	349

RESUMEN

Las proliferaciones de algas nocivas (HABs) son fenómenos naturales en los que determinados tipos de algas, presentes en el agua a ciertas concentraciones, conllevan efectos adversos en los humanos y/o en el medio ambiente. Los impactos negativos pueden ser debidos a desequilibrios ecológicos (hipoxia, limitación de luz) asociados al exceso de biomasa algal acumulada y/o a las toxinas producidas por algunas microalgas, que pueden afectar directamente la fauna marina o bioacumularse en organismos y transmitirse a través de las redes tróficas hasta los humanos que consumen los alimentos contaminados por ellas. En las últimas décadas, las HABs parecen ser más frecuentes debido al calentamiento global, la eutrofización y otras presiones antrópicas. Por ello, el estudio de las HABs se dirige a comprender sus causas y efectos, predecir su ocurrencia y desarrollar estrategias para prevenir o mitigar sus impactos. Esta Tesis se centra en el estudio de *Ostreopsis* cf. *ovata* (*O.* cf. *ovata*), un dinoflagelado que ha provocado eventos nocivos en ambientes costeros de mares templados y tropicales. *Ostreopsis* cf. *ovata* produce varias toxinas, análogos de la palitoxina (PLTX), que podrían estar relacionados con algunos casos de intoxicaciones alimentarias, irritaciones cutáneas y respiratorias en humanos, así como con episodios de mortalidad masiva de fauna marina con poca movilidad.

En esta Tesis se ha desarrollado una metodología analítica para el estudio de los análogos de la PLTX (OVTXs e iso-PLTX) en muestras medioambientales. Se ha evaluado un método de extracción y se ha desarrollado un método para la identificación/cuantificación de estas toxinas basado en la cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC–HRMS). Los análogos de la PLTX son compuestos polihidroxilados que generan un espectro de masas complejo debido a la presencia de múltiples iones (doble y triplemente cargados) incluyendo pérdidas de moléculas de agua y la formación de iones aductos con sodio y calcio, entre otros. Se ha estudiado la variabilidad de la abundancia de estos iones en función del diseño de la fuente de electrospray (ESI) (con/sin asistencia térmica) y de la medida en instrumentos con diferentes analizadores de masas (Cuadrupolo-Orbitrap y Trampa de Iones Lineal-Orbitrap). Estos estudios han permitido establecer un método de cuantificación robusto basado en la selección de trece iones que permiten compensar las variaciones en su intensidad según las condiciones instrumentales. Además, y por primera vez, se han estudiado estas toxinas utilizando la movilidad iónica (IM) en tres sistemas diferentes: la espectrometría de movilidad iónica en tubo de deriva (DTIMS), la espectrometría de movilidad iónica con trenes de ondas (TWIMS) y la espectrometría de movilidad de iones atrapados (TIMS). Como resultado se han propuesto, por primera vez, los valores de sección transversal de colisión (CCS) para los diferentes

iones observados tanto para la PLTX patrón como para las OVTX-a y OVTX-b detectadas en muestras de agua de mar. Además, se han combinado los experimentos de movilidad iónica con estudios de simulaciones de dinámica molecular para poder dar respuesta a algunos de los datos observados en la espectrometría de movilidad iónica (IMS), como la similar movilidad iónica de aductos de Na y Ca o las pequeñas diferencias en la movilidad de isómeros generados por pérdidas de moléculas de agua.

La presente memoria también incluye estudios sobre las proliferaciones anuales de *O. cf. ovata* ocurridas en Sant Andreu de Llavaneres (Barcelona), en el periodo 2018–2021. Estos estudios han permitido evaluar el efecto de la disponibilidad de nutrientes en la modulación de la concentración de toxinas en el agua, sugiriendo que los niveles de fósforo orgánico y la temperatura tienen una relación directa con las concentraciones de toxinas en el medio natural. Asimismo, se han llevado a cabo experimentos con cultivos para estudiar la cepa aislada en la zona de estudio, viéndose que es capaz de utilizar diferentes tipos de fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas para su crecimiento, aunque no se observa una relación directa con la producción de toxinas.

Esta Tesis finaliza con estudios sobre la aerosolización de las toxinas incubando comunidades naturales procedentes de 3 proliferaciones (2019, 2020 y 2021) de *O. cf. ovata* mediante una cámara generadora de aerosoles. La aerosolización de las toxinas ocurriría principalmente durante las primeras horas de la incubación. Además, las concentraciones de toxinas en los aerosoles variaron según la fase de la proliferación en la que las células fueron obtenidas y la concentración de la toxina en el agua incubada. Otros aspectos técnicos y la implicación de la toxina disuelta requieren futuros estudios.

ABSTRACT

Harmful algal blooms (HABs) are natural phenomena in which certain types of algae, present in water at particular concentrations, have adverse effects on humans and/or the environment. Negative impacts may be due to the accumulation in organisms of toxins produced by microalgae, and/or other ecological imbalances (hypoxia, light limitation) associated with excess accumulated algal biomass. However, the toxins produced can also be transmitted through food chain to humans who consume contaminated food. In the last decades, HABs seem to be more frequent due to global warming, eutrophication, and anthropogenic pressures. Therefore, the study of HABs is important to understand their causes and effects, predict their occurrence and develop strategies to prevent or mitigate their impacts. This Thesis focuses on the study of *Ostreopsis cf. ovata* (*O. cf. ovata*), which is a dinoflagellate that has caused harmful events in coastal environments of temperate and tropical seas. *Ostreopsis cf. ovata* produces palytoxin analogues (PLTX), which could be related to some food poisoning cases, skin, and respiratory irritations in humans, as well as episodes of mass mortality of marine fauna with low mobility.

In this Thesis, an analytical methodology has been developed for the study of PLTX analogues (OVTXs and iso-PLTX) in environmental samples. An extraction method has been evaluated and a quantification method for the identification/quantitation of these toxins based on ultra-high performance liquid chromatography coupled to high performance mass spectrometry (UHPLC-HRMS) has been developed. PLTX analogues are polyhydroxylated compounds that generate a complex mass spectrum due to the presence of multiple ions (doubly and triply charged) including those due to losses of multiple water molecules and the formation of adduct ions with sodium and calcium, among others. The variability of the abundance of these ions has been studied with different electrospray (ESI) ionization sources (with/without thermal assistance) and in instruments with different mass analyzers (Quadrupole-Orbitrap and Linear Ion Trap-Orbitrap). These studies have allowed the establishment of a robust quantification method using thirteen selected ions, which could vary their intensity according to the instrumental conditions. In addition, these toxins have been studied, for the first time, using ion mobility (IM) in three different systems, drift tube ion mobility spectrometry (DTIMS), travelling wave ion mobility spectrometry (TWIMS) and trapped ion mobility spectrometry (TIMS). As a result of these studies, collision cross section (CCS) values have been proposed for the first time for the different ions observed in PLTX_{std} and OVTX-a and OVTX-b detected in seawater samples. In addition, ion mobility experiments have been combined with molecular dynamics simulations studies to support some of the results observed in ion mobility spectrometry (IMS), such as the similarity in

the ion mobility of Na and Ca adducts or the small differences observed in the mobility of isomers generated by losses of water molecules.

The Thesis also includes studies of the annual *O. cf. ovata* proliferations occurred in the study area (Sant Andreu de Llavaneres, Barcelona), in the period 2018–2021. These studies have allowed evaluating the effect of nutrient availability on the modulation of toxin concentration in water, suggesting that organic phosphorus levels and temperature have a direct relationship with toxin concentrations in the natural environment. In addition, experiments with cultures were performed to study the strain isolated in the study area, showing that it can use different types of nitrogen sources, both organic and inorganic, for its growth, although a direct relationship with toxin production was not observed.

The Thesis ends with aerosolization studies carried out in an incubation chamber designed for this purpose. The aerosolization of these toxins was studied throughout three *O. cf. ovata* proliferations (2019, 2020 and 2021), observing that the toxins appear to aerosolize mainly during the first hours of incubation and the toxin concentration levels in the aerosols varied according to the physiological stage of the proliferation in which the cells were obtained, and the toxin concentration in the incubated water. Other technical aspects and the involvement of dissolved toxin require future studies.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP	Anteroposterior
APCI	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> Ionización química a presión atmosférica
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization Ionization</i> Fotoionización a presión atmosférica
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato

C

C18	Fase estacionaria de octadecilsilano
CCS	<i>Collision Cross Section</i> Sección transversal de colisión
CTX	Ciguatoxina

D

DMS	Sulfuro de dimetilo
DMSP	Dimetilsulfoniopropionato
DOM	<i>Dissolved Organic Matter</i> Materia orgánica disuelta
DTIMS	<i>Drift Tube Ion Mobility Spectrometry</i> Espectrometría de movilidad iónica en tubo de deriva
DV	Diámetro dorsoventral

E

EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ESI	<i>Electrospray ionization</i> Ionización por electrospray

F

FAIMS	<i>Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry</i> Espectrometría de movilidad iónica de campo asimétrico
-------	---

FSW	<i>Filtered Seawater</i> Agua de mar filtrada
FTMS	<i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i> Espectrometría de masas con transformada de Fourier

G

GF/F	<i>Glass Fiber Filter</i> Filtro de fibra de vidrio
gPF	Gramos de peso fresco

H

HABs	<i>Harmful Algal Blooms</i> Proliferaciones algales nocivas
HESI	<i>Heated electrospray</i> Electrospray con asistencia térmica
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> Espectrometría de masas de alta resolución

I

IMS	<i>Ion Mobility Spectrometry</i> Espectrometría de movilidad iónica
-----	--

K

KMD	<i>Kendrick Mass Defect</i> Defecto de masa de Kendrick
-----	--

L

LC-MS	<i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i> Cromatografía de líquidos - espectrometría de masas
LD ₅₀	<i>Median Lethal Dose</i> Dosis letal media
LIT	<i>Linear Ion Trap</i> Trampa de iones lineal

M

MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> Desorción con láser asistida por la matriz
McTX	Mascarenotoxinas
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> Monitoreo de múltiples reacciones (transiciones)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de masas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> Espectrometría de masas en tándem
<i>m/z</i>	masa/carga

N

NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> Nivel sin efecto adverso observado
-------	---

O

<i>O. cf. ovata</i>	<i>Ostreopsis cónfer ovata</i>
OST	Ostreocina
OVTX	Ovatoxina

P

PLTX	Palitoxina
POM	<i>Particulate Organic Matter</i> Materia orgánica particulada

Q

Q	<i>Quadrupole</i> Cuadrupolo
QM-A	<i>Quantitation method A</i> Método de cuantificación A
QM-B	<i>Quantitation method B</i> Método de cuantificación B
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i> Triple cuadrupolo

S

SML *Sea Surface Microlayer*
Microcapa de la superficie del mar

T

TEP *Transparent Exopolymer Particles*
Partículas de exopolímeros transparentes

TIMS *Trapped Ion Mobility Spectrometry*
Espectrometría de movilidad de iones atrapados

TOC *Total Organic Carbon*
Carbono orgánico total

TOF *Time-of-Flight*
Analizador de masa de tiempo de vuelo

TWIMS *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*
Espectrometría de movilidad iónica con trenes de onda

U

UHPLC *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*
Cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia

V

VOCs *Volatile organic compounds*
Compuestos orgánicos volátiles



OBJETIVOS Y ESTRUCTURA



OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

El objetivo general de esta Tesis es profundizar en el conocimiento sobre las proliferaciones nocivas de la microalga *Ostreopsis* cf. *ovata* (*O. cf. ovata*), su crecimiento y producción de toxinas, las cuales se han relacionado con efectos nocivos en la salud humana (intoxicaciones alimentarias, irritaciones respiratorias y cutáneas) y en el medio marino (mortalidad de macrofauna, deterioramiento de la calidad del agua).

Este objetivo principal se divide en los siguientes subobjetivos concretos que han fundamentado el trabajo experimental de esta Tesis:

- Desarrollar métodos de análisis para la detección y cuantificación de la palitoxina y sus análogos producidos por *O. cf. ovata* en muestras de agua de mar, evaluando la variabilidad de la abundancia de los iones en función de las características instrumentales (fuentes de electrospray, ESI, HESI; analizadores de masas, Q-Orbitrap, LIT-Orbitrap). Estos estudios persiguen establecer un método robusto de cuantificación para el análisis de los análogos de la PLTX.

- Estudiar los isómeros de la PLTX y sus análogos mediante movilidad iónica y evaluar su aplicabilidad para el análisis de estas toxinas en muestras de agua. Este estudio pretende establecer los parámetros de la sección transversal de colisión (CCS) de los iones generados por electrospray para estas toxinas, proporcionando un parámetro de gran utilidad para la identificación de esta familia de compuestos. Asimismo, se pretende evaluar la herramienta del defecto de masa de Kendrick (KMD) para la identificación de nuevos compuestos relacionados con la PLTX.

- Caracterizar la dinámica de las proliferaciones anuales de *O. cf. ovata* ocurridas en una zona rocosa de Sant Andreu de Llavaneres (Barcelona), con especial énfasis en la variabilidad de la concentración de toxinas producidas por la microalga. Para ello, se realizarán muestreos de diversos parámetros ecológicos, incluyendo las toxinas producidas por la microalga, y cubriendo las proliferaciones anuales de 2018 a 2021.

- Evaluar el crecimiento de *O. cf. ovata* y la producción de toxinas bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes. Este objetivo se abordará con experimentos de laboratorio con una cepa de *O. cf. ovata* creciendo en diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes (deficiencia de fósforo, deficiencia de nitrógeno, fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas).

- Investigar la aerosolización de las toxinas producidas por *O. cf. ovata* utilizando una cámara experimental generadora de aerosoles donde se incubarán comunidades naturales obtenidas a lo largo de la proliferación de la microalga en la zona de estudio (Sant Andreu de Llavaneres). Los aerosoles serán analizados con el

fin de detectar la presencia y concentración de toxinas. Se realizarán experimentos diversos para comprender los mecanismos implicados en la posible aerosolización.

Para alcanzar estos objetivos, la presente Tesis se ha estructurado en cuatro grandes capítulos donde se incluyen las 5 publicaciones científicas derivadas de los resultados experimentales obtenidos:

- **Capítulo 1.** La Tesis se inicia con una introducción general relacionada con las proliferaciones de algas nocivas, haciendo especial mención a las producidas por el género de *Ostreopsis*. Además, se explica la morfología y ciclo celular de *Ostreopsis*, el perfil de toxinas que puede producir, el mecanismo de acción de la PLTX y sus efectos, así como la problemática en la zona de estudio, los factores que pueden influir en el crecimiento o toxicidad durante las proliferaciones y los diferentes métodos de análisis para la detección y cuantificación de estas toxinas.

- **Capítulo 2.** Este capítulo se centra en las metodologías analíticas aplicadas en el análisis de las biotoxinas marinas producidas por *Ostreopsis cf. ovata*. En la *Introducción* de este capítulo se presentan las toxinas analizadas durante la presente Tesis y los métodos de extracción y de determinación instrumental que hasta ahora se están utilizando en el análisis de estas toxinas. Además, se describen con algo más de detalle algunas de las técnicas analíticas utilizadas en esta Tesis. Este capítulo incluye dos publicaciones científicas en la sección de *Experimental y Resultados* (Artículo #1: “*Multiply charged ion profiles in the UHPLC-HRMS analysis of palytoxin analogues from Ostreopsis cf. ovata blooms*”, *Analytical Methods* 2023, 15, 1355; Artículo #2: “*Ion Mobility – Mass Spectrometry studies of palytoxin-like compounds produced by Ostreopsis cf. ovata*”, pendiente de publicación en la revista *Analytical Chemistry*). Los resultados incluidos en el Artículo #2 son los derivados de una estancia predoctoral en el *Institute of Chemistry and Biochemistry, Freie Universitat Berlin*, (Berlín, Alemania). El capítulo finaliza con una discusión de los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos.

- **Capítulo 3.** En este capítulo se estudian las proliferaciones de *O. cf. ovata* durante los años 2018–2021 y la posible relación de su crecimiento y de la producción de toxinas con la disponibilidad de nutrientes. El capítulo empieza con una *Introducción* en la que se comparan las diferentes proliferaciones ocurridas en el Mar Mediterráneo, se presenta la problemática en la zona de estudio de esta Tesis, y se expone la importancia que tiene la disponibilidad de nutrientes durante las proliferaciones de esta especie. Además, la sección de *Experimental y Resultados* incluye la publicación científica fruto de los resultados de estos estudios (Artículo #3: “*Progress on the link between nutrient availability and toxin production by Ostreopsis cf. ovata: field and laboratory experiments*”, *Toxins* 2023, 15, 188). Este

capítulo finaliza con una discusión de los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos.

- **Capítulo 4.** Este capítulo se centra en la aerosolización de las toxinas a lo largo de las proliferaciones de 2019–2021. En la *Introducción* del capítulo se exponen los procesos de aerosolización, así como estudios realizados hasta el momento sobre la aerosolización de otras biotoxinas marinas y se destacan los escasos estudios realizados hasta el momento para la PLTX y sus análogos. En el capítulo se incluyen dos publicaciones científicas en la sección *Experimental y Resultados* (Artículo #4: “*Aerosol toxins emitted by Harmful Algal Blooms susceptible to complex air-sea interactions*”, *Environmental Science & Technology* 2021, 55, 468–477, Artículo #5: “*Biological factors affecting the aerosolization of toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata**”, pendiente de publicación en la revista *Environmental Science & Technology*). Finalmente, se comentan en detalle los resultados y hallazgos más relevantes obtenidos en todos los experimentos realizados.

Esta memoria finaliza con las secciones donde se presentan las principales conclusiones extraídas de esta Tesis y donde se recopilan las citas bibliográficas utilizadas y que apoyan la discusión de los diferentes capítulos. Asimismo, se incluyen al final de la memoria una serie de anexos con información adicional relevante referente a las proliferaciones del 2018–2021.



CAPÍTULO 1.

Introducción



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Proliferaciones de algas nocivas

Las microalgas son organismos que forman parte del fitoplancton y el fitobentos en ecosistemas acuáticos marinos y de agua dulce y son mayoritariamente fotosintéticas. Éstas contribuyen al 50% de la producción del oxígeno terrestre a través de la fotosíntesis, fijando el carbono inorgánico, forman la base de las redes alimentarias acuáticas e intervienen de manera fundamental en los flujos biogeoquímicos del planeta.

Cuando las condiciones ambientales les son favorables (nutrientes, temperatura, salinidad, hidrodinamismo, etc.), ciertas especies de microalgas proliferan, alcanzando abundantes concentraciones celulares que pueden llegar a "colorear" las aguas [1]. A menudo, proliferan especies del grupo de los dinoflagelados, los cuales contienen pigmentos fotosintéticos (peridina) que confieren un aspecto rojizo al agua de mar. Por ello, este fenómeno es conocido tradicionalmente como "marea roja". Sin embargo, una variedad de especies con pigmentos fotosintéticos distintos, pueden proliferar de manera que dan otras coloraciones (amarilla, marrón, verdes, verdeazulada) al agua, tal y como se puede observar en la Figura 1.1. Cuando los organismos que han proliferado mueren, la gran cantidad de materia orgánica acumulada en la columna de agua o en el fondo, es consumida (respirada) por las bacterias, lo cual conlleva una disminución de la concentración de oxígeno disponible en el ecosistema.

Por otro lado, entre los organismos que proliferan, se encuentran algunos productores de toxinas que pueden afectar a las personas u otros organismos. Es por todo ello que actualmente el término aceptado por la comunidad científica para referirse a las proliferaciones de algas, tóxicas o no, es el de "proliferaciones algales nocivas", *Harmful Algal Blooms* en inglés (HABs). De todos modos, esta definición no es estrictamente científica, sino que se basa en la percepción de los humanos sobre determinados efectos perjudiciales asociados a las HABs, y no en los aspectos ecológicos implicados.

Así pues, el término HAB hace referencia a las proliferaciones de organismos fotosintéticos que crecen por encima de niveles considerados "normales" (los cuales varían con la especie y el ecosistema) y causan impactos ecológicos importantes (alteración de las redes tróficas, hipoxia o anoxia), produciendo toxinas en algunos casos, y conllevando problemas económicos o en los servicios ecosistémicos (pesca, turismo, etc.).

a) Proliferación de algas nocivas en alta mar en el condado de San Diego, California.



Imagen: Kai Schumann (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)

b) Proliferación de algas nocivas en la cuenca occidental del lago Erie.



Imagen: Aerial Associates Photography, Inc. (Zachary Haslick). National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) cc 2.0

Figura 1.1. Imágenes de proliferaciones de algas nocivas en **a)** San diego (California) y **b)** en una cuenca occidental del lago Erie (EE.UU.).

El término HAB incluye la palabra “algas” en un sentido amplio. Algunos eventos nocivos son producidos por organismos heterotróficos (se alimentan de compuestos orgánicos disueltos o particulados y/o ingieren otros microorganismos) o mixotróficos (heterotróficos con capacidad de realizar la fotosíntesis según las circunstancias) [2]. Asimismo, entre los formadores de HABs se encuentran organismos eucariotas (las algas *sensu stricto*) y procariotas (las cianobacterias), y organismos microscópicos (las microalgas de tamaño inferior a 200 μm aproximadamente, visibles con el microscopio) y macroscópicos (*Sargassum*, *Ulva*) de grandes dimensiones. Entre los grupos de microorganismos que incluyen especies que pueden causar las HABs se encuentran principalmente:

- Cianobacterias: bacterias fotosintéticas que se pueden encontrar en hábitats de agua dulce y marinos. Algunas especies de cianobacterias pueden producir toxinas, como las microcistinas y anatoxinas, que son dañinas para los humanos y otros organismos [3,4]. Las acumulaciones de grandes biomásas de cianobacterias (a menudo en la superficie) pueden producir la mortalidad de organismos acuáticos por hipoxia del medio o toxicidad específica, y disminuir la luz de los niveles inferiores de la columna del agua o el bentos. En el caso de las proliferaciones en agua dulce, contaminan el agua de beber. Las toxinas pueden causar irritaciones cutáneas, y aerosolizarse, y producir irritaciones respiratorias [5].

- Dinoflagelados: algas unicelulares que también se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce. Poseen dos característicos flagelos que les permiten nadar. Algunas especies de dinoflagelados también pueden producir toxinas diversas (saxitoxinas, brevetoxinas, etc.) que circulan a través de las redes tróficas y resultan dañinas para los humanos y los animales que consumen alimentos contaminados [1,6,7]. Algunas toxinas se aerosolizan (brevetoxinas), causando irritación de las vías respiratorias por inhalación [8].

- Diatomeas: grupo de algas unicelulares caracterizadas por sus distintivas paredes celulares de sílice, rígidas y con formas intrincadas. Las diatomeas son importantes productores primarios en los ecosistemas acuáticos, responsables de gran parte de la fotosíntesis que se produce en los océanos, y juegan un papel fundamental en las redes alimentarias acuáticas y los ciclos biogeoquímicos globales. Algunas especies de diatomeas pueden producir toxinas que son dañinas en humanos y en animales, como el ácido domoico. En algunos casos, las prolongaciones de la teca silícica dañan las agallas de los peces, causándoles la muerte por asfixia. Las proliferaciones de estos organismos pueden causar problemas ecológicos y de salud humana, como la muerte de peces y el envenenamiento por mariscos [6,9].

Las HABs pueden tener lugar en todos los sistemas acuáticos, tanto en agua salada como dulce, y en todas las latitudes, desde las zonas cálidas hasta el Ártico y la Antártida [10]. Algunos organismos, los bentónicos, proliferan adhiriéndose a sustratos abióticos (rocas, arena) o bióticos (macroalgas, corales). Otros son planctónicos, encontrándose en la columna de agua y en la superficie. En algunos casos, durante episodios de altas concentraciones celulares, se observan agregados celulares flotando en la superficie del agua.

En principio, el fenómeno de las HABs, es un fenómeno natural conocido desde la antigüedad por las diversas culturas [11,12]. Los principales factores ambientales que determinan las HABs son los aportes elevados de nutrientes (orgánicos e inorgánicos) y la relativa calma, los cuales también pueden tener un origen o una contribución antrópica [13]. Por ejemplo, tormentas y actividades antropogénicas pueden transportar los fertilizantes utilizados en los sectores agrícolas hasta las zonas costeras. Asimismo, la construcción de infraestructuras costeras (puertos, barreras protectoras de playa, playas artificiales) modifica la circulación natural y facilita el confinamiento de las aguas, en las que, en presencia de los nutrientes adecuados pueden producirse HABs [14,15]. Otros factores fundamentales son la temperatura, esencial en el metabolismo celular, de manera que facilita la reproducción y crecimiento de los organismos, y la salinidad, factor determinante en el medio acuático. De hecho, cada especie, tiene sus preferencias en cuanto a los factores indicados. Por ello en una sección posterior (sección 1.5) se comentarán en detalle todos estos factores en relación con la especie objeto de esta Tesis, el dinoflagelado *Ostreopsis cf. ovata* productor de HABs.

Como se ha comentado previamente, existen algunas especies de microalgas que pueden producir biotoxinas de manera natural. Se desconoce la función que las toxinas juegan en los organismos que las producen, pero en base a diversos experimentos, se ha sugerido que pueden constituir mecanismos de defensa contra predadores o de competencia con otras microalgas o bacterias [16–19]. Estas toxinas se transfieren a través de las redes tróficas hasta los humanos, pudiendo afectar o no

a los organismos que las han bioacumulado. Por ejemplo, los bivalvos filtradores (mejillones, ostras, etc.) no muestran a menudo síntomas de intoxicación [20] aunque últimas observaciones sugieren que sí podrían estar afectados [21]. Los organismos que consumen estos bivalvos pueden experimentar síntomas negativos revelados, por ejemplo, por las mortalidades masivas de peces, aves y mamíferos marinos, aunque en el medio natural es difícil conocer qué problemas han sufrido. Los humanos que han ingerido moluscos o pescados contaminados con algunas de estas biotoxinas, pueden experimentar distintos síndromes. Esencialmente todas las ficotoxinas son neurotoxinas, que provocan daños específicos a nivel digestivo, muscular, respiratorios, irritaciones cutáneas o hepatotóxicos y pueden llegar incluso a provocar la muerte [22]. Los casos más comunes de toxicidad en humanos son la intoxicación paralizante por ingesta de moluscos (PSP: *Paralytic Shellfish Poisoning*) causada por la saxitoxina que sintetizan ciertos dinoflagelados como *Alexandrium* spp. o cianobacterias como *Anabaena circinalis*, la intoxicación diarreica por ingesta de moluscos (DSP: *Diarrhetic Shellfish Poisoning*) causada también por microalgas dinoflageladas como el *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. que sintetizan el ácido okadaico, la intoxicación amnésica por ingesta de moluscos (ASP: *Amnesic Shellfish Poisoning*) causada por el ácido domoico producido por las diatomeas, la intoxicación azaspirácida por ingesta de moluscos (AZP: *Azaspiracid Shellfish Poisoning*) causada por los azaspirácidos producidos por dinoflagelados pertenecientes a los géneros *Azadinium* y *Amphidoma* y la intoxicación ciguatera por ingesta de pescado (CFP: *Ciguatera Fish Poisoning*) causada por las ciguatoxinas (CTX) producidas por dinoflagelados como *Gambierdiscus toxicus*, entre otros. Otras toxinas, como la brevetoxina o los análogos de la palitoxina, son aerosolizadas y transportadas por el viento o debido a diferentes condiciones meteorológicas, llegando a causar irritaciones respiratorias [23,24]. Puede encontrarse más información sobre los síndromes en humanos en Berdalet et al. (2016) [25].

Estas neurotoxinas son una gran preocupación para la salud humana, ya que gran parte suelen ser resistentes a la elevación de temperaturas, es decir, se mantienen estables una vez cocinado el alimento contaminado. Una de las estrategias más eficaces para prevenir las intoxicaciones es realizar el seguimiento de la presencia de las especies tóxicas en las zonas de producción acuícola y de las toxinas en los productos alimentarios, y prohibir la comercialización de marisco que ha estado expuesto a la presencia y/o a la toxina de determinadas HABs. Ello conlleva directa o indirectamente problemas económicos y sociales, especialmente en el ámbito pesquero y de la acuicultura (de peces o bivalvos) [14,15]. En el caso de las toxinas que pueden aerosolizarse, para evitar el riesgo de los bañistas, las autoridades en salud pública de los diferentes países en los que este problema persiste proceden a cerrar el acceso a las playas, lo cual comporta también problemas económicos y sociales.

En las últimas décadas, el aumento del seguimiento de los eventos nocivos, indica que los fenómenos de HABs podrían estar aumentando, sin bien no existe una tendencia global, sino que depende de las especies y las regiones [26]. En el Mar Mediterráneo son las proliferaciones de dinoflagelados bentónicos las que parecen estar en aumento en los últimos 20 años [27,28]. Por un lado, se ha detectado la presencia (aunque no formen proliferaciones por el momento en esta región) de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*, especies tropicales causantes de la ciguatera [29–32]. Por otro lado, son las proliferaciones de alta biomasa de otro género tropical, *Ostreopsis* las que tienen lugar de manera recurrente en diversas playas del Mediterráneo. Las actividades antropogénicas, factores medioambientales y el cambio climático estarían facilitando la expansión de estas especies desde las zonas tropicales a las templadas [27].

Las primeras proliferaciones de las especies del género *Ostreopsis* se han descrito en áreas tropicales, aunque en los últimos años, la expansión de este género se ha ido observando en otras regiones templadas [33–35] y desde la última década del siglo XX se han ido produciendo regularmente proliferaciones de *Ostreopsis* a lo largo de las costas del Mar Mediterráneo (sección 1.2.2) [36–39]. Este género es de especial interés debido a que algunas de sus especies producen toxinas análogas a la palitoxina (PLTX), una de las biotoxinas marinas más potentes y que puede transferirse de manera aún desconocida en las redes tróficas provocando intoxicaciones en humanos que consumen los alimentos contaminados [40–42]. La Figura 1.2 muestra la posible transferencia de las toxinas producidas por *Ostreopsis* a través de la cadena trófica hasta los humanos. Las especies tóxicas se adhieren a superficies como los corales o macrófitos mediante un mucílago que ellas mismas secretan. Estas macroalgas y corales recubiertos por las microalgas son consumidos por peces herbívoros que finalmente pueden ser consumidos por humanos.

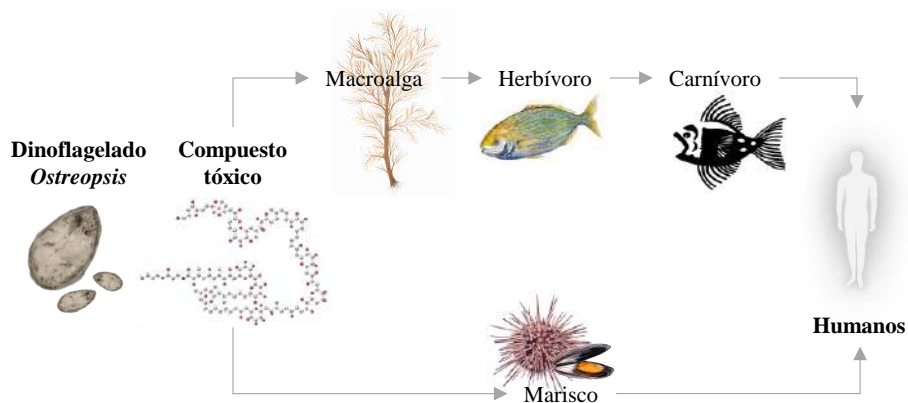


Figura 1.2. Posibles vías de transferencia de las biotoxinas producidas por dinoflagelados bentónicos como *Ostreopsis* y *Gambierdiscus* a través de las redes tróficas.

Además, las proliferaciones de *Ostreopsis* se han asociado (aunque no demostrado) con enfermedades respiratorias leves (rinitis, fiebre y garganta irritada) [43,44] y se ha apuntado como posible causa las toxinas aerosolizadas [24]. Así mismo, también se relaciona esta especie con la irritación de la piel y las mucosas (ojos y labios) de bañistas después de nadar o bucear en playas donde se han producido las proliferaciones de *Ostreopsis* [45–49].

Según algunos estudios publicados hasta ahora, *Ostreopsis* cf. *ovata* (*O.* cf. *ovata*) junto con *O.* cf. *siamensis* son algunas de las especies de este género más abundantes en el Mar Mediterráneo y que su proliferación ha conllevado varios efectos negativos simultáneos, desde la contaminación del hábitat y de los organismos que en él habitan, hasta los efectos en la salud humana y las repercusiones económico/sociales [50,51]. Por ello, es importante estudiar estos fenómenos y caracterizar aspectos diversos como son, las especies que proliferan, las toxinas que se producen, los factores ambientales que las facilitan, la dinámica temporal de las proliferaciones, su expansión biogeográfica, o la aerosolización de las toxinas producidas. En consecuencia, esta Tesis se centra en el estudio de las proliferaciones de la especie *O.* cf. *ovata*, la cual ha experimentado un expansión creciente durante los últimos años en el Mar Mediterráneo y en especial en la costa catalana [52,53].

1.2. *Ostreopsis*

El género *Ostreopsis*, perteneciente a la familia de las *Ostreopsidaceae* (*Gonyaulacales*, *Dinophyceae*, *Dinozoa*) incluye varias especies presentes en zonas costeras desde latitudes tropicales a templadas. El género *Ostreopsis* comprende once especies descritas hasta el momento (Tabla 1.1), aunque nuevos ribotipos se están encontrando en zonas diversas y constituirán, probablemente, nuevas especies. Para la descripción de las especies, se utilizaron tradicionalmente las descripciones morfológicas incluyendo la medida de sus diámetros dorsoventral (DV) y anteroposterior (AP), la relación del DV con la anchura, la longitud de las placas y su estructura, el tamaño de los poros de la teca, la forma y los patrones de las placas, etc. [54–57]. A menudo, algunas de las especies suelen presentar parámetros morfológicos muy similares, lo que dificulta notablemente su identificación [55,58]. Por ejemplo, un carácter taxonómico tradicionalmente utilizado para discriminar especies o cepas de *Ostreopsis* es la relación DV/AP [55,59,60], lo cual conlleva ambigüedades para la identificación. Actualmente, la secuenciación de regiones específicas de ácido desoxirribonucleico ribosómico (rDNA), se combina con la morfometría para identificar las nuevas especies [55,61]. El estado actual del género se resume en la Tabla 1.1, que muestra información sobre las descripciones originales e información sobre la localidad e indica si presentan algún tipo de toxicidad.

En relación a la toxicidad, la información es en general limitada para la mayoría de las especies (Tabla 1.1). Por un lado, la toxicidad de *O. belizeanus*, *O. caribbeanus* y *Ostreopsis* sp. 2/3/4 todavía no se conoce, mientras que *O. marinus* parece no ser tóxico. Por otro lado, *Ostreopsis fattorussoi*, *O. heptagona*, *O. labens*, *O. mascarenensis* y *O. rhodesae* son especies más o menos tóxicas, y *Ostreopsis* sp. 7 es altamente tóxico. *Ostreopsis siamensis*/*O. cf. siamensis* parecen ser solo moderadamente tóxicos o no tóxicos, observando las cepas no tóxicas en el Mar Mediterráneo y las moderadamente tóxicas en el Océano Pacífico.

En resumen, en el Mediterráneo se encuentra 3 especies descritas: *O. cf. ovata*, la más tóxica, y las poco tóxicas *O. cf. siamensis* y *O. fattorussoi*.

Tabla 1.1. Especies de *Ostreopsis* descritas hasta el momento. Especie y referencia en de la fecha de descripción, localización, presencia o no de toxicidad y referencias representativas de la descripción del grado de toxicidad. Fuente: Resumen de la Tabla 2 de Tester et al. (2020) [27].

Especie [Ref.]	Localización	Toxicidad [Ref.]
<i>O. belizeanus</i> [62]	Belice, Mar Caribe	-
<i>O. caribbeanus</i> [62]	La Parguera, Puerto Rico, Mar Caribe	-
<i>O. fattorussoi</i> [63]	Líbano, Mar Mediterráneo	Sí [63,64]
<i>O. heptagona</i> [65]	Cayo Knight, Florida, Golfo de México	Sí [65]
<i>O. labens</i> [66]	Man of War Cay, Mar Caribe de Belice	Sí [67]
<i>O. lenticularis</i> [68] (<i>Ostreopsis</i> sp. 5 [69])	Islas Gambier y de la Sociedad, Polinesia Francesa, Nueva Calendonia	~ [69–71]
<i>O. marinus</i> [62]	El Canal Principal, Twin Cays, Belice, Mar Caribe	No [70]
<i>O. mascarenensis</i> [72]	Islas Rodrigues y Reunión, Océano Índico	Sí [73]
<i>O. ovata</i> / <i>O. cf. ovata</i> (Clade A) [68]	Atlántico/Mediterráneo/Pacífico	Sí [56,74,75]
<i>O. rhodesae</i> [76]	Laguna Heron Reef, al sur de Great, Barrier Reef, Mar del Coral, Australia	Sí [76]
<i>O. siamensis</i> / <i>O. cf. siamensis</i> [77]	Golfo de Tailandia	~ [78–80]
<i>Ostreopsis</i> sp. 1 (<i>O. cf. ovata</i> según ribotipo, Clade B) [81,82]	Costa de Japón	Sí [81]
<i>Ostreopsis</i> sp. 2 [81]	Islas Cooks	-
<i>Ostreopsis</i> sp. 3 y 4 [81]	Islas Cooks y Australia	-
<i>Ostreopsis</i> sp.6 (<i>O. lenticularis</i> según ribotipo) [81]	Golfo de Tailandia	Sí [70,81,83]
<i>Ostreopsis</i> sp.7 [83]	Mar de Andamán, Océano Índico	Sí [83]

-: No hay datos; Sí: Hay evidencias de toxicidad; No: No hay evidencias de toxicidad; ~: Hay estudios que indican que no presenta toxicidad y otros que sí.

1.2.1. Morfología y ciclo celular

Ostreopsis es un organismo fotosintético que utiliza la energía de la luz solar (a través de los pigmentos como la clorofila) para convertir el dióxido de carbono y otros nutrientes en compuestos orgánicos que puede utilizar para crecer y sobrevivir. Al igual que otros dinoflagelados, *Ostreopsis* tiene dos flagelos que le permiten nadar y una estructura celular única que incluye una serie compleja de pliegues y placas que le confieren estructura y protección. Las células de *Ostreopsis* presentan una pared celular (teca), son aplanadas y tienen una forma ovalada similar a la de una almendra, lágrima o pipa. La teca está compuesta principalmente de celulosa y su estructura está formada por placas que varían según la especie. En la Figura 1.3 se muestran algunas imágenes del *O. cf. ovata* donde es posible observar la forma de esta especie que es la que se va a estudiar en profundidad en esta Tesis. Las Figuras 1.3(a,b) son ilustraciones de una célula de *O. cf. ovata* tal y como la veríamos a través de un microscopio invertido (a) o por microscopía electrónica de barrido (b) donde se puede observar la forma de pipa comentada, además de unos filamentos que la componen y que parecen estar formados por varios filamentos más delgados. La

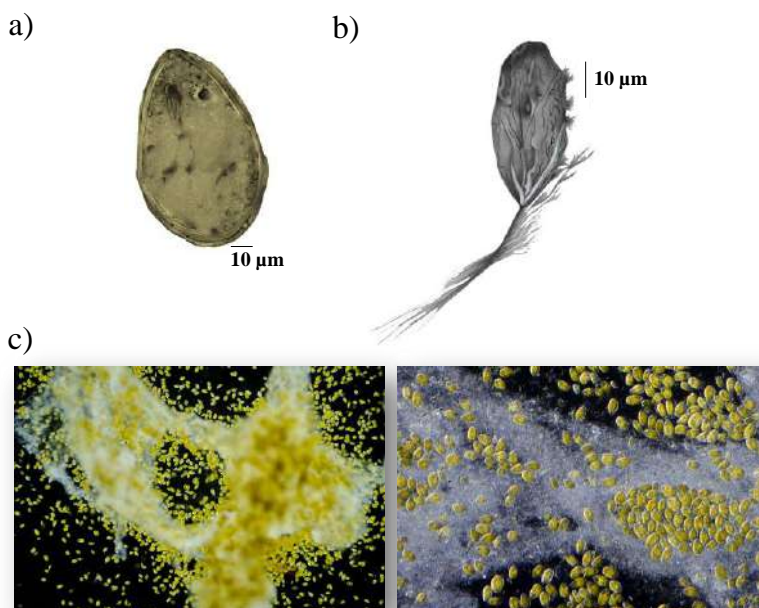


Figura 1.3. a) Célula de *Ostreopsis cf. ovata* que se observa en el microscopio invertido (ilustración) b) Célula de *O. cf. ovata* con un filamento largo que sale de su lado ventral observada por microscopía electrónica de barrido (ilustración a partir de la Figura 2 de Honsell et al. (2013) [84]) c) Células de *O. cf. ovata* de una muestra de cultivo donde se puede apreciar el mucílago que producen (Imágenes de @Rubén Duro, ScienceIntoImages).

Figura 1.3c, muestra una fotografía real de un cultivo de *O. cf. ovata* visto a través del microscopio electrónico, donde se puede observar la sustancia viscosa (mucílago) que genera y que se compone principalmente de una compleja mezcla de polisacáridos, proteínas y lípidos [84–86]. El papel del mucílago producido por *O. cf. ovata* no está definido, pero es fundamental para la sujeción de las células a los substratos, y podría proporcionar una barrera protectora contra los factores estresantes ambientales, como la alta intensidad de luz, las fluctuaciones de temperatura y los cambios en la salinidad. Además, podría desempeñar un papel en la estrategia de alimentación de *O. cf. ovata*, ayudando al dinoflagelado a atrapar y consumir pequeños organismos, como bacterias y otros microorganismos [84,87].

Por otro lado, en la Tabla 1.2 se indican las dimensiones de las células de *O. cf. ovata* que se han especificado en algunos estudios publicados hasta la actualidad. Se indican las medidas tanto de las células estudiadas procedentes de muestras de campo de una población natural como para los correspondientes estudios con cultivos de células de *O. cf. ovata*. Tal y como se puede observar, las dimensiones de las células son aparentemente más pequeñas en los estudios con cultivos, a pesar de que éstas también procedan de una comunidad natural. Hay varios factores que pueden contribuir al tamaño celular, como la fase de crecimiento o la disponibilidad de nutrientes. Además, el tamaño de estas especies puede variar incluso entre las diferentes cepas y su procedencia, tal y como ocurre con cepas del Mar Mediterráneo o Atlántico que muestran esa elevada variabilidad en tamaños [55,58], presentando un mayor tamaño las células del Atlántico (Tabla 1.2).

El ciclo de vida de *Ostreopsis* sigue esencialmente el patrón de los dinoflagelados, aunque aún se desconocen muchos detalles. Se caracteriza por tener tanto una fase asexual como sexual [88], las cuales van ligadas a la motilidad.

La fase asexual es la más habitual y da lugar a las llamadas células vegetativas, haploides (n). Las células se dividen por desmosquistis (división celular), “heredando” ambas células parte de las placas tecales que definen las características morfológicas. Las células vegetativas poseen los dos flagelos típicos (longitudinal o tractor, y transversal, que recorre la cintura y les permite rotar). Las células vegetativas de *Ostreopsis*, pasan una buena parte de su ciclo celular adheridas al substrato. Por razones aún desconocidas, tal vez ligado a los ciclos día:noche o la agitación del agua de mar, las células bentónicas se desprenden, pasan a formar parte del plancton, y de agregados que flotan en la superficie del mar [89]. La reproducción asexual tiene un papel importante ya que en condiciones favorables las células pueden multiplicarse rápidamente y formar poblaciones densas, provocando las proliferaciones de *Ostreopsis*.

Tabla 1.2. Características morfométricas de *Ostreopsis* cf. *ovata*. DV, diámetro dorsoventral (longitud); W, ancho; AP: diámetro anteroposterior (altura); DV/AP, valores medios y referencia asociada (Ref.).

Procedencia de la cepa	DV (µm)	W (µm)	DV/AP	Ref.
Población natural				
Costa de Japón	36–60	24–45	3,1	[60]
Archipiélago de Currais, Brasil	29–66	17–46	-	[41]
Río de Janeiro, Brasil	40–65	18–45	-	[74]
N Nueva Zelanda	38–50	25–35	-	[90]
Rovinj, N Mar Adriático, Croacia	52–68	ND	1,7–2,3	[48]
Conero Riviera, N Mar Adriático, Italia	18–75	12–60	1,9–2,7	[91]
Passetto, NO Mar Adriático, Italia	29–68	17–46	-	[92]
Golfo de Trieste, N Mar Adriático, Italia	48–65	31–46	-	[93]
Golfo de Trieste, N Mar Adriático, Italia	30–71	18–53	1,5–2,8	[94]
Mar Egeo del Norte, Grecia	26–62	13–48	<2	[59]
Costa vasca-francesa, Atlántico	55–72	35–50	-	[95]
NO Mar Mediterráneo, España	21–77	16–51	-	[96]
NO Mar Mediterráneo (España) y Croacia	24–87	13–53	-	[88]
NO Mar Mediterráneo, España	27–65	19–57	<2	[55]
Costa atlántica ibérica, NE España	55–84	30–62	-	[58]
Cultivos a partir de la población natural				
Brasil	23–60	15–49	-	[41]
NO Mar Mediterráneo, España	14–62	14–44	-	[97]
NO Mar Mediterráneo (España) y Croacia	24–85	17–65	-	[88]
Mar Adriático	28–76	18–51	-	[56]
Mar Tirreno	22–59	14–44	-	[56]

-: No hay datos; N: Norte; NO: Noroeste.

Cuando las condiciones ambientales no les son favorables, las células vegetativas pueden enquistarse: se desprenden de los flagelos, cambian rápidamente las propiedades de la pared celular, la cual se desprende, cambian la forma y originan los quistes temporales de ecdisis, sin movilidad, pero sin cambiar su contenido de ADN, es decir, siguen siendo haploides. Normalmente estos pueden durar unas horas,

días o semanas, recuperando la forma y los flagelos cuando las condiciones ambientales vuelven a ser propicias.

Además, los dinoflagelados, también *Ostreopsis*, pueden reproducirse sexualmente por la fusión de dos células vegetativas, que se transforman en gametos (cambiando o no la forma celular) y originando así un cigoto diploide ($2n$). Los cigotos pueden mantener los flagelos paternos durante un tiempo, o perderlos totalmente, a la vez que cambian las propiedades de su pared celular para resistir periodos de hasta varios años. Por eso se llaman también "hipnozigos" (se han hecho germinar quistes que estaban en sedimentos fósiles). Estos quistes sexuales, de resistencia experimentarán meiosis en el momento de la germinación y producirán nuevas células vegetativas que entrarán en el ciclo de vida). Se ha demostrado que estos quistes pueden germinar dependiendo de la temperatura, es por ello que este parámetro representa un factor clave (entre otros) para el inicio de las proliferaciones de *Ostreopsis* [98].

1.2.2. Proliferaciones de la especie *Ostreopsis cf. ovata*

El género *Ostreopsis* (concretamente la especie *O. siamensis* Schmidt) se describió por primera vez en muestras recolectadas en el Golfo de Tailandia (también conocido como el Golfo de Siam) [77]. Las proliferaciones de *Ostreopsis* suelen ocurrir principalmente en aguas tranquilas y cuando se produce un relativo aumento de la temperatura y una elevada disponibilidad de nutrientes. En la Figura 1.4 se muestra la distribución a nivel global del género *Ostreopsis* desde el 1995 hasta la actualidad. Se puede observar que la presencia de *Ostreopsis* se está extendiendo desde las zonas tropicales y subtropicales a templadas. Además, estas últimas están experimentando una elevación de las temperaturas debido al cambio climático. Estos mapas van a ir cambiando en el futuro según se vayan expandiendo las proliferaciones a otras zonas. En concreto, a lo largo de la costa Mediterránea de Italia, Francia, España y Grecia, las proliferaciones masivas de *Ostreopsis*, en su mayoría generadas por la especie *O. cf. ovata* [35,99,100], han cubierto el bentos, produciendo películas (o biofilms) en aguas poco profundas y protegidas de las fuertes corrientes. Asimismo, se han reportado muertes masivas de erizos de mar durante períodos de alta abundancia de *O. cf. ovata* en la costa tropical de Brasil (Estado de Río de Janeiro) [101].

La primera presencia documentada del género *Ostreopsis* en el Mar Mediterráneo es de 1972 [102]. Podría tratarse de *O. cf. siamensis* y *O. cf. ovata*, pues ambas especies se han ido detectando posteriormente, desde final del siglo XX en distintas playas [55,103]. En las zonas muestreadas, *Ostreopsis* se presenta adherido a rocas y macroalgas, los cuales quedan cubiertos por la película gelatinosa de color marrón rojizo que contienen elevadas concentraciones de *Ostreopsis*. Las

células suelen ser epífitas sobre macrófitos [104], y también sobre corales, sedimentos o rocas, constituyendo el stock de células (células bentónicas) para la proliferación [86,103,105]. Además, debido a una combinación de procesos físicos, biológicos o ambientales, las células de *Ostreopsis* spp. también pueden encontrarse en la columna de agua (células planctónicas) o formando agregados en la superficie del agua [36,50,89]. Los sustratos a los que se adhiere en la zona de estudio se comentarán más adelante (Capítulo 2).

En el caso de la especie *O. cf. ovata*, sus proliferaciones se han ido detectando a lo largo de la costa Mediterránea como por el ejemplo en el mar Tirreno en 2002, en el norte del Mar Egeo en 2003–2004 [59,106], en la costa catalana en Sant Andreu de Llavaneres desde 2004 y otros puntos [36,50,107], en las Islas Baleares en 2008 [43] y en el golfo de Nápoles en 2008 [43,108]. En relación a los efectos en la salud humana, la alarma estalló cuando en el verano de 2005 y 2006 [46,109], se produjo una proliferación de *O. cf. ovata* cerca de Génova (costa de la costa de Liguria, Italia). Ante este evento, cientos de personas requirieron atención médica tras estar expuestos a los aerosoles marinos, ya sea porque trabajaban cerca de donde se produjo dicha proliferación o porque eran los propios bañistas o se encontraban cercanos al paseo marítimo. La sintomatología presentada por todos los pacientes incluía fiebre asociada a dificultad respiratoria grave y, en algunos casos, conjuntivitis. Además, 20 personas requirieron una hospitalización prolongada. Este brote tóxico fue observado durante la mayor concentración de *O. ovata* en el agua de mar (1.8×10^6 cél. L⁻¹) y desapareció a medida que la población de esta microalga empezaba a desvanecerse. En 2006 se controló la presencia de *O. ovata* a lo largo de las costas italianas y se detectó una notable proliferación en el Mar Mediterráneo entre julio y agosto del 2006, cuando se prohibió bañarse en varias zonas para evitar o minimizar el número de afectados por el año anterior.

Además, en 2006 también se detectó en la costa española [110] y en 2009 en la argelina [44]. En la costa mediterránea francesa [47] se notificaron 47 intoxicaciones durante proliferaciones también entre el 2006 y 2009. Los síntomas descritos corresponden a irritaciones de la piel inducidas por el contacto directo con células o moco de *Ostreopsis*, junto con irritaciones de las vías respiratorias, así como náuseas, fiebre, mareos, tos y dolores de cabeza inducidos por aerosoles de *O. cf. ovata*. A partir de ahí, anualmente se han ido controlando y detectando las proliferaciones de la especie *Ostreopsis* a lo largo de la costa mediterránea [36,49,86,93,99,111–114].

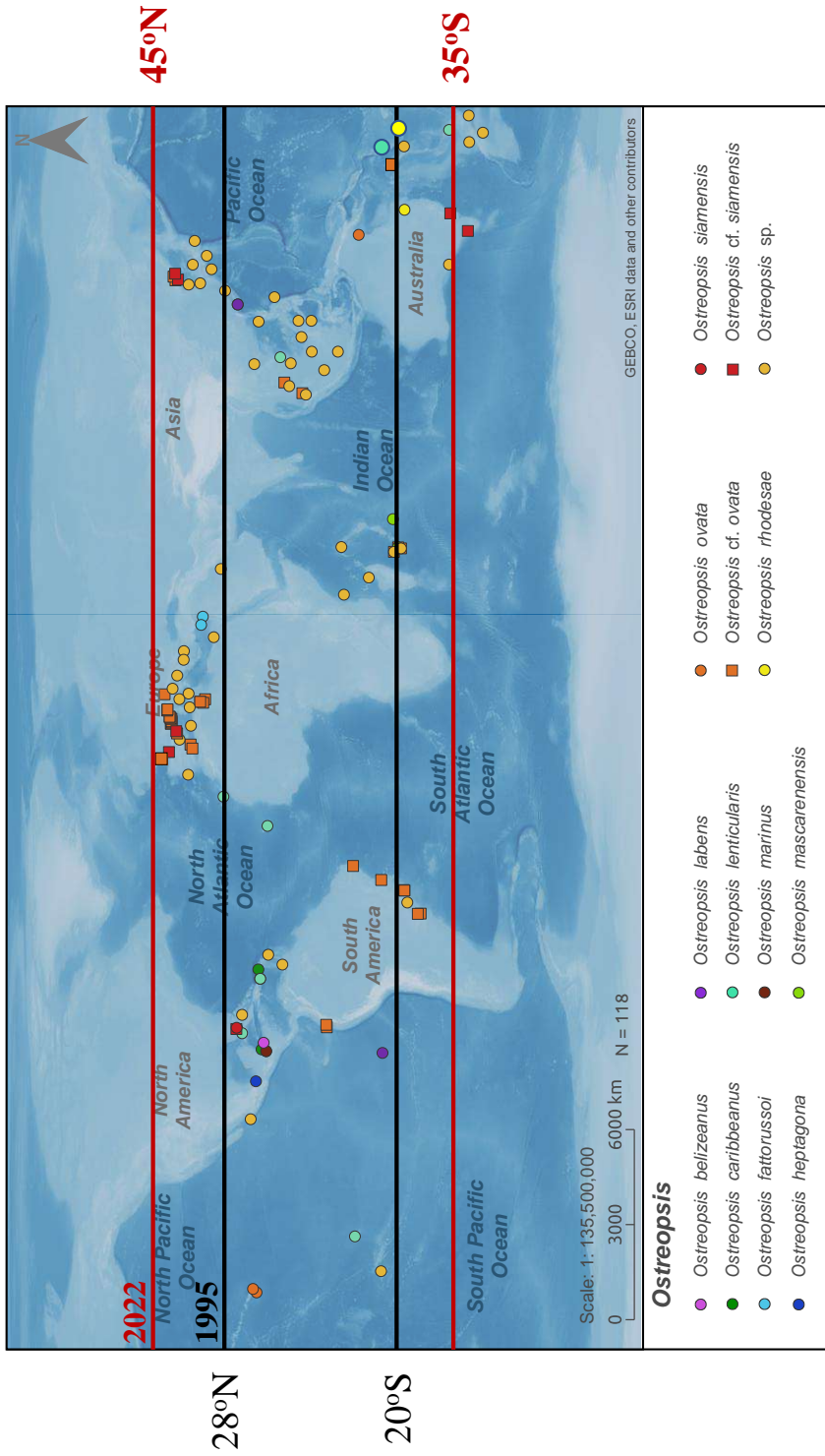


Figura 1.4. Proliferaciones de *Ostreopsis* observadas en el Mar Mediterráneo. Fuente: Figura modificada de Tester et al. (2020) [27] (Incluye los estudios de Chomérat et al. 2022 [95]).

1.2.3. Perfil de toxinas

De las 11 especies descritas taxonómicamente del género *Ostreopsis*, las especies *O. siamensis*, *O. mascarenensis*, *O. cf. ovata* y *O. fattorussoi* son las que producen algunos de los análogos de la PLTX (ovatoxinas, ostreocinas y mascarenotoxinas). La palitoxina (PLTX) es un compuesto polihidroxlado con una cadena larga de carbonos, soluble en agua y con algunas partes tanto lipofílicas/hidrofóbicas (Figura 1.5). Esta toxina, que fue aislada a partir de celenterados marinos (corales blandos) del género *Palythoa*, en particular *Palythoa tuberculosa* [115,116], es una de las toxinas más potentes que existe y es altamente letal en ratones. Además, tal y como se ha ido comentando, la PLTX y sus análogos pueden tener efectos adversos en la salud humana.

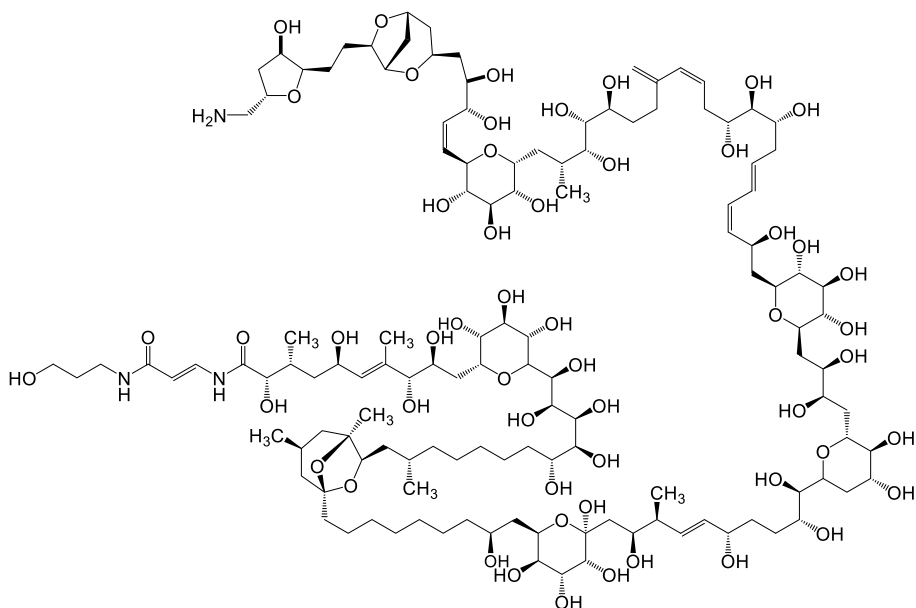


Figura 1.5. Estructura de la PLTX.

El grupo de toxinas producidas por el género *Ostreopsis* es muy amplio según la especie. En la Tabla 1.3, se muestran algunas de las diferentes toxinas que produce *Ostreopsis* en función de la especie, indicándose la localización, su composición elemental (Parte A y B) y la masa. Las dos primeras toxinas que se muestran, PLTX y PLTX-b, son las toxinas que se encuentran en el estándar de Wako Chemicals, compuestos extraídos y procedentes del coral *Palythoa tuberculosa*. La PLTX isobárica (Iso-PLTX) es una toxina similar a la PLTX, tiene la misma fórmula molecular, pero una estructura ligeramente diferente. Esta toxina la produce la especie *O. cf. ovata* y *O. fattorussoi*. Por otro lado, se encuentran las ovatoxinas (OVTXs) que fueron nombradas así a partir de su identificación durante las

proliferaciones tóxicas de la especie llamada *O. cf. ovata* en el Mar Mediterráneo en 2005 [117]. La primera de estas OVTXs para la cual se elucidó su estructura fue la OVTX-a, observándose que presentaba una estructura muy similar a la PLTX pero con dos átomos de oxígeno menos [117–119]. A partir de esta primera caracterización se han ido identificando/caracterizando otros análogos a la PLTX producidos por la especie *O. cf. ovata* como las OVTX-b, -c, -d y -e en el 2010 [120] y, más adelante, las OVTX-f, -g, -h, y -l [121–124] entre 2012–2017. Además, en la especie *O. fattorussoi* se identificaron otros análogos a la PLTX, como las OVTX-i, -j1, -j2 y -k en las costas del Líbano y de Chipre [63,64]. Posteriormente, en la costa de Japón se identificaron análogos a las OVTX-a, -b, -d y -e, los cuales se denominaron OVTX-a AC, -b AC, -d AC y -e AC, respectivamente [125], así como también las OVTX-a IK2, -d IK2 y -e IK2 [126]. Para otras especies de *Ostreopsis* como *O. mascarenensis* y *O. siamensis* también se identificaron otras toxinas, las mascarenotoxinas (McTX) [73] y ostreocinas (OST) (Tabla 1.3) [127–131]. En el Capítulo 2 se comentará con mayor detalle la estructura química de los diferentes análogos de la PLTX que se han estudiado en la presente Tesis (OVTX-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g y la PLTX isobárica -iso-PLTX-).

Tabla 1.3. Lista de algunos de los análogos de la PLTX indicando la especie de *Ostreopsis* que los ha producido, la localización de su detección, su composición elemental y masa molecular.

Toxina	Organismo	Localización	Masa monoisotópica	Parte A Parte B	Ref.
PLTX	Estándar <i>Palythoa tuberculosa</i> (95,8%)	-	2678,4796 $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{48}$	[116]
PLTX-b	Estándar <i>Palythoa tuberculosa</i> (4,2%)	-	2720,4901 $C_{131}H_{225}N_3O_{55}$	-	[132]
Iso-PLTX	<i>O. cf. ovata</i>	NO Mar Mediterráneo Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar de Liguria	2678,4796 $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	$C_{16}H_{28}N_2O_7$ $C_{113}H_{195}NO_{47}$	[64,108– 110,112, 121,122]
	<i>O. sp.</i> (<i>fattorussoi</i>)	Chipre			[64]
OVTX-a	<i>O. cf. ovata</i>	NO Mar Mediterráneo, Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Mar Jónico, Islas Canarias	2646,4898 $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{46}$	[64,97,123 ,124,101, 106,108– 110,112, 121,122]
	<i>O. fattorussoi</i>	Chipre, Líbano			[63,64]

-: No hay datos; NO: Noroeste.

Tabla 1.3 (cont.).

Toxina	Organismo	Localización	Masa monoisotópica	Parte A Parte B	Ref.
OVTX-b	<i>O. cf. ovata</i>	Golfo de Nápoles, NO Mar Mediterráneo, Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Mar Jónico, Islas Canarias, Brasil	2690,5160 $C_{131}H_{227}N_3O_{53}$	$C_{18}H_{32}N_2O_7$ $C_{113}H_{195}NO_{46}$	[64,97, 108– 110,112, 121,122]
OVTX-c	<i>O. cf. ovata</i>	Golfo de Nápoles, NO Mar Mediterráneo, Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Mar Jónico, Islas Canarias, Brasil	2706,5109 $C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	$C_{18}H_{32}N_2O_7$ $C_{113}H_{195}NO_{47}$	[63,64,123, 124,97,101, 108–110, 112,121, 122]
OVTX-d	<i>O. cf. ovata</i>	Golfo de Nápoles, NO Mediterráneo, Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Mar Jónico, Islas Canarias, Brasil,	2662,4847 $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{47}$	[63,64,123, 124,97,101, 108–110, 112,121, 122]
	<i>O. fattorussoi</i>	Chipre, Líbano			[63,64]
OVTX-e	<i>O. cf. ovata</i>	NO Mar Mediterráneo, Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Mar Jónico, Islas Canarias, Brasil	2662,4847 $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{16}H_{28}N_2O_7$ $C_{113}H_{195}NO_{46}$	[63,64,123, 124,97,101, 108–110, 112,121, 122]
	<i>O. fattorussoi</i>	Chipre, Líbano			[63,64]
OVTX-f	<i>O. cf. ovata</i>	NO Mar Mediterráneo Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar de Liguria	2674,5211 $C_{131}H_{227}N_3O_{52}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{115}H_{199}NO_{46}$	[122– 124,135]
OVTX-g	<i>O. ovata</i>	NO Mar Mediterráneo Sud de Cataluña, Mar Adriático, Mar Tirreno, Mar de Liguria, Australia, Brasil, China, Islas Cooks, Caribe, Polinesia Francesa,	2630,4949 $C_{129}H_{223}N_3O_{51}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{45}$	[122,124]

–: No hay datos; NO: Noroeste.

Tabla 1.3 (cont.).

Toxina	Organismo	Localización	Masa monoisotópica	Parte A Parte B	Ref.
OVTX-g	<i>O. ovata</i>	Océano Índico, Japón, Malasia, Nueva Caledonia, Nueva Zelanda, Venezuela, Vietnam	2630,4949 $C_{129}H_{223}N_3O_{51}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{45}$	[122,124]
OVTX-h	<i>O. cf. ovata</i>	Villefranche-sur-Mer (Francia) Mar de Liguria	2632,5105 $C_{129}H_{225}N_3O_{51}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{197}NO_{45}$	[123]
OVTX-i	<i>O. sp.</i>	Chipre	2688,5003 $C_{131}H_{225}N_3O_{53}$	-	[64]
OVTX-j1	<i>O. sp.</i>	Chipre	2704,4952 $C_{131}H_{225}N_3O_{54}$	-	[64]
OVTX-j2	<i>O. sp.</i>	Chipre	2704,4952 $C_{131}H_{225}N_3O_{54}$	-	[64]
	<i>O. cf. ovata</i>	China (sud)			[137]
OVTX-k	<i>O. sp.</i>	Chipre	2720,4901 $C_{131}H_{225}N_3O_{55}$	-	[64]
	<i>O. cf. ovata</i>	China (sud)			[137]
OVTX-l	<i>O. cf. ovata</i>	Mar de Liguria y Sud del Mar Adriático	2660,5054 $C_{130}H_{225}N_3O_{52}$	-	[124]
OST-A	<i>O. siamensis</i>	Japón	2650,4483 $C_{127}H_{219}N_3O_{54}$	$C_{15}H_{26}N_2O_6$ $C_{112}H_{193}NO_{48}$	[131]
OST-B	<i>O. siamensis</i>	Japón, Mar Mediterráneo Atlántico, China (sud)	2650,4483 $C_{127}H_{219}N_3O_{54}$	$C_{15}H_{26}N_2O_6$ $C_{112}H_{193}NO_{48}$	[79,130,137]
OST-D	<i>O. cf. siamensis</i>	Japón, Mar Mediterráneo, Atlántico, Australia, Caribe, Hawaii, Océano Índico, Japón, Mediterráneo, Méjico, Golfo de California, Nueva Zelanda, Norte de África, Tailandia, Venezuela, Vietnam, China (sud)	2634,4534 $C_{127}H_{219}N_3O_{53}$	$C_{15}H_{26}N_2O_6$ $C_{112}H_{193}NO_{47}$	[67,113,115,116,125]
OST-E1	<i>O. siamensis</i>	Japón	2616,4428 $C_{127}H_{217}N_3O_{52}$	$C_{15}H_{26}N_2O_6$ $C_{112}H_{191}NO_{46}$	[131]

-: No hay datos; NO: Noroeste.

Tabla 1.3 (cont.).

Toxina	Organismo	Localización	Masa monoisotópica	Parte A Parte B	Ref.
42-hidroxi-PLTX	<i>Palythoa toxica</i> / <i>Palythoa tuberculosa</i>	Costa de Hawaii Especies de <i>Palythoa</i> (acuuario personal)	2694,4745 $C_{129}H_{223}N_3O_{55}$	-	[138,139]
Deoxi-PLTX	<i>Palythoa</i> cf. <i>toxica</i> <i>Palythoa tuberculosa</i>	Especies de <i>Palythoa</i> crecidas en un acuario personal	2662 $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	-	[138,140]
Homo-PLTX	<i>Palythoa tuberculosa</i>	-	2692 $C_{130}H_{225}N_3O_{54}$	-	[140]
Bishomo-PLTX	<i>Palythoa tuberculosa</i>	-	2706 $C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	-	[140]
NeoPLTX	<i>Palythoa tuberculosa</i>	-	2661 $C_{129}H_{221}N_3O_{53}$	-	[140]
McTX-a	<i>O. ovata</i> , <i>O. mascarenensis</i>	Golfo de Nápoles	2588,4843 $C_{127}H_{221}N_3O_{50}$	-	[132]
McTX-b	<i>O. mascarenensis</i>	Océano Índico, Caribe	2500–2535 -	-	[73]
McTX-c	<i>O. ovata</i>	Golfo de Nápoles	2628,4792 $C_{129}H_{221}N_3O_{51}$	-	[132]
OVTX-a, AC	<i>O. sp.</i>	Japón	-	-	[125]
OVTX-b, AC	<i>O. sp.</i>	Japón	-	-	[125]
OVTX-d, AC	<i>O. sp.</i>	Japón	-	-	[125]
OVTX-e, AC	<i>O. sp.</i>	Japón	-	-	[125]
OVTX-a IK2	<i>O. ovata</i> IK2	Japón	2646,4898 $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{46}$	[126]
OVTX-d IK2	<i>O. ovata</i> IK2	Japón	2662,4847 $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{47}$	[126]
OVTX-e IK2	<i>O. ovata</i> IK2	Japón	2662,4847 $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{16}H_{28}N_2O_6$ $C_{113}H_{195}NO_{47}$	[126]
Liguria-toxina	<i>O. cf. ovata</i>	Mediterráneo	1370–2142	-	[141]
Riviera-toxina	<i>O. cf. ovata</i>	Mediterráneo	-	-	[141]

-: No hay datos; NO: Noroeste.

1.3. Efectos de los análogos de la palitoxina

En las últimas décadas, se han ido documentando casos que relacionan las proliferaciones de *Ostreopsis* con su impacto en la salud de humanos expuestos a esta microalga, lo que ha terminado siendo un problema emergente [45,46,110,142,143]. La PLTX y sus análogos se han relacionado con intoxicaciones alimentarias graves en el trópico debido a la ingesta de mariscos, crustáceos y peces contaminados [144–146]. Por ejemplo, en Madagascar (1994) una mujer murió 15 horas después de haber ingerido una pequeña porción de sardinas (*Herklotsichthys quadrimaculatus*) pescadas en la misma zona de proliferaciones y que posiblemente podrían estar contaminadas [147]. A su vez, su gato también murió a los 15 minutos de haber ingerido otra porción de las mismas sardinas. El análisis de las cabezas de pescado (congeladas) potencialmente contaminadas se analizaron dos años más tarde. Los resultados de estos análisis revelaron la presencia de un compuesto similar a la PLTX, lo que permitió establecer una relación entre esta toxina y la probable causa de la intoxicación. En el Mediterráneo, irritaciones cutáneas y respiratorias observadas en bañistas de las zonas de proliferación, se han asociado al contacto con el agua y la inhalación de aerosoles marinos, los cuales podrían contener las toxinas [24,114,143,148]. Finalmente, también hay que indicar que la mortalidad de erizos y mejillones en las zonas afectadas también se ha llegado a relacionar con la presencia de estas toxinas en el agua [43,86,106].

1.3.1. Mecanismo de acción de la palitoxina, estudios toxicológicos y sus efectos

El mecanismo de acción de PLTX se centra básicamente en bloquear la acción de la enzima Na^+/K^+ ATPasa, la cual se encarga de mantener el gradiente de potencial químico de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática de las células de los organismos vivos. Dicha bomba de sodio/potasio contribuye substancialmente al mantenimiento del potencial de membrana de la célula, proporcionando la base para la comunicación neuronal y contribuyendo a la regulación osmótica del volumen celular. La alteración de esta bomba puede inducir indirectamente una cascada de efectos en la célula, incluyendo la disminución del pH. En este contexto, la PLTX puede afectar a la bomba Na^+/K^+ transformándola en un canal iónico a través del cual los iones Na^+ y K^+ pueden fluir más fácilmente y más rápidamente a favor de su gradiente de concentración [149–151]. Este efecto hace que aumente la concentración de Na^+ en el espacio citoplasmático igualándola a la concentración extracelular y disminuyendo así la concentración de K^+ en el citosol hasta igualarla con la concentración extracelular, lo que termina deteniendo el transporte de iones. Por otro lado, la entrada de Na^+ en la célula a través de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa puede activar la bomba Na^+/H^+ para eliminar el exceso de iones Na^+ , aumentando la concentración

de protones H^+ . En consecuencia, la acidificación de la célula lleva a la muerte celular afectando de manera letal al organismo [152].

La PLTX parece actuar directa o indirectamente a diferentes niveles celulares, causando efectos que van desde reacciones inflamatorias hasta la muerte celular. Por ello, se ha visto la necesidad de definir las dosis que pueden producir los diferentes efectos nocivos en los organismos, y estimar su potencial tóxico según las vías de exposición. Se han realizado numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*, con el fin de evaluar los riesgos de la PLTX y sus análogos. Los modelos *in vitro* suelen reflejar el efecto en un solo tipo de tejido ofreciendo una visión más restringida de la farmacocinética y el metabolismo a diferencia de los modelos *in vivo* donde estos factores son más importantes. Los estudios *in vivo* proporcionan la dosis letal media (LD_{50}) que representa la dosis de una sustancia que se requiere para causar la muerte del 50% de los animales de prueba (generalmente ratas o ratones) a los que se les administra. La LD_{50} normalmente se expresa en términos de la cantidad de sustancia por unidad de peso corporal del animal de prueba (p. ej., miligramos o microgramos por kilogramo, $mg\ kg^{-1}$, $\mu g\ kg^{-1}$). Un valor LD_{50} más bajo indica un nivel más alto de toxicidad, ya que se requiere una cantidad más pequeña de la sustancia para causar la muerte en los animales de prueba. Por otro lado, antes de comentar los diferentes estudios realizados es necesario tener en cuenta también el término NOAEL (Nivel Sin Efecto Adverso Observado), término utilizado en toxicología y evaluación de riesgos para describir la dosis más alta de la sustancia estudiada o nivel de exposición a ella más elevado, por debajo del cual no se han observado efectos adversos en un organismo o grupo de organismos en particular. La determinación de estos niveles permite establecer un umbral de seguridad para la exposición a la sustancia en cuestión. Aunque los valores LD_{50} y NOAEL no son directamente aplicables en humanos, ya que los efectos de una determinada sustancia pueden variar según factores como la edad, la salud y otras diferencias individuales, se suelen utilizar estos valores estimados en animales como punto de partida para establecer niveles de exposición seguros en humanos. Además, Nair y Jacob (2016), propusieron un método simple y práctico para convertir las dosis de drogas o químicos estimadas en animales (NOAEL) a los niveles correspondientes en humanos. Este método pretendía servir de guía para ayudar a los investigadores, médicos y autoridades reguladoras a tomar decisiones informadas sobre el uso seguro y eficaz de medicamentos o productos químicos en humanos [153]. La guía utiliza una fórmula simple que tiene en cuenta las diferencias en el peso corporal y en el área superficial entre humanos y animales. Por ejemplo, para convertir la dosis animal en la dosis equivalente en humanos se debe dividir la dosis en ratones por 12,3 y la de ratas por 6,2, valores que se indican en la Tabla 1 de Nair y Jacob (2016).

En 1964, se llevaron a cabo algunos estudios de exposición en animales usando la toxina semipurificada de la *Palythoa vestitus*. En estos estudios, una serie de animales de ambos géneros (monos, cobayas, conejos, perros, ratas y ratones) se expusieron a la PLTX (posiblemente mezclada con 42-OH PLTX) utilizando varias vías de exposición [154] con el objetivo de evaluar su toxicidad. En estos estudios, se observó que la vía de exposición más significativa era la intravenosa, obteniendo valores de LD₅₀ (24 h) que oscilaban entre 0,025 y 0,45 µg kg⁻¹. Mientras que los valores de LD₅₀ por vía intraperitoneal, intramuscular, subcutánea e intratraqueal eran de tan solo 0,24–0,63 µg kg⁻¹, los obtenidos a partir de experimentos de exposición por vías intragástrica e intrarrectal eran más elevados (>40, >10 µg kg⁻¹), indicando una toxicidad mucho menor. A pesar de que a partir de este estudio se han realizado numerosos trabajos *in vivo* e *in vitro*, este trabajo sigue siendo la evaluación más completa sobre los riesgos potenciales de exposición de mamíferos a la PLTX de la que se dispone hasta la fecha.

La Tabla 1.4 muestra un resumen de algunos de los estudios que se han llevado a cabo sobre toxicidad y donde se indican las LD₅₀ según la ruta de exposición *in vivo*, el tipo de animal, la toxina administrada y el organismo del cual procede la toxina. Los valores más pequeños de LD₅₀ se han obtenido en los estudios de exposición por inhalación y por vía intravenosa en ratas/ratones, indicando que estas son las vías de exposición más peligrosas. Por otro lado, parece que las vías intragástrica, intrarrectal e intraperitoneal serían las menos peligrosas, ya que presentan los valores de LD₅₀ más elevados [154]. Estudios posteriores en los que se han tenido en cuenta otras rutas de exposición (como el aerosol) además de las ya comentadas han observado los valores más altos de LD₅₀ para las ruta intraperitoneal (0,29 y 1,81 µg kg⁻¹ para la PLTX) [155].

La principal ruta de riesgo de exposición en Europa y, en particular, en el Mediterráneo, se ha asociado a la inhalación de los aerosoles y al contacto directo con la piel [156]. Sin embargo, solo hay un estudio de toxicidad por inhalación en ratas en el que se indica un valor de LD₅₀ (24 h) de 0,041 µg kg⁻¹ para la PLTX y 0,031 µg kg⁻¹ para la OVTX-a (mezcla de OVTX-a/d/e, mayoritariamente OVTX-a) [155]. En cuanto a la vía de exposición subcutánea se han determinado valores de LD₅₀ de 0,40 µg kg⁻¹ en ratas y 1,39 µg kg⁻¹ en ratones [154].

Por otro lado, los primeros estudios *in vivo* en ratones para evaluar la toxicidad aguda por vía oral de la PLTX mostraron unos valores de LD₅₀ (24h) muy elevados que oscilaban entre 510 y 767 µg kg⁻¹ [157,158], con alteraciones tisulares visibles por microscopía óptica en el antestómago, el hígado y el páncreas, y cambios ultraestructurales, en miocardio, músculo esquelético y riñones y un valor de NOAEL de 300 µg kg⁻¹. Unos años más tarde, en estudios en los que se prolongó la administración oral de la PLTX a 96 h, se obtuvieron los mismos valores de LD₅₀

(510 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [159]. Sin embargo, los valores de NOAEL estimados fueron 10 veces más bajos (30–36 $\mu\text{g kg}^{-1}$) observando alteraciones a nivel gastrointestinal, hepático, pulmonar y cardíaco [159,160]. Ese mismo año, en otro estudio prolongando el tiempo de exposición oral a 28 días se determinaron unos valores de LD₅₀ de 0,44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y un NOAEL de 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, registrándose alteraciones macroscópicas y microscópicas en el tracto gastrointestinal a dosis $\geq 0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ [161].

Tabla 1.4. Toxicidad de la PLTX y algunos de sus análogos en función de la vía de exposición y del animal expuesto.

Ruta de exposición	Animal	Toxina (Organismo procedente)	LD ₅₀ (24h) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ref.
Intravenosa	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,089	[154]
	Ratón	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,045	[154]
Intraperitoneal	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,63	[154]
	Rata	PLTX (<i>Palythoa tuberculosa</i>)	1,81	[155]
	Rata	*OVTX-a/d/e (<i>Ostreopsis ovata</i>)	3,26	[155]
	Ratón	PLTX (<i>Palythoa tuberculosa</i>)	0,45	[147]
	Ratón	OST-D (<i>Ostreopsis siamensis</i>)	0,75	[127]
	Ratón	PLTX (<i>Palythoa tuberculosa</i>)	0,295	[155]
	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,24	[154]
Intragástrica	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	>40,0	[154]
Intrarrectal	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	>10,0	[154]
Intratraqueal	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,36	[154]
Aerosol	Rata	PLTX (<i>Palythoa tuberculosa</i>)	0,041	[155]
	Rata	*OVTX-a/d/e (<i>Ostreopsis ovata</i>)	0,031	[155]
Subcutánea	Rata	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	0,40	[154]
	Ratón	PLTX (<i>Palythoa vestitus</i>)	1,39	[154]
Oral	Ratón	PLTX (<i>Palythoa tuberculosa</i>)	♦0,44	[161]

*Extracto de una muestra de *Ostreopsis cf. ovata* que contenía una mezcla de OVTX-a/d/e, siendo la OVTX-a mayoritaria.

♦Valor LD₅₀ dado para la exposición durante 28 días.

Respecto a los efectos observados, después de la exposición por vía intraperitoneal de la PLTX [155] o de la mezcla de OVTX-a/d/e [119] (extracto de *O. cf. ovata*) en ratones, éstos comenzaron a retorcerse, presentaron convulsiones y sus extremidades se paralizaron, muriendo durante los 30–84 minutos siguientes. Respecto a la exposición por vía intratraqueal, se observó disnea y convulsiones (al igual que pasó a la exposición por vía intravenosa e intramuscular) [154]. La

exposición de la PLTX por vía intramuscular y subcutánea también produjo irritación local en el lugar de la inyección [154]. Además, un estudio reciente realizado *in vitro* confirmó la elevada toxicidad de extractos de *O. cf. ovata* en tejidos de piel, ojos y cerebro [162]. La vía de exposición por inhalación produjo congestión pulmonar e inflamación traqueal, entre otros, e incluso algunas ratas exhibieron costras alrededor de los párpados y las fosas nasales [155]. Sin embargo, la marcada diferencia en la toxicidad cuando la PLTX se administró por vía intragástrica o intrarrectal en comparación con las otras vías todavía no se ha explicado.

Por otro lado, estudios *in vitro* realizados recientemente han observado que la OVTX-a y -d podían provocar una toxicidad menos aguda (menos citotóxicos) que la PLTX, y mientras la PLTX y la OVTX-a afectaban a la barrera intestinal, la OVTX-d necesitaba una concentración mayor para observar el mismo efecto [163]. Por el contrario, otro estudio *in vitro* que también avalaba la menor toxicidad de la OVTX-a indicando que era unas 100 veces menos tóxica que la PLTX [164], observó que su citotoxicidad en concentraciones nanomolares después de un tiempo de exposición corto genera cierta preocupación para la salud humana. Además, se ha demostrado que la PLTX y sus análogos (OVTXs) aumentan el nivel de codificación de ARNm para proteínas involucradas en reacciones inflamatorias [165], lo que podría explicar los síntomas que se encuentran en humanos después de la inhalación o el contacto con la piel.

Aunque en el Mediterráneo no se han descrito casos por intoxicación en humanos, en vista a la alta toxicidad de la PLTX observada en animales y al riesgo que puede suponer para la salud humana [135,166–170], la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda la PLTX con un límite máximo de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la carne de mariscos [171] teniendo en cuenta una persona de 60 kg que puede consumir 400 g de marisco.

1.3.2. Efectos en organismos marinos

Las proliferaciones de *Ostreopsis* pueden afectar negativamente al entorno donde proliferan, llegando a afectar a los organismos que se encuentran en la zona. Se desconoce si *Ostreopsis* produce una/s toxina/s que específicamente serían nocivas para los organismos marinos o si es debido a la masa de mucílago que impide la difusión de gases y los organismos mueren por limitación de oxígeno. Hay que destacar las proliferaciones ocurridas en la zona de Australia, donde se encontraron rastros de microalgas en crustáceos y moluscos muertos [80]. En erizos de Nueva Zelanda (vulnerables a las proliferaciones de *Ostreopsis cf. siamensis*) se observó la pérdida de espinas e incluso les provocó la muerte [105]. En las Filipinas se detectó PLTX en cangrejos de acuicultura y se vinculó a la muerte de dos humanos [172]. En la costa de Brasil también se detectó una proliferación que provocó la muerte de

erizos de mar [173]. Los organismos omnívoros y herbívoros son los que tienen los niveles más altos de toxinas ya que se alimentan directamente de las macroalgas en las cuales prolifera el *Ostreopsis* [135,169,170]. Por ello, hay que destacar que los erizos de mar son los organismos que más análogos de la PLTX acumulan, con concentraciones de 3 a 10 veces superiores al umbral de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ definido por la EFSA para la PLTX [112,168].

Existen diferentes estudios que se centran en la toxicidad de *O. cf. ovata* en organismos invertebrados y vertebrados. Por ejemplo, en los estudios de Simonini et al. (2011) se expuso un organismo invertebrado como el poliqueto *Dinophilus gyrociliatus* a muestras de agua de mar que contenían células de *O. cf. ovata*. En los experimentos realizados con células recolectadas a mediados de verano, se observó una mortalidad de estos organismos mucho más elevada que en aquellos experimentos donde las células de *Ostreopsis* se recolectaron a finales de verano [174]. Otros experimentos que se llevaron a cabo con *Artemia salina* (especie de crustáceo) indicaron que esta especie es de las más sensibles a la presencia de *O. cf. ovata* observándose la mortalidad de estos crustáceos cuando son expuestos a tan solo 10 cél. mL^{-1} de *Ostreopsis* en fase exponencial [175,176], mientras no se observó la misma mortalidad para las larvas de *Dicentrarchus labrax* (vertebrados) hasta que las células de *O. ovata* no llegaron a las $1000 \text{ cél. mL}^{-1}$. Por otro lado, se ha demostrado la bioacumulación de las toxinas en mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* durante proliferaciones de *O. cf. ovata*, junto a una inhibición de la actividad N^+/K^+ -ATPase produciéndose a la vez alteraciones de las respuestas inmunológicas, lisosomales y neurotóxicas [177].

1.4. Problemática en Sant Andreu de Llavaneres

Desde principios del siglo XXI se han ido produciendo brotes de afecciones respiratorias y cutáneas en humanos coincidiendo con las proliferaciones de *Ostreopsis* en playas del Mediterráneo. Este hecho ha llevado a estudiar la posible relación de estas proliferaciones con los síntomas observados despertando el interés por estudiar las proliferaciones anuales de esta especie y la producción de toxinas durante estos eventos [49]. En este contexto y en las últimas décadas, la playa de Sant Andreu de Llavaneres ($41^\circ 33,13' \text{ N}$; $2^\circ 29,54' \text{ E}$) en la costa catalana ha sido una zona de proliferaciones recurrentes (anuales) de *O. cf. ovata* y en las proliferaciones de los últimos años son en las que se han centrado los estudios llevados a cabo en esta Tesis [36,50,178].

El primer brote de síntomas respiratorios en habitantes de la zona de la Playa de Sant Andreu de Llavaneres se observó en 1998 coincidiendo también con la mortalidad de parte de la fauna bentónica [43]. En el verano de 2004 se registraron 74 casos de trastornos respiratorios (con hasta 200 personas potencialmente

afectadas) que a la vez coincidió con la presencia de la microalga [43,142]. Posteriormente, en 2006, un nuevo brote afectó a 37 personas en Sant Andreu de Llavaneres aunque en esta ocasión no fue posible establecer una relación directa con la presencia de la microalga, ya que las muestras de agua de mar se tomaron dos días después de reportarse la irritación respiratoria [179]. Se detectaron algunos síntomas como irritación de mucosas e infecciones de heridas en parte de la población que vivía o trabajaba en esta zona de playa y que había estado expuesta a la microalga en el periodo de verano [49,50]. Sin embargo, en esta ocasión las densidades de células de *O. cf. ovata* en el plancton fueron muy bajas (del orden de 2×10^3 células L^{-1}).

La problemática y el estudio de las proliferaciones de *Ostreopsis* en la Playa de Sant Andreu de Llavaneras se estudian más ampliamente en el Capítulo 3 (sección 3.1.2), indicándose detalles del muestreo anual de las proliferaciones de *O. cf. ovata* junto con el análisis individual de las toxinas producidas por esta especie. Por otro lado, en el Capítulo 2 se abordan las técnicas analíticas para la determinación de estas toxinas en muestras de agua (macroalga). Además, la exploración del papel de los nutrientes en las proliferaciones y su toxicidad se incluyen en el Capítulo 3, así como el estudio de la aerosolización de estas toxinas utilizando muestras recolectadas durante las proliferaciones de *O. cf. ovata*, detallado en el Capítulo 4.

1.5. Factores implicados en las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata*

Los factores que dan lugar a las proliferaciones del dinoflagelado *O. cf. ovata* y que facilitan la producción de especies tóxicas aún no se conocen bien. Se trata de un fenómeno complejo vinculado a muchos factores que interactúan, incluidas las actividades humanas. Por ejemplo, las proliferaciones de *O. cf. ovata*, al igual que ocurre con otras HABs, pueden haberse visto influenciadas por la eutroficación de aguas costeras, la construcción de puertos o el cambio climático global [14,180–182]. Pistocchi et al. (2011) resume en una tabla los datos sobre la presencia de especies de *Ostreopsis* en algunas áreas tropicales y templadas y los factores ambientales (temperatura, salinidad y nutrientes) en el momento de la proliferación [183].

Algunos de los factores ambientales más importantes que pueden llegar a influir en las proliferaciones de *O. cf. ovata* son:

- **Temperatura:** Éste parece ser un factor clave en la proliferación de *O. cf. ovata* en aguas templadas [37,98]. Sin embargo, los estudios publicados no parecen ser concluyentes sobre el efecto de la temperatura del agua sobre la producción de toxinas ya que existen pocos datos disponibles y parece haber una cierta incoherencia en los resultados. En la Tabla 1.5 se muestran algunos datos de las temperaturas a las cuales se ha producido la máxima abundancia celular y la máxima producción de toxinas. En general, se sugiere que, en el contexto de cambio climático, el incremento

de temperatura podría favorecer la proliferación de *Ostreopsis* como observaron Wu et al. (2021) a 30–32,5°C [184], Granéli et al. (2011) a 26–30°C [185] y Manganelli et al. (2007) a 28°C [186]. También, Gemin et al. (2021) observó una mayor abundancia celular en cultivos de *O. cf. ovata* recolectados en la costa francesa (NW Mediterráneo) a una temperatura de 27°C [187], mientras que otros estudios detectaron un mayor crecimiento celular a menores temperaturas (25–24°C) [188]. Por otro lado, hay estudios que indican una mayor abundancia celular a unas temperaturas todavía más bajas, entre 20–25°C [75,189], incluso Selina et al. (2010) observó la máxima abundancia de *Ostreopsis* spp. en aguas japonesas a una temperatura de 9°C [60]. Estos hechos demuestran que la relación entre la temperatura y el aumento de la abundancia celular no está del todo clara, ya que posiblemente influyen muchos otros factores [188]. Respecto a la concentración de toxina en las células, en general, tal y como se observa en la Tabla 1.5, la mayor concentración se encuentra a una temperatura por debajo de la óptima indicada para el crecimiento celular [185,187,188]. En cambio, Pezzolesi et al. (2012) observó una mayor concentración celular de *Ostreopsis* (recolectado en el Mar Adriático) a 20°C y una mayor concentración de toxinas a una temperatura mayor (25°C) [75]. En resumen, el impacto definitivo de la temperatura en la dinámica de la proliferación podría ser más complejo que un simple factor facilitador del crecimiento de algas.

Tabla 1.5. Temperaturas a las que se han observado la máxima abundancia celular y el máximo contenido de toxina celular en cultivos de *Ostreopsis cf. ovata* recolectado en diferentes zonas.

Origen de la cepa <i>O. cf. ovata</i>	Temperatura en la máx. abundancia celular	Temperatura en el máx. contenido de toxina celular	Ref.
Isla Hainan (China)	30, 32,5°C	-	[184]
Mar Tirreno (Italia)	26–30°C	20–22°C	[185]
Génova (Italia)	28°C	-	[186]
NO Mediterráneo (Francia)	27°C	23°C	[187]
Japón	24–25°C	25°C	[188]
NO Mediterráneo (Mónaco)	21–25°C	-	[189]
Génova (Italia)	ND	>20°C	[190]
Adriático (Italia)	20°C	25°C	[75]

-: No hay datos.

En una escala de tiempo estacional/anual, Vila et al. (2016) ilustra cómo la proliferación va aumentando a medida que aumenta la temperatura y también disminuye la intensidad del viento, en primavera/verano. En otoño, la disminución progresiva y el aumento del viento, llevan a la desaparición de la proliferación [49].

Droeut et al. (2022), estudiando la serie temporal de seguimiento de *Ostreopsis cf. ovata* durante 13 años en Mónaco, observó que cuanto más cálida y más temprana era la primavera, más pronto ocurriría la proliferación [189].

- **Intensidad lumínica:** La intensidad lumínica en el mar disminuye con la profundidad y en algunos estudios se ha observado que la abundancia de células de *Ostreopsis* también disminuía simultáneamente, indicando la covariación de ambos factores (luz y profundidad) en la distribución y la proliferación de la microalga [41,86,135,191,192]. En algunos estudios se ha observado que *O. cf. ovata* es capaz de crecer bajo irradiaciones de intensidad lumínica que varían entre 50 y 650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [108,193], presentando mayores abundancias celulares a una mayor intensidad de luz (400–600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [187]. Sin embargo, la exposición a la luz también puede desempeñar un papel importante en la producción de toxinas, observando que las células de *O. cf. ovata* produjeron menos toxinas a medida que aumentaba la profundidad y en consecuencia disminuye la irradiación [135], lo que está de acuerdo con estudios previos que sugieren que hay una correlación entre la irradiación y la producción de toxinas, tanto en cultivos como en muestras de campo [191,194,195].

En cambio, un estudio que combinó los dos factores comentados anteriormente (temperatura y luz), observó que a una temperatura de 22°C y condiciones de luz durante un período largo de iluminación (15h luz:9h oscuridad), la concentración de toxinas en la fase exponencial (cuando las células se van reproduciendo) fue menor en comparación con las células que crecieron a menor temperatura (18°C) y bajo un período un poco más corto de luz (12:12, 125 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) [108], resultados que demuestran que es difícil entender los parámetros óptimos en su crecimiento y producción de toxinas.

- **Hidrodinamismo:** Se ha sugerido que el hidrodinamismo del mar también tiene un papel importante en el desarrollo de las proliferaciones de HABs en general, y también en la de *Ostreopsis* [37]. La hidrodinámica moderada parece favorecer que las células de *O. cf. ovata* permanezcan adheridas al sustrato [14,86,105,196], mientras que un mar más agitado y con corrientes ayudaría a su dispersión.

- **Salinidad:** Entre los diferentes parámetros químicos y físicos, la salinidad es probablemente el que menos varía con el periodo estacional en el Mediterráneo. Sin embargo, las áreas costeras que se encuentran bajo la influencia del aporte de agua dulce de los grandes ríos son las que pueden experimentar unas fluctuaciones más importantes (tal es el caso del Mar Báltico, por ejemplo). Esta variabilidad de la salinidad puede afectar a las proliferaciones. En el caso de *Ostreopsis*, Pezzolesi et al. (2012) observó que se producía una mayor abundancia celular a salinidades de entre 36 y 40, mientras que el mayor contenido de toxina en células se producía a 32–

36, disminuyendo a salinidades mayores, por ejemplo de 40 [75]. Por otro lado, otras observaciones indican que parece haber una correlación negativa entre el crecimiento de algunas especies de *Ostreopsis* y la salinidad [197,198].

- **Nutrientes:** El papel de la disponibilidad de nutrientes en la dinámica de las proliferaciones de *Ostreopsis* sigue siendo un tema complejo. Aunque la relación de concentraciones entre nitrógeno y fósforo (N:P) puede estar relacionada con el inicio de la proliferación [199], no se ha establecido aún una relación directa entre las concentraciones de nutrientes inorgánicos y la abundancia celular de *O. cf. ovata* durante los períodos de proliferación [91,103,183,200]. En el Capítulo 3 de esta Tesis se estudiará el efecto de la disponibilidad de nutrientes (fuentes orgánicas e inorgánicas) en el crecimiento y producción de toxinas de la especie *O. cf. ovata* para aportar datos nuevos.

- **Sustrato:** *Ostreopsis* tiene una ecología bentónica y crece adherido y colonizando una variedad de sustratos mediante la producción de un mucílago o *mucus*. Este mucílago es una estructura compleja formada por una red de fibras expulsadas a través de los poros de la teca y formada por una matriz de polisacáridos ácidos [84,87]. Se han observado células de *Ostreopsis* en muchos sustratos, por ejemplo, rocas, guijarros, macroalgas, mejillones, piezas de plástico o sedimentos, lo que lo convierte en un organismo epifítico, epilítico y epizoico [41,59,86,103]. Muy probablemente, esta versatilidad en cuanto al sustrato sea una de sus capacidades que explicarían su expansión biogeográfica.

A pesar de la cantidad de estudios sobre los diferentes factores que pueden tener un efecto en el crecimiento de *O. cf. ovata* y en producción de toxinas, las condiciones óptimas aún no están claras y, además, las diferentes condiciones para su crecimiento y producción de toxinas varían según la cepa de *Ostreopsis* estudiada. Esta Tesis contribuirá a aportar nueva información sobre la implicación de los nutrientes en la producción de toxinas.

1.6. Métodos de análisis para la determinación de las toxinas producidas por *Ostreopsis*

Existen diversos métodos para la detección de las toxinas producidas por *Ostreopsis*, por ejemplo, los métodos *in vivo*, *in vitro*, inmunológicos y los métodos químicos. Los métodos de bioensayo *in vivo* suelen utilizar ratones a los que se les inyecta intraperitonealmente las toxinas o extractos de marisco [201,202] para observar los diferentes efectos que causan en estos animales. Generalmente se ha observado que las toxinas producen estiramiento y debilitamiento de las extremidades de los ratones, ataxia, disminución de la locomoción, convulsiones, dificultad para respirar y finalmente la muerte. Estos métodos *in vivo* presentan la controversia de

que no son éticamente aceptables y, de hecho, en Europa se ha prohibido su utilización en este campo. Además, suelen presentar poca selectividad siendo difícil identificar el compuesto responsable del efecto observado. Sin embargo, los ensayos *in vitro*, basados en el efecto toxicológico que se observa al exponer una línea celular a la PLTX o la propia unión de la toxina a un receptor [203–205] no requieren reactivos caros ni estabularios.

A principios de los años 80, Habermann et al. (1981) describió la acción hemolítica retardada de PLTX en los glóbulos rojos de mamíferos liberando al medio la hemoglobina y llevando a cabo su medición espectrofotométrica a 405 nm [206]. Bignami et al. (1993) desarrolló el primer ensayo hemolítico para la PLTX utilizando sangre de ratón (considerada más sensible al efecto de la PLTX). A partir de aquí se han ido aplicando algunas modificaciones (parámetros u origen de los glóbulos rojos) [207]. En este contexto, en los últimos años Riobó et al. (2008) propuso la Ouabaína como un inhibidor competitivo ante la PLTX, un compuesto de fácil adquisición que se mantiene a temperatura ambiente y estable en el tiempo [208]. En este estudio se observó que la Ouabaína presentaba los mismos sitios receptores en la membrana de los eritrocitos en estudio que la PLTX. La Ouabaína es un bloqueador altamente específico de la bomba de Na^+/K^+ por lo que la inhibición de la hemólisis por Ouabaína se consideró como un indicador de la presencia de PLTX o compuestos similares a la PLTX [208–210]. Por otro lado, otros estudios indicaron que hay sitios de unión de la PLTX a células epiteliales que son insensibles a la Ouabaína [211]. Por ello, el ensayo hemolítico puede ser un método muy rápido para la determinación de la actividad hemolítica de la PLTX, aunque sigue requiriendo el uso complementario de métodos confirmatorios para relacionar la respuesta con la toxina causante de la misma.

Por otro lado, los métodos inmunológicos se basan en el reconocimiento de una determinada parte de la molécula de PLTX por un anticuerpo [42,211–213]. Sin embargo, como el anticuerpo solo reconoce una parte de la molécula, la similar estructura con las OVTXs puede provocar una subestimación o una sobreestimación de la concentración real de PLTX, y aun así se debe realizar la confirmación de la toxina.

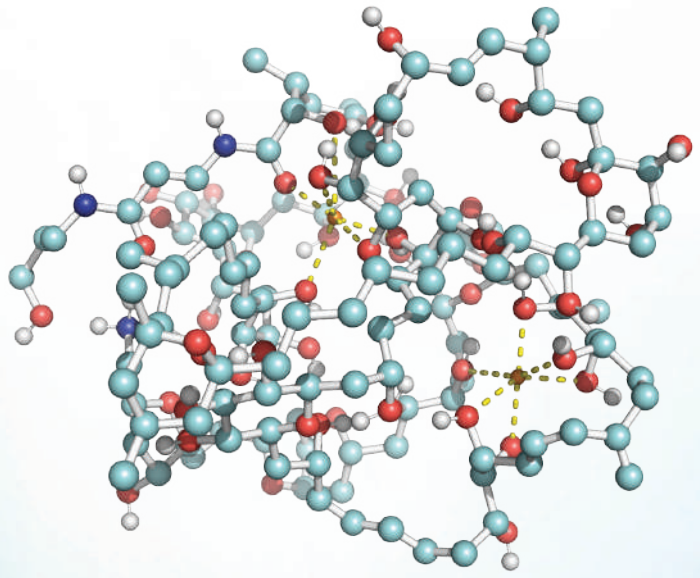
Los métodos químicos basados en la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) son los que suelen utilizarse para identificar y cuantificar individualmente cada una de las toxinas producidas por el *Ostreopsis*.

1.6.1. Técnicas de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS)

La cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica (UV-vis) ha sido ampliamente utilizada para la determinación de la PLTX en diferentes tipos de muestras (plancton, dinoflagelados, mejillones, erizos, peces, etc.) [214,215]. Hoy en día, la separación cromatográfica de las toxinas producidas por el dinoflagelado *O. cf. ovata* (análogos a la PLTX) se suele llevar a cabo con columnas de fase invertida (fase estacionaria C18) y fases móviles compuestas por acetonitrilo y agua. Además, con la implantación de los sistemas de espectrometría de masas en los laboratorios de control, hoy en día es habitual el acoplamiento de los sistemas cromatográficos a la espectrometría de masas, utilizando para ello la fuente de ionización de electrospray (ESI) y un analizador de masas de alta resolución (HRMS) como el Orbitrap [114,124,216]. Estas técnicas basadas en la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) ofrecen unas altas capacidades para la detección de las toxinas en matrices complejas, proporcionando además información estructural importante para la caracterización de las moléculas detectadas, y permitiendo a la vez un análisis cuantitativo selectivo, sensible y de gran calidad.

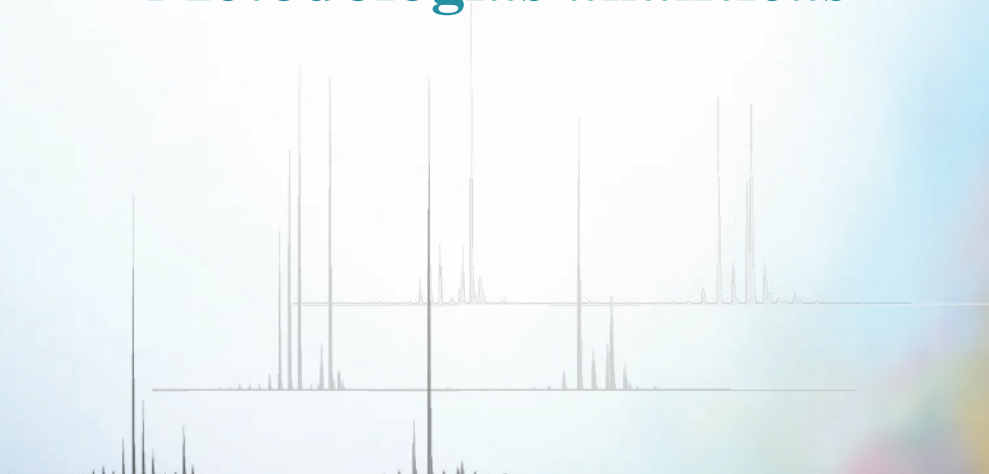
En el perfil del espectro de masas de estas moléculas (PLTX y OVTXs) suelen identificarse un gran número de iones mono y multicargados que se han generado en fase gas durante el proceso de ionización por ESI. Estos iones pueden proceder de procesos de transferencia de protones, así como de la formación de aductos con cationes monovalentes y divalentes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}). Además, pueden generarse también algunos iones fragmento debido a procesos de disociación inducida por colisión en la fuente (CID en la fuente) como por ejemplo los iones en los que se han perdido moléculas de agua, ya que estos compuestos presentan un elevado número de grupos hidroxilo en su estructura química. El perfil del espectro ESI-HRMS se utiliza como huella dactilar en la identificación de la PLTX isobárica y las OVTXs producidas por *Ostreopsis cf. ovata*.

En el Capítulo 2 se detallan los diferentes sistemas de análisis, detección y cuantificación utilizados en la presente Tesis.



CAPÍTULO 2.

Metodologías analíticas



CAPÍTULO 2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

En este capítulo se evalúan las metodologías analíticas para la identificación de las toxinas generadas por el dinoflagelado *Ostreopsis cf. ovata* (análisis cualitativo) y para la determinación de su concentración (análisis cuantitativo). Esta información es importante para estimar la dimensión tóxica de la proliferación y evaluar los riesgos potenciales que puede conllevar para la salud humana y el medio ambiente. En este contexto, la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) suele ser la técnica analítica utilizada para estudiar las diferentes toxinas que se encuentran en las muestras de *O. cf. ovata*, ya que proporciona una alta sensibilidad y especificidad en la determinación de estos analitos en matrices complejas. Sin embargo, se ha visto que aún hay algún problema y un cierto margen de mejora en los métodos que hasta ahora se han publicado y utilizado. En esta Tesis, se evalúan las diferentes etapas en el procedimiento de análisis de las toxinas generadas por el *O. cf. ovata* con el objetivo de proponer un método de determinación de dichas toxinas utilizando la cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-HRMS) que mejore los métodos actualmente existentes. En el desarrollo de esta metodología se estudia el comportamiento de los análogos pertenecientes a la familia de la palitoxina durante el proceso de ionización y de adquisición de datos, y se optimizan las condiciones de trabajo para lograr la máxima robustez en la determinación de estos compuestos. Además, por primera vez, se estudia la capacidad de la movilidad iónica como herramienta para el análisis de esta familia de toxinas con el objetivo de poder disponer de un parámetro adicional en la identificación/confirmación de su presencia en las muestras de estudio.

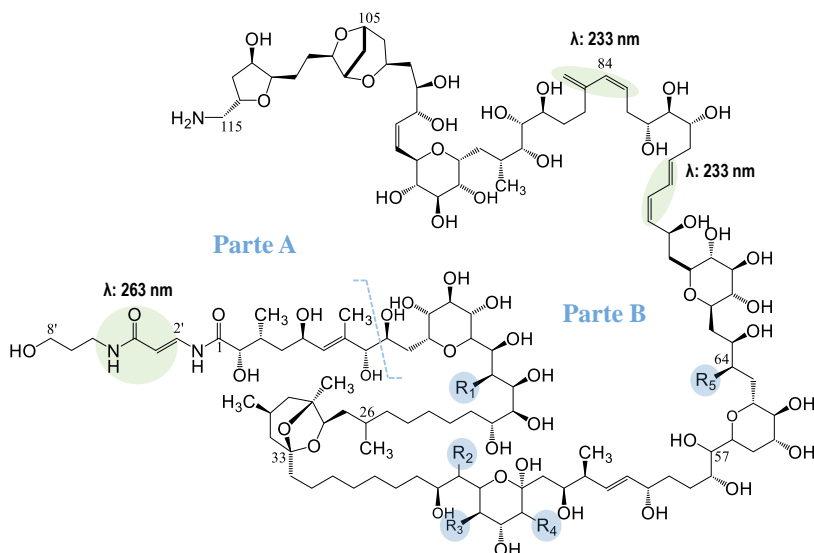
Este capítulo incluye una *Introducción* en la que se presentan las toxinas estudiadas en esta Tesis y los métodos de extracción y cuantificación utilizados hasta el momento. También, se comenta con algo más de detalle la utilización de la técnica de movilidad iónica para la identificación de las diferentes toxinas ya que es la primera vez que se aplica en este tipo de estudios. En la sección *Experimental y resultados* se incluyen dos publicaciones científicas. La primera (Artículo #1) se centra en la evaluación y mejora del método de extracción y la propuesta de un nuevo método de cuantificación de estas toxinas utilizando UHPLC-HRMS. En la segunda publicación (Artículo #2) se describe, por primera vez, la aplicación de la movilidad iónica como una herramienta complementaria en el estudio de esta familia de toxinas. Este capítulo termina con una discusión transversal de los resultados obtenidos en las dos publicaciones incluidas en el capítulo.

2.1. Introducción

Se sabe que las microalgas del género *Ostreopsis* producen sustancias tóxicas que son análogas a la palitoxina (PLTX), una de las toxinas marinas no proteica más potentes y que fue aislada por primera vez en un coral del género *Palythoa* [116]. La PLTX se considera una molécula compleja y grande: contiene 129 átomos de carbono alifáticos, 41 grupos hidroxilo secundarios, una amina, dos amidas, ocho enlaces insaturados, cadenas de hidrocarburos hidrofóbicos, éteres cíclicos y acetales bicíclicos (Figura 2.1). La PLTX tiene una cadena muy larga de átomos de carbono con regiones tanto lipofílicas como hidrofílicas. Es una molécula termoestable y que no se inactiva por ebullición. Suele ser estable en soluciones acuosas neutras durante períodos prolongados, pero en condiciones ácidas o alcalinas se descompone rápidamente, lo que lleva a disminuir/perder su toxicidad [217]. Además, en solución acuosa la PLTX puede llegar a formar un dímero, probablemente a través de la interacción del grupo amino terminal entre las dos moléculas de PLTX [218]. Por otro lado, únicamente existe un patrón comercializado de la PLTX y que procede su extracción en el coral *Palythoa tuberculosa*. Con el fin de evitar confusiones, en este capítulo, así como a lo largo de los siguientes capítulos de la Tesis, se llamará PLTX_{std} a la PLTX patrón diferenciándola del resto de los análogos de la PLTX producidos por la especie *O. cf. ovata*.

Tal y como se comentó en la sección 1.2.3 las diferentes especies de *Ostreopsis* pueden generar diferentes análogos de la PLTX, algunos de los cuales se muestran en la Figura 2.1. Estos análogos pueden contener grupos hidroxilos y/o metilos adicionales a los ya existentes en la PLTX o incluso pueden perder algunos de ellos. Además, también es posible que en algún caso se produzca algún cambio en la quiralidad. Todos estos cambios en la molécula original de PLTX pueden influir en la toxicidad final de los compuestos derivados [164,219]. Por otro lado, la PLTX detectada en las muestras de *O. cf. ovata* presenta una estructura que difiere ligeramente de la PLTX_{std} aislada directamente del coral *Palythoa tuberculosa*. Por esta razón, suele llamarse “PLTX isobárica (iso-PLTX)” (anteriormente llamada también supuesta-PLTX, *putative-PLTX*) a la PLTX generada por *O. cf. ovata*. Sin embargo, la iso-PLTX presenta la misma composición elemental y similares características físico-químicas que la PLTX_{std} del coral *Palythoa* [122]. La diferencia entre ambas sustancias se encuentra en que la iso-PLTX presenta un oxígeno más en la Parte A de la molécula y uno menos en la Parte B en comparación con la PLTX_{std} (Figura 2.1). Además, hay que indicar que el estudio de HRMS/MS de García-Altres et al. (2015) sugiere que la iso-PLTX y la OVTX-g el OH del C57 podría estar localizado en otra posición, pero esta hipótesis no se ha podido confirmar debido a la baja concentración a la que se encuentran estas toxinas en las muestras [122].

Hoy en día la espectrometría de masas (MS) es una técnica de análisis instrumental indispensable para el análisis de estas toxinas debido a su capacidad de identificación inequívoca, su gran sensibilidad, selectividad y rapidez. No obstante, se requiere un tratamiento de las muestras que incluya etapas de limpieza (*cleanup*) y/o preconcentración para extraer/aislar los analitos previamente a su separación por cromatografía de líquidos y a su detección por espectrometría de masas utilizando generalmente electrospray (ESI) como fuente de ionización. El tratamiento de muestra que generalmente se aplica antes de la determinación por LC-MS tiene por objeto reducir el efecto matriz provocado por los componentes de la muestra en la ionización por ESI de los analitos, ya que algunas sustancias presentes en la matriz ambiental pueden llegar a influir en la eficacia de la ionización de las toxinas y así afectar de manera significativa (positiva/negativa) en su detección/cuantificación.



Toxina	Composición elemental	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Otros
PLTX _{std}	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	OH	H	OH	OH	OH	
Iso-PLTX	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	H	OH	OH	OH	H	+O en la parte A, región C8-C8'
OVTX-a	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	H	OH	H	OH	H	
OVTX-b	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₃	H	OH	H	OH	H	+C ₂ H ₄ O en la parte A, región N-C8'
OVTX-c	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₄	H	OH	OH	OH	H	+C ₂ H ₄ O en la parte A, región N-C8'
OVTX-d	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	H	OH	OH	OH	H	
OVTX-e	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	H	OH	H	OH	H	+O en la parte A, región C8-C8'
OVTX-f	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₂	H	OH	H	OH	H	+C ₂ H ₄ en la parte B, región C95-C105
OVTX-g	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₁	H	OH	H	H	H	

Figura 2.1. Análogos de la PLTX producidos por la especie *Ostreopsis cf. ovata* y que se han estudiado en la presente Tesis.

2.1.1. Extracción y aislamiento de las toxinas

Algunos de los análogos de la PLTX se han detectado a lo largo de la cadena alimentaria. Por ejemplo, estas toxinas se han llegado a detectar en mariscos y cangrejos y se cree que han podido ser las responsables de algunos efectos adversos observados en la salud de los humanos expuestos a ellas durante estos episodios. Para poder llevar a cabo una determinación analítica (detección y cuantificación) fiable de los análogos de la PLTX en los diferentes tipos de matrices (agua, macroalgas, mariscos y cultivos) son necesarios métodos de extracción y purificación de las toxinas antes de llevar a cabo la determinación cuantitativa, generalmente por LC-HRMS.

En 2006, en los trabajos de Ciminiello et. al (2006) se propuso un método de tratamiento de muestra para el aislamiento de la PLTX presente en muestras de macroalga (toxinas en el interior de las células adheridas a la macroalga) y en las muestras de agua (toxinas disueltas) durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en las costas del Mediterráneo [117]. En las extracciones de las primeras muestras se utilizó un concentrado (centrifugación) de células que posteriormente fueron extraídas consecutivamente dos veces con MeOH:H₂O (1:1, v/v) y el sobrenadante fue sonicado y centrifugado para obtener una fracción más limpia que posteriormente se analizó directamente por LC-MS. En cambio, para las muestras de agua se llevaron a cabo un par de extracciones líquido-líquido consecutivas utilizando butanol como disolvente de extracción. Finalmente, la fase orgánica se evaporaba a sequedad y se redisolvió en MeOH:H₂O (1:1, v/v) antes de proceder a la determinación por LC-MS. En este trabajo la recuperación de las toxinas con estos métodos de extracción mostró una buena eficiencia de extracción para la PLTX_{std}, proporcionando valores de 91–98% para los concentrados de células y de 73–82% para los extractos de butanol (toxina disuelta).

A partir de este trabajo de Ciminiello et al. (2006), se han ido publicando numerosos estudios que, aunque se basan en el procedimiento anteriormente descrito [117], incluyen pequeñas modificaciones que afectan principalmente a la etapa de preconcentración de las células. Tal como se puede observar en la Tabla 2.1 donde se resumen algunos de los métodos más relevantes para el análisis de estas toxinas, algunos estudios llevan a cabo una centrifugación de las muestras para obtener el extracto de células concentradas, mientras que otros prefieren filtrar las muestras (Nylon, microfibras de vidrio) para retener en el filtro dichas células (Tabla 2.1). Respecto al disolvente de extracción, en la mayoría de los estudios publicados, la extracción de las toxinas a partir de los extractos celulares suele llevarse a cabo con una mezcla MeOH:H₂O (1:1, v/v), aunque en otros casos también se propone el uso de una proporción de disolvente orgánico más elevada (MeOH:H₂O, 60–90:40–10 v/v). Además, la cantidad de disolvente de extracción utilizado y el número de

extracciones realizadas (Tabla 2.1), así como el tiempo de sonicación y centrifugación suelen variar entre los diferentes estudios. Aun así, la mayoría de estos trabajos indican que los valores de recuperación y efectos matrices siguen siendo los mismos a los observados inicialmente por Ciminiello et al. (2006), sin que se explicite un estudio específico de ello en el trabajo [117].

Por lo que se refiere a los métodos de extracción de toxinas marinas en moluscos, la EFSA destacó la falta de información que existe sobre la eficiencia de la extracción de los análogos de la PLTX en este tipo de muestras. Por ello, en 2011 se realizó un estudio más exhaustivo para evaluar la extracción de estos compuestos en diferentes matrices y su análisis por LC-MS/MS [220]. En este trabajo se propuso el uso de una mezcla MeOH:H₂O (80:20, v/v) como disolvente de extracción de los análogos de la PLTX presentes en los moluscos, obteniéndose recuperaciones del 92% y un efecto matriz que tan solo producía una disminución de la señal (supresión) del orden de 7–13% (Tabla 2.1). Este método también se utilizó en el análisis de erizos de mar y anchoas obteniéndose recuperaciones de las toxinas del 89 y 56% y un efecto matriz (supresión) del 3–19 y 7–24%, respectivamente. Asimismo, se observó en este trabajo que, independientemente del tipo de matriz de marisco considerada, el efecto matriz observado también parecía depender del nivel de concentración. Finalmente, los autores de este trabajo terminaban recomendando el uso de métodos de calibración empleando disoluciones patrón preparadas en matriz (*matrix matched calibration*) para lograr una cuantificación más precisa y exacta.

En cuanto a la recuperación de las toxinas durante los procesos de aislamiento, en 1985 se consiguieron aislar 4 mg de toxinas individuales puras (PLTX, neoPLTX, deoxyPLTX, homoPLTX, bihomoPLTX) a partir de 45 kg de *Palythoa tuberculosa* como material de partida [140]. En este contexto, el trabajo de Ciminiello et al. (2012), consiguió aislar 700 µg de la OVTX-a pura a partir de 80 L de cultivo de algas (recuperación general del 12%) con cuatro pasos de cromatografía preparativa y varias etapas de evaporación [119]. Por otro lado, Brissard et al. (2014) obtuvo una recuperación del 85% de las OVTXs después de llevar a cabo una sola etapa de cromatografía preparativa; sin embargo, dos tercios de las toxinas esperadas se perdieron en la etapa de evaporación [135]. En este caso, no hay evidencias experimentales que expliquen si las bajas recuperaciones observadas para los diferentes análogos de la PLTX se deben a la inestabilidad de los compuestos en disolución o a la adsorción irreversible de estas sustancias sobre los materiales empleados o incluso que sean otros factores no controlados la causa de estas pérdidas. Posteriormente, en el trabajo de Mazzeo et al. (2021) llevado a cabo en 2021, se estudiaron algunos de los factores que podrían afectar a la recuperación de la PLTX_{std} [221]. Los autores concluyeron que era preferible utilizar mezclas hidro-orgánicas con una proporción de disolvente orgánico (etanol o metanol) de 50–80%. También,

Tabla 2.1. Recopilación de algunos de los trabajos más relevantes sobre tratamiento de muestra y métodos de análisis de las toxinas producidas por *Ostreopsis* cf. *ovata*. Se incluyen protocolos aplicados a muestras microplancónicas o microbentónicas, cultivos, muestras de agua de mar y muestras de marisco. Además, se especifican el efecto matriz (EM%) y recuperación (R%) observados, la columna cromatográfica y el sistema de espectrometría de masas utilizado.

Muestra/ Matriz	Tratamiento de muestra	*RP-LC	Ionización-MS Analizador	EM (%) R (%)	Ref.
Muestras naturales; células planctónicas o bentónicas (epifitas de macroalgas)	Aislamiento células: Centrifugación	150 × 2 mm, 5 µm	ESI-MS/MS <i>QqQ</i>	EM: 6–20% R: 91–98%	[117]
	Extracción toxinas: 2 × 4 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)				
	Aislamiento células: Filtración	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[48]
	Extracción toxinas: MeOH:H ₂ O (60:40, v/v)				
	Aislamiento células: Filtración	150 × 2 mm, 5 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[133]
	Extracción toxinas: 2 × 50 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)				
Aislamiento células: Filtración	100 × 2,1 mm, 2,7 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[114]	
Extracción toxinas: 2 × 3 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)					
Cultivos de <i>O. cf. ovata</i>	Aislamiento células: Filtración	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[93]
	Extracción toxinas: 50 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)				
	Aislamiento células: Centrifugación	150 × 2 mm, 5 µm	ESI-MS/MS <i>Q-LIT</i>	-	[168]
	Extracción toxinas: 1 mL MeOH:H ₂ O (90:10, v/v)				
	Aislamiento células: Centrifugación	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[121]
	Extracción toxinas: 2 × 20 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v, 0,5% ácido acético)				

-: No hay datos.

Tabla 2.1 (cont.).

Muestra/ Matriz	Análisis de toxinas Extracción de toxinas	*RP-LC	Ionización-MS Analizador	EM (%) R (%)	Ref.
Cultivos de <i>O.</i> cf. <i>ovata</i>	Aislamiento células: Centrifugación Extracción toxinas: 2 × 1 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	100 × 2,1 mm, 2,7 μm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[64]
	Aislamiento células: Centrifugación Extracción toxinas: 2 × 3 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v, 0,2% ácido acético)	100 × 2,1 mm, 2,7 μm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[124]
	Aislamiento células: Centrifugación Extracción toxinas: MeOH:H ₂ O (90:10, v/v)	100 × 2,1 mm, 2,7 μm	ESI-MS/MS <i>Q-LIT</i>	-	[41]
	Aislamiento células: Filtración Extracción toxinas: 2 × 20/5 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 μm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[120]
	Aislamiento células: Filtración Extracción toxinas: 2 × 30 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 μm	ESI-MS/MS <i>QqQ</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[56]
	Aislamiento células: Filtración Extracción toxinas: 2 × 9 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 μm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[75,92]
	Aislamiento células: Filtración Extracción toxinas: 3 × 30 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	100 × 2,1 mm, 2,7 μm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	-	[122]

-: No hay datos.

Tabla 2.1 (cont.).

Muestra/ Matriz	Análisis de toxinas Extracción de toxinas	*RP-LC	Ionización-MS Analizador	EM (%) R (%)	Ref.
Cultivos de <i>O.</i> cf. <i>ovata</i>	Aislamiento células: Filtración				
	Extracción toxinas: 2 × 0.5–3 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 91–98% [117]	[222]
	Aislamiento células: Filtración				
	Extracción toxinas: 2 × X mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	100 × 2,1 mm, 2,6 µm	ESI-HRMS/MS <i>Q-Orbitrap</i>	-	[216]
	Aislamiento células: Filtración				
	Extracción toxinas: 2 × 1 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-MS/MS <i>Q-LIT</i>	-	[135]
	Aislamiento células: Filtración				
	Extracción toxinas: 3 × 5 mL MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1, v/v)	100 × 2.1 mm, 1.7 µm	ESI-HRMS <i>Q-TOF</i>	-	[223]
	Extracción toxinas (500 mL): 2 × 500 mL butanol; evaporación sequedad; rediseuelto en 4 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 5 µm	ESI-MS/MS <i>QqQ</i>	EM: 6–20% R: 73–82%	[117]
	Extracción toxinas: 5 × mismo volumen agua-butanol; evaporación sequedad; rediseuelto en 45 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 73–82% [117]	[133]
Extracción toxinas (945 mL cultivo): 3 × 945 mL butanol; evaporación sequedad; rediseuelto en 5 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-MS/MS <i>QqQ</i>	EM: - R: 73–82% [117]	[56]	
Extracción toxinas (100 mL): SPE Oasis HLB LP (500 mg)	100 × 2,1 mm, 2,6 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: 15% R: 50–75%	[224]	

-: No hay datos.

Tabla 2.1 (cont.).

Muestra/ Matriz	Análisis de toxinas Extracción de toxinas	*RP-LC	Ionización-MS Analizador	EM (%) R (%)	Ref.
Agua de mar (toxinas disueltas en agua de mar, previa filtración)	Extracción toxinas (cultivo): 5 × mismo volumen de agua que de butanol; evaporación sequedad; redisolto en 5 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 73–82% [117]	[75,92]
	Extracción toxinas (100 mL cultivo): 5 × 100 mL butanol; evaporación sequedad; redisolto en 2 mL MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 73–82% [117]	[222]
Mejillones	1 g muestra Extracción toxinas: 2 × 3 mL MeOH:H ₂ O (80:20, v/v)	150 × 2 mm, 3 µm	ESI-MS/MS <i>QQ</i>	EM: 7–13% R: 90–94%	[220]
	1 g muestra Extracción toxinas: 3 mL MeOH:H ₂ O (80:20, v/v) SPE STRATA-X 500 mg	100 × 2,1 mm, 2,7 µm	ESI-HRMS <i>LIT-Orbitrap</i>	EM: - R: 65%	[225]

-: No hay datos.

*RP-LC: Cromatografía de líquidos de fase inversa
Tamaños de partícula de las columnas LC:

2,6 – 2,7 µm: columnas de UHPLC con partículas superficialmente porosas (Kinetex/Phoroshell C18).

3 – 5 µm: columnas de HPLC con partículas totalmente porosas (Gemini C18).

se recomendaba no llegar a sequedad durante las etapas de evaporación para evitar pérdidas por posible adsorción de la PLTX en las paredes del material de vidrio utilizado y, por ello, sugieren siempre mantener una pequeña cantidad de disolvente durante la preconcentración de las toxinas y utilizar preferiblemente material de Teflón.

2.1.2. Análisis LC-MS de la palitoxina y sus análogos

Los primeros métodos cromatográficos para la determinación de la PLTX y sus análogos utilizaban detección espectrofotométrica (UV-Vis) [214] ya que estos compuestos presentan dos grupos cromóforos que absorben a longitudes de onda de 233 y 263 nm (Figura 2.1). Sin embargo, debido a la baja sensibilidad y poca especificidad de esta técnica, en los últimos años ha sido sustituida por la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. El acoplamiento LC-MS ha conseguido mejorar la capacidad de identificación y caracterización de la PLTX y sus análogos, así como su determinación cuantitativa a niveles de concentración mucho más bajos, especialmente cuando estas toxinas están presentes en matrices muy complejas (Tabla 2.1) [220,225].

Cromatografía de líquidos y fuentes de ionización

En este contexto, en 2006 se desarrolló un método LC-MS/MS para la determinación de la PLTX_{std} y que se utilizó para investigar el perfil de toxinas de *O. ovata* durante los brotes tóxicos ocurridos a lo largo de las costas de Génova en 2005 y 2006 [117]. En dicho estudio se detectó una toxina que pareció ser la PLTX_{std}, pero en aquel momento recibió el nombre de “supuesta PLTX” (*putative PLTX* - pPLTX), ya que al realizar los estudios de fragmentación utilizando espectrometría de masas en tándem y el modo monitoreo de múltiples reacciones (MRM) con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) se observó un pico en la transición m/z 1340 $[M+2H]^{2+} \rightarrow 327$, aunque a una intensidad relativamente baja, donde el ion producto a m/z 327 coincidía con el fragmento $[M+H-\text{Parte B}-H_2O]^+$ de la molécula de PLTX_{std} (Figura 2.1). Sin embargo, no se pudo observar la transición de confirmación.

Posteriormente, durante los análisis de muestras procedentes de la costa de Liguria de ese mismo año (2006) se detectó otro compuesto con un espectro de masas muy similar al de la PLTX_{std}, el cual eluía cromatográficamente a un tiempo de retención mayor y con una masa ligeramente diferente de la PLTX_{std} [118]. A este compuesto se le llamó ovatoxina-a (OVTX-a) y aunque compartía la misma parte A (Figura 2.1) que la PLTX_{std}, presentaba dos oxígenos menos en su estructura química (C₁₂₉H₂₂₃N₃O₅₂). En este estudio también se detectó la pPLTX cuantificándola por

MRM en un QqQ (transición m/z 1331,7 $[M+2H-H_2O]^{2+} \rightarrow 327$), pero la intensidad de la segunda transición de confirmación fue muy baja (transición m/z 1340 $[M+2H]^{2+} \rightarrow 327$). Además, en 2012 se consiguió aislar y purificar dicha OVTX-a, siendo posible estudiar de manera detallada su estereoquímica [119,226]. A partir de aquí se han ido identificando nuevas ovatoxinas (OVTX-b, -c, -d y -e) en cepas de *O. cf. ovata* [120,132,227]. Generalmente, para la separación cromatográfica se solía utilizar un gradiente de elución más lento para conseguir una mejor resolución cromatográfica de las nuevas toxinas y unos espectros de masas más limpios y puros, que presentasen menos coeluciones, con el objetivo de facilitar el proceso de identificación y caracterización. También se llevó a cabo un estudio comparativo del comportamiento de las nuevas toxinas y de la PLTX_{std} en LC-HRMS y HRMS/MS. En dicho estudio fue posible determinar la composición elemental de las diferentes OVTXs, así como obtener información preliminar sobre sus estructuras químicas. Estos trabajos permitieron confirmar que se trataban de sustancias muy similares a la PLTX_{std} y por lo tanto podían ser catalogadas dentro del grupo de análogos de la PLTX. Hay que remarcar que el estudio LC-HRMS/MS no se realizó para la pPLTX, debido quizás a su baja concentración. Más tarde, entre 2012 y 2015 se descubrieron las OVTX-f, -g y -h producidas también por la cepa *O. cf. ovata* aisladas en el NO del Mar Adriático (OVTX-f) y NO del Mar Mediterráneo (OVTX-g en la costa catalana y OVTX-h en la costa francesa) [121–123].

En los estudios iniciales se sugirió que la pPLTX presentaba la misma parte A que la PLTX_{std} original/patrón procedente del coral *Palythoa* ya que se observaba el mismo ion $[M+H-Parte\ B-H_2O]^+$. Sin embargo, en los estudios realizados por García-Altres et al. (2015) se observó que la toxina producida por *O. cf. ovata*, supuesta-PLTX (pPLTX), era un isómero de la PLTX_{std} que presentaba un tiempo de retención diferente, pero con el mismo perfil de iones observado en HRMS. Además, al realizar experimentos HRMS/MS, el ion producto observado a m/z 343,1863 ($C_{16}H_{27}N_2O_6$) parecía corresponder al ion $[M+H-Parte\ B-H_2O]^+$. Estos resultados indicaban que la pPLTX presentaba un oxígeno más en la Parte A de la molécula y uno menos en la Parte B (R_1 , Figura 2.1), respecto a la PLTX_{std} (obtenida de la *Palythoa tuberculosa*) donde el ion $[M+H-Parte\ B-H_2O]^+$ se observaba a un m/z de 327,1910 ($C_{16}H_{27}N_2O_5$) [122]. Por estas razones, la hasta entonces pPLTX se renombró, a partir de ese momento, como la iso-PLTX.

La separación cromatográfica de los análogos de la PLTX suele llevarse a cabo mayoritariamente mediante cromatografía de líquidos de fase inversa utilizando columnas con fase estacionaria de C18 (Tabla 2.1). Como algunas de las toxinas que se han ido descubriendo han presentado problemas de separación con los métodos más antiguos, éstos se han ido adaptando para conseguir una mayor resolución cromatográfica. En 2015 se publicó un trabajo en el que se comparó la separación

2

cromatográfica del perfil de toxinas utilizando 3 columnas con fases estacionarias diferentes: una columna de HPLC, Gemini C18 (2×150 mm, 3 μm) con partículas totalmente porosas; dos columnas de UHPLC, la Kinetex C18 (2,10×100 mm, 2,6 μm) y la Poroshell 120 EC-C18 (2,1×100 mm, 2,7 μm), ambas con partículas superficialmente porosas que proporcionan una mayor eficacia cromatográfica. Los mejores resultados (resolución y eficacia) se obtuvieron con la columna Poroshell 120 EC-C18 (Figura 2.2) [225]. A partir de aquí, en los últimos años, los métodos que se han ido desarrollando mayoritariamente contemplan el uso de columnas UHPLC rellenas con partículas superficialmente porosas, utilizándose indistintamente tanto la columna Poroshell 120 EC-C18 como la Kinetex C18 (Tabla 2.1). Finalmente, en 2018 se utilizó por primera vez una columna con fase estacionaria fluorofenil en partículas totalmente porosas de 1,7 μm (Acquity UPLC CSH, 2,1×100 mm, 1,7 μm, 130 Å) [223]. Los autores no explican los motivos para utilizar esta nueva columna ni tampoco muestran cromatogramas, pero desde el conocimiento de nuestro grupo de investigación, y teniendo en cuenta la composición de la fase móvil a las que se trabaja en este estudio (gradiente de elución 90:10:0,1 a 0:100:0,1, agua:acetonitrilo:ácido fórmico, en 12 minutos), el comportamiento esperable de la fluorofenil se supone que debería ser similar al de una fase inversa como la C18. Con las columnas totalmente porosas de 1,7 μm puede llegarse a conseguir una eficacia cromatográfica similar o ligeramente superior a la que se consigue con las columnas superficialmente porosas anteriormente comentadas. En relación con las fases móviles utilizadas, en la mayoría de casos se ha optado por utilizar mezclas de agua:acetonitrilo con un pequeño porcentaje (0,1%) de ácido fórmico o ácido acético para mejorar la respuesta de los analitos y la forma de los picos cromatográficos.

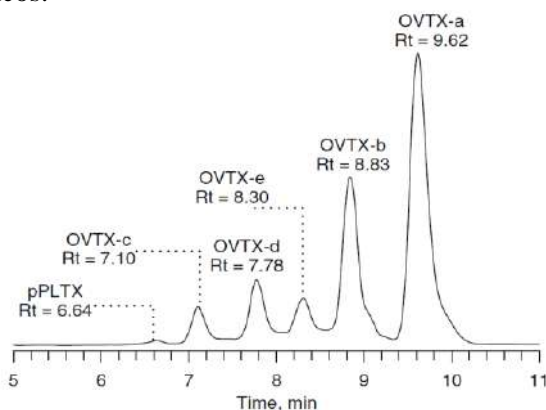


Figura 2.2. Separación cromatográfica de los análogos de la PLTX utilizando Poroshell 120 EC-C18 como columna cromatográfica y un gradiente de elución. Fase móvil: A: agua 30 mM ácido acético, B: 95% acetonitrilo:agua 30 mM ácido acético. Gradiente de elución: 28–29% B en 5 min, 29–30% B en 10 min. Fuente: Figura 2d, Ciminiello et al. (2015) [225].

Como se ha comentado anteriormente (sección 1.6.1), el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas (LC-MS) en la determinación de la PLTX y sus análogos suele llevarse a cabo utilizando únicamente la ionización por ESI (Figura 2.3). El proceso de evaporación iónica que tiene lugar en el ESI facilita la liberación hacia la fase gas de los iones de los análogos de la PLTX preformados en la fase líquida. Estas toxinas, además de protonarse en modo positivo, tienen tendencia a formar aductos con iones metálicos (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+}) presentes en la fase móvil y en el sistema cromatográfico generando especies múltiplemente cargadas. Además, también suelen tener lugar algunas fragmentaciones en la fuente dando lugar a iones que se han generado por pérdidas múltiples de moléculas de agua [117].

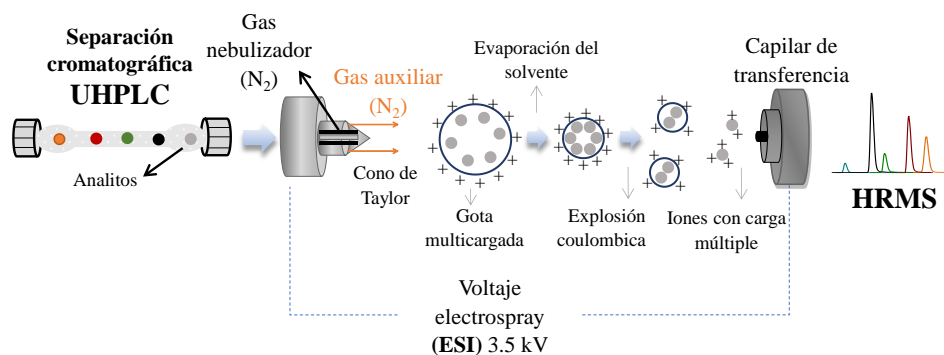


Figura 2.3. Esquema del sistema LC-ESI-HRMS y mecanismo de ionización por electro spray (ESI).

Además del ESI, se han utilizado algunas otras técnicas de ionización para detectar análogos de la PLTX pero sin separación cromatográfica previa. En particular, a mediados de los años 90 el bombardeo de átomos rápidos (FAB) permitió detectar la ostreocina-D en muestras del dinoflagelado *Ostreopsis siamensis* [127,128], aplicando un haz de átomos rápidos de alta energía sobre la superficie de la muestra y así facilitar la formación de iones en fase gas. Pero durante la última década, esta técnica tan utilizada para el análisis de macromoléculas ha sido sustituida por la ionización por desorción con láser asistida por la matriz (MALDI). Curiosamente, solo hay un trabajo publicado hasta el momento en los que se aplica esta tecnología para el análisis de este grupo de toxinas en muestras de cultivo o de campo. En este caso, la matriz que se utilizó fue el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) con 0.1% trifluoroacético:acetonitrilo (3:7) [228]. La mezcla de esta matriz con la muestra permitió que los grupos cromóforo presentes en la estructura química de la matriz absorbiesen la energía del láser para posteriormente transferirla a las toxinas, ionizarlas (generalmente especies monocargadas) y favorecer, de esta manera, el paso de estos iones a la fase gas (Figura 2.4).

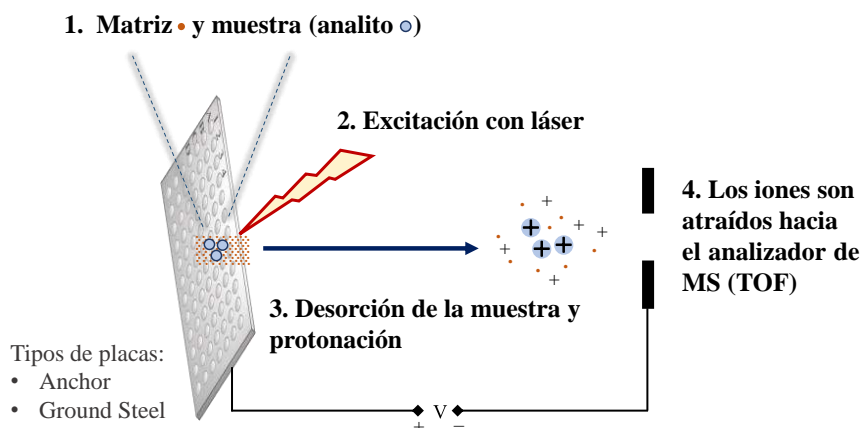


Figura 2.4. Esquema del proceso de ionización con MALDI.

Analizadores de masas

Como sistemas de espectrometría de masas, solían utilizarse inicialmente los equipados con analizadores de baja resolución (Tabla 2.1), como el triple cuadrupolo (QqQ) o el cuadrupolo-trampa de iones lineal (Q-LIT), operando en modo de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para aumentar la selectividad y sensibilidad de los métodos. Los estudios con triples cuadrupolos (QqQ) permiten la detección y cuantificación selectiva de un número limitado de análogos de la PLTX. Sin embargo, la adquisición en modo de *Full Scan*, que permite la detección simultánea de un número mayor de compuestos y facilita la identificación de nuevas toxinas, suele presentar limitaciones en cuanto a sensibilidad cuando se aplica este modo de adquisición en los sistemas cuadrupolares. Por ello, para trabajar en baja resolución con máxima sensibilidad para la identificación de un número amplio de toxinas se ha popularizado el uso de los analizadores de trampa de iones. Sin embargo, en estos últimos años se han popularizado los sistemas híbridos LIT-Orbitrap (Tabla 2.1), para poder aprovechar las ventajas que ofrece la alta resolución como se comenta a continuación.

Debido a la elevada complejidad de las muestras a analizar (mariscos, tejido animal, macroalgas, agua de mar, etc.) pueden darse coeluciones de compuestos isobáricos e isoméricos presentes en la matriz que interfieran en la identificación/cuantificación de las toxinas. Por ejemplo, en el análisis de la PLTX y sus análogos, el aducto de calcio de la OVTX-a (m/z 895,8195) difiere del aducto de magnesio de la OVTX-d/-e (m/z 895,8253) en tan solo 0,0058 unidades de m/z . En este contexto, la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) puede ayudar a separarlos y a estudiarlos individualmente. Por esta razón, la tendencia durante los últimos años ha sido la utilización de analizadores de masas de alta resolución como

el Orbitrap, el cual ha adquirido gran popularidad debido a su gran robustez y facilidad de uso, llevando a muchos laboratorios dedicados al análisis medioambiental a incorporarlo en sus instalaciones (Tabla 2.1) [64,114,225]. En la Tabla 2.2 se muestran algunos de los iones que suelen observarse en ESI para las toxinas en estudio y que presentan valores de m/z similares (iones isobáricos). Como ya se ha comentado, el analizador de masas de alta resolución dota a la metodología de análisis de estas toxinas de una gran selectividad y capacidad de caracterización, pero que combinada, además, con la elevada capacidad de separación de la cromatográficas de ultra elevada eficacia (UHPLC-HRMS) proporciona una herramienta de análisis muy potente para la detección y cuantificación de estas toxinas. Muchos de los espectros de masas que se obtienen en el análisis de las toxinas son muy complejos, presentan una elevada cantidad de iones y en muchos casos se produce el solapamiento de sus clústeres isotópicos (Figura 2.5). Sin embargo, la HRMS posibilita la separación de estos iones y permite la detección individualizada

Tabla 2.2. Iones isobáricos generados por diferentes toxinas.

Iones isobáricos		$\Delta m/z$
OVTX, ion asignado		
<i>m/z</i>		
OVTX-c, $[M+2H-3H_2O]^{2+}$ 1327,2469	OVTX-g, $[M+H+Na]^{2+}$ 1327,2457	0,0012
OVTX-a, $[M+H+Mg]^{3+}$ 890,4937	OVTX-g, $[M+H+Mg]^{3+}$ 890,4879	0,0058
OVTX-a, $[M+H+Ca]^{3+}$ 895,8195	OVTX-d/-e, $[M+H+Mg]^{3+}$ 895,8253	0,0058
OVTX-a, $[M+H+Mg]^{3+}$ 901,1569	OVTX-d/-e, $[M+H+Ca]^{3+}$ 901,1511	0,0058
OVTX-b, $[M+H+Mg]^{3+}$ 905,1691	OVTX-f, $[M+H+Ca]^{3+}$ 905,1633	0,0058
OVTX-b, $[M+H+Ca]^{3+}$ 910,4949	OVTX-c, $[M+H+Mg]^{3+}$ 910,5007	0,0058
OVTX-a, $[M+H+Na]^{2+}$ 1335,2431	OVTX-g, $[M+H+K]^{2+}$ 1335,2326	0,0105
OVTX-a, $[M+H+K]^{2+}$ 1343,2301	OVTX-d/-e, $[M+H+Na]^{2+}$ 1343,2406	0,0105
PLTX _{std} /iso-PLTX, $[M+H+Na]^{2+}$ 1351,2380	OVTX-d/-e, $[M+H+K]^{2+}$ 1351,2276	0,0105
OVTX-b, $[M+H+Na]^{2+}$ 1357,2562	OVTX-f, $[M+H+K]^{2+}$ 1357,2457	0,0105
OVTX-b, $[M+H+K]^{2+}$ 1365,2432	OVTX-c, $[M+H+Na]^{2+}$ 1365,2537	0,0105

de cada una de las toxinas a través de la selección de determinados iones aductos. En algunos trabajos se ha optado por la utilización de sistemas híbridos donde se combinan la baja y la alta resolución. Por ejemplo, utilizando LIT o Q como analizadores de baja resolución y un Orbitrap como analizador de alta resolución. Estos sistemas híbridos (LIT-Orbitrap, Q-Orbitrap) disponen de una celda C-Trap (Figura 2.6) (una especie de trampa de iones) ubicada entre los analizadores de baja y alta resolución. Este dispositivo permite la acumulación y estabilización de los iones procedentes del Q o del LIT para luego inyectarlos (en pulsos) en el Orbitrap. Además, desde el C-Trap los iones pueden ser también enviados a una celda de colisión de alta energía (HDC) donde los iones son forzados a romperse en iones fragmento (producto) más pequeños. Posteriormente, estos iones fragmento son acumulados y estabilizados en el C-Trap e inyectados en el Orbitrap para su análisis por HRMS. Así, estos sistemas permiten disponer de la medida de masa exacta tanto de iones precursores como iones productos, los espectros de masas presentan un menor número de interferencias isobáricas y es posible aplicar filtros mucho más selectivos para obtener cromatogramas más limpios.

A pesar de la gran sensibilidad y selectividad que puede alcanzarse con los sistemas UHPLC-HRMS, el análisis cuantitativo presenta aún algunos inconvenientes. Un primer problema es la falta de patrones, ya que no existen patrones individuales para cada una de las OVTXs. Únicamente está disponible comercialmente el patrón de PLTX_{std} y es éste el que se suele utilizar como patrón para el análisis cuantitativo de las OVTXs, ya que tiene una estructura similar a las toxinas encontradas en los extractos de *Ostreopsis cf. ovata* y el perfil de iones y el factor de respuesta también es muy parecido. Por lo tanto, la concentración individual de cada OVTX se expresa como concentración equivalente a la PLTX_{std}. Otro problema está relacionado con el número y tipo de iones que se seleccionan para la obtención de las trazas de los cromatogramas y que se utilizan en el proceso de cuantificación de estas toxinas. Hasta ahora, la determinación cuantitativa se ha basado en el monitoreo/seguimiento de los dos iones más abundantes observados en el espectro de masas (*full scan*). Pero en algunos casos, estos iones pueden cambiar, lo que ha obligado en cada tanda de análisis a comprobar si siguen siendo los mismos o son otros iones los que predominan en el espectro y que, por tanto, han de ser monitorizados [229]. La gran tendencia que presentan estas toxinas a formar aductos diferentes en función de las condiciones del sistema UHPLC-HRMS es la principal causa por la cual se observan diferencias significativas en los espectros de masas de la PLTX_{std} al utilizar diferentes instrumentos [229]. Estas diferencias, que dan lugar a perfiles de iones diferentes, pueden dar lugar a ambigüedades en la asignación de iones para una misma toxina y en consecuencia unos resultados cuantitativos poco robustos o poco comparables entre laboratorios, instrumentos o condiciones de mantenimiento diferentes.

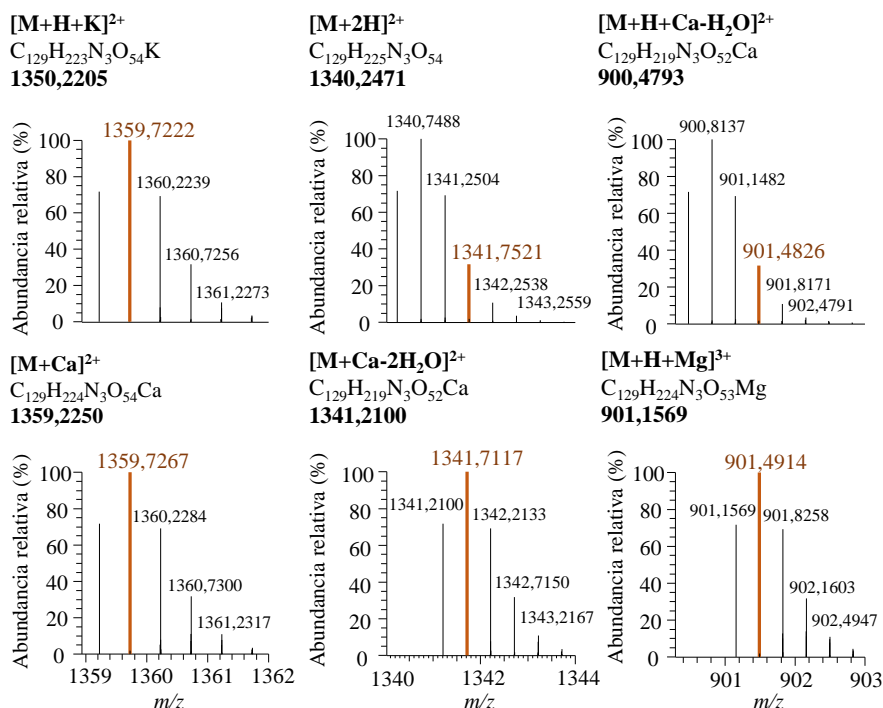


Figura 2.5. Clústeres isotópicos de algunos de los iones generados en ESI por la PLTX_{std} y que muestran las posibles interferencias isobáricas entre ellos (color naranja).

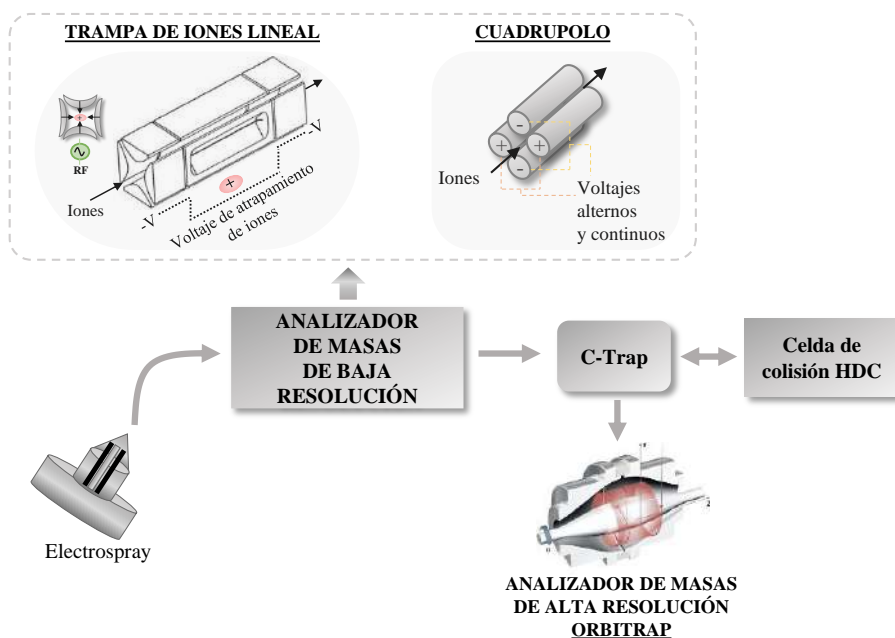


Figura 2.6. Esquema de los sistemas híbridos ESI-(LIT/Q)-Orbitrap utilizados en el análisis de las toxinas.

Espectrometría de movilidad iónica

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la estructura química de la PLTX contiene 64 centros quirales, lo que da lugar a una gran cantidad de posibles estereoisómeros conformacionales: más de 10^{21} [230]. La HRMS por sí sola no permite resolver o separar isómeros, los cuales tienen la misma masa (misma composición elemental) y dan lugar a iones con el mismo valor de m/z . Sin embargo, la espectrometría de movilidad iónica (IMS) combinada con la espectrometría de masas de alta resolución (IMS-HRMS) proporciona una herramienta muy potente para separar y diferenciar los isómeros presentes en muestras medioambientales complejas. La principal ventaja de esta combinación IMS-HRMS es la posibilidad de separar a los isómeros del mismo compuesto químico por IMS e identificar/caracterizar cada uno de estos isómeros por HRMS, mejorando las capacidades de sensibilidad, capacidad máxima de separación e identificación/caracterización de cada una de estas técnicas por sí solas [231,232]. La técnica de IMS permite la diferenciación de los isómeros, además de por su carga y masa, por su volumen y forma, proporcionando un nuevo parámetro específico para cada molécula, la sección transversal de colisión (CCS). El CCS es una propiedad fisicoquímica robusta y precisa de cada ion y que está relacionada con su estructura química y su conformación tridimensional.

Los orígenes históricos de la movilidad iónica se remontan a 1896 en los trabajos de Thomson y Rutherford donde investigaban la conductividad eléctrica en medios gaseosos [233]. Hoy en día, la espectrometría de movilidad iónica (IMS) estudia el movimiento de los iones (orgánicos e inorgánicos) en fase gas a través de una cámara presurizada con un gas, generalmente He o N₂, y bajo la influencia de un campo eléctrico. En los últimos años se han desarrollado diferentes tecnologías para llevar a cabo estas separaciones de los iones en IMS. Los dispositivos que hoy en día se encuentran disponibles comercialmente y que se combinan con la detección por espectrometría de masas de alta resolución (IMS-HRMS) suelen estar basados en tres conceptos: dispersiones de iones en el tiempo, dispersiones de iones en el espacio y separación de iones por confinamiento de éstos con una posterior liberación selectiva [234]. Los sistemas basados en la dispersión temporal de iones incluyen la espectrometría de movilidad iónica que aplica un campo uniforme y constante en un tubo de deriva (DTIMS) y la espectrometría de movilidad iónica que aplica un campo eléctrico en forma de tren de ondas móviles (TWIMS). Respecto a los sistemas de dispersión espacial, incluyen la espectrometría de movilidad diferencial (DMS), también llamada espectrometría de movilidad iónica aplicando un campo eléctrico asimétrico (FAIMS). Por último, se encuentran los sistemas basados en el atrapamiento de iones y su posterior liberación selectiva mediante el cambio gradual

del campo eléctrico, dicho sistema es el denominado espectrometría de movilidad iónica mediante atrapamiento de iones (TIMS).

Mientras que las técnicas de movilidad iónica diferencial (FAIMS, DMS) suelen utilizarse como sistemas externos, ubicados entre la fuente de ionización y la entrada al analizador de masas (*front-end systems*), las técnicas DTIMS, TWIMS y TIMS, suelen ser sistemas integrados en el analizador de masas de alta resolución, por lo general un sistema híbrido Q-TOF. Estas tres últimas técnicas son las que se han utilizado en la presente Tesis para estudiar, por primera vez, los análogos de la PLTX con movilidad iónica. Por ello, se describen brevemente a continuación.

En DTIMS, los iones que se mueven a través de un tubo de deriva que contiene el gas de deriva (generalmente He o N₂) lo hacen impulsados por un campo eléctrico uniforme que los atrae hacia la salida del tubo de deriva (celda de movilidad) y hacia el analizador de masas (Figura 2.7a) [235,236]. El tipo de gas de deriva seleccionado puede afectar a las interacciones y colisiones de los iones con dicho gas y consecuentemente a su movilidad. Por lo general, la mayoría de los datos de movilidad iónica suelen obtenerse utilizando N₂ como gas de deriva ya que suele proporcionar mejores separaciones que con el He [234]. Al avanzar los iones a través de la celda de movilidad, la aerodinámica de los mismos, así como su carga y tamaño afectan de manera significativa al tiempo que tardan dichos iones en atravesar la celda

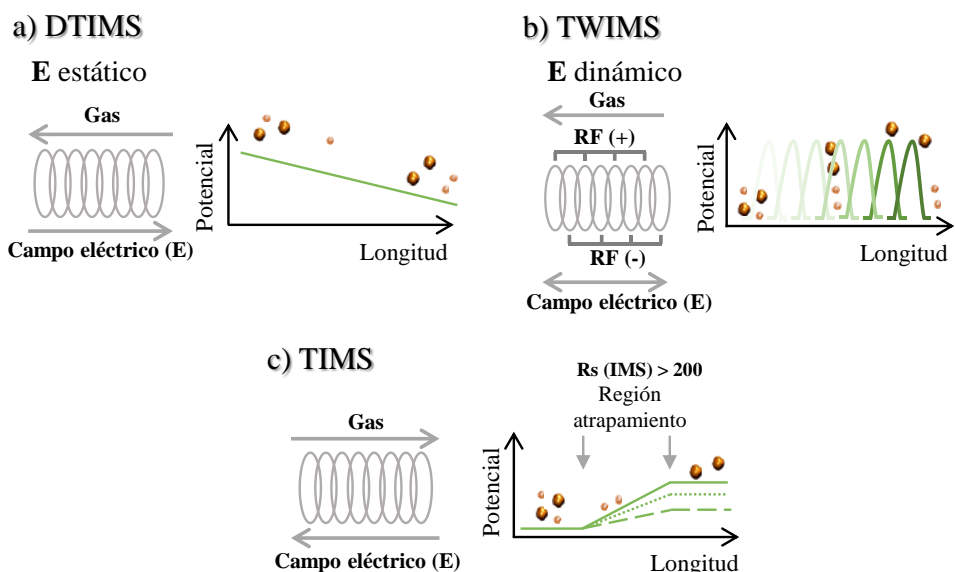


Figura 2.7. Esquema de las técnicas de movilidad iónica más importantes y que se han utilizado en la presente Tesis. **a)** Espectrometría de movilidad iónica de tubo de deriva (DTIMS), **b)** espectrometría de movilidad iónica con trenes de onda (TWIMS), **c)** espectrometría de movilidad iónica mediante atrapamiento de iones (TIMS).

de movilidad (t_d : tiempo de deriva). Los iones más cargados como, por ejemplo, los iones triplemente cargados de la PLTX llegarán al analizador antes (t_d más cortos) que los iones con menor número de cargas; pero los iones más grandes y desplegados (menos favorecidos aerodinámicamente) tardarán más en atravesar la celda de movilidad (t_d más largos). Las fuerzas (eléctrica y de rozamiento) implicadas en el movimiento de estos iones terminan alcanzando un equilibrio, así los iones adquieren una velocidad (V_d) que es directamente proporcional al campo eléctrico (E) aplicado (ecuación 2.1), siendo K el coeficiente de movilidad iónica de cada ion y t_d el tiempo de deriva o tiempo necesario para que un ion atravesase un tubo de deriva de una longitud determinada (L).

$$V_d = K \cdot E = \frac{L}{t_d} \quad (\text{ecuación 2.1})$$

K es característico para cada ion en unas condiciones determinadas (presión, temperatura, masa del gas de deriva) y depende de su masa, carga, así como de su forma y tamaño, y es inversamente proporcional al tiempo de deriva. Pero para poder comparar los espectros obtenidos utilizando diferentes condiciones experimentales, el coeficiente de movilidad iónica (K) se suele normalizar a la temperatura y presión de referencia (T_0 y p_0) dando lugar a la constante de movilidad reducida (K_0). La ecuación 2.2 muestra este parámetro donde T y p son la temperatura y presión de trabajo en Kelvin y pascales (Pa), respectivamente, y que se normalizan a los valores de referencia de $T_0 = 273,16$ K y $p_0 = 1,01 \cdot 10^5$ Pa.

$$K_0 = K \cdot \left(\frac{T_0}{T}\right) \cdot \left(\frac{p}{p_0}\right) \quad (\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}) \quad (\text{ecuación 2.2})$$

La sección transversal de colisión (CCS) de la molécula neutra es el área efectiva de una molécula que puede colisionar con las moléculas del gas, este valor puede obtenerse directamente a partir de los valores de tiempo de deriva medidos en un DTIMS-MS mediante métodos primarios de calibración. Durante el proceso de calibración del TOF también se lleva a cabo la calibración del DTIMS para tener bajo control todos los parámetros que puedan afectar a variaciones en los tiempos de deriva (presiones, voltajes, longitud del tubo, temperaturas, etc.). La ecuación de Mason-Schamp es una ecuación empírica que permite calcular el valor de CCS de una molécula (ecuación 2.3) a partir de la movilidad reducida de su ion y, por lo tanto, a partir del tiempo de deriva observado para dicho ion. En esta ecuación, z es la carga del ion, N es la densidad de las moléculas de gas neutro a la presión de medida, μ es la masa reducida del ion y k_B es la constante de Boltzmann [237].

$$K_0 = \frac{3z}{16N} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_B T}} \cdot \frac{1}{CCS} \quad (\text{ecuación 2.3})$$

Los valores de CCS en DTIMS (^{DT}CCS) suelen considerarse los valores de CCS de referencia (CCS_{ref}). Estos valores han sido muy útiles para identificar y caracterizar compuestos orgánicos en mezclas complejas, especialmente en aplicaciones como la proteómica, metabolómica y lipidómica. Proporcionan información adicional más allá de la relación masa-carga (m/z) de los iones, lo que permite mejorar la selectividad y la sensibilidad del análisis. Además, los valores de CCS se pueden usar en combinación con otros parámetros utilizados en otras técnicas, como la masa exacta medida con HRMS o el tiempo de retención cromatográfico, para aumentar la capacidad de separación y la selectividad de los métodos, así como la confianza en la identificación y cuantificación de iones específicos en la muestra. La Figura 2.8 muestra un esquema del sistema Q-TOF con la celda de movilidad DTIMS integrada.

En TWIMS, en lugar de usar un campo eléctrico uniforme y constante, se aplica un campo eléctrico en forma de tren de ondas de potencial simétrico y que se propaga continuamente a través de la celda de movilidad. Para ello, la celda de movilidad iónica, presurizada con He o N_2 como gas de deriva, consta de una serie de anillos consecutivos que actúan como electrodos. Entre cada dos electrodos adyacentes se aplica, de manera periódica y alternando la polaridad (positivo/negativo), un voltaje de radiofrecuencia (RF) para generar pulsos de trenes de ondas de una determinada amplitud y frecuencia por los cuales viajan o “surfean” los iones (Figura 2.7b). Los iones más pequeños, al elevar el campo aplicado, se mueven más rápidamente que los iones más grandes pudiendo llegar antes a la cresta de la onda, ya que los iones más voluminosos, menos favorecidos aerodinámicamente, experimentan una mayor fricción con el gas de deriva. Además, en las zonas de descenso de potencial, los

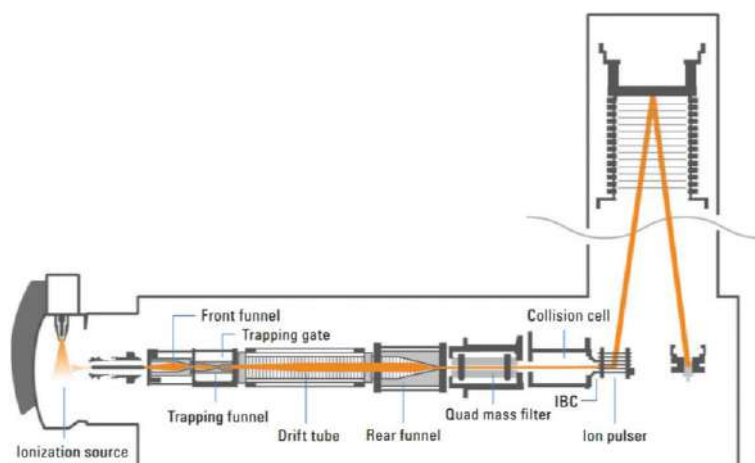


Figura 2.8. Esquema del sistema Q-TOF con la celda de movilidad DTIMS integrada y comercializado por Agilent. Fuente: *The Agilent Ion Mobility Q-TOF Mass Spectrometer System*, <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-3244EN.pdf>.

iones más pesados experimentan una mayor movilidad debido a su mayor energía potencial.

Debido a la no linealidad del campo eléctrico, que complica las ecuaciones que describen las trayectorias de los iones en TWIMS, no existe una relación directa entre la movilidad iónica de cada ion y el tiempo de llegada, al contrario de lo que sucede en DTIMS. Este hecho hace que no sea posible calcular directamente los valores de CCS en TWIMS (^{TW}CCS) a partir de los tiempos de llegada (t_A). Por ello es necesario calcular los valores de ^{TW}CCS a partir de la calibración de la celda de movilidad utilizando patrones que generan iones para los cuales ya se conocen sus valores de CCS_{ref} (métodos de calibración secundarios). Generalmente, estos valores de CCS_{ref} suelen ser los obtenidos en sistemas de DTIMS ($^{DT}CCS_{ref}$).

El protocolo de calibración y obtención de los valores de CCS en un sistema de TWIMS es el siguiente: primero, a partir de los $^{DT}CCS_{ref}$ de los patrones utilizados en la calibración, se calculan sus CCS corregidos (CCS'),

$$CCS' = CCS_{ref} \cdot \frac{\sqrt{\mu}}{z} \quad (\text{ecuación 2.4})$$

donde $\mu = \frac{m_{ion} \cdot m_{gas}}{m_{ion} + m_{gas}}$, y m_{ion} y m_{gas} son las masas del ion del patrón de calibración y del gas de deriva (generalmente N_2), respectivamente. A continuación, el tiempo de llegada corregido (t'_A) se calcula a partir del tiempo de llegada experimental (t_A) del ion de calibración, según la ecuación 2.5,

$$t'_A = t_A - c \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (\text{ecuación 2.5})$$

donde $c = \frac{EDC}{1000}$, y EDC es el coeficiente de retardo del ciclo de trabajo mejorado (EDC) del instrumento. Finalmente, a partir de la correlación lineal existente entre los valores corregidos de los CCS (CCS') y de los tiempos de llegada (t'_A) (ecuación 2.6) se obtiene los coeficientes experimentales A y N .

$$CCS' = A t'_A + N \quad (\text{ecuación 2.6})$$

Estos coeficientes A y N son los que se utilizan posteriormente en el cálculo de los valores de CCSs de los patrones de calibración (estimar exactitud) y de los analitos (análogos de la PLTX) por interpolación de los correspondientes t'_A y CCS' medidos y corregidos, siguiendo las recomendaciones de Thalassinos et al. (2009) [238].

La selección del tipo de patrón de calibración a utilizar en el sistema de TWIMS es de gran importancia para garantizar mediciones precisas y confiables. Además de ser necesario conocer los valores de $^{DT}CCS_{ref}$ de estos patrones (bien caracterizados

previamente por DTIMS), es importante que tanto su tamaño (m/z) como la forma o el tipo de estructura química sean similares a los analitos en estudio. El cálculo de $^{TW}CCSs$ mediante métodos secundarios de calibración hace que estos valores sean dependientes del set de compuestos elegidos para este proceso pudiendo afectar de manera significativa a la exactitud de las mediciones de $^{TW}CCSs$ experimentales. La Figura 2.9 muestra un esquema del sistema de Q-TOF con la celda de movilidad TWIMS integrada.

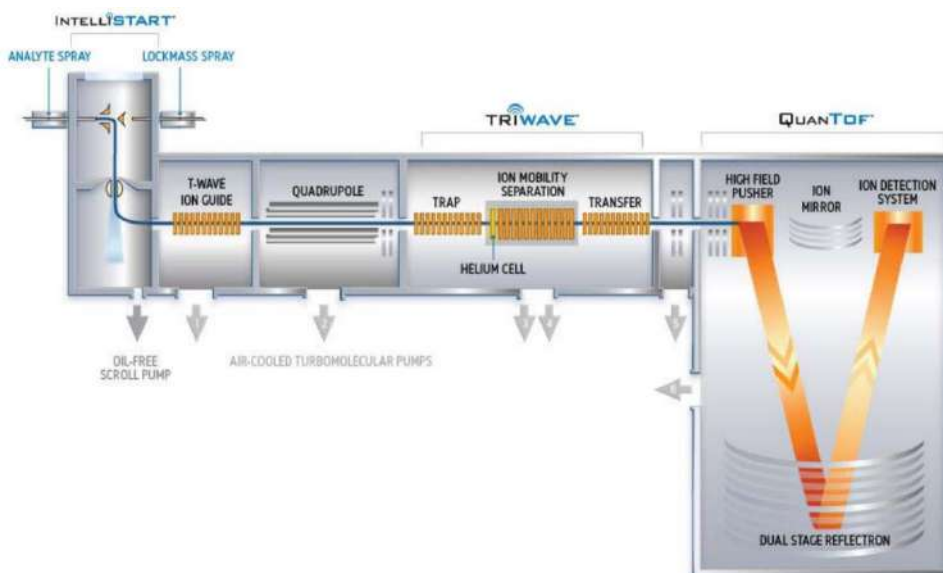


Figura 2.9. Esquema del sistema Q-TOF con la celda TWIMS integrada y comercializado por Waters. Fuente: https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/SW_NMS2011_Product_intr_Vendors_sem_44_Alist_air_Wallacepdf.pdf.

Por último, en TIMS se aplica un campo eléctrico (de la entrada a la salida de la celda de movilidad) en sentido contrario al del caudal del gas de deriva (N_2) (de la salida a la entrada de la celda de movilidad) (Figura 2.7c). Los iones más cargados y compactos pueden avanzar mucho más rápidamente hacia la entrada de la celda de movilidad impulsados por el campo eléctrico, mientras que los iones más grandes y menos favorecidos aerodinámicamente presentan una mayor resistencia para su avance en el sentido del campo eléctrico y se mueven más lentamente; pero, que impulsados por el gas de deriva, se aproximarán más a la salida de la celda en comparación con los iones más ligeros. El equilibrio entre el potencial aplicado y el caudal de gas permite atrapar los iones en diferentes secciones axiales dependiendo de su movilidad. Los iones terminan liberándose secuencialmente al ir disminuyendo de manera continua el campo eléctrico, lo que da como resultado tiempos de llegada que son inversamente proporcional a la movilidad reducida ($1/K_0$). En primer lugar,

se liberan los iones con menor movilidad (iones más grandes, más desplegados y menos cargados) que están más cerca de la salida, mientras que los iones de alta movilidad (iones más pequeños, más compactos y menos cargados) son los últimos en salir de la celda de movilidad iónica ya que han conseguido avanzar más hacia la entrada en el sentido del campo eléctrico. La Figura 2.10 muestra un esquema del sistema Q-TOF con la celda de movilidad TIMS integrada. En términos de resolución en movilidad iónica, la técnica TIMS es la que actualmente proporciona la mayor resolución pudiendo alcanzar hasta resoluciones de 200, frente al TWIMS que puede trabajar en un máximo de resolución de 65 y el DTIMS que con los modos *multiplexing* pueden llegar a proporcionar resoluciones de hasta 100–120. Sin embargo, el modo de operación del TIMS es más complejo que con las otras técnicas de IMS (DTIMS y TWIMS), requiriendo una mayor especialización y experiencia tanto para los procesos de operación/adquisición de datos, como para la interpretación de los mismos. En este caso, el cálculo de los valores de ^{T}CCS s, al igual que en el TWIMS, requiere un proceso de calibración secundario utilizando patrones cuyos CCSs han sido previamente calculados en DTIMS.

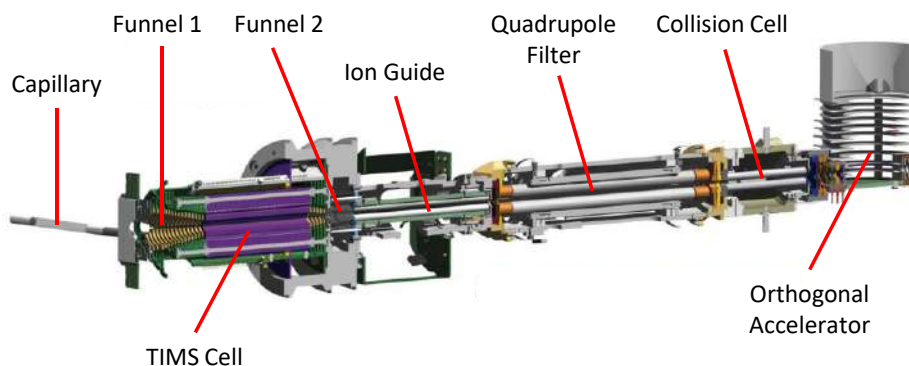


Figura 2.10. Esquema del sistema Q-TOF con la celda de movilidad TIMS integrada y comercializado por Bruker. Fuente: Meier et al. (2021) [239].

Hasta el momento no hay ninguna información relativa al estudio de la movilidad iónica de la PLTX_{std} o análogos de la PLTX, pero la IMS está siendo últimamente utilizada en análisis de otras toxinas marinas. Por ejemplo, en la determinación de toxinas paralizantes presentes en mariscos se ha utilizado el FAIMS para reducir el ruido de fondo de los cromatogramas y de los espectros de masas, de manera que se facilitaba su interpretación y se conseguía prevenir algunas interferencias isobáricas [240]. Por otro lado, se han estudiado análogos de las saxitoxinas utilizando TWIMS con el objetivo de ayudar a separar y caracterizar los diferentes isómeros presentes en patrones de saxitoxinas y, por primera vez, se calcularon sus ^{TW}CCS [241].

2.2. Experimental y resultados

Este Capítulo 2 se centra en los aspectos más relevantes de la metodología analítica aplicada en esta Tesis para el estudio y determinación de los análogos de la PLTX producidos por la cepa de *Ostreopsis cf. ovata* del Mediterráneo, como son la PLTX isobárica (iso-PLTX) y las ovatoxinas (OVTXs). En relación con el tratamiento de muestra se discuten los aspectos más significativos de la extracción de las toxinas, número de extracciones necesarias y tipos de disolventes a utilizar en la extracción (Artículo #1). Por otro lado, debido al complejo espectro de masas que se observa para esta familia de toxinas y las variaciones que se pueden producir según la instrumentación utilizada, en este capítulo se comparan diferentes estrategias para el análisis cuantitativo utilizando UHPLC-ESI-HRMS, con el fin de obtener una metodología robusta y comparable, incluso cuando se lleva a cabo en instrumentos y períodos de tiempo diferentes (Artículo #1). La metodología desarrollada (tratamiento e instrumentación) en el Artículo #1 es la que se utiliza para el análisis de las toxinas producidas por las células de *O. cf. ovata*, y cuyos resultados se incluyen en los Capítulos 3 y 4, y en los Artículos #1, #3, #4 y #5.

Hasta ahora, los trabajos publicados únicamente han utilizado ESI y no hay ningún dato sobre la utilización de APCI y APPI para el análisis UHPLC-HRMS de estas moléculas. Por ello, se ha querido evaluar el potencial de estas dos técnicas alternativas de ionización. Así, en este Capítulo 2 se muestran los resultados obtenidos sobre la evaluación del APCI y del APPI como técnicas alternativas de ionización en el acoplamiento UHPLC-HRMS para el análisis de los análogos de la PLTX.

Por otro lado, durante el período de una proliferación de *O. cf. ovata* (varios meses) es necesario recoger un importante número de muestras lo que implica un número muy elevado de análisis y un tiempo de análisis y de procesamiento de datos ingente. Por esta razón y sabiendo las capacidades de alto rendimiento del MALDI-TOF, en este capítulo también se evalúa el potencial de esta técnica para la determinación de los análogos a la PLTX y la capacidad para llevar a cabo el análisis de muchas muestras de manera rápida y eficiente.

Finalmente, en esta Tesis también se ha querido explorar el potencial de la técnica de movilidad iónica-espectrometría de masas para el estudio de esta familia de toxinas. El Artículo #2 recoge los resultados del primer estudio de movilidad iónica para estas toxinas. En este trabajo se comparan los resultados obtenidos con tres instrumentos que están equipados con tres tecnologías de movilidad iónica diferentes (DTIMS-MS, TWIMS-MS, TIMS-MS). Además, se calculan, por primera vez, los valores experimentales de CCSs de la PLTX_{std} y de algunos de sus análogos (OVTX-a y OVTX-b).

El presente Capítulo 2 finaliza con un estudio del defecto de masa de Kendrick para esta familia de compuestos con el objetivo de explorar las posibilidades de su utilización como parámetro adicional en la identificación/confirmación de estos analitos en las muestras.

A person is sitting on dark, jagged rocks in the foreground, looking out at the ocean. The water is shimmering with sunlight, creating a rainbow-like effect. The sky is a soft, hazy orange and yellow, suggesting sunset or sunrise. A white rectangular box with a thin black border is overlaid on the upper part of the image, containing text.

2.2.1. Artículo #1

Multiply charged ion profiles in the UHPLC- HRMS analysis of palytoxin analogues from Ostreopsis cf. ovata blooms

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Francisco Javier Santos, Elisa Berdalet, Encarnación Moyano

Analytical Methods **2023**, 15, 1355

Cite this: *Anal. Methods*, 2023, 15, 1355

Multiply charged ion profiles in the UHPLC-HRMS analysis of palytoxin analogues from *Ostreopsis cf. ovata* blooms†

 Noemí Inmaculada Medina-Pérez,^{1b,ab} Francisco Javier Santos,^{1b,ac}
 Elisa Berdalet^{1b,b} and Encarnación Moyano^{1b,*ac}

Analogues of palytoxin (PLTX), one of the most potent marine biotoxins, are produced by some species of the marine dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*. The proliferation of these species in different coastal zones represents a potential threat of seafood poisoning in humans because the produced toxins can be transferred through marine food webs. Thus, the determination of the concentration of PLTX analogues (ovatoxins—OVTXs, ostreocins—OSTs and isobaric PLTX) in different matrices (seawater, marine fauna, etc.) is necessary to protect human health. This study is addressed to overcome some of the challenges that the chemical complexity of these molecules poses to their quantification by ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry-based techniques (UHPLC-HRMS). In particular, the mass spectra of the palytoxin analogues show the presence of a large number of ions (including mono- and multiply charged ions) whose nature, relative abundances and behavior can lead to quantitation errors if the correct ions are not selected. In this work, the variability of the PLTX and OVTX profiles under different instrument conditions, including the use of diverse electrospray generation sources and different quantitation methods, is studied. Moreover, the extraction protocol in seawater containing *Ostreopsis* sp. *ovata* cells is also evaluated. The use of a heated electrospray operating at 350 °C and a quantitative method including ions from different multiply charged species provides a more robust and reliable method for overcoming the problems due to the variability in the toxin's mass spectrum profile. A single MeOH : H₂O (80 : 20, v/v) extraction is proposed as the best and reliable procedure. The overall method proposed was applied to quantify OVTXs (-a to -g) and iso-PLTX along the 2019 *Ostreopsis cf. ovata* bloom. The cells contained a total toxin concentration of up to 20.39 µg per cell.

Received 14th December 2022
Accepted 6th February 2023

DOI: 10.1039/d2ay02019j

rsc.li/methods

1. Introduction

Certain benthic dinoflagellates, which grow preferentially attached to biotic and abiotic substrates in the seabed, are of special interest because some of them can produce toxic compounds that affect marine fauna and humans. In particular, *Ostreopsis*, a genus of tropical origin, has been increasing its biogeographic distribution to temperate waters since the beginning of the 21st century and producing recurrent blooms on certain Mediterranean beaches.¹ Some *Ostreopsis* species can produce palytoxin analogues (ovatoxins—OVTXs, ostreocins—OSTs and isobaric palytoxin—iso-PLTX)^{2–7} that have been related, although not completely proven yet, to dramatic

seafood poisonings in tropical areas.⁸ In the Mediterranean, iso-PLTX, OVTX-a and OVTX-b were found in the tissues of some bivalve (mussels, clams, and hairy mussels) and other marine fauna collected from Greek, French and Italian coasts, but seafood-borne poisonings have not been (luckily) detected in humans after their consumption.^{9–14} However, respiratory and cutaneous irritations, general malaise and other relatively mild symptoms have been documented in beach users of certain areas (in Algeria, Croatia, France, Italy and Spain) where *Ostreopsis* spp. proliferations occur.^{15–20} Massive mass mortalities of benthic marine fauna have also been found concurrently with high concentrations of *Ostreopsis* species. For this reason, the recurrence of *Ostreopsis* proliferation in touristic areas in summer and the potential risk of food poisoning have raised concern and incentivized monitoring to prevent impacts on human health.^{17,21} The biogeographic expansion of *Ostreopsis* spp., likely linked to climate change and anthropic pressures on the coasts, is also a matter of study,²² especially after the important bloom episodes in the Bay of Biscay (France) affecting between 700 and 3000 people in 2021.²³

^aDepartment of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain. E-mail: encarna.moyano@ub.edu

^bDepartment of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona, Spain

^cWater Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2ay02019j>

Methodological advances in the last few decades have allowed the efficient and reliable development of extraction and analytical determination methods (chromatography and mass spectrometry) for the most common phycotoxins (saxitoxin, domoic acid, lipophilic toxins, and microcystins) whose presence in seafood and drinking water is strictly controlled by European regulations.^{24,25} However, the analogues produced by *Ostreopsis* have not yet been included in routine monitoring as blooms of these microalgae are still an emerging and poorly characterized issue that requires fundamental research of their dynamics and impacts on human health and the environment. Furthermore, it is also necessary to overcome some analytical methodology limitations related to the quantitative analysis of toxins produced by *Ostreopsis* in different matrices.

The extraction of PLTX analogues from samples or cultures of *Ostreopsis* spp. is conducted on cell pellets obtained by centrifugation or filtration (nylon filters). Toxins are extracted using mixtures of MeOH : H₂O (50 : 50 or 80 : 20)^{2,7,12,26,27} with, sometimes, the addition of small percentages of acetic or formic acid to improve recovery.^{28–30} Despite some differences in the extraction used in the published studies, the obtained recoveries are similar to those reported by Ciminiello *et al.*, *i.e.* 91–98%.⁷

Nowadays, PLTX analogues are mainly determined by mass spectrometry (MS)-based techniques, since they offer high detection capabilities and provide exhaustive structural information and accurate quantitative analysis with a relevant degree of selectivity. Different OVTX analogues (OVTX-a to -i) produced by *Ostreopsis* spp. have been identified by multiple-stage mass spectrometry (MSⁿ) and high-resolution mass spectrometry (HRMS),^{3,5} and the isobaric palytoxin molecule produced by the microalga has also been identified as a structural isomer of the palytoxin produced by the soft coral *Palythoa tuberculosa*.²

PLTX analogues are chromatographically separated by UHPLC using reversed-phase C18 columns^{7,30} and detected by mass spectrometry using electrospray ionization (ESI) as an ionization technique and a hybrid mass spectrometer such as a linear ion trap-Orbitrap (LIT-Orbitrap).^{3,29,31} By electrospray, a large number of mono- and multiply charged ions are mainly generated by proton transfer in addition to adducts formed with monovalent and divalent cations (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and Fe²⁺). Additionally, some fragment ions because of in-source collision-induced dissociation (in-source CID) processes can also be generated. The ESI-HRMS spectrum profile is used as a fingerprint for the identification of both iso-PLTX and OVTXs produced by *Ostreopsis cf. ovata*.

So far, the quantitative estimation of iso-PLTX and OVTX analogues has been based on the selection of only two ions: [M + 2H⁺ - H₂O]²⁺ as representative of doubly charged ions and [M + H + Ca]³⁺ or [M + 2H + K]³⁺ for triply charged ions depending on the ion abundance observed.^{2,29,32,33} However, the large number of ions that can be generated by ESI from each molecule and the subsequent variation of the mass spectral profile²⁸ (depending on the working conditions) can have relevant implications for the correct quantification of the concentration of each analogue.

In this work, two key aspects in the quantitative determination of the PLTX analogues produced by *O. cf. ovata* are studied: the variability of the PLTX analogue mass spectral profiles under different instrument conditions, including the use of different electrospray sources and different extraction solvents. The proposed method was then applied to determine the concentrations of PLTX analogues along the 2019 natural *O. cf. ovata* bloom.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

The PLTX standard (from *Palythoa tuberculosa*) was purchased from Wako Chemicals GmbH (Germany) (lot number: SAH7036), and it was used to prepare standard calibration solutions. Water, acetonitrile (ACN), methanol, formic acid and acetic acid (LC-MS grade >98%) used to prepare mobile phases and standard solutions and as extraction solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

PLTX stock standard solution (100 µg mL⁻¹) was prepared by weight in MeOH : H₂O (50 : 50, v/v). PLTX calibration working solutions were prepared at concentration levels ranging from 0.005 to 3 µg mL⁻¹ by dilution of the stock standard solution in MeOH : H₂O (80 : 20, v/v). All standard working solutions were stored at -20 °C until their use.

Solvents used for the mobile phase were filtered through 0.22 µm nylon membrane filters (Whatman, Clifton, NJ, USA) before use. Nitrogen (99.95%) supplied by Linde (Barcelona, Spain) was used as the sheath gas and auxiliary gas in a heated electrospray ionization (HESI) source. GF/F glass fiber filters (25 mm diameter) were provided by Whatman (Clifton, NJ, USA). Neutral Lugol solution was prepared with I₂ and IK, from Merck, Darmstadt, Germany.³⁴

2.2. Instrumentation and analytical procedure

2.2.1. UHPLC-HRMS. The chromatographic separation was performed in an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system equipped with an Accela 1250 pump, an Accela autosampler, and a column oven (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA). The reversed-phase chromatographic separation was performed on a Hypersil GOLD C18 column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.9 µm particle size) (Hypersil, Thermo Fisher Scientific) packed with fully porous silica particles. The chromatographic separation was performed in gradient elution mode using water as solvent A and acetonitrile as solvent B, both containing 0.1% formic acid. The gradient elution program started with 30% solvent B for 1.5 min followed by a linear gradient up to 35% solvent B in 12 min. Afterward, in the third stage, solvent B was raised to 90% during 1.5 min and these conditions were maintained in an isocratic step for one additional minute before returning to the initial conditions. The mobile phase flow rate was 300 µL min⁻¹ and the column temperature was held at 23 °C. This chromatographic system was coupled to two mass spectrometers: System I was a quadrupole-Orbitrap (Q-Orbitrap) and System II was a linear ion trap-Orbitrap (LIT-Orbitrap).

System I was a hybrid mass spectrometer equipped with a Q-Orbitrap (Q-Exactive Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) mass analyzer and a heated electrospray of second-generation (HESI-II) as an ionization source, which operated in positive ion mode. The HESI-II source used nitrogen as sheath gas, sweep gas and auxiliary gas at flow rates of 60, 0 and 10 au (arbitrary units), respectively. The temperatures of the vaporizer and ion transfer tube were set at 350 °C (Method 1) or 25 °C (Method 2) and 275 °C, respectively. The spray voltage was +3.5 kV and the S-lens RF level was 70 au. The Q-Orbitrap mass spectrometer operated in positive ion mode and full scan MS mode (m/z 800–1500) at a mass resolution of 70 000 at full width at half maximum (FWHM) (m/z 200). The Xcalibur software v2.1 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the UHPLC-HRMS system and to acquire and process the mass spectrometry data.

System II was a hybrid mass spectrometer equipped with a LIT-Orbitrap (LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific) and a classical electrospray of a second-generation (ESI) source without thermal assistance (Method 3), which operated in positive ion mode. The ESI source used nitrogen as sheath gas, sweep gas and auxiliary gas at flow rates of 60, 0 and 10 au (arbitrary units), respectively. The temperature of the ion transfer tube was set at 275 °C. The spray voltage and the S-lens RF level were +3.5 kV and 70 au, respectively. The LIT-Orbitrap mass spectrometer operated in full scan MS mode (m/z 800–1500) at a mass resolution of 70 000 at full width at half maximum (FWHM) (m/z 200). The Xcalibur software v2.1 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the UHPLC-HRMS system and to acquire and process the MS data.

Analytical standards for iso-PLTX and OVTXs are not available; thus, their quantitative determination was based on PLTX equivalents. The calculation of the elemental formulae was based on the monoisotopic mass with a mass tolerance of <5 ppm and an isotope fit score of >80%. Extracted ion chromatograms for iso-PLTX and OVTXs were reconstructed using the integrated signal of the ions selected (Table S2†) from the different cluster ions observed for each toxin ($[M + 3H - 4H_2O]^{3+}$, $[M + 3H - 3H_2O]^{3+}$, $[M + 3H - 2H_2O]^{3+}$, $[M + 3H - H_2O]^{3+}$, $[M + H + Mg]^{3+}$, $[M + H + Ca]^{3+}$, $[M + H + Fe]^{3+}$, $[M + 2H - 3H_2O]^{2+}$, $[M + 2H - 2H_2O]^{2+}$, $[M + 2H - H_2O]^{2+}$, $[M + 2H]^{2+}$, $[M + H + Na]^{2+}$, and $[M + H + K]^{2+}$). The limit of quantitation of the PLTX standard was estimated by injecting a blank sample filter extract spiked with the PLTX standard at low concentration levels and considering a signal-to-noise ratio (S/N) of 10.

2.2.2. Study of the presence of metal ions in the UHPLC-HRMS system. Studies of the effect of the presence of alkali metal ions (calcium and sodium) in the UHPLC-HRMS system (System I, Method 1) on the mass spectrum toxin profiles were performed through post-column addition (T-piece) of 1 mM CaCl₂ and 3 mM NaCl at 5 μ L min⁻¹ into the mobile phase (300 μ L min⁻¹). Calcium and sodium concentrations in the mobile phase after the post-column addition were 0.68 mg_{Ca} L⁻¹ and 1.15 mg_{Na} L⁻¹.

2.2.3. Sample treatment. The PLTX analogues were extracted from benthic *Ostreopsis cf. ovata* natural samples collected in the GF/F filters (see the next Section 2.3) using 2 mL MeOH : H₂O (80 : 20, v/v) and an ice-cooled ultrasonic bath (5 min). The

supernatant was centrifuged (3893 g, 4 °C, 5 min), filtered through a 0.22 μ m nylon membrane and stored in amber glass vials at -80 °C until their analysis by UHPLC-HRMS.

This extraction protocol was applied to evaluate extraction efficiency (EE%) and the matrix effect (ME%) using filters containing *O. cf. ovata* cells obtained during the bloom and proved to be free of any PLTX analog by previous analysis. These filters will be referred to as “blank sample filters”.

For the EE%, three blank sample filters were spiked with a 2 μ g PLTX standard and submitted to the indicated extraction procedure, in order to obtain 1 μ g mL⁻¹ of the PLTX standard in the final extract. In parallel, three non-spiked blank sample filters were also extracted and the PLTX standard was added at a final concentration of 1 μ g mL⁻¹ in the obtained extracts and before the injection into the UHPLC-HRMS system. To evaluate the EE%, the signal of the PLTX standard in the two obtained extracts was compared.

The ME% has been evaluated by analyzing four different extracts of the non-spiked blank sample filters (post-extraction). The PLTX standard was added to four aliquots of each extract to obtain four spiked concentration levels (0.035, 0.200, 0.500 and 1 μ g mL⁻¹) that were injected into the UHPLC-HRMS system in triplicate. The obtained areas were interpolated into an external calibration PLTX curve to obtain the recovered concentration. The ME% was estimated by correlating the recovered vs. the spiked concentration of each extract [ME% = (1 - slope) × 100].

2.2.4. Comparative study of different UHPLC-HRMS methodologies. A comparison of the quantification of toxins using three different acquisition methods has been conducted. All samples collected in the *O. cf. ovata* proliferation in 2019 were analyzed using the two mass spectrometers (System I and System II). Moreover, the quantification was performed based on two types of extracted ion chromatograms. Quantification method A (QM-A): the most frequently used method in published studies, where the integrated signal corresponds to the two most intense ions observed. Quantification method B (QM-B): where the integrated signal corresponds to the group of ions selected in the present study, as explained earlier (see the last paragraph of Section 2.2.1).

For clarity, Table S1† shows a summary of the analytical methods tested with an indication of the instrumentation and electrospray ionization systems used and the type of quantification approach applied.

2.3. Study site and *Ostreopsis cf. ovata* bloom sampling in 2019

The natural samples for this study were obtained from the benthic *Ostreopsis cf. ovata* bloom that occurred in the 2019 summer at the rocky beach of Sant Andreu de Llanvanes (Catalan coast of Spain, 41°33.13'N; 2°29.54'E). At this sampling site, the sedimentary substrate extends from the shoreline to at least 5–7 m depth and is densely colonized by macroalgae, mainly *Ellisolandia elongata* Ellis & Solander and *Jania rubens* (Linnaeus) J. V. Lamouroux. To these macroalgae, *Ostreopsis* adheres and proliferates during the summer-fall period.^{17,35} From July 19th to November 7th, samplings were performed at

a very shallow depth (20–50 cm) at three points (A, B and C) separated by approximately 10 m among them, to monitor the *O. cf. ovata* bloom and characterize the temporal toxin variation.

On every sampling day, ca. 10–20 g of fresh macroalgae were collected and transferred into a 250 mL plastic bottle and filled with a known volume (200–300 mL) of the surrounding seawater. Each collected sample was then vigorously shaken for 1 minute, and subsequently sieved through a 200 μm mesh. A subsample of the percolated seawater (125 mL), which contained *O. cf. ovata* and the accompanying microbiota, was preserved with 0.5 mL of Lugol solution to estimate the concentration of *O. cf. ovata* cells. *Ostreopsis cf. ovata* cell concentrations were estimated by using a 1 mL Sedgwick–Rafter counting cell chamber under a Leica-inverted light microscope. This is a suitable counting method to quantify the number of cells in the range of 10^5 – 10^6 cells per L_{water} , with a 5% confidence limit. The sampling and counting method in this study had an estimated global variation coefficient (CV%) of 20%. The macroalgae were slightly wiped and weighed. Cell abundances were expressed as cells per g of fresh weight (FW) of macroalga. For toxin characterization, 5 to 30 mL subsamples of the percolated water were filtered through 25 mm GF/F filters and frozen at -80°C until extraction. Water temperature and salinity were measured using a microprocessor conductimeter WTW (Model LF197).

Some samples collected during the bloom were used to conduct several methodological tests and are explained in the different sections of this paper.

3. Results and discussion

3.1. UHPLC-HRMS of PLTX analogues

Traditionally, the methods published describe the use of HPLC separations of PLTX analogues based on reversed-phase chromatography using C18 columns (Gemini C18) packed with 3 μm fully porous particles and ACN:H₂O (with acetic acid) mobile phases.^{29,36–38} However, in the last decade, most methods proposed the use of UHPLC columns packed with superficially porous particles (Poroshell 120 EC-C18 and Kinetex C18 columns)^{5,14,39} and Terner *et al.*⁴⁰ used 1.8 μm fully porous particles for the first time.^{41,42} In the present work, an Hypersil GOLD C18 column packed with 1.9 μm fully porous particles is used to take advantage of the higher chromatographic efficiency it provides. The chromatographic separation of PLTX analogues was optimized in the present study by using an *O. cf. ovata* extract that contains most of the target compounds (Fig. 1).

Different gradient elution programs and different mobile phase composition (ACN:H₂O with acetic or formic acid) were tested. The two most intense ions observed were both the triply charged $[\text{M} + 3\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ and the doubly charged $[\text{M} + 2\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, which showed the same relative abundance when using both mobile phases (adding acetic or formic acid). However, by using formic acid the chromatographic peak was slightly narrower indicating an improvement in the chromatographic efficiency (7199 theoretical plates when using formic acid vs. 6741 theoretical plates when using acetic acid). This fact was

probably due to the effect of the lower $\text{p}K_a$ of formic acid compared to that of acetic acid; the higher acidity favored the protonation of the silanol groups on the surface of the silica particles preventing their collateral interactions with protonated basic nitrogen on the toxin molecule. Furthermore, the slow step gradient elution (from 30% to 35% in 12 min, Section 2.2.1) using ACN:H₂O (0.1% formic acid) allowed the baseline chromatographic separation of all compounds in less than 6 minutes (Fig. 1a). As can be seen in Fig. 1a, iso-PLTX elutes ca. 1 min earlier than the PLTX standard.

The chromatographic system was coupled to two mass spectrometer systems (System I and II) equipped with different generations of electrospray sources (Method 1, 2 or 3, detailed below). The study of the HRMS spectra of iso-PLTX and OVTXs revealed the formation of a large number of ions for each target compound. As an example, Fig. 1b shows the HRMS spectrum obtained for the PLTX chromatographic peak in the analysis of a PLTX standard solution ($1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) by UHPLC-HRMS (HESI-II, Method 1 at 350°C), and Fig. 1c shows zoomed views of the m/z areas of doubly and triply charged ions. Furthermore, Table S2† summarizes the most abundant ions (exact mass and monoisotopic mass of the most abundant isotope) observed in the UHPLC-HRMS analysis of an *O. cf. ovata* 2019 sample extract that contained the target marine biotoxins (iso-PLTX and OVTXs). The complex HRMS spectra include doubly and triply charged species originated by proton transfer mechanisms (e.g. $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$), often with subsequent in-source CID fragmentation (e.g. $[\text{M} + 2\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ or $[\text{M} + 3\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{3+}$) and adduct ion formation with monovalent and divalent cations (e.g. $[\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}]^{2+}$, $[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ or $[\text{M} + \text{H} + \text{Ca}]^{3+}$). These complex mass spectra, while challenging the quantitative analysis, are useful for the identification of PLTX congeners. Furthermore, some of these ions can be confused with other possible nearby isobaric ions, with differences in their m/z values lower than 0.005 indicating that it is necessary for a mass resolution higher than 400 000 FWHM to distinguish these ions. In fact, the maximum available mass resolution in the Orbitrap instrument used was 140 000 FWHM. For instance, the ion at 1359.7267 (the most abundant isotope) could be assigned to both $[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ (3.7 ± 1.4 ppm) or $[\text{M} + \text{Ca}]^{2+}$ (1.5 ± 1.0 ppm) and the ion at 901.4914 (the most abundant isotope) could also be assigned to $[\text{M} + \text{H} + \text{Mg}]^{3+}$ (2.5 ± 2.3 ppm) or $[\text{M} + 2\text{H} + \text{Na}]^{3+}$ (2.3 ± 2.2 ppm). For the final assignment (Table S2†), the information obtained from the experiments where alkali ions were added by post-column addition (discussed in Section 3.2) was useful, which was in agreement with the results reported by Cimminiello *et al.*⁴¹ In preliminary tests, it was observed that the nature of ions and their relative abundances changed with working conditions. Thus, a detailed study of these variations using different instrument conditions and different generations of electrospray ionization sources was conducted. The PLTX standard solution used was freshly prepared from the stock standard solution for each injection at an identical concentration ($1\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Fig. 2 shows the HRMS spectra of the PLTX standard analyzed at different times: on the day, one week and one year later (stock standard maintained frozen at -80°C) and using the same instrument and source parameters after instrument

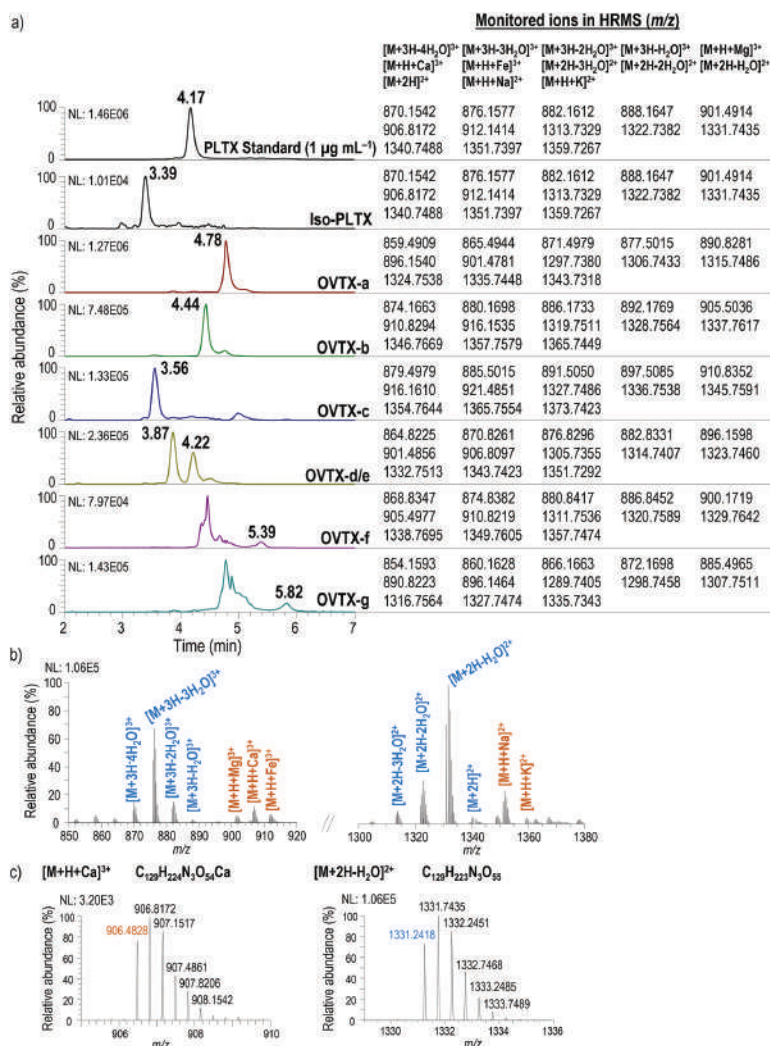


Fig. 1 (a) UHPLC-HRMS chromatogram of a 2019 sample extract that contains the PLTX analogues (m/z of the extracted ion chromatogram is shown) (the ions listed are the monoisotopic mass of the most intense isotopes); (b) HRMS spectra corresponding to the PLTX standard at $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; (c) zoomed view of two m/z areas to visualize the isotope cluster of doubly and triply charged ions, as an example (mass error < 5 ppm).

maintenance and tuning. As shown in Fig. 2, the relative ion ratio of the different ions changed over time resulting in significant modification of the mass spectrum profile. In particular, focusing on the most abundant ions, $[M+H+Ca]^{3+}$ at m/z 906.4828, $[M+2H-H_2O]^{2+}$ at m/z 1331.2418 and $[M+3H-H_2O]^{3+}$ at m/z 887.8303, when the abundance of one of them

decreased, the relative contribution of the other increased. These differences might depend on the state of the instrument (cleanliness and small variations in the voltages applied to the lenses, temperatures and gas flow rates) and the salinity of samples injected before the analysis of the PLTX standard. This is an important fact to consider, especially for those

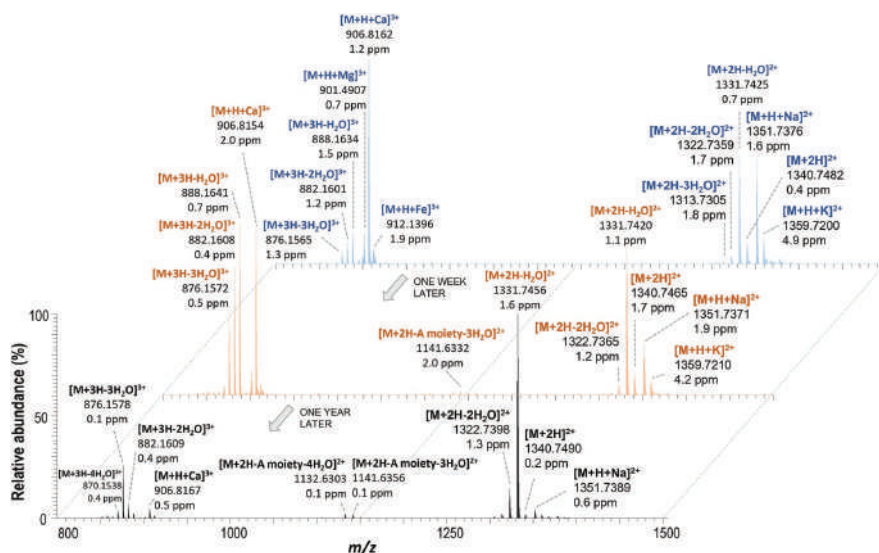


Fig. 2 HRMS spectra of freshly prepared PLTX standard solutions ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) from the stock solution made after purchasing the chemical and one week and one year later by using the same UHPLC-HRMS instrument conditions and electrospray source (ESI, Method 3).

instruments that process samples of different natures and concentrations.

Moreover, the intensity of the different ions and their relative abundances also varied when the type of electrospray ionization source changed (Fig. 3). In the analysis of the PLTX standard, the intensity of all ions was higher when the HESI-II source was used with the vaporizer temperature set at $350 \text{ }^\circ\text{C}$ (Method 1, Table S1†). This may be due to the efficient desolvation/

ionization of this electrospray source that produced a higher number of gas-phase ions. However, the abundance of fragment ions due to water loss increased, indicating that they could be related to possible thermal degradation. Nevertheless, HESI-II (Method 1, $350 \text{ }^\circ\text{C}$) is preferred to the other electrospray sources that work at room temperature, because the ion responses are much higher. Therefore, these conditions were proposed for toxin analysis along the *O. cf. ovata* 2019 bloom.

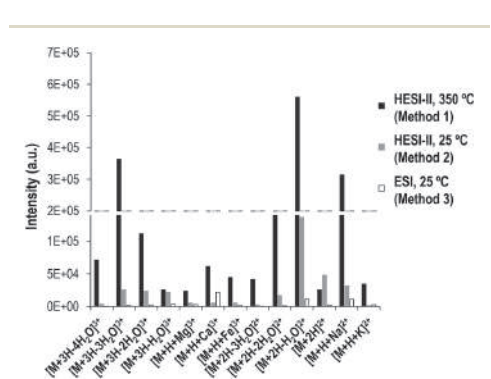


Fig. 3 Intensity of ions detected in the UHPLC-HRMS analysis of the PLTX standard ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) using HESI-II (Method 1 or 2) or ESI (Method 3).

3.2. Effect of the presence of calcium/sodium on the toxin mass spectral profiles

To investigate the effect of salinity on the mass spectral profile of PLTX analogues, the post-column addition of Ca^{2+} or Na^+ was performed and compared with that under control conditions. It was observed that the ionic species changed depending on the presence of alkali metal ions in the UHPLC-HRMS system (Fig. S1†). The base peak in the mass spectrum changed from the triply charged ion $[\text{M} + \text{H} + \text{Ca}]^{3+}$ when Ca^{2+} was added (Fig. S1b†) to the doubly charged ion $[\text{M} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$ when Na^+ was added (Fig. S1c†), while ions such as $[\text{M} + 2\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and $[\text{M} + 3\text{H} - n\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ were still present but at different relative abundance. Furthermore, the intensity of the ions at m/z 1359.7267 assigned to $[\text{M} + \text{H} + \text{K}]^{2+}$ and m/z 901.4914 assigned to $[\text{M} + \text{H} + \text{Mg}]^{3+}$ remained unchanged or decreased with the addition of Ca^{2+} or Na^+ , respectively. These results compared to the control ones (Fig. S1a†) were in agreement with those of Ciminiello *et al.*³¹ that stated that the addition of divalent cations (Ca^{2+}) favour the formation of doubly charged ions and

the divalent cations (Na^+) favour the formation of triply charged ions. These results evidence that small variations in salt composition and concentration, in both the sample and mobile phase or even in the mass spectrometer environment, could produce changes in the HRMS spectrum profile of these toxins, which is a relevant aspect for the determination of marine toxins.

3.3. Toxin extraction

The literature shows that different protocols are being applied for the extraction of PLTX analogues from macroalgal samples. Essentially, the main differences between these protocols are in the methanol : water ratio and in the number of extraction steps used. In the present study, a double extraction *vs.* a single extraction using two extraction solvents, MeOH : H₂O (50 : 50, v/v) and MeOH : H₂O (80 : 20, v/v), were tested. For each condition and in triplicate, the same volume (20 mL) of the percolated seawater containing *O. cf. ovata* cells, obtained from the benthic samples (Section 2.3), was filtered through GF/F filters. The highest total toxin concentration in a sample ($1037 \pm 83 \text{ ng mL}^{-1}$) was obtained with a double extraction in MeOH : H₂O (80 : 20, v/v), while, the single extraction in MeOH : H₂O (80 : 20, v/v) yielded only $98 \pm 4\%$. In MeOH : H₂O (50 : 50, v/v), the toxin extracted accounted for $53 \pm 1\%$ in one single step and $42 \pm 9\%$ in a double step. In consequence, a single extraction with MeOH : H₂O (80 : 20, v/v) was proposed for further studies and EE% for these conditions (detailed in the Experimental section 2.2.3) was 95–116%. The ME% was evaluated as indicated in Section 2.2.3 and the correlation between the recovered and the spiked concentration is plotted in Fig. S2.† The slopes of the correlation curves for the four different extracts were between 0.86 and 1.02 indicating a ME% from –14% to 2%.

3.4. Effect of UHPLC-HRMS configuration systems on the quantitation of PLTX analogues

All the samples collected during the *O. cf. ovata* bloom in 2019 and extracted with the optimized extraction method (described in the Experimental section 2.2.3) were analyzed using System I (Methods 1 and 2) and System 2 (Method 3). Additionally, they were quantified with two ions (QM-A) or with the integrated signal of the most abundant isotope of all adduct ions (>5%) (QM-B), providing the results in picograms of each toxin per *O. cf. ovata* cell (pg per cell). A paired *t*-test at a 5% significance level was applied to evaluate the statistical differences between the three different methods used (Table S3†). The results showed that when using the quantitation method QM-A, there were significant differences (p -value < 0.05) between the three instrument methods (Methods 1–3). However, when using the acquisition method QM-B (the integrated signal of the most abundant isotopes of all adduct ions), there were no significant differences (p -value = 0.183) between instrumental Methods 1 and 2. This means that only the HESI-II source (Methods 1 and 2) provided comparable results. Furthermore, if the quantification methods are compared (QM-A *vs.* QM-B) using the three different methodologies, the p -values (using one or two tails) were always smaller for Method 1 (HESI-II at 350 °C), than those

found when using Method 2 (HESI-II at room temperature) or Method 3 (ESI source), indicating that Method 1 was yielding more comparable results.

As has been shown, the most abundant ions in the toxin profile can change in the ionization/mass spectrometry acquisition process, depending on the instrumental conditions used, but the ion profile can also change even between ovatoxins. Fig. 4 shows the abundance of OVTX-a (Fig. 4a) and OVTX-b (Fig. 4b) for two replicates (R1 and R2) of the same sample analyzed on different days. As can be observed, the abundance of the two most abundant ions ($[\text{M} + 3\text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ and $[\text{M} + 2\text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$) for OVTX-a varies from one replicate (R1) to another (R2) despite continuing to be the most abundant in both replicates. Conversely, the nature of the two most abundant ions for OVTX-b changes from one replicate to another. In the first replicate (R1), the two most abundant ions are $[\text{M} + 3\text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ and $[\text{M} + 2\text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ but in the second replicate (R2) were $[\text{M} + 2\text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$. The quantification procedure with a larger number of ions should be more robust since it considers these changes in the toxin mass spectral profile. When the intensity of the most abundant ion decreases, the intensity of another ion in the profile should increase. Using method QM-B, the maximum RSD% observed was 8% for the PLTX standard, while the RSD% was up to 28% when using method QM-A.

3.5. UHPLC-HESI-HRMS quality parameters

Table 1 summarizes the quality parameters estimated for the analysis of PLTX in *O. cf. ovata* samples using the proposed UHPLC-HESI-HRMS (System I – Method 1) method. The limit of quantification (LOQ), based on a S/N of 10 and estimated by spiking a blank sample filter extract with the PLTX standard at

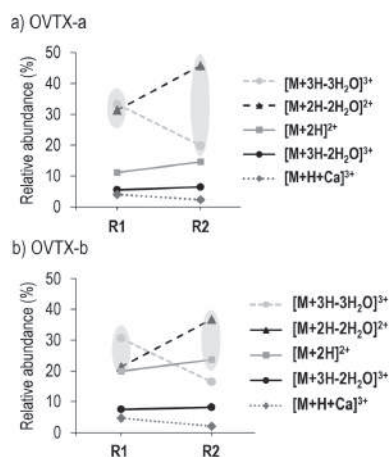


Fig. 4 Relative abundance of some ions of the (a) OVTX-a and (b) OVTX-b and between two different replicates (R1 and R2).

Table 1 UHPLC-HRMS quality parameters for the analysis of PLTX samples (System I, Method 1, QM-B)

	Concentration	%
Run-to-run precision (RSD, %)	Low level (75 ng mL ⁻¹)	1.3
	Medium level (800 ng mL ⁻¹)	1.0
Day-to-day precision (RSD, %)	Low level (75 ng mL ⁻¹)	1.6
	Medium level (800 ng mL ⁻¹)	3.4
Trueness (rel. error, %)	Low level (75 ng mL ⁻¹)	7.6
	Medium level (800 ng mL ⁻¹)	9.7
LOQ	6.5 ng mL ⁻¹	

low concentrations, was 6.5 ng mL⁻¹. Precision (run-to-run and day-to-day) and trueness were calculated by analyzing 5 replicates of the blank sample filter extract spiked with the PLTX standard at two concentration levels (low level: 75 ng mg⁻¹; medium level: 800 ng mL⁻¹). As can be seen in Table 1, precision values were always lower than 3.4% (RSD, %) and trueness values (rel. error, %) lower than 9.7%. These quality parameters indicated the good performance of the method for the determination of the target marine toxins.

3.6. Study of the *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2019

Using the proposed method, the temporal evolution of the toxin concentration per cell along the 2019 *O. cf. ovata* proliferation was studied. Fig. 5a shows the temporary abundance of *O. cf. ovata* per gram of macroalgae (an indicator of the intensity of the bloom) and the total toxin content per cell over time. It was observed that the toxin concentration was similar in the 3

collecting points during the proliferation (Fig. S3a†), so the average concentration (ABC) is used. During the sampling period, the water temperature and salinity were 15–27 °C and 37.6–38.2 g L⁻¹, respectively (Fig. S3b†).

The bloom developed exponentially (cells per g_{FW}) from the beginning of the sampling period (early June) until July 23rd. At this moment, the stationary phase of the bloom begins with a subsequent decline phase. The maximum toxin cell concentration was found at the beginning of the stationary phase with values between 14.66 and 19.11 pg per cell and in the decline phase with values of 19.29 ± 1.10 pg per cell (Fig. 5a). Concentrations of the same order of magnitude have been reported for other Mediterranean *O. cf. ovata* strains (22–75 pg per cell).^{27,42}

The OVTX analogues-a to -g were detected in most of the analyzed extracts (2019), while iso-PLTX was only detected on August 6th and September 3rd. In this period, the highest *O. cf. ovata* concentration (marked in Fig. 5a with a circle) was observed and the total toxin cell concentrations oscillated between 0.01 and 0.04 pg per cell within this period. In the rest of the samples, iso-PLTX was below the quantitation or detection limit. Regarding the toxin profile, the relative abundance of individual toxins was higher for OVTX-a and OVTX-b (abundance > 25%) followed by OVTX-c (3.06 ± 0.23%), OVTX-d (6.78 ± 0.67%), and OVTX-e (6.09 ± 1.18%), while the contribution of the other toxin analogues (OVTX-f, OVTX-g and iso-PLTX) corresponds to the remaining 2.5% (Fig. 5b). In all samples, OVTX-a and OVTX-f were the major and minor components of the toxin profile, respectively.

The main challenge posed by the *O. cf. ovata* blooms is to establish the link between cell abundance and toxin risk. The data suggest that there is no direct link and the intracellular toxin concentration was not constant, suggesting that complex interacting metabolic, physiological and ecological factors may be at play. Understanding the factors that control toxins is key to estimating the health and environmental risks associated with *O. cf. ovata* proliferations. Such studies are underway by many research groups today.

4. Conclusions

In this work, the variability of the PLTX analogue mass spectral profiles under different instrumental conditions, including the use of different generations of electrospray sources, was studied. Our results show that the variability in the intensity of the different ions could change using different electrospray ionization sources, but the abundances of ions can also change when analyzing the same sample at different times. These differences might depend on the state of the instrument and the salinity of samples injected before the analysis of PLTX analogues. This fact should be especially considered for those instruments in which different types of samples are processed. Among the methods tested, the use of HESI-II (350 °C - Method 1) for the ionization process and the quantitation method that monitors multiple ions are recommended. This approach provided the best quantitative results since it allowed for the best ionization efficiency and considered the potential changes

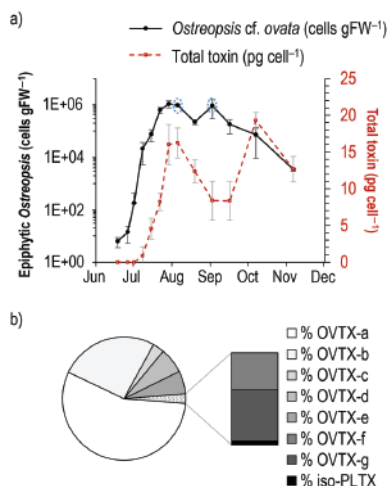


Fig. 5 (a) Temporal evolution of the *O. cf. ovata* bloom in 2019 (referred to cell concentration per gram of fresh weight of macroalgae), with the average toxin cell content variation along the bloom. (b) Cell toxin profile (%) of the *O. cf. ovata* bloom samples.

Paper

Analytical Methods

that could take place in toxin mass spectral profiles. Regarding the extraction method, the results indicated that a single extraction with MeOH:H₂O (80:20, v/v) is enough for the efficient extraction of PLTX analogues from these samples. Finally, the method proposed in this study showed a good performance and it was successfully applied for the study and quantitation of PLTX and OVTXs from the *O. cf. ovata* proliferation.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors thank the different financing agencies that supported the study. N. I. M.-P. was granted the fellowship FLSUR2020-00254 (AGAUR, Government of Catalonia). Financial support: MICIU (Spain, project PGC2018-095013-B-I00), AGAUR (Generalitat de Catalunya, project 2017SGR-310) and the Water Research Institute (IdRA, University of Barcelona). Support was provided also by the CoCLiME project, an ERA4CS network (ERA-NET) initiated by JPI Climate and co-financed by FORMAS (SE) and the European Union (Grant no. 690462), ERC-2019-CoG-863934-GlycoSpec (European Research Council Consolidator Grant). Furthermore, the authors want to thank Laia Viure (ICM-CSIC) for the field samplings and logistics. CoCLiME is endorsed to the IOC/SCOR Program GlobalHAB and contributes to the implementation of its research plan, concerning in particular, toxin determination.

Notes and references

- 1 A. S. Pavaux, E. Berdalet and R. Lemée, *Front. Mar. Sci.*, 2020, **7**, 498.
- 2 M. García-Altare, L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, O. Carnicer, P. De La Iglesia, M. Forino, J. Diogène and P. Ciminiello, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 1191–1204.
- 3 L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna and C. Dell'Aversano, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 13920–13928.
- 4 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, M. Forino and L. Tartaglione, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, **7**, 1357–1369.
- 5 L. Tartaglione, A. Mazzeo, C. Dell'Aversano, M. Forino, V. Giussani, S. Capellacci, A. Penna, V. Asnaghi, M. Faimali, M. Chiantore, T. Yasumoto and P. Ciminiello, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 915–932.
- 6 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano and M. Forino, in *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, ed. L. M. Botana and A. Alfonso, Wiley-Blackwell, 2nd edn, 2015, pp. 85–111.
- 7 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G. S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo and N. Melchiorre, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 6153–6159.
- 8 Y. Onuma, M. Satake, T. Ukena, J. Roux, S. Chanteau, N. Rasolofonirina, M. Ratsimaloto, H. Naoki and T. Yasumoto, *Toxicon*, 1999, **37**, 55–65.
- 9 K. Aligizaki, P. Katikou, G. Nikolaidis and A. Panou, *Toxicon*, 2008, **51**, 418–427.
- 10 R. Biré, S. Trotereau, R. Lemée, C. Delpont, B. Chabot, Y. Aumond and S. Kryz, *Harmful Algae*, 2013, **28**, 10–22.
- 11 R. Biré, S. Trotereau, R. Lemée, D. Oregioni, C. Delpont, S. Kryz and T. Guérin, *Mar. Drugs*, 2015, **13**, 5425–5446.
- 12 Z. Amzil, M. Sibat, N. Chomérat, H. Gossel, F. Marco-Mirallas, R. Lemée, E. Nezan and V. Sechet, *Mar. Drugs*, 2012, **10**, 477–496.
- 13 S. Accoroni, M. Ubaldi, S. Bacchiocchi, F. Neri, M. Siracusa, M. G. Buonomo, A. Campanelli and C. Totti, *J. Mar. Sci. Eng.*, 2022, **10**, 1402.
- 14 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, M. Forino and L. Tartaglione, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 1463–1473.
- 15 C. Brescianini, C. Grillo, N. Melchiorre, R. Bertolotto, A. Ferrari, B. Vivaldi, G. Icardi, L. Gramaccioni, E. Funari and S. Scardala, *Eurosurveillance*, 2006, **11**, 03040.
- 16 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, G. Benedettini, M. Onorari, F. Serena, C. Battocchi, S. Casabianca and A. Penna, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 3532–3540.
- 17 E. Berdalet, A. S. Pavaux, R. Abós-Herrándiz, M. Travers, G. Appéré, M. Vila, J. Thomas, L. de Haro, M. Estrada, N. I. Medina-Pérez, L. Viure, B. Karlson and R. Lemée, *Harmful Algae*, 2022, **119**, 102320.
- 18 H. Illoul, F. Rodríguez, M. Vila, N. Adjas, A. A. Younes, M. Bournissa, A. Koroghli, N. Marouf, S. Rabia and F. L. K. Ameur, *Cryptogam.: Algol.*, 2012, **33**, 209–216.
- 19 L. Tichadou, M. Glaizal, A. Armengaud, H. Gossel, R. Lemée, R. Kantin, J. L. Lasalle, G. Drouet, L. Rambaud, P. Malfait and L. De Haro, *Clin. Toxicol.*, 2010, **48**, 839–844.
- 20 M. Pfannkuchen, J. Godrijan, D. Marić Pfannkuchen, L. Iveša, P. Kružić, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione and M. Godrijan, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, **46**, 5574–5582.
- 21 A. S. Pavaux, E. Ternon, L. Dufour, S. Marro, M. P. Gémin, O. P. Thomas and R. Lemée, *Aquat. Toxicol.*, 2020, **223**, 105485.
- 22 P. A. Tester, R. W. Litaker and E. Berdalet, *Harmful Algae*, 2020, **91**, 101655.
- 23 N. Chomérat, E. Antajan, I. Auby, G. Bilién, L. Carpentier, M. N. de Casamajor, F. Ganthy, F. Hervé, M. Labadie, C. Méteigner, C. Paradis, M. Perrière-Rumèbe, F. Sanchez, V. Séchet and Z. Amzil, *Mar. Drugs*, 2022, **20**, 461.
- 24 EFSA, Scientific Opinion. Marine Biotoxins in Shellfish – Saxitoxin Group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065E), *EFSA J.*, 2009, **1019**, 1–76.
- 25 EFSA, Scientific Opinion on Marine Biotoxins in Shellfish – Palytoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), *EFSA J.*, 2009, **7**, 1393.
- 26 F. Guerrini, L. Pezzolesi, A. Feller, M. Riccardi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino and R. Pistocchi, *Toxicon*, 2010, **55**, 211–220.
- 27 S. Accoroni, T. Romagnoli, F. Colombo, C. Pennesi, C. G. di Camillo, M. Marini, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso,

Analytical Methods

Paper

- L. Tartaglione, A. Penna and C. Totti, *Mar. Pollut. Bull.*, 2011, **62**, 2512–2519.
- 28 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino and L. Tartaglione, *Toxicon*, 2011, **57**, 376–389.
- 29 P. Ciminiello, C. D. Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Battocchi, R. Crinelli, E. Carloni, M. Magnani and A. Penna, *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, **25**, 1243–1252.
- 30 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, T. Yasumoto, C. Battocchi, M. Giacobbe, A. Amorim and A. Penna, *Harmful Algae*, 2013, **23**, 19–27.
- 31 P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso and L. Tartaglione, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2012, **23**, 952–963.
- 32 L. Pezzolesi, F. Guerrini, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione and R. Pistocchi, *Water Res.*, 2012, **46**, 82–92.
- 33 S. Vanucci, L. Pezzolesi, R. Pistocchi, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione and F. Guerrini, *Harmful Algae*, 2012, **15**, 78–90.
- 34 P. Andersen and J. Throndsen, Estimating cell numbers, in *Manual on Harmful Marine Microalgae*, ed. G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson and A. D. Cembella, UNESCO, Paris, 2004, pp. 99–129.
- 35 M. Vila, R. Abós-Herrándiz, J. Isern-Fontanet, J. Álvarez and E. Berdalet, *Sci. Mar.*, 2016, **80**(S1), 107–115.
- 36 V. Giussani, F. Sbrana, V. Asnaghi, M. Vassalli, M. Faimali, S. Casabianca, A. Penna, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, A. Mazzeo and M. Chiantore, *Harmful Algae*, 2015, **44**, 46–53.
- 37 L. Pezzolesi, S. Vanucci, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, L. Tartaglione and R. Pistocchi, *Harmful Algae*, 2016, **55**, 202–212.
- 38 O. Carnicer, M. García-Altare, K. B. Andree, L. Tartaglione, C. Dell'Aversano, P. Ciminiello, P. de la Iglesia, J. Diogène and M. Fernández-Tejedor, *Harmful Algae*, 2016, **57**, 98–108.
- 39 S. Accoroni, T. Romagnoli, A. Penna, S. Capellacci, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, M. Abboud-Abi Saab, V. Giussani, V. Asnaghi, M. Chiantore and C. Totti, *J. Phycol.*, 2016, **52**, 1064–1084.
- 40 E. Ternon, A. S. Pavaux, S. Marro, O. P. Thomas and R. Lemée, *Harmful Algae*, 2018, **75**, 35–44.
- 41 E. Ternon, A. S. Pavaux, A. Peltekis, M. P. Gemin, C. Jauzein, B. Bailleul, R. Lemée and O. P. Thomas, *Aquat. Ecol.*, 2022, **56**, 475–491.
- 42 C. Brissard, C. Herrenknecht, V. Séchet, F. Hervé, F. Pisapia, J. Harcouet, R. Lémée, N. Chomérat, P. Hess and Z. Anzil, *Mar. Drugs*, 2014, **12**, 2851–2876.

Paper

Analytical Methods

† Electronic Supporting Information (ESI)

Multiple charged ions profile in the UHPLC-HRMS analysis of palytoxin analogues from *Ostreopsis cf. ovata* blooms

*Noemí Inmaculada Medina-Pérez,^{a,b} Francisco Javier Santos,^{a,c} Elisa Berdalet^b and Encarnación Moyano^{*a,c}*

^a Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona, Spain

^c Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

*encarna.moyano@ub.edu

Table S1 Summary of the instrumental systems, electrospray ionization sources and quantification methods used in the comparative of the analytical quantification of the PLTX analogues.

System	System I: Q-Exactive Orbitrap				System II: LTQ-Orbitrap	
Electrospray Ionization Sources	Method 1: HESI-II at 350 °C		Method 2: HESI-II at 25 °C		Method 3: ESI source at 25 °C	
Quantification method	QM-A: the 2 most intense ions	QM-B: group of 13 ions selected	QM-A: the 2 most intense ions	QM-B: group of 13 ions selected	QM-A: the 2 most intense ions	QM-B: group of 13 ions selected

Table S2 Molecular formulae of PLTX analogues, the ion exact mass (m/z) and the monoisotopic mass of the most intense isotope (m/z) selected for quantitative analysis by UHPLC-HRMS.

	Iso-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	OVTX-g
Formula	$C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{53}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{52}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{51}$
[M+3H-4H₂O]³⁺	Exact mass 869.8197	859.1564	873.8318	879.1635	864.4881	864.4881	868.5002	853.8248
Selected ion*	870.1542	859.4909	874.1663	897.4979	864.8225	864.8225	868.8347	854.1593
[M+3H-3H₂O]³⁺	Exact mass 875.8232	865.1600	879.8354	885.1670	870.4916	870.4916	874.5037	859.8283
Selected ion*	876.1577	865.4944	880.1698	885.5015	870.8261	870.8261	874.8382	860.1628
[M+3H-2H₂O]³⁺	Exact mass 881.8268	871.1635	885.8389	891.1705	876.4951	876.4951	880.5073	865.8318
Selected ion*	882.1612	871.4979	886.1733	891.5050	876.8296	876.8296	880.8417	866.1663
[M+3H-H₂O]³⁺	Exact mass 887.8303	877.1670	891.8424	897.1741	882.4986	882.4986	886.5108	871.8354
Selected ion*	888.1647	877.5015	892.1769	897.5085	882.8331	882.8331	886.8452	872.1698
[M+H+Mg]³⁺	Exact mass 901.1569	890.4937	905.1691	910.5007	895.8253	895.8253	899.8374	885.1620
Selected ion*	901.4914	890.8281	905.5036	910.8352	896.1598	896.1598	900.1719	885.4965

*Selected ion: monoisotopic mass of the most intense isotope selected for quantitative analysis.

Table S2 (cont.) Molecular formulae of PLTX analogues, the ion exact mass (m/z) and the monoisotopic mass of the most intense isotope (m/z) selected for quantitative analysis by UHPLC-HRMS.

	Iso-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	OVTX-g
Formula	$C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{53}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	$C_{131}H_{227}N_3O_{52}$	$C_{129}H_{223}N_3O_{51}$
[M+H+Ca]³⁺	Exact mass 906.4828	895.8195	910.4949	915.8266	901.1511	901.1511	905.1633	890.4879
	Selected ion* 906.8172	896.1540	910.8294	916.1610	901.4856	901.4856	905.4977	890.8223
[M+H+Fe]³⁺	Exact mass 911.1418	900.4785	915.1539	920.4856	905.8102	905.8102	909.8223	895.1469
	Selected ion* 912.1414	901.4781	916.1535	921.4851	906.8097	906.8097	910.8219	896.1464
[M+2H-3H₂O]²⁺	Exact mass 1313.2312	1297.2363	1319.2494	1327.2469	1305.2338	1305.2338	1311.2520	1289.2389
	Selected ion* 1313.7329	1297.7380	1319.7511	1327.7486	1305.7355	1305.7355	1311.7536	1289.7405
[M+2H-2H₂O]²⁺	Exact mass 1322.2365	1306.2416	1328.2547	1336.2522	1314.2390	1314.2390	1320.2572	1298.2441
	Selected ion* 1322.7382	1306.7433	1328.7564	1336.7538	1314.7407	1314.7407	1320.7589	1298.7458
[M+2H-H₂O]²⁺	Exact mass 1331.2418	1315.2469	1337.2600	1345.2574	1323.2443	1323.2443	1329.2625	1307.2494
	Selected ion* 1331.7435	1315.7486	1337.7617	1345.7591	1323.7460	1323.7460	1329.7642	1307.7511

*Selected ion: monoisotopic mass of the most intense isotope selected for quantitative analysis.

Table S2 (cont.) Molecular formulae of PLTX analogues, the ion exact mass (m/z) and the monoisotopic mass of the most intense isotope (m/z) selected for quantitative analysis by UHPLC-HRMS.

	Iso-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	OVTX-g
Formula	$C_{129}H_{223}N_3O_5$	$C_{129}H_{223}N_3O_5$	$C_{131}H_{227}N_3O_5$	$C_{131}H_{227}N_3O_5$	$C_{129}H_{223}N_3O_5$	$C_{129}H_{223}N_3O_5$	$C_{131}H_{227}N_3O_5$	$C_{129}H_{223}N_3O_5$
[M+2H]²⁺	Exact mass 1340.2471	1324.2522	1346.2653	1354.2627	1332.2496	1332.2496	1338.2678	1316.2547
	Selected ion* 1340.7488	1324.7538	1346.7669	1354.7644	1332.7513	1332.7513	1338.7695	1316.7564
[M+H+Na]²⁺	Exact mass 1351.2380	1335.2431	1357.2562	1365.2537	1343.2406	1343.2406	1349.2588	1327.2457
	Selected ion* 1351.7397	1335.7448	1357.7579	1365.7554	1343.7423	1343.7423	1349.7605	1327.7474
[M+H+K]²⁺	Exact mass 1359.2250	1343.2301	1365.2432	1373.2407	1351.2276	1351.2276	1357.2457	1335.2326
	Selected ion* 1359.7267	1343.7318	1365.7449	1373.7423	1351.7292	1351.7292	1357.7474	1335.7343

*Selected ion: monoisotopic mass of the most intense isotope selected for quantitative analysis.

Table S3 Statistic p -values of the paired t-tests to explore the significant differences in the total toxin concentrations as a function of the quantification methods (QM-A or QM-B) and instrumental methods (Method 1, Method 2, or Method 3).

		<i>P</i> -value (one-tail)	<i>P</i> -value (two-tails)
QM-A	Method 1 vs. 2	1.44E-05	2.89E-05
	Method 1 vs. 3	7.47E-06	1.49E-05
	Method 2 vs. 3	7.88E-05	1.58E-04
QM-B	Method 1 vs. 2	1.83E-01	3.67E-01
	Method 1 vs. 3	3.43E-06	6.86E-06
	Method 2 vs. 3	2.86E-05	5.72E-05
QM-A vs. QM-B	Method 1	4.61E-06	9.23E-06
	Method 2	1.08E-04	2.16E-04
	Method 3	3.89E-04	7.78E-04

a) Control conditions

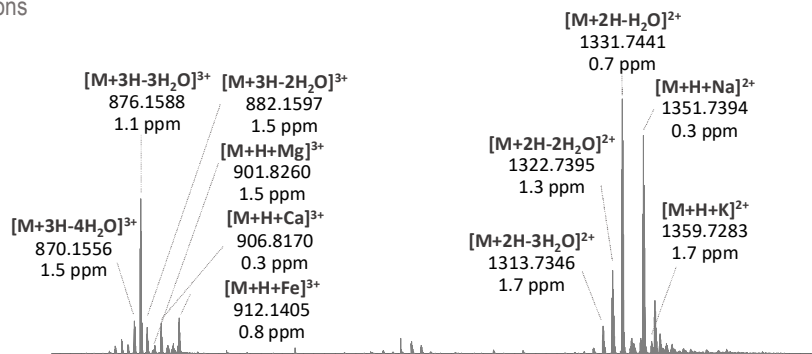
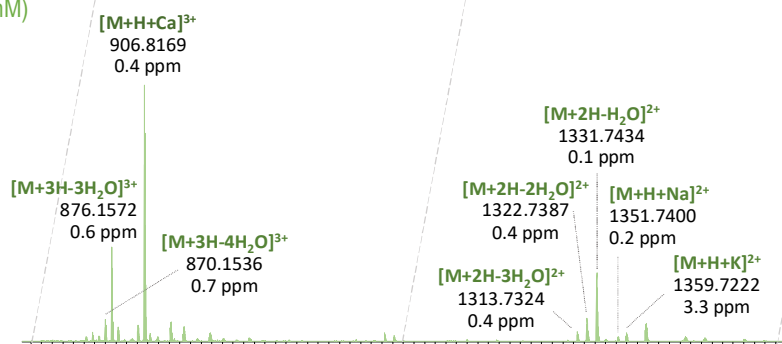
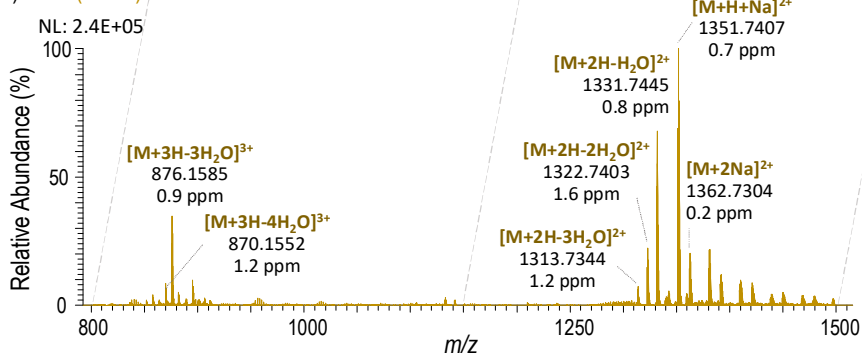
b) $CaCl_2$ (1 mM)c) $NaCl$ (3 mM)

Fig. S1 HRMS spectra obtained from the UHPLC-HRMS analysis of PLTX standard ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) using the post-column addition of (a) control conditions (b) $CaCl_2$ (1 mM) and (c) $NaCl$ (3 mM).

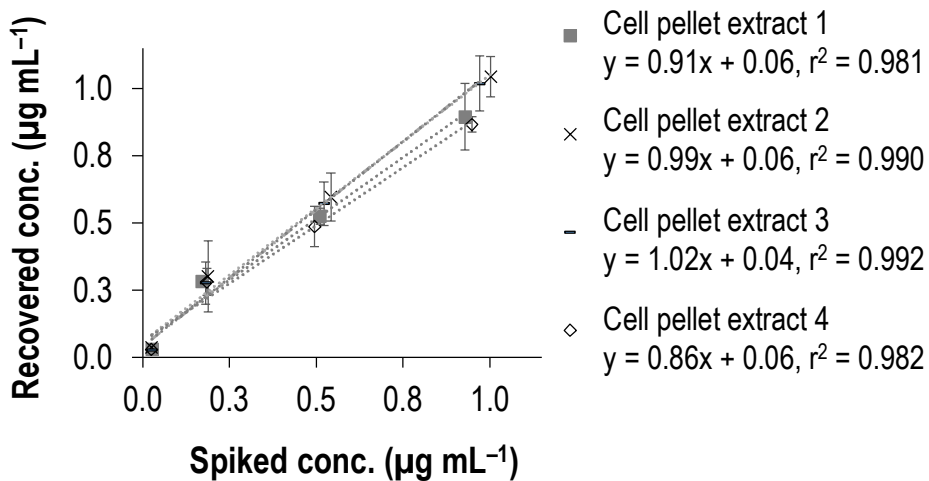


Fig. S2 Calibrations curves for PLTX standard spiked in cell pellets (matrix-matched standards). The vertical bars indicate the standard deviation for three replicate injections.

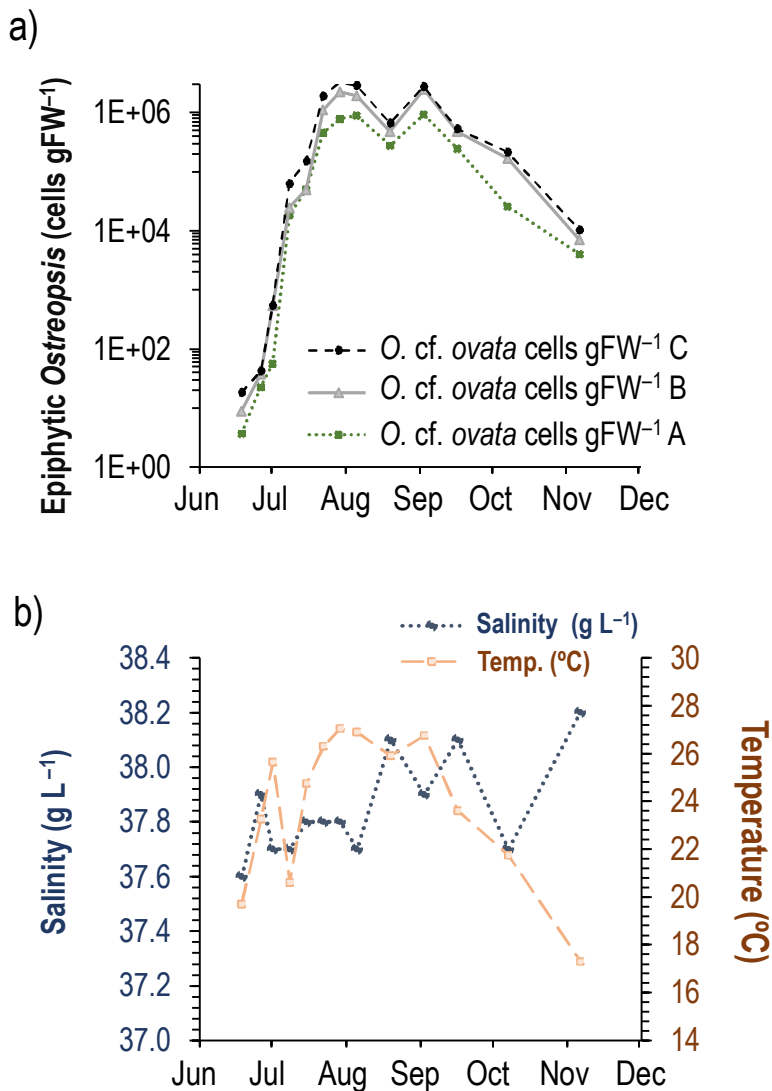


Fig. S3 (a) *Ostreopsis cf. ovata* epiphytic abundance during the 2019 proliferation; (b) salinity and temperature measured during the *O. cf. ovata* proliferation.

2.2.2. Artículo #2

Ion Mobility – Mass Spectrometry studies of palytoxin-like compounds produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, M. Nuria Peralta-Moreno, Jaime Rubio-Martinez, Leïla Bachtella, Lukasz Polewski, Elisa Berdalet, Encarnación Moyano, Kevin Pagel

To be submitted for publication in Analytical Chemistry

Ion Mobility – Mass Spectrometry studies of palytoxin-like compounds produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez · M. Nuria Peralta-Moreno · Jaime Rubio-Martinez · Leila Bechtella · Lukasz Polewski · Elisa Berdalet · Encarnación Moyano* · Kevin Pagel

ACCESS |

 Metrics & More Article Recommendations Supporting Information

ABSTRACT. Palytoxin (PLTX) and its analogues produced by *Ostreopsis cf. ovata* are of concern due to seafood poisoning, generally in the tropics and Mediterranean coasts. PLTX analogues contain many chiral centers that could lead to numerous isomers, being a challenge for both chromatographic separation and high-resolution mass spectrometry identification. In this work, the ion mobility spectrometry (IMS) behavior of this family of compounds is explored for the first time to overcome these analytical challenges. Drift tube (DTIMS) and traveling wave (TWIMS) mass spectrometry were used and the results were compared. Moreover, to justify some unexpected results, TIMS and computational studies of molecular dynamics simulation were performed as complementary tools. The higher resolution of the mobilogram provided by TIMS allowed distinguishing isomer ions generated in the electrospray source by losing n -units of water molecules from different sites of the chemical structure. Computational studies provided evidence to understand the ion mobility behavior of triply charged calcium and sodium adduct ions and indicated a possible folded conformation of these molecules. $^{DT}CCS_{N_2}$ values were obtained for PLTX_{std}, as well as for ovatoxin-a and ovatoxin-b present in the extracts of microalgae samples collected in Sant Andreu de Llanvaneres (Barcelona, Spain). These results were comparable ($\Delta CCS_s < 2\%$) to those measured in the TWIMS instrument when it was calibrated using PLTX_{std}. In this work, a list of 102 CCS values calculated from DTIMS and TWIMS data obtained for adducts and fragment ions observed in the mass spectra of PLTX analogues (PLTX standard, ovatoxin-a and ovatoxin-b) is presented. These values can serve as reference values and be included in databases to help in the screening of these toxins in complex samples.

KEYWORDS: Palytoxin analogues, Ion mobility, Collision Cross Section.

■ INTRODUCTION

Since the late 1990s, the microalga *Ostreopsis cf. ovata* proliferates on Mediterranean beaches.¹⁻³ This marine dinoflagellate produces different biotoxins such as isobaric palytoxin and its analogues (ovatoxins-OVXTs) depending on sea conditions. Palytoxin (PLTX) is considered one of the most potent marine biotoxins that has been implicated in severe seafood poisoning in tropics

and it is of increasing concern along the Mediterranean coast.⁴

Nowadays, PLTX analogues are mainly determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) based methods, since they offer high separation and detection capabilities, provide comprehensive information on the chemical structure and accurate, selective, and sensitive quantitative analysis. Different OVTX analogues (OVTX-a to -i) produced by *Ostreopsis* have

been identified by multiple-stage mass spectrometry (MS^n) and high-resolution mass spectrometry (HRMS),^{5,6} and the isobaric palytoxin produced by the microalga has also been identified as a structural isomer of palytoxin produced by the coral *Palythoa tuberculosa*.⁷

Over the past few decades, ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) has become a powerful analytical technique for the separation of ions in the gas phase based on their size, shape, and charge, and which have been mainly generated by electrospray ionization.⁸⁻¹⁰ IM-HRMS combines the capability of IM to differentiate isomers with the potential of HRMS to unequivocally identify compounds. PLTX and OVTXs have the same structure, but the analogues differ in the location of the hydroxyl groups (Figure 1). In addition, PLTX contains 64 chiral centers, leading to more than 10^{21} possible isomers, making their separation and identification a great challenge with the already established techniques. In this project, IM-MS is used for the first time to improve isomer separation and gain deeper insight into the isomer composition of ovatoxins in complex environmental samples.

Several technologies are available to separate ions by ion mobility spectrometry. Drift Tube Ion Mobility Spectrometry (DTIMS), Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry (TWIMS) and Trapped Ion Mobility Spectrometry (TIMS) are the most frequently IMS technology used to combine with LC-HRMS are. In DTIMS systems, ions are injected into a drift tube pressurized with a drift gas (usually N_2 or He) and where a uniform electric field is applied to drag the ions to the mass analyzer region. Under these conditions, the ion drift time (the time it takes for the ion to traverse the ion mobility cell) is directly proportional to the electric

field, being the reduced ion mobility (K_o) the proportionality constant. The larger and more expanded the ion, the longer the drift time, and the smaller and more compact the ion, the shorter its drift time. Moreover, from the ion mobility constant of each ion the corresponding collision cross-section (CCS) can be calculated, a unique parameter for the characterization of molecules, which is independent of the instrument and unaffected by matrix effects. With DTIMS, a primary calibration method is used to calculate ^{DT}CCS and this value is considered as reference and used to calibrate ion mobility systems such as TWIMS and TIMS, which require secondary calibration methods to get reliable and comparable CCS values. In TWIMS, a non-uniform electric field is applied, which generates a sequence of symmetric potential waves that propagate continuously through the ion mobility cell and drives the ions into the mass analyzer. The ions “surf” on the wave front for a while before being overtaken by the next wave. Finally, in the TIMS system, ions are propelled by a gas flow to pass the drift cell on their way to the mass analyzer, while an electrical field is applied in the opposite direction that slows down the ions, trapping and accumulating them. Finally, ions are released according to their ion mobility by progressively decreasing the applied electric field.

This work aims to study, for the first time, PLTX and OVTXs produced by *Ostreopsis* by using ion mobility-mass spectrometry. Collisional cross section (CCS) values of ions observed in electrospray are calculated and compared using both DTIMS and TWIMS. In addition, to achieve a deeper understanding of these analytes, the ion mobility data has also been studied using the TIMS system taking advantage of the higher ion mobility resolution.

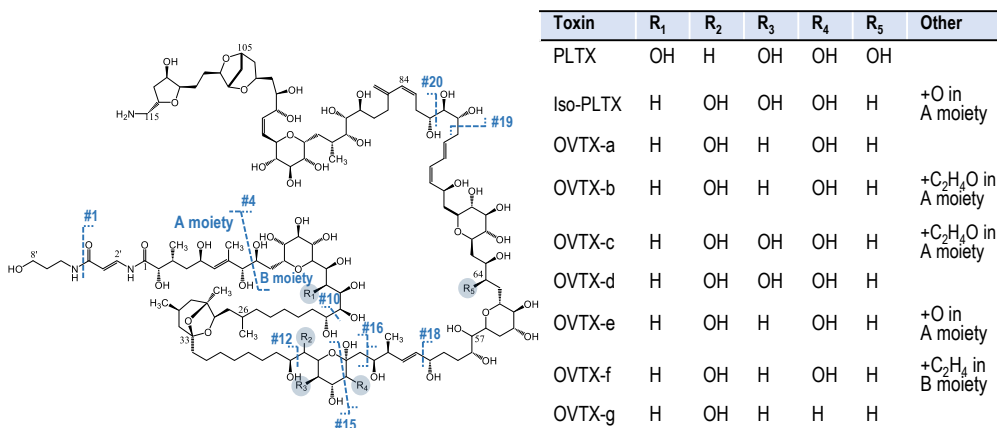


Figure 1. Chemical structure of palytoxin and its analogues (iso-PLTX, OVTX-a to -g) generally observed in *Ostreopsis cf. ovata* NW Mediterranean samples. Note: the numbering of cleavages corresponds to the general fragmentation proposed by Ciminiello et al. (2012).¹¹

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and solvents

Palytoxin standard (PLTX_{std}) (from *Palythoa tuberculosa*) was purchased from Wako Chemicals GmbH (Germany). Stock standard solution (100 mg kg⁻¹) was prepared by weight in MeOH:H₂O (50:50, v/v). PLTX_{std} working solutions were prepared by diluting stock standard solution in MeOH:H₂O (80:20, v/v). All standard solutions were stored at -20 °C until their use. Water, acetonitrile, formic acid, and methanol (LC-MS grade >98%) used to prepare mobile phases and standard solutions were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* Mw1000 (used as a calibrant in TWIMS experiments) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The calibrant solution was prepared by dissolving the Dextran Mw 1,000 to 0.5 µg µL⁻¹ in H₂O:MeOH (1:1, v/v).

Samples

Samples extracts containing OVTXs were obtained from *Ostreopsis cf. ovata* samples collected during the 2021 bloom. The selected samples were the most concentrated ones, from 28th July to 2nd August. These samples were collected and extracted following the method described previously.^{12,13} Briefly, 5 to 20 g of the dominant macroalgae was carefully collected and transferred into a 250 mL plastic bottle with ca. 180 mL of in situ seawater. These samples were vigorously shaken and sieved through a 200 µm mesh, and the percolated water was filtered through duplicate GF/F glass fiber filters. These filters were extracted with 2 mL of MeOH:H₂O (80:20, v/v) for 5 min in an ultrasonic bath (ice-cooled), followed by vortex and centrifugation. The supernatant was filtered through 0.22 µm Nylon membranes and stored at -80 °C until their fractionation. Finally, the OVTXs extracts were fractionated by LC-UV into individual toxin fractions. The collected fractions were stored on

amber glass vials at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until their analysis by nanoESI-IM-MS.

Instrumentation and analytical procedure

Liquid Chromatography with UV detection. The reversed-phase chromatographic separation was performed in a Hypersil GOLD C18 column (100 mm x 2.1 mm id., 1.9 μm particle size) packed with totally porous silica particles (Hypersil, Thermo Fisher Scientific). The chromatographic separation was performed under gradient elution mode using acetonitrile as solvent A and water as solvent B, both containing 0.1% formic acid. The gradient elution program started with 30% solvent A (70% solvent B) for 1.5 min followed by a linear gradient up to 35% solvent A (65% solvent B) in 12 min. Afterward, in the third stage, solvent A raised up to 90% (10% solvent B) for 1.5 min and these conditions were maintained in an isocratic step for an additional 1 min before returning to the initial conditions. The mobile phase flow rate was 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ with the column temperature hold at $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ and by injecting 20 μL of each sample. OVTX-like compounds were detected monitoring the absorbance at their characteristic wavelengths, 233 and 263 nm.

Nano-electrospray ionization (nESI). Direct infusion analyses were performed in positive ion mode using platinum/palladium (Pt/Pd, 80/20)-coated borosilicate capillaries prepared in-house. Typically, 5–10 μL of the samples were loaded on nESI capillaries and electrosprayed by applying voltages within the range of 1.0–1.5 kV.

Source temperature was kept at $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, the cone gas was 1 L h^{-1} , the sampling cone voltage was fixed at 30 V, while the extraction cone voltage was 25 V when working with

Waters Synapt G2-S (DTIM and TWIM) instruments.

The home-made nanoESI source conditions applied in the timsTOF of Bruker were a drying gas of 3 L min^{-1} at $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, an end plate offset of 500 V; and a nebulizer pressure of 0.1 bar (Michael et al. 2023 in prep.).

DTIM-MS. Drift tube ion mobility spectrometry-mass spectrometry measurements were performed on a modified Synapt G2-S HDMS instrument (Waters Corporation, Manchester, UK), described in detail by Bush et al. (2010) and others.^{14–16} In the modified Synapt the traveling wave ion mobility cell was replaced by an rf-confining drift tube, which allowed the determination of ^{DT}CCS s values using helium and nitrogen as buffer gases (1.8 Torr).

Ion mobility parameters were as follows. Cell DC voltages were 60 V when using He as drift gas and 100 V when using N_2 , and drift voltage range was 40–240 V. The gas flows were 2 mL min^{-1} in the trap, and 90 mL min^{-1} in the IM cell. To study the ion mobility of product ions, tandem mass spectrometry experiments were performed prior to ion mobility separation using N_2 as collision gas and applying different collision energies (25–50 eV). The mass spectra were acquired from m/z 100 to 1500. Table S1 summarizes the different product ions observed along with the corresponding precursor ion and collision energies used in both DTIM-MS and TWIM-MS instruments.

Mass Lynx v4.1 software (Waters) was used to control the instrument and to acquire and process the LC-IM-HRMS data. This software was used both in DTIMS and in TWIMS experiments.

TWIM-MS. Traveling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry measurements were performed on a Synapt G2-S

HDMS instrument (Waters Corporation, Manchester, UK) using N₂ as buffer gas.

The settings were as follows: 45.0 V trap DC bias voltage, 2 mL min⁻¹ trap gas flow, 90 mL min⁻¹ cell gas flow, 650 m s⁻¹ IM wave velocity, 40.0 V IM wave height, 20 mL min⁻¹ IM gas flow, 380 m s⁻¹ transfer wave velocity, and 5.0 V transfer wave height voltage. In tandem mass spectrometry experiments, argon was used as a collision gas with collision energies ranging from 32 to 60 eV. The mass spectra data was acquired within the m/z range of 100–1500.

TIMS-MS. Trapped ion mobility spectrometry-mass spectrometry measurements were performed on the timsTOF Pro from Bruker (Massachusetts, EEUU).

The reversed ion mobility ($1/K_0$) ranges from 0.6 to 1.6 V·s cm⁻². The drift gas used was N₂. RF amplitudes of the Funnel 1 and Funnel 2 were 300 Vpp and 400 Vpp, respectively. The transfer hexapole was operated at a 30 V deflection delta voltage and a 400 Vpp RF. The quadrupole ion energy was 3 eV and the “low mass” was set to m/z 300. Transfer time and pre-pulse storage time were 70 μs and 15 μs, respectively. The mass range was set at m/z 100–3000 and the collision energy was applied within the range 20–65 eV for tandem mass spectrometry experiments.

Bruker Compass Analysis Viewer Software 5.3 was used to control the instrument and acquire and process the LC-IM-HRMS data.

CCSs measurements. CCS values were calculated from the ion mobility drift times. ^{DT}CCS_{He} and ^{DT}CCS_{N₂} values were determined via Stepped-Field method by plotting the arrival times (centroid of the best-fit Gaussian) as a function of reciprocal drift voltages and measured using the Mason-

Shamp equation.¹⁷ The PLTX standard (PLTX_{std}) (1 μg mL⁻¹), OVTX-a and OVTX-b were analyzed using ten different drift voltages that increase axial potential across the drift tube. The drift voltage range was 40–240 V using He and 100–240 V using N₂ as buffer gases, while the gas pressure was always 1.8 Torr. The ion mobility data was acquired for 60 s at each electric field. Compounds were injected by triplicate in the same day (intra-day) and in three consecutive days (inter-day) to calculate the ^{DT}CCS repeatability using both He and N₂ as buffer gases. Data was processed with Mass Lynx v4.1 software (Waters). The drift times were extracted and the CCSs were calculated using software developed in-house. Details about the code and modules can be found online (<https://github.com/jeriedel/CCS>).

TWIMS system used secondary calibration methods using ^{DT}CCS values already measured for a selected calibrant because the relationship between traveling-wave drift time and mobility values were corrected for the mass-dependent giving the corrected drift time (dt') and the corrected CCS values (CCS') as described previously.¹⁸ The linear correlation provided the adjusted parameters of the equation $(CCS')=A(dt')+N$, from which the estimated CCSs values for PLTX analogues can be obtained by interpolation of the corresponding dt' and CCS' , following the recommendations of Thalassinos et al. (2009).¹⁹ The TWIMS calibration was performed by using two calibrants, dextran oligosaccharides and PLTX_{std}. Both calibrants were injected by triplicate in the same day (intra-day) to calculate the ^{TW}CCSs repeatability using N₂ as a buffer gas. Data was processed with Mass Lynx v4.1 software (Waters) and OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton).

Computational details

System preparation. Starting from the simplified molecular-input line-entry system (SMILES) ASCII string of PLTX_{std}, an initial guess of the 3D structure of the molecule was generated with the Online SMILES Translator and Structure File Generator of the NIH (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>). Then, the system was initially prepared using the Maestro 2016-2 software.²⁰ Parameters and partial charges were obtained using Antechamber from AMBER20²¹ employing the AM1-BCC model.²² To represent and explore the conformational space of the toxin, 15 different initial random positions of Ca²⁺ and 2Na⁺ were considered in the simulation of each of the [M+H+Ca]³⁺ and [M+H+2Na]³⁺ systems. The same protocol was carried out for OVTX-a and OVTX-b.

Energy minimization and Molecular Dynamics Simulation. Prior to any molecular dynamics (MD) simulation, the structure was initially relaxed in a 10000-step minimization protocol using the steepest descent approach. Gas-phase conventional Molecular Dynamics (cMD) simulations of 1 μ s length were carried out in the vacuum (igb = 6, cut-off = 999.99) and using AMBER20 in its GPU CUDA version²³ for all adducts. The generalized Amber forcefield (GAFF2) and the ff14SB.water forcefield were employed for the simulations.²⁴

Analysis. To analyse the trajectories, the Cpptraj AMBER20 module was employed.²⁵ Structural stability of the system was evaluated by means of a Root-Mean Square Deviation (RMSD) analysis. To examine the structural conformations explored, a hierarchical clustering was performed using the average linkage algorithm. Moreover, the

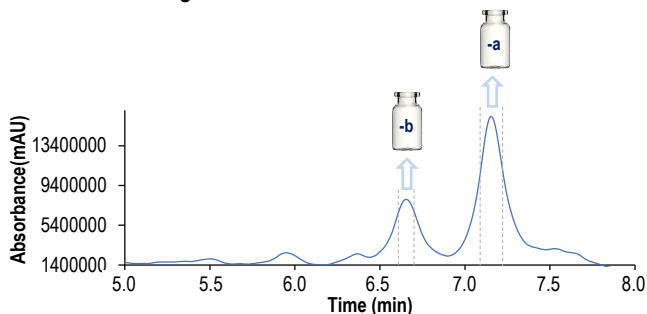
conformational diversity of the studied adducts were analyzed through the inspection of radius of gyration (Rg). Additionally, donor-acceptor hydrogen bond interactions established during the trajectory were evaluated.

RESULTS AND DISCUSSION

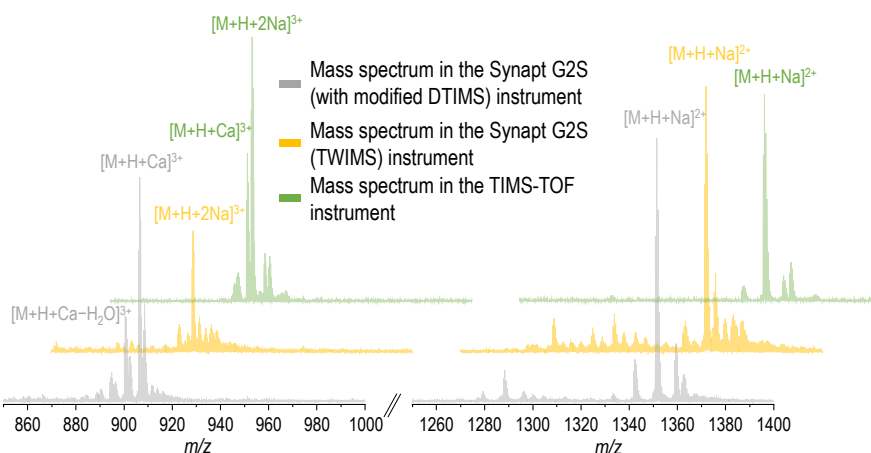
To study the ion mobility behavior of PLTX analogues, the sample extracts were separated by UHPLC to collect fractions rich in these compounds. Figure 2a shows the UHPLC-UV chromatogram of the sample extract indicating the retention time windows for the collected fractions (A and B). Fractions collected from multiple injections were pulled to increase the concentration for further analysis by nESI-IM-HRMS using the three ion mobility instruments. The 2 pulled fractions (A and B) contained OVTX-a and -b at high concentration and provided a relatively clean mass spectrum. The mass spectrum profile observed for each toxin included several adduct ions with calcium, sodium, magnesium, and potassium, as well as different ions that have been formed by *n* water losses due to in-source fragmentation. The ions observed are listed in Table S2, and as can be seen in Figure 2b the most abundant ions were the triply-charged ions [M+H+Ca]³⁺ and [M+H+2Na]³⁺, and the doubly-charged ones [M+H+Na]²⁺. However, in the high-resolution mass spectra profiles not all ions observed in the DTIMS system were also observed in the TWIMS and in the TMS instrument. This fact is in agreement with our previous results which indicated that nature, intensity and relative abundances of ions generated in the electrospray source by these toxins may vary depending on the instrumentation, maintenance and working conditions used.¹³ Additionally, no information about the potential presence of isomers or isobaric ions coeluting with the

diagnostic ions is available. The combination of nESI-HRMS and ion mobility for the analysis of PLTX analogues gave an extra dimension helping to better characterize these toxins and these natural extracts.

a. LC-UV chromatogram of the fractionated OVTXs extract



b. PLTX standard mass spectra using different instrumentation



c. PLTX standard heat-map visualization of TWIMS

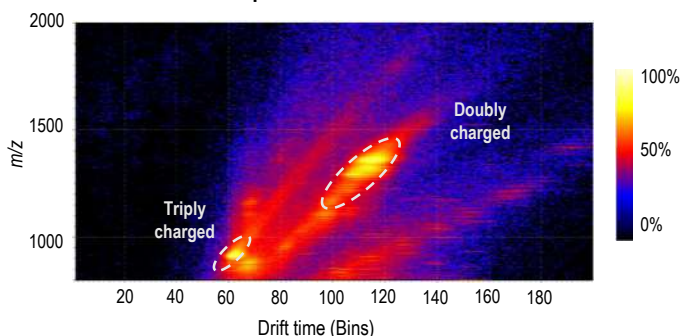


Figure 2. **a** LC-MS chromatogram of the fractionated sample, **b** Mass spectrum of the palytoxin standard in different instrumentation used and **c** 2D Mobiligram for PLTX_{std} in TWIMS instrument.

The ion mobility of ions generated in the nESI source has been studied and CCS values have been calculated for all the ions observed in DTIMS and TWIMS instruments.

As an example, [Figure 2c](#) shows the heatmap visualization of a representative mobiligram obtained with TWIMS instrument, where the doubly and triply charged ions generated in nESI for PLTX_{std} can be easily distinguished. Furthermore, the higher ion mobility resolution provided by TMS was helpful to separate and study the isomers produced by the loss of *n* water molecules.

Some selected ion mobility peaks corresponding to triply charged ions of PLTX_{std} and OVTX-a (among the most abundant ions) and observed using the three IMS instruments (DTIMS, TWIMS and TMS) are shown in [Figure 3](#). For the ions selected, only one peak was observed on both DTIMS and TWIMS, while more than one mobility peak or a distorted peak (maybe due to the overlap of more than one peak) was observed in TMS. Despite the differences in the chemical structure and in molecular weight of these triply charged ions, similar ion mobility/CCS values were obtained ([Figure 3](#), details in [Table S2](#)), which indicates that they should have a comparable size. The largest number of peaks and the broadest peaks observed in TMS could be related to the different sites where each metal cation could interact to form the corresponding adduct ion or to the different sites where the *n* water molecules were lost leading to different conformational structures. As can be seen in [Figure 4a](#) and [Figure 5a](#), the results in the TMS instrument indicated that all Na/Ca-triply charged adduct ions $[M+H+2Na]^{3+}/[M+H+Ca]^{3+}$ had values within a very narrow $1/K_0$ window, independently of the toxin analogue.

To help explain these facts, a computational analysis was performed using molecular dynamics simulations based for the PLTX and OVTXs (-a and -b). As a consequence of the many degrees of freedom (torsions, dihedral angles, etc.) presented by the structures, the minimization process carried out prior to any simulation indicated that these molecules tend to fold. A first visual inspection of the dynamic simulations showed folding structures through stabilization of electrostatic interactions and hydrogen bonds. Furthermore, simulations with $2Na^+$ and Ca^{2+} cations indicated that they could form adduct ions through coordination numbers of 6 and 8, respectively ([Figure 4b](#) and [Figure 5b](#)) and favored by interactions with oxygens of different functional groups. Comparing the dynamic results, no clear preference for specific binding sites were observed, but the interaction is maintained through the trajectory of the cations within the chemical structure and favored by the "folded and compacted" structure that approach some regions of the toxin structure. As an example, [Figure S1](#) gives extra information about different points of view of the tridimensional clustered structures (most prone) of the different adduct ions where the $2Na$ (orange) and the Ca (green) cations were coordinated. [Figure 4c](#) and [Figure 5c](#) show the hydrogen bonds (yellow dashed lines) that could stabilize the "folding and compacted" structure of these toxins and, [Figure S2](#) and [Table S3](#) also summarize the specific hydrogen bonds that are more prone to be established to stabilize the structure of each adduct ion.

Although the simulations showed different possible conformations, the volume of the molecule appeared to be similar, and no significant differences were observed between the radius of gyration of the adduct ions, $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ ([Figure S3](#)). It could be said that these cations tend

to stabilize the "folded" structure by the coordination of cations in the "inner" sites. Despite possible conformational interconversions, the radius of gyration remains stable (with slightly variations) for each ion through the dynamics, but the averaged measurements indicates that it is slightly higher in the case of calcium adduct (Figure S3), which is in agreement with the calculated ${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ values (${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$

$[\text{M}+\text{H}+\text{Ca}]^{3+} = 586.1 \pm 1.3 \text{ \AA}^2$, ${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{N}_2}$ $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^{3+} = 582.5 \pm 1.6 \text{ \AA}^2$). In this context, it could be hypothesized that the distorted peaks of these adduct ions observed in TIMS (Figure 3) could be due to the different conformations that this structure could adopt in the gas phase that leads to the slightly variations in the radius of gyration observed (while cations could be moving in the inner sites of the molecule).

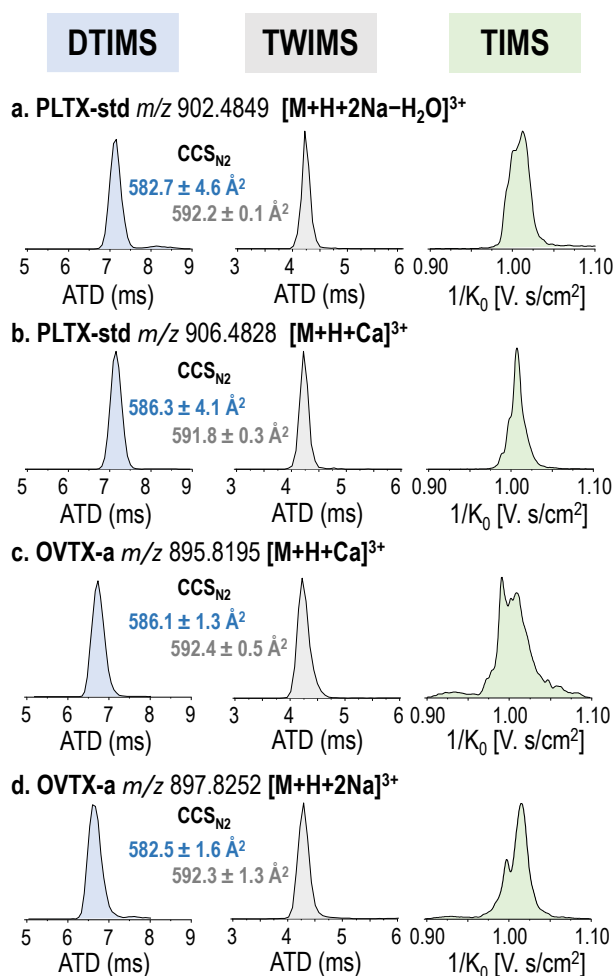


Figure 3. Comparative between ion mobility peaks observed in DTIMS, TWIMS or TIMS for the selected adduct ions and toxins.

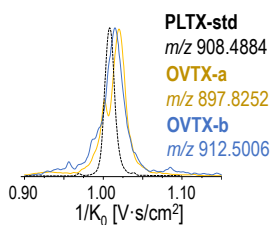
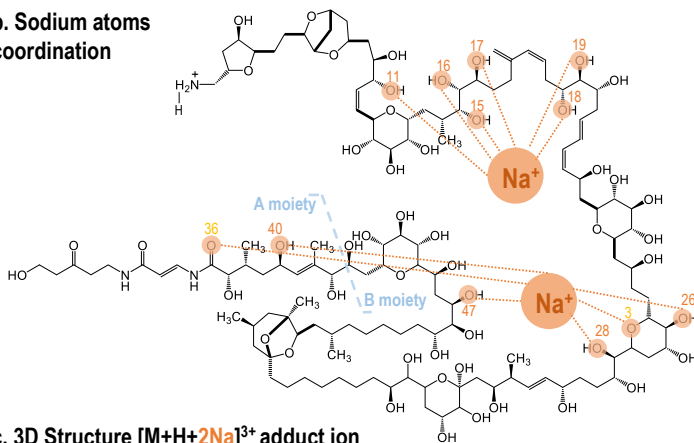
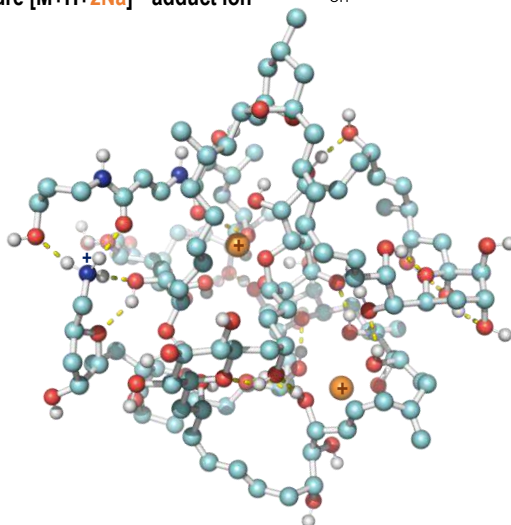
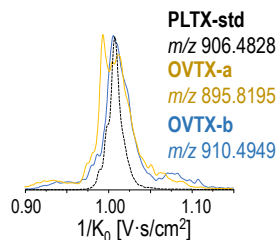
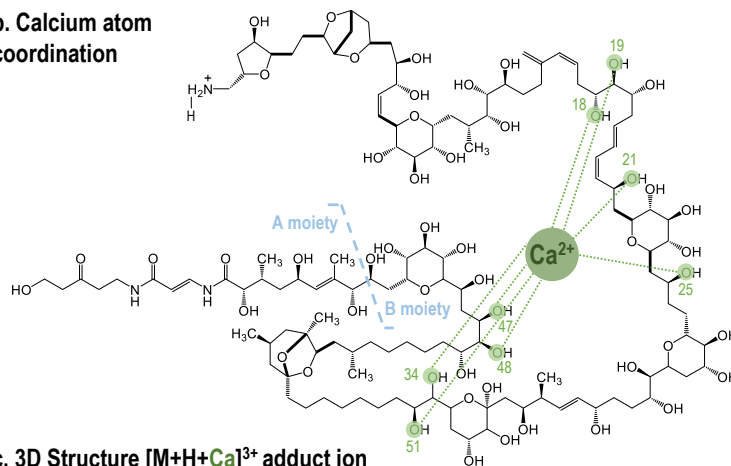
a. Ion mobility peaks of $[M+H+2Na]^{3+}$ adduct ion**b. Sodium atoms coordination****c. 3D Structure $[M+H+2Na]^{3+}$ adduct ion**

Figure 4. **a** Ion mobility peaks of the $[M+H+2Na]^{3+}$ adduct ion by TIMS for the three toxins. **b** Coordination (dashed lines) of the Na ion in the structure. **c** 3D structure the $[M+H+2Na]^{3+}$ adduct ion (yellow dashed lines indicates the hydrogen bonds). The **b** and **c** structures were shown for OVTX-b as an example of the family structure. See details of the hydrogen bonds in Table S3 and Figure S2.

a. Ion mobility peaks of $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ion



b. Calcium atom coordination



c. 3D Structure $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ion

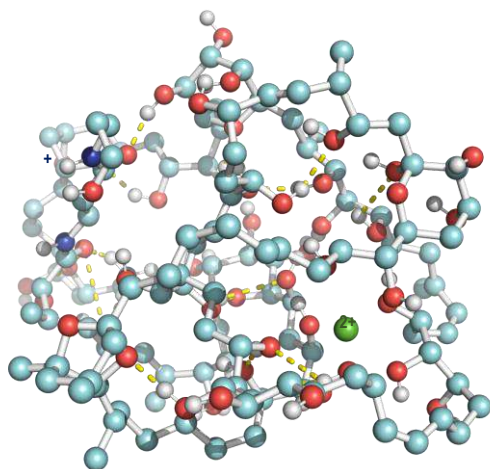


Figure 5. **a** Ion mobility peaks of the $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ion by TIMS for the three toxins. **b** Coordination (dashed lines) of the Ca ion in the structure. **c** 3D structure the $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ion (yellow dashed lines indicates the hydrogen bonds). The b and c structures were shown for OVTX-b as an example of the family structure. See details of the hydrogen bonds in Table S3 and Figure S2.

In addition, the loss of water molecules could take place from different hydroxyl groups, which could give rise to different isomers. If the hydroxyl groups involved in n water losses are located at the peripheral sites of the folded molecule (as indicated in Figure S4), different ion mobility values would be expected corresponding to isomers generated in this process (Figure 6). This fact was only observed when working at higher ion mobility resolution in TIMS, since the loss of n water molecules could have a significant effect on the volume of these ions affecting their ion mobility. But further computational analysis will be carried out in future studies to explain more accurately the observations in the TIMS instrument.

Moreover, the isomer ions observed under the same m/z but with multiple reversed reduced ion mobilities ($1/K_0$) were fragmented individually in TIMS by applying high energy in the collision cell before the high-resolution mass measurement. As an example, Figure S5 shows the mass spectra of fragment ions observed for the ion $[M+2H+Na-3H_2O]^{3+}$ of OVTX-a (Figure 6c). As can be seen, the same fragmentation

pattern was observed for the different isomers despite the sites where the loss of water took place. In addition, peak #4 is the isomer with the highest reversed reduced mobility ($1/K_0 = 1.084 \text{ V}\cdot\text{s cm}^{-2}$) (the lowest reduced mobility, K_0), so the largest one, being the closest to that of the intact toxin molecule. Consequently, this isomer should be the biggest/most expanded one. These results allow us to hypothesize that in this ion the loss of water could occur in the inner site of the molecule without affecting the final volume. In contrast, the isomer #1, which shows the lowest reversed reduced mobility ($1/K_0=1.027 \text{ V}\cdot\text{s cm}^{-2}$) (the highest K_0) could be related with n water losses in the outer part of the toxin structure, which should be the smallest/most compact isomer. In addition, the fragment ion at m/z 327.1914 can be assigned to $[M+H-B \text{ moiety}-H_2O]^{3+}$, indicating that one of the losses of a water molecule could be taking place in the A moiety (Figure 1). While the fragment ion at m/z 1136.1299 can be assigned to $[M+H+Na-A \text{ moiety}-3H_2O]^{2+}$, indicating that one Na^+ conjugation can occur in the B moiety (Figure 4b) and simultaneously the 3 losses of water occur in this B moiety (in agreement with the dynamic simulation results).

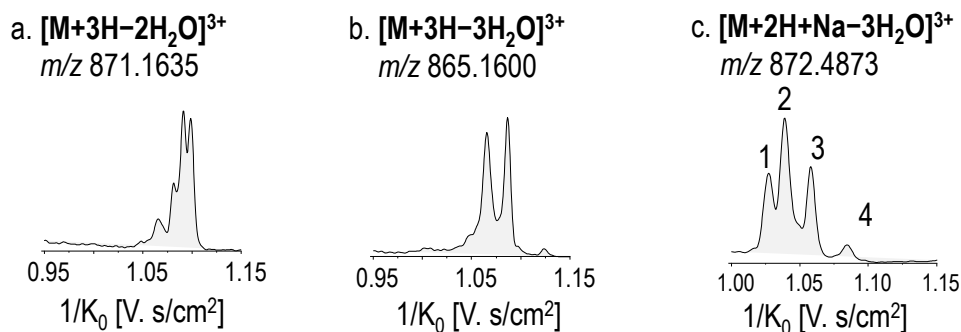


Figure 6. Triply charged ions observed with water losses for OVTX-a using TIMS system, **a** $[M+3H-2H_2O]^{3+}$; **b** $[M+3H-3H_2O]^{3+}$; **c** $[M+2H+Na-3H_2O]^{3+}$. Note that the **c** ion was observed on another day compared to the a/b ions. Thus, the ion mobility is not comparable.

CCSs values

Recent years have seen an increasing use of CCS values, in addition to retention time, exact mass, and tandem mass spectrum to identify and characterize molecules in complex matrixes and to make analytical methods more selective and sensitive. Currently, there is no information on ion mobility and CCS values for PLTX and OVXTs, so it is of great interest to include this information in databases to help in the screening of these toxins. In this work, for the first time, the CCSs values corresponding to the different ions observed in nESI-IM-HRMS have been calculated for PLTX_{std}, OVXT-a and OVXT-b. Table S2 summarizes CCS values of 102 ions generated by nESI and measured in DTIMS and TWIMS systems, using two drift gases (He and N₂). The ^{DT}CCS and ^{TW}CCS values have been measured in triplicates on three different days providing intra- and inter-day precision with an RSD% lower than 2%. The comparison of the results using helium and nitrogen as buffer gas showed that ^{DT}CCS_{N₂} values were higher than the ^{DT}CCS_{He} ones (Table S2) in agreement with previous studies.^{14,26,27} These observations can be related to the higher (> 8-fold) polarizability of N₂ (N₂: 1.74×10⁻²⁴ cm³, He: 0.21×10⁻²⁴ cm³),^{17,28} which could undergo more significant distortion by the electric field during ion-neutral collisions thus resulting in larger changes in the shape or conformation of the ions. Differences between ^{DT}CCS_{He} and ^{DT}CCS_{N₂} for doubly- and triply-charged ions were between 12–14%, but these differences increased (16–21%) for smaller ions such as monocharged fragment ions.

Since ^{DT}CCS_{N₂} values are generally accepted as reference values, they have been compared with those obtained in the TWIMS system (^{TW}CCS_{N₂}). Table S2 summarizes ^{TW}CCS_{N₂} calculated for ions observed for

PLTX analogues using both dextran and PLTX_{std} as calibrants and Figure S6 shows the correlation of ^{DT}CCS_{N₂} values against ^{TW}CCS_{N₂} using dextran and PLTX_{std} as calibrants. The higher correlation coefficient ($R^2=0.996$) and the slope closer to 1 (slope=1.02) was obtained when using PLTX_{std} as calibrant, indicating that it is the best option to obtain reliable ^{TW}CCS_{N₂} values for PLTX analogues, with differences between these values in the range of 0.9±0.6%. While, when the TWIMS system was calibrated using dextran, these differences were higher (4.6±1.6%). These observations support the fact that the selection of a calibrant with a chemical nature similar to that of the analytes give more reliable estimations of the corresponding CCS values.

Figure 7 shows the CCSs values measured for the different toxins versus the corresponding m/z values. As can be seen, the doubly- and triply-charged are clearly separated. The doubly-charged ions with a higher m/z values have smaller ^{DT}CCS_{N₂} values than the triply-charged ones. The ^{DT}CCS_{N₂} values in these ranges were between 497 and 593 Å². Furthermore, it can be observed that for the different PLTX analogues, the CCS values were within a narrow range, supporting the idea that the small differences in their structure do not affect the spatial conformation. The CCS value of the same type of ion for the different toxins (Table S2), only differed by less than 1.1%.

Triply-charged ions ^{DT}CCS_{N₂} ranged from 576 to 593 Å², and doubly-charged ions ranged from 538 to 557 Å². As expected, the loss of the A moiety led to ions with smaller ^{DT}CCS_{N₂} values (497–512 Å²). The larger ^{DT}CCS_{N₂} values for triply charged ions may indicate that they should have a more extended chemical conformation compared to doubly-charged ones, which could be likely due to charge repulsion. Furthermore, the

mobility behavior of ions can also be affected by their charge state. For instance, in ionic species with higher charge states the coulomb repulsions might predominate in

the intramolecular interactions, which could unzip the structure to minimize the repulsion,^{29,30} leading to both higher ion mobility and CCS value.

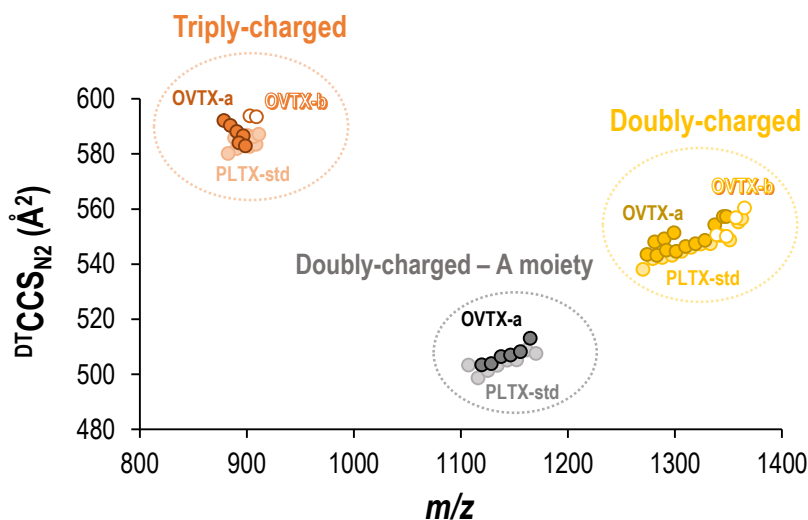


Figure 7. Conformational space map of the stepped field absolute CCS values for the different toxins and ions detected using DTIMS in the 800–1400 m/z range.

CONCLUSIONS

This study shows, for the first time, the ion mobility behavior of PLTX_{std} and PLTX analogues (OVTX-a and OVTX-b) in the three different ion mobility instruments most frequently used to study small molecules by UHPLC-IM-HRMS.

The ion mobility results in combination with the computational simulations allowed suggesting a "folded" configuration for the chemical structure of PLTX analogues, which could be stabilized by hydrogens bonds involving oxygens and hydroxyl groups located in inner sites of the folded molecule. Furthermore, adduct formation of $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ could occur through coordination of $2Na^+$ or Ca^{2+} in the inner sites of the folded structure without a significant effect on the total volume

and, consequently, in the corresponding CCS value. On the other hand, the loss of n water molecules could involve hydroxyl groups located in the peripheral sites of the folded molecule, according to the observations in TIMS.

A list of 102 CCS values have been calculated indicating that these toxins show $DTCCSN_2$ values in a narrow range (479–593 \AA^2), which can be used as an additional parameter to identify this family of compounds in complex samples, as well as to improve sensitivity and selectivity by reducing the background of chromatograms (UHPLC-IMS-HRMS) of the complex sample extracts. Moreover, the $DTCCSN_2$ reported in this work can be used as reference values to be included in databases to help in the screening of these toxins. Additionally,

the comparison of $^{TW}CCS_{N_2}$ values with those of $^{DT}CCS_{N_2}$ indicated that $PLTX_{std}$ should be used in the secondary calibration processes required by TWIMS, TIMS and cyclic IMS systems to obtain more reliable CCS values for PLTX analogues with these instruments.

■ ASSOCIATED CONTENT

The Supporting Information is available free of charge at -.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Encarnación Moyano –

Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain.

Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, E-08001 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1233-8864, Email: encarna.moyano@ub.edu

Authors

Noemí Inmaculada Medina-Pérez – *Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain.*

Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0003-0208-1580

Nuria Peralta-Moreno – *Department of Materials Science and Physical Chemistry, University of Barcelona and the Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUCB), Barcelona E-08028,*

Spain; orcid.org/0000-0002-7762-0406

Jaime Rubio-Martinez – *Department of Materials Science and Physical Chemistry, University of Barcelona and the Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTUCB), Barcelona E-08028, Spain; orcid.org/0000-0002-5529-2325*

Leila Bechtella – *Department of Molecular Physics, Fritz Haber Institute of the Max Planck Society, Berlin, Germany.*

Department of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany; orcid.org/0000-0002-7354-3108

Lukasz Polewski – *Department of Molecular Physics, Fritz Haber Institute of the Max Planck Society, Berlin, Germany.*

Department of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Elisa Berdalet – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0003-1123-9706*

Kevin Pagel – *Department of Molecular Physics, Fritz Haber Institute of the Max Planck Society, Berlin, Germany.*

Department of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany; orcid.org/0000-0001-8054-4718

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the different financing agencies that supported the study. N.I.M-P was granted by the fellowship FI-SDUR2020-00254 (AGAUR, Government of Catalonia). Financial support: Ministry of Science and Innovation (Spain, project PID2021-122743NB-I00), AGAUR (Generalitat de Catalunya, project 2021 SGR 00281) and the Water Research Institute (IdRA, University of Barcelona). Support was provided also by the CoCliME project, an ERA4CS network (ERA-NET) initiated by JPI Climate and co-financed by FORMAS (SE) and the European Union (Grant n° 690462). K.P. acknowledges generous funding by the European Research Council, ERC-2019-CoG-863934-GlycoSpec.

REFERENCES

- (1) Berdalet, E.; Pavaux, A. S.; Abós-Herrándiz, R.; Travers, M.; Appéré, G.; Vila, M.; Thomas, J.; de Haro, L.; Estrada, M.; Medina-Pérez, N. I.; Viure, L.; Karlson, B.; Lemée, R. Environmental, Human Health and Socioeconomic Impacts of *Ostreopsis* spp. Blooms in the NW Mediterranean. *Harmful Algae* **2022**, *119*, 102320.
- (2) Chomérat, N.; Antajan, E.; Auby, I.; Bilien, G.; Carpentier, L.; Casamajor, M. N. de; Ganthy, F.; Hervé, F.; Labadie, M.; Méteigner, C.; Paradis, C.; Perrière-Rumèbe, M.; Sanchez, F.; Séchet, V.; Amzil, Z. First Characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 461.
- (3) Gémin, M. P.; Réveillon, D.; Hervé, F.; Pavaux, A. S.; Tharaud, M.; Séchet, V.; Bertrand, S.; Lemée, R.; Amzil, Z. Toxin Content of *Ostreopsis* cf. *ovata* Depends on Bloom Phases, Depth and Macroalgal Substrate in the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* **2020**, *92*, 101727.
- (4) Tichadou, L.; Glaizal, M.; Armengaud, A.; Grossel, H.; Lemée, R.; Kantin, R.; Lasalle, J. L.; Drouet, G.; Rambaud, L.; Malfait, P.; De Haro, L. Health Impact of Unicellular Algae of the *Ostreopsis* Genus Blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean Coast Surveillance Network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 839–844.
- (5) Tartaglione, L.; Dello Iacovo, E.; Mazzeo, A.; Casabianca, S.; Ciminiello, P.; Penna, A.; Dell’Aversano, C. Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 13920–13928.
- (6) Tartaglione, L.; Mazzeo, A.; Dell’Aversano, C.; Forino, M.; Giussani, V.; Capellacci, S.; Penna, A.; Asnaghi, V.; Faimali, M.; Chiantore, M.; Yasumoto, T.; Ciminiello, P. Chemical, Molecular, and Eco-Toxicological Investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: Structural Insights into Four New Ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 915–932.
- (7) García-Altare, M.; Tartaglione, L.; Dell’Aversano, C.; Carnicer, O.; De La Iglesia, P.; Forino, M.; Diogène, J.; Ciminiello, P. The Novel Ovatoxin-g and Isobaric Palytoxin (so Far Referred to as Putative Palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural Insights by LC-High Resolution MSn. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 1191–1204.
- (8) Hofmann, J.; Pagel, K. Glycan Analysis by Ion Mobility–Mass Spectrometry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 8342–8349.
- (9) Poyer, S.; Loutelier-Bourhis, C.; Coadou, G.; Mondeguer, F.; Enche, J.; Bossée, A.; Hess, P.; Afonso, C. Identification and Separation of Saxitoxins Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Traveling Wave

Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2014**.

(10) Manz, C.; Götze, M.; Frank, C.; Zappe, A.; Pagel, K. Dextran as Internal Calibrant for N-Glycan Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414*, 5023–5031.

(11) Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L. High Resolution LC-MSⁿ Fragmentation Pattern of Palytoxin as Template to Gain New Insights into Ovatoxin-A Structure. The Key Role of Calcium in Ms Behavior of Palytoxins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 952–963.

(12) Medina-Pérez, N. I.; Cerdán-García, E.; Rubió, F.; Viure, L.; Estrada, M.; Moyano, E.; Berdalet, E. Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis cf. ovata*: Field and Laboratory Experiments. *Toxins (Basel)*. **2023**, *15*, 188.

(13) Medina-Pérez, N. I.; Santos, F. J.; Berdalet, E.; Moyano, E. Multiply Charged Ion Profiles in the UHPLC-HRMS Analysis of Palytoxin Analogues from *Ostreopsis cf. ovata* Blooms. *Anal. Methods* **2023**, *15*, 1355–1364.

(14) Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. Collision Cross Sections of Proteins and Their Complexes: A Calibration Framework and Database for Gas-Phase Structural Biology. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9557–9565.

(15) Hofmann, J.; Struwe, W. B.; Scarff, C. A.; Scrivens, J. H.; Harvey, D. J.; Pagel, K. Estimating Collision Cross Sections of Negatively Charged N- Glycans Using Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10789–10795.

(16) Pagel, K.; Harvey, D. J. Ion Mobility-Mass Spectrometry of Complex Carbohydrates: Collision Cross Sections of Sodiated N-Linked Glycans. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 5138–5145.

(17) Mason, E. A.; McDaniel, E. W. *Transport Properties of Ions in Gases*; John Wiley & Sons: New York, 1988

(18) Ruotolo, B. T.; Benesch, J. L. P.; Sandercock, A. M.; Hyung, S. J.; Robinson, C. V. Ion Mobility-Mass Spectrometry Analysis of Large Protein Complexes. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1139–1152.

(19) Thalassinos, K.; Grabenauer, M.; Slade, S. E.; Hilton, G. R.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. Characterization of Phosphorylated Peptides Using Traveling Wave-Based and Drift Cell Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 248–254.

(20) Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.

(21) Case, D.A.; Belfon, K.; Ben-Shalom, I.Y.; Brozell, S.R.; Cerutti, D.S.; Cheatham, T.E.; Cruzeiro, III, V.W.D.; Darden, T.A.; Duke, R.E.; Giambasu, G.; Gilson, M.K.; Gohlke, H.; Goetz, A.W.; Harris, R.; Izadi, S.; Izmailov, S.A.; Kasavajhala, K.; Kovalenko, A.; Krasny, R.; Kurtzman, T.; Lee, T.S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Man, V.; Merz, K.M.; Miao, Y.; Mikhailovskii, O.; Monard, G.; Nguyen, H.; Onufriev, A.; F. Pan, F.; Pantano, S.; Qi, R.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shen, J.; Simmerling, C. L.; Skrynnikov, N. R.; Smith, J.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wilson, L.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiong, Y.; Xue, Y.; York, D. M.; Kollman, P.A. AMBER 2020, **2020**, University of California, San Francisco.

(22) Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation. *J. Comput. Chem* **2002**, *23*, 1623–1641.

(23) Tian, C.; Kasavajhala, K.; Belfon, K. A. A.; Raguette, L.; Huang, H.; Miguez, A. N.; Bickel, J.; Wang, Y.; Pincay, J.; Wu, Q.; Simmerling, C. Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16*, 528–552.

(24) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem* **2004**, *25*, 1157–1174.

(25) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.

(26) May, J. C.; Goodwin, C. R.; Lareau, N. M.; Leaptrot, K. L.; Morris, C. B.; Kurulugama, R. T.; Mordehai, A.; Klein, C.; Barry, W.; Darland, E.; Overney, G.; Imatani, K.; Stafford, G. C.; Fjeldsted, J. C.; McLean, J. A. Conformational Ordering of Biomolecules in the Gas Phase: Nitrogen Collision Cross Sections Measured on a Prototype High Resolution Drift Tube Ion Mobility-Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2014**.

(27) Salbo, R.; Bush, M. F.; Naver, H.; Campuzano, I.; Robinson, C. V.; Pettersson, I.; Jørgensen, T. J. D.; Haselmann, K. F. Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry of Protein Complexes: Accurate Calibrated Collision Cross-Sections of Human Insulin Oligomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 1181–1193.

(28) Haynes, W. M.; Lide, D. R.; Bruno, T. J. CRC Handbook of Chemistry and Physics 2012–2013, 93 Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012.

(29) Stow, S. M.; Causon, T. J.; Zheng, X.; Kurulugama, R. T.; Mairinger, T.; May, J. C.; Rennie, E. E.; Baker, E. S.; Smith, R. D.; McLean, J. A.; Hann, S.; Fjeldsted, J. C. An Interlaboratory Evaluation of Drift Tube Ion Mobility-Mass Spectrometry Collision Cross Section Measurements. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 9048–9055.

(30) Ghosh, D.; Baksi, A.; Mudedla, S. K.; Nag, A.; Ganayee, M. A.; Subramanian, V.; Pradeep, T. Gold-Induced Unfolding of Lysozyme: Toward the Formation of Luminescent Clusters. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 13335–13344.

SUPPORTING INFORMATION for

Ion Mobility – Mass Spectrometry studies of palytoxin-like compounds produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez^{1,2} · M. Nuria Peralta-Moreno³ · Jaime Rubio-Martínez³ · Leïla Bechtella^{4,5} · Lukasz Polewski^{4,5} · Elisa Berdalet² · Encarnación Moyano^{*1,6} · Kevin Pagel^{4,5}

¹ Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona, Spain

³ Department of Materials Science and Physical Chemistry, University of Barcelona and the Institut de Recerca en Química Teòrica i Computacional (IQTCUB), Barcelona, Spain

⁴ Department of Molecular Physics, Fritz Haber Institute of the Max Planck Society, Berlin, Germany

⁵ Department of Chemistry and Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

⁶ Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Barcelona, Spain

Table S1. List of the product ions with the respective precursor ions (and the collision energy used) whose CCSs values are calculated.

Table S2. List of the CCSs values for the PLTX standard, OVTX-a and OVTX-b measured and estimated using DTIMS and TWIMS. ¹Intraday; ²Interday, nd: non detected, na: non analyzed. * Product ions (see Table S1).

Table S3. Most important hydrogen bonds established during the complete 1 μ s simulations have been performed for each of the 15 independent replicates of the two adducts studied for OVTX-b. Averaged occupancies have been calculated from the complete independent trajectories. Only hydrogen bonds exhibiting occupancies > 20% of the simulation are included in the table.


Figure S1. Different points of view of the coordination of Na and Ca atoms in the $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ions, respectively, along the conformational simulation (example of the OVTX-b structure). The spheres  (different colors) represent reference positions to better visualize the three-dimensional structure and the yellow dashed lines the Na/Ca coordination.

Figure S2. Hydrogen bonds of the **a** $[M+H+2Na]^{3+}$ and **b** $[M+H+Ca]^{3+}$ ions observed during the conformational simulation (example of the OVTX-b structure). Only hydrogen bonds exhibiting occupancies > 20% of the simulation are included in the Figure (see details about each occupancy in Table S3).

Figure S3. Radius variation of the $[M+H+Ca]^{3+}$ and $[M+H+2Na]^{3+}$ ions during the conformational simulation (example of the OVTX-b structure).

Figure S4. Hydroxyls groups in the inner (grey) and outer (blue) part of the clustered structures of the $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ ions (example of the OVTX-b structure).

Figure S5. Fragmentation of the $[M+2H+Na-3H_2O]^{3+}$ (blue diamond) at CE 35 V for the different ion mobility peaks observed for the OVTX-a using TIMS.

Figure S6. Correlation between CCS values measured in traveling wave or in the drift tube instrument and using Dextran or PLTX standard as a calibrants.

Table S1. List of the product ions with the respective precursor ions (and the collision energy used) whose CCSs values are calculated.

Toxin	Precursor ion	<i>m/z</i> & CE	IMS	Product ion	<i>m/z</i>
PLTX _{std}	[M+H+Ca] ³⁺	906.4828 (40 V)	TWIM	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	900.4793
				[M+H+Ca-2H ₂ O] ³⁺	894.4757
	[M+H+2Na] ³⁺	908.4884 (32 V)	TWIM	[M+H+2Na-2H ₂ O] ³⁺	896.4814
				[M+H+2Na-3H ₂ O] ³⁺	890.4779
				[M+H+2Na-4H ₂ O] ³⁺	884.4743
				[M+H+2Na-5H ₂ O] ³⁺	878.4708
	[M+H+Na] ³⁺	1351.2380 (40–60 V)	TWIM	(#1+#4-2H ₂ O) ⁺ (A side charged)	234.1127
				[M+H-B moiety-H ₂ O] ⁺	327.1914
				(#20-H ₂ O) ⁺ (B side charged)	726.4059
				(#19+H-H ₂ O) ⁺ (B side charged)	786.4270
				(#19+H) ⁺ (B side charged)	804.4376
				[M+H+Na-2H ₂ O] ³⁺	1333.2275
				[M+H+Na-3H ₂ O] ³⁺	1324.2222
				[M+H+Na-4H ₂ O] ³⁺	1315.2169
				[M+H+Na-5H ₂ O] ³⁺	1306.2116
				[M+H+Na-6H ₂ O] ³⁺	1297.2063
				[M+H+Na-7H ₂ O] ³⁺	1288.2011
				[M+H+Na-8H ₂ O] ³⁺	1279.1958
				[M+H+Na-A moiety-4H ₂ O] ²⁺	1143.1195
				[M+H+Na-A moiety-5H ₂ O] ²⁺	1134.1143
				[M+H+Na-A moiety-6H ₂ O] ²⁺	1125.1090
	[M+H+Na] ³⁺	1351.2380 (50 V)	DTIM	(#1+#4-2H ₂ O) ⁺ (A side charged)	234.1127
				[M+H-B moiety-H ₂ O] ⁺	327.1914
				(#20-2H ₂ O) ⁺ (B side charged)	708.3954
				(#20-H ₂ O) ⁺ (B side charged)	726.4059
				(#20) ⁺ (B side charged)	744.4165
				(#19+H-2H ₂ O) ⁺ (B side charged)	768.4165
				(#19+H-H ₂ O) ⁺ (B side charged)	786.4270
				(#19+H) ⁺ (B side charged)	804.4376
				[M+H+Na-A moiety-H ₂ O] ²⁺	1170.1354
				[M+H+Na-A moiety-2H ₂ O] ²⁺	1161.1301
				[M+H+Na-A moiety-3H ₂ O] ²⁺	1152.1248
				[M+H+Na-A moiety-4H ₂ O] ²⁺	1143.1195
				[M+H+Na-A moiety-5H ₂ O] ²⁺	1134.1143
				[M+H+Na-A moiety-6H ₂ O] ²⁺	1125.1090
				[M+H+Na-A moiety-7H ₂ O] ²⁺	1116.1037
				[M+H+Na-A moiety-8H ₂ O] ²⁺	1107.0984
				[M+H+Na-2H ₂ O] ²⁺	1333.2275
				[M+H+Na-3H ₂ O] ²⁺	1324.2222
				[M+H+Na-4H ₂ O] ²⁺	1315.2169
				[M+H+Na-5H ₂ O] ²⁺	1306.2116

Toxin	Precursor ion	m/z & CE	IMS	Product ion	m/z
PLTX _{std}	[M+H+Na] ³⁺	1351.2380 (50 V)	DTIM	[M+H+Na-6H ₂ O] ²⁺	1297.2063
				[M+H+Na-7H ₂ O] ²⁺	1288.2011
				[M+H+Na-8H ₂ O] ²⁺	1279.1958
				[M+H+Na-9H ₂ O] ²⁺	1270.1905
OVTX-a	[M+H+Ca] ³⁺	895.8195 (40 V)	TWIM	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	889.8160
				[M+H+Ca-2H ₂ O] ³⁺	883.8125
				[M+H+Ca-3H ₂ O] ³⁺	877.8089
				[M+H+Ca-4H ₂ O] ³⁺	871.8054
	[M+H+Ca] ³⁺	895.8195 (30 V)	DTIM	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	889.8160
				[M+H+Ca-2H ₂ O] ³⁺	883.8125
				[M+H+Ca-3H ₂ O] ³⁺	877.8089
	[M+H+2Na] ³⁺	897.8252 (37 V)	TWIM	[M+H+2Na-H ₂ O] ³⁺	891.8216
				[M+H+2Na-2H ₂ O] ³⁺	885.8181
				[M+H+2Na-3H ₂ O] ³⁺	879.8146
				[M+H+2Na-4H ₂ O] ³⁺	873.8111
				[M+H+2Na-5H ₂ O] ³⁺	867.8076
				[M+2Na-Amoiety-2H ₂ O] ²⁺	1156.1262
				[M+2Na-Amoiety-3H ₂ O] ²⁺	1147.1209
	[M+H+2Na] ³⁺	897.8252 (30 V)	DTIM	(#16+Ca) ²⁺ (A side charged)	625.3401
				(#16+Ca-2H ₂ O) ²⁺ (B side charged)	719.8557
				(#16+Ca-H ₂ O) ²⁺ (B side charged)	728.8610
				(#16+Ca) ²⁺ (B side charged)	737.8663
	[M+H+Na] ²⁺	1335.2431 (60 V)	TWIM	(#1+#4-2H ₂ O) ⁺ (A side charged)	234.1127
				[M+H-B moiety-H ₂ O] ⁺	327.1914
				(#10+#12) ⁺ (A side charged)	447.2762
				(#15+Ca) ²⁺ (A side charged)	588.3217
				(#16+Ca) ²⁺ (A side charged)	625.3401
				(#16+Ca-2H ₂ O) ²⁺ (B side charged)	719.8557
				(#16+Ca-H ₂ O) ²⁺ (B side charged)	728.8610
				(#16+Ca) ²⁺ (B side charged)	737.8663
				(#19+H) ⁺ (B side charged)	804.4376
				(#19+H-H ₂ O) ⁺ (B side charged)	786.4270
				[M+H+Na-2H ₂ O] ³⁺	1317.2326
				[M+H+Na-3H ₂ O] ³⁺	1308.2273
				[M+H+Na-4H ₂ O] ³⁺	1299.2220
				[M+H+Na-5H ₂ O] ³⁺	1290.2167
				[M+H+Na-6H ₂ O] ³⁺	1281.2114
				[M+H+Na-7H ₂ O] ³⁺	1272.2062
				[M+H+Na-Amoiety-H ₂ O] ²⁺	1154.1405
				[M+H+Na-Amoiety-2H ₂ O] ²⁺	1145.1352
				[M+H+Na-Amoiety-3H ₂ O] ²⁺	1136.1299
				[M+H+Na-Amoiety-4H ₂ O] ²⁺	1127.1246
				[M+H+Na-Amoiety-5H ₂ O] ²⁺	1118.1193

					Article
Toxin	Precursor ion	m/z & CE	IMS	Product ion	m/z
OVTX-a	[M+H+Na]²⁺	1335.2431 (45 V)	DTIM	[M+H-B moiety-H ₂ O] ⁺	327.1914
				[M+H+Na-A moiety] ²⁺	1163.1458
				[M+H+Na-A moiety-H ₂ O] ²⁺	1154.1405
				[M+H+Na-A moiety-2H ₂ O] ²⁺	1145.1352
				[M+H+Na-A moiety-3H ₂ O] ²⁺	1136.1299
				[M+H+Na-A moiety-4H ₂ O] ²⁺	1127.1246
				[M+H+Na-A moiety-5H ₂ O] ²⁺	1118.1193
				[M+H+Na-2H ₂ O] ³⁺	1317.2326
				[M+H+Na-3H ₂ O] ³⁺	1308.2273
				[M+H+Na-4H ₂ O] ³⁺	1299.2220
				[M+H+Na-5H ₂ O] ³⁺	1290.2167
				[M+H+Na-6H ₂ O] ³⁺	1281.2114
[M+H+Na-7H ₂ O] ³⁺	1272.2062				
OVTX-b	[M+H+Na]³⁺	1357.2562 (42 V)	TWIM	[M+H+Na-H ₂ O] ²⁺	1348.2510
	[M+H+Na]³⁺	1357.2562 (27 V)	DTIM	[M+H+Na-2H ₂ O] ²⁺	1339.2457
	[M+H+Ca]³⁺	910.4950 (25 V)	DTIM	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	904.4914

Table S2. List of the CCSs values for the PLTX standard, OVTX-a and OVTX-b measured and estimated using DTIMS and TWIMS. ¹Intraday; ² Interday; nd: non detected, na: non analyzed. * Product ions (see Table S1).

Toxin	Ion	m/z	DTIMS						TWIMS using dextran as a calibrant			TWIMS using PLTX _{std} as a calibrant			
			Helium gas			Nitrogen gas			Nitrogen gas			Nitrogen gas			
			DT ¹ CCS _{He} (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS _{He} (Å ²) ²	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS _{N2} (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS _{N2} (Å ²) ²	SD ¹	SD ²	TW ² CCS _{N2} (Å ²) ²
PLTX	(#1+#4-2H ₂ O) ⁺	234.1127	*95.6	0.1	*95.3	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	*180.5	0.1	*170.0	0.3
PLTX	[M+H-B moiety-H ₂ O] ⁺	327.1914	*120.6	0.0	*120.7	0.6	*184.6	0.5	*184.6	2.1	nd	188.6	0.2	181.5	3.3
PLTX	(#20-2H ₂ O) ⁺	708.3954	*186.6	1.5	*186.7	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	(#20-H ₂ O) ⁺	726.4059	*186.3	0.7	*186.9	1.2	*275.5	0.6	*275.0	3.4	*276.0	2.1	*269.5	2.7	
PLTX	(#20) ⁺	744.4165	*187.9	0.5	*186.8	0.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	(#19+H-2H ₂ O) ⁺	768.4165	*193.9	1.4	*193.0	1.0	*263.5	0.5	*263.3	2.4	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	(#19+H-H ₂ O) ⁺	786.4270	*192.6	0.2	*192.2	0.7	nd	nd	nd	nd	*273.5	3.2	*259.3	0.3	
PLTX	(#19+H) ⁺	804.4376	*191.6	0.4	*191.1	0.3	nd	nd	nd	nd	*270.0	1.0	*258.5	0.3	
PLTX	[M+3H-7H ₂ O] ³⁺	851.8090	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	644.9	0.9	612.5	1.1	
PLTX	[M+H+Mg-3H ₂ O] ³⁺	883.1464	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	647.3	0.3	595.5	0.1	
PLTX	*[M+H+2Na-5H ₂ O] ³⁺	878.4708	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*620.9	1.8	*588.9	2.0	
PLTX	*[M+H+2Na-4H ₂ O] ³⁺	884.4743	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*623.6	0.5	*591.6	0.3	
PLTX	*[M+H+2Na-3H ₂ O] ³⁺	890.4779	462.5	1.3	462.5	2.5	576.4	2.9	581.9	3.9	*622.6	0.7	*590.6	0.4	
PLTX	*[M+H+2Na-2H ₂ O] ³⁺	896.4814	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	*622.9	0.2	*590.9	0.5	
PLTX	[M+H+2Na-H ₂ O] ³⁺	902.4849	nd	nd	nd	nd	577.3	1.9	582.7	4.6	624.2	0.4	592.2	0.1	
PLTX	[M+H+2Na] ³⁺	908.4884	440.1	1.6	441.7	3.4	577.9	2.0	583.5	4.2	623.6	0.2	591.6	0.1	
PLTX	[M+H+Ca-4H ₂ O] ³⁺	882.4687	469.9	1.0	469.2	0.7	579.2	1.6	580.2	1.1	nd	nd	nd	nd	

Toxin	Ion	m/z	DTIMS						Nitrogen gas			TWIMS using dextran as a calibrant			TWIMS using PLTX _{std} as a calibrant				
			Helium gas			DTIMS			DTIMS			TWIMS			TWIMS				
			DT ¹ CCS ^{He} (Å ³) ¹	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS ^{He} (Å ³) ²	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS ^{N₂} (Å ³) ¹	SD ¹	SD ²	DT ¹ CCS ^{N₂} (Å ³) ²	SD ¹	SD ²	TW ¹ CCS ^{N₂} (Å ³) ²	SD ¹	SD ²	TW ¹ CCS ^{N₂} (Å ³) ²	SD ¹
PLTX	*[M+H+Ca-3H ₂ O] ³⁺	888.4722	467.9	1.4	466.9	0.9	579.1	1.4	585.8	4.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	*[M+H+Ca-2H ₂ O] ³⁺	894.4757	461.3	1.5	459.9	2.1	581.5	1.4	586.5	3.9	*629.3	0.2	*597.2	0.4	*597.2	0.4	*597.2	0.4	0.4
PLTX	*[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	900.4793	444.1	1.8	445.0	2.9	581.6	1.2	586.7	3.9	*630.4	0.4	*598.3	0.6	*598.3	0.6	*598.3	0.6	0.6
PLTX	[M+H+Ca] ³⁺	906.4828	442.0	1.6	443.4	3.5	581.0	1.6	586.3	4.1	623.8	0.1	591.8	0.3	591.8	0.3	591.8	0.3	0.3
PLTX	[M+H+Fe] ³⁺	911.1418	443.2	1.5	442.3	0.9	582.1	1.8	587.1	4.0	623.5	0.1	591.6	0.3	591.6	0.3	591.6	0.3	0.3
PLTX	[M+H+Na- A moiety-8H ₂ O] ²⁺	1107.0984	*389.3	0.7	*390.0	1.0	*496.7	2.9	*497.6	6.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	[M+H+Na- A moiety-7H ₂ O] ²⁺	1116.1037	*392.1	0.1	*391.7	0.7	*501.4	0.6	*498.7	2.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	[M+H+Na- A moiety-6H ₂ O] ²⁺	1125.1090	*392.4	0.8	*392.0	0.7	*499.4	0.9	*501.3	1.9	*521.5	0.8	*498.3	0.8	*498.3	0.8	*498.3	0.8	0.8
PLTX	[M+H+Na- A moiety-5H ₂ O] ²⁺	1134.1143	*393.1	0.1	*393.4	1.1	*502.9	1.6	*503.2	0.3	*522.5	0.5	*499.3	0.5	*499.3	0.5	*499.3	0.5	0.5
PLTX	[M+H+Na- A moiety-4H ₂ O] ²⁺	1143.1195	*394.4	0.6	*394.2	0.7	*503.1	0.9	*505.2	1.6	*524.4	0.2	*501.2	0.3	*501.2	0.3	*501.2	0.3	0.3
PLTX	[M+H+Na- A moiety-3H ₂ O] ²⁺	1152.1248	*394.6	0.2	*394.7	0.8	*504.8	0.6	*505.3	1.1	525.0	0.8	501.8	0.8	501.8	0.8	501.8	0.8	0.8
PLTX	[M+H+Na- A moiety-2H ₂ O] ²⁺	1161.1301	*397.0	0.4	*396.5	0.8	*507.5	1.9	*508.7	1.3	527.7	0.4	504.5	0.4	504.5	0.4	504.5	0.4	0.4
PLTX	[M+H+Na- A moiety-H ₂ O] ²⁺	1170.1354	*396.6	0.1	*396.8	0.4	*508.8	2.6	*507.6	1.6	528.8	0.4	505.5	0.5	505.5	0.5	505.5	0.5	0.5
PLTX	[M+H+Na-9H ₂ O] ²⁺	1270.1905	*429.3	0.1	*429.3	0.7	*537.9	1.0	*538.1	0.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PLTX	[M+H+Na-8H ₂ O] ²⁺	1279.1958	*429.7	0.2	*429.9	0.5	*541.6	1.0	*541.9	0.4	*566.9	0.8	*542.9	0.8	*542.9	0.8	*542.9	0.8	0.8
PLTX	[M+H+Na-7H ₂ O] ²⁺	1288.2011	*430.5	0.1	*430.4	0.9	*541.0	0.4	*542.4	1.1	*566.6	0.3	*542.7	0.4	*542.7	0.4	*542.7	0.4	0.4

Toxin	Ion	m/z	DTIMS						TWIMS using dextran as a calibrant		TWIMS using PLTX _{acid} as a calibrant			
			Helium gas			Nitrogen gas			Nitrogen gas		Nitrogen gas			
			DTCCS _{He} ¹ (Å ³) ¹	SD ¹	SD ²	DTCCS _{N2} ¹ (Å ³) ¹	SD ¹	SD ²	DTCCS _{N2} ² (Å ³) ²	SD ²	TWCCS _{N2} ¹ (Å ³) ¹	SD ¹	TWCCS _{N2} ² (Å ³) ²	SD ²
PLTX	[M+H+Na-6H ₂ O] ²⁺	1297.2063	*430.8	0.2	*430.9	0.6	*542.2	0.0	*543.2	0.9	*566.9	0.1	*543.0	0.5
PLTX	[M+H+Na-5H ₂ O] ²⁺	1306.2116	*432.3	0.3	*432.2	0.7	*542.7	1.2	*544.6	1.6	*568.3	0.4	*544.4	0.4
PLTX	[M+H+Na-4H ₂ O] ²⁺	1315.2169	*432.8	0.1	*432.7	0.5	*543.6	0.7	*546.1	1.8	*570.1	0.3	*546.1	0.3
PLTX	[M+H+Na-3H ₂ O] ²⁺	1324.2222	*433.2	0.1	*433.2	0.6	*545.9	0.5	*547.3	1.0	*571.2	0.5	*547.2	0.4
PLTX	[M+H+Na-2H ₂ O] ²⁺	1333.2275	*433.5	0.1	*433.6	0.6	*546.3	0.5	*547.4	1.1	*572.6	0.1	*548.5	0.1
PLTX	[M+H+Na-H ₂ O] ²⁺	1342.2328	431.0	0.4	432.6	1.6	546.7	0.8	550.4	3.1	572.6	1.2	548.6	1.2
PLTX	[M+H+Na] ²⁺	1351.2380	432.6	0.9	431.6	0.7	551.7	5.4	548.8	2.5	569.7	0.3	545.7	0.3
PLTX	[M+2H-4H ₂ O] ²⁺	1304.2259	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	564.4	0.6	540.6	0.5
PLTX	[M+2H-3H ₂ O] ²⁺	1313.2312	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	566.0	0.7	542.1	0.7
PLTX	[M+2H-2H ₂ O] ²⁺	1322.2365	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	565.9	0.8	542.0	0.7
PLTX	[M+2H-H ₂ O] ²⁺	1331.2418	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	567.0	1.0	542.9	2.2
PLTX	[M+H+K] ²⁺	1359.2250	433.4	0.5	435.3	1.7	551.5	1.6	555.2	4.3	572.6	0.4	548.6	0.4
PLTX	[M+2Na] ²⁺	1362.2290	437.0	0.6	439.2	1.6	553.4	2.6	566.5	2.2	573.1	0.3	549.1	0.2
OVTX-a	(#1+#4-2H ₂ O) ⁺	234.1127	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*172.0	0.1	*161.5	0.2
OVTX-a	[M+H-Bmoiety-H ₂ O] ⁺	327.1914	na	na	na	na	*181.7	0.5	*180.7	1.1	*185.9	0.1	*182.4	0.2
OVTX-a	(#10+#12) ⁺	447.2762	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*215.4	0.2	*204.4	1.0
OVTX-a	(#15+Ca) ²⁺	588.3217	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*390.8	0.2	*369.9	0.4
OVTX-a	(#16+Ca) ²⁺	625.3401	na	na	na	na	*378.5	2.3	*377.0	1.5	*401.0	0.3	*379.8	0.5
OVTX-a	(#16+Ca-2H ₂ O) ²⁺	719.8557	na	na	na	na	*392.9	0.4	*392.6	0.2	*412.7	0.2	*391.2	1.1

Toxin	Ion	m/z	DTIMS						TWIMS using dextran as a calibrant		TWIMS using PLTX _{std} as a calibrant			
			Helium gas			Nitrogen gas			Nitrogen gas		Nitrogen gas			
			DT ⁺ CCS _{He} (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²	DT ⁺ CCS _{He} (Å ²) ²	SD ¹	SD ²	DT ⁺ CCS _{N₂} (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²	DT ⁺ CCS _{N₂} (Å ²) ²	SD ²	
OVTX-a	[#16+Ca-H ₂ O] ²⁺	728.8610	na	na	na	na	*393.6	0.8	*394.5	0.9	*414.4	0.3	*393.1	0.5
OVTX-a	[#16+Ca] ²⁺	737.8663	na	na	na	na	*393.1	1.3	*392.7	0.4	*413.4	0.2	*392.1	0.1
OVTX-a	[#19+H-H ₂ O] ⁺	786.4270	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*270.0	0.6	*258.2	0.6
OVTX-a	[#19+H] ⁺	804.4376	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*270.5	0.1	*258.6	0.1
OVTX-a	[M+H+Mg-4H ₂ O] ³⁺	866.4796	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	627.8	0.2	601.1	1.7
OVTX-a	[M+H+Mg-3H ₂ O] ³⁺	872.4831	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	627.1	0.2	594.7	1.8
OVTX-a	[M+H+Mg-2H ₂ O] ³⁺	878.4866	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	627.0	1.3	594.7	1.0
OVTX-a	[M+H+Mg-H ₂ O] ³⁺	884.4901	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	627.6	0.7	595.3	1.5
OVTX-a	[M+H+Mg] ³⁺	890.4937	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	626.2	0.8	594.0	1.3
OVTX-a	[M+H+Ca-4H ₂ O] ³⁺	871.8054	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*633.9	1.3	*601.5	1.6
OVTX-a	[M+H+Ca-3H ₂ O] ³⁺	877.8089	na	na	na	na	*592.1	1.1	591.7	0.4	*631.4	1.5	*599.3	1.2
OVTX-a	[M+H+Ca-2H ₂ O] ³⁺	883.8125	na	na	na	na	*589.3	1.0	589.9	0.6	*630.1	0.9	*598.0	0.6
OVTX-a	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	889.8160	na	na	na	na	*587.0	0.2	587.7	0.7	*628.5	0.1	*596.4	0.2
OVTX-a	[M+H+Ca] ³⁺	895.8195	na	na	na	na	*584.8	0.2	586.1	1.3	624.4	0.2	592.4	0.5
OVTX-a	[M+H+2Na-5H ₂ O] ³⁺	867.8076	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*634.2	0.8	*602.0	0.6
OVTX-a	[M+H+2Na-4H ₂ O] ³⁺	873.8111	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*629.7	0.1	*597.6	0.2
OVTX-a	[M+H+2Na-3H ₂ O] ³⁺	879.8146	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*626.3	0.8	*594.3	0.5
OVTX-a	[M+H+2Na-2H ₂ O] ³⁺	885.8181	na	na	na	na	nd	nd	nd	nd	*626.0	0.4	*594.0	0.1
OVTX-a	[M+H+2Na-H ₂ O] ³⁺	891.8216	na	na	na	na	582.5	1.3	583.6	1.1	*628.4	0.3	*595.4	0.1
OVTX-a	[M+H+2Na] ³⁺	897.8252	na	na	na	na	582.5	1.0	582.5	1.6	624.1	1.6	592.3	1.3

Toxin	Ion	m/z	DTIMS						TWIMS using PLTX _{std} as a calibrant		
			Helium gas			Nitrogen gas					
			DTCCS _{He} ¹ (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²	DTCCS _{N2} ¹ (Å ²) ¹	SD ¹	SD ²		TWCCS _{N2} (Å ²) ²	SD ²
OVTX-a	[M+H+Na-3H ₂ O] ²⁺	1308.2273	na	na	na	*545.9	0.8	*546.3	0.4	*545.7	0.1
OVTX-a	[M+H+Na-2H ₂ O] ²⁺	1317.2326	na	na	na	*546.8	0.1	*547.4	0.5	547.2	0.1
OVTX-a	[M+H+Na-H ₂ O] ²⁺	1326.2378	na	na	na	548.2	0.2	548.5	0.3	547.9	0.2
OVTX-a	[M+H+Na] ²⁺	1335.2431	na	na	na	554.3	0.5	554.2	0.1	544.6	0.5
OVTX-a	[M+H+K] ²⁺	1343.2301	na	na	na	557.0	1.6	557.1	0.1	547.6	0.8
OVTX-a	[M+2Na] ²⁺	1346.2341	na	na	na	557.2	0.7	557.1	0.1	546.9	0.9
OVTX-b	[M+H+Ca-H ₂ O] ³⁺	904.4910	na	na	na	*592.9	2.3	*593.5	0.6	nd	nd
OVTX-b	[M+H+Ca] ³⁺	910.4950	na	na	na	590.8	0.2	593.2	2.4	593.4	0.5
OVTX-b	[M+2H-4H ₂ O] ²⁺	1310.2441	na	na	na	nd	nd	nd	nd	547.0	0.2
OVTX-b	[M+2H-3H ₂ O] ²⁺	1319.2494	na	na	na	nd	nd	nd	nd	549.9	0.5
OVTX-b	[M+H+Na-2H ₂ O] ²⁺	1339.2457	na	na	na	*548.9	0.6	*550.4	1.5	nd	nd
OVTX-b	[M+H+Na-H ₂ O] ²⁺	1348.2510	na	na	na	549.8	0.1	549.8	3.2	*552.1	0.6
OVTX-b	[M+H+Na] ²⁺	1357.2562	na	na	na	549.6	0.7	556.6	7.0	549.9	0.2
OVTX-b	[M+H+K] ²⁺	1365.2432	na	na	na	552.7	0.2	560.1	7.4	nd	nd

Table S3. Most important hydrogen bonds established during the complete 1 μ s simulations have been performed for each of the 15 independent replicates of the two adducts studied for OVTX-b. Averaged occupancies have been calculated from the complete independent trajectories. Only hydrogen bonds exhibiting occupancies > 20% of the simulation are included in the table.

System	Acceptor	Donor	Occupancy (%)
[M+H+2Na]³⁺	O33	O32-H166	59.0
	O46	O47-H214	54.3
	O4	O25-H159	45.6
	O5	O15-H149	42.2
	O30	O29-H163	41.1
	O31	O32-H166	36.1
	O12	O14-H148	30.9
	O32	O31-H165	30.5
	O32	O33-H167	29.6
	O42	O43-H210	28.5
	O5	O11-H145	24.7
	O21	O22-H156	22.6
	O3	O29-H163	22.2
	O35	O42-H209	22.1
	[M+H+Ca]³⁺	O33	O32-H166
O46		O47-H214	39.8
O30		O29-H163	36.0
O4		O25-H159	35.2
O12		O14-H148	33.9
O16		O17-H151	31.4
O6		O10-H144	30.0
O31		O32-H166	29.5
O49		O47-H214	29.3
O20		O18-H152	29.2
O5		O15-H149	27.2
O17		O15-H149	25.2
O4		O21-H155	24.6
O34		O28-H162	20.0

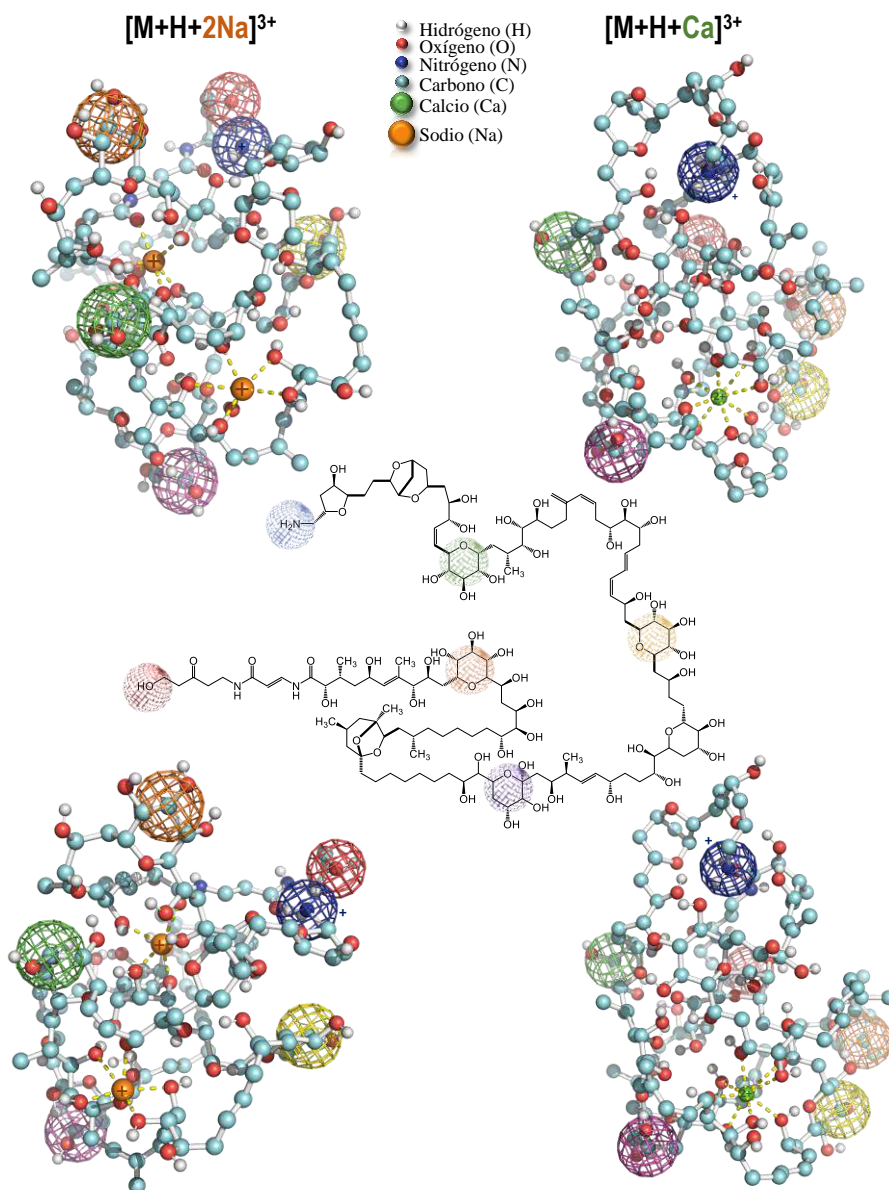


Figure S1. Different points of view of the coordination of Na and Ca atoms in the $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ions, respectively, along the conformational simulation (example of the OVTX-b structure). The spheres (different colors) represent reference positions to better visualize the three-dimensional structure and the yellow dashed lines the Na/Ca coordination.

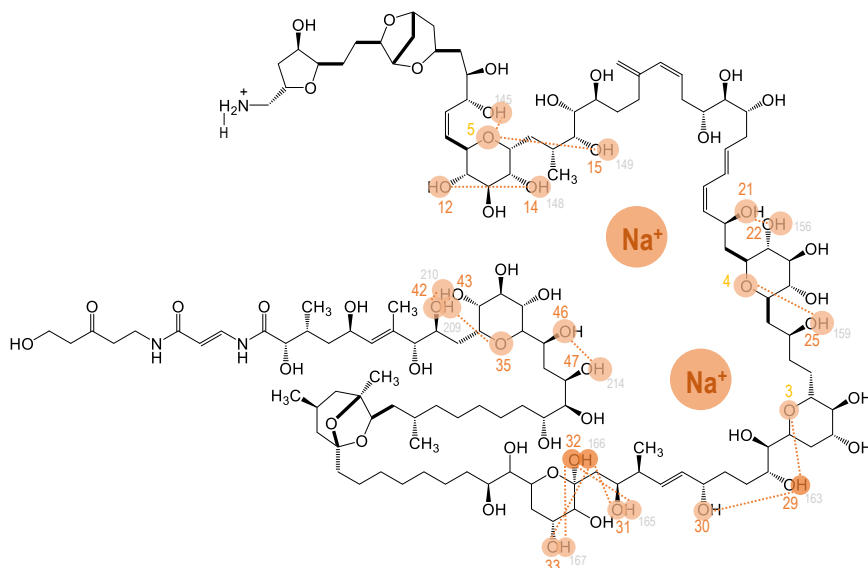
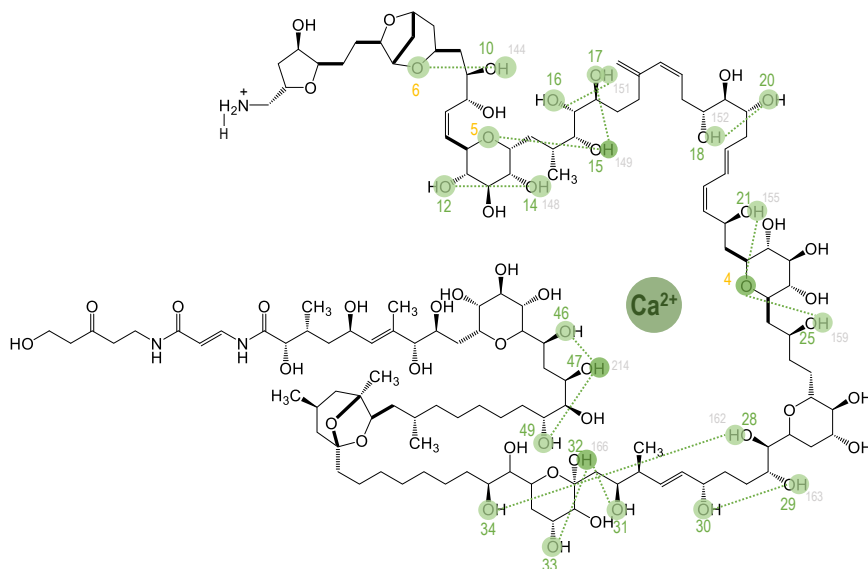
a) Hydrogen bonds of the $[M+H+2Na]^{3+}$ adduct ionb) Hydrogen bonds of the $[M+H+Ca]^{3+}$ adduct ion

Figure S2. Hydrogen bonds of the a) $[M+H+2Na]^{3+}$ and b) $[M+H+Ca]^{3+}$ ions observed during the conformational simulation (example of the OVTX-b structure). Only hydrogen bonds exhibiting occupancies > 20% of the simulation are included in the Figure (see details about each occupancy in Table S3).

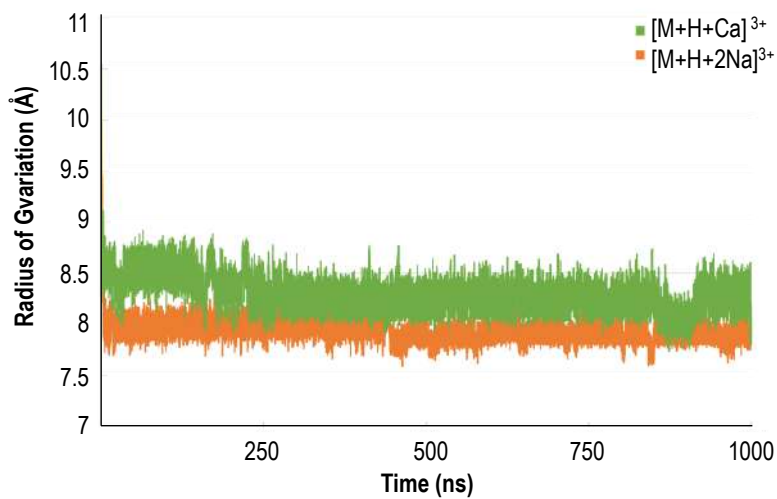


Figure S3. Radius variation of the $[M+H+Ca]^{3+}$ and $[M+H+2Na]^{3+}$ ions during the conformational simulation (example of the OVTX-b structure).

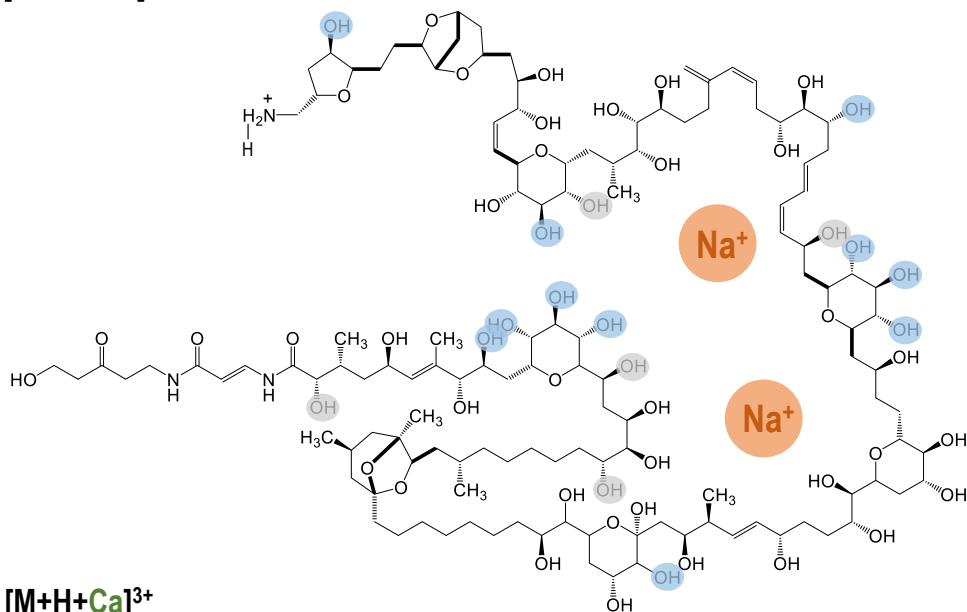
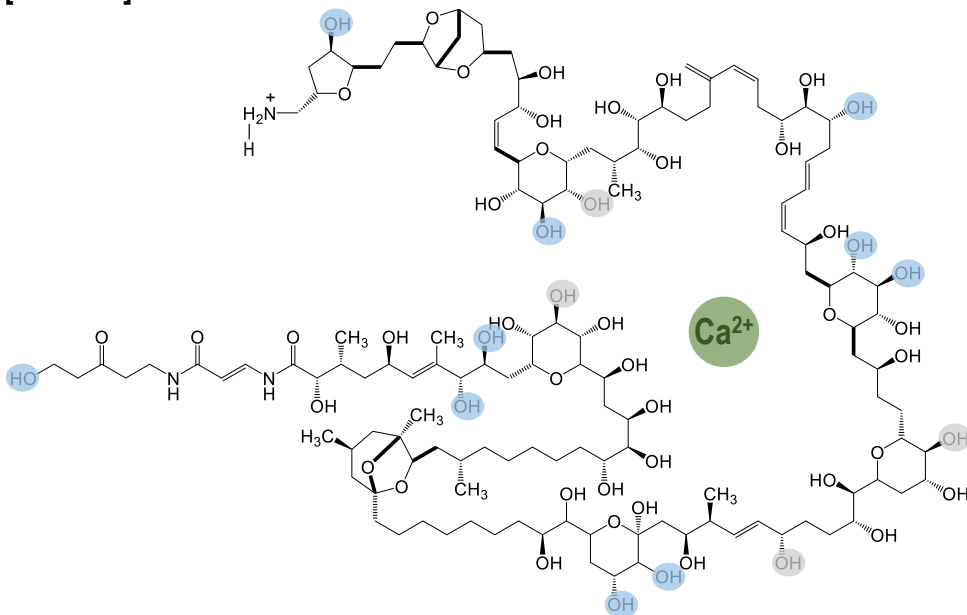
a. $[M+H+2Na]^{3+}$ b. $[M+H+Ca]^{3+}$ 

Figure S4. Hydroxyls groups in the inner (grey) and outer (blue) part of the clustered structures of the $[M+H+2Na]^{3+}$ and $[M+H+Ca]^{3+}$ ions (example of the OVTX-b structure).

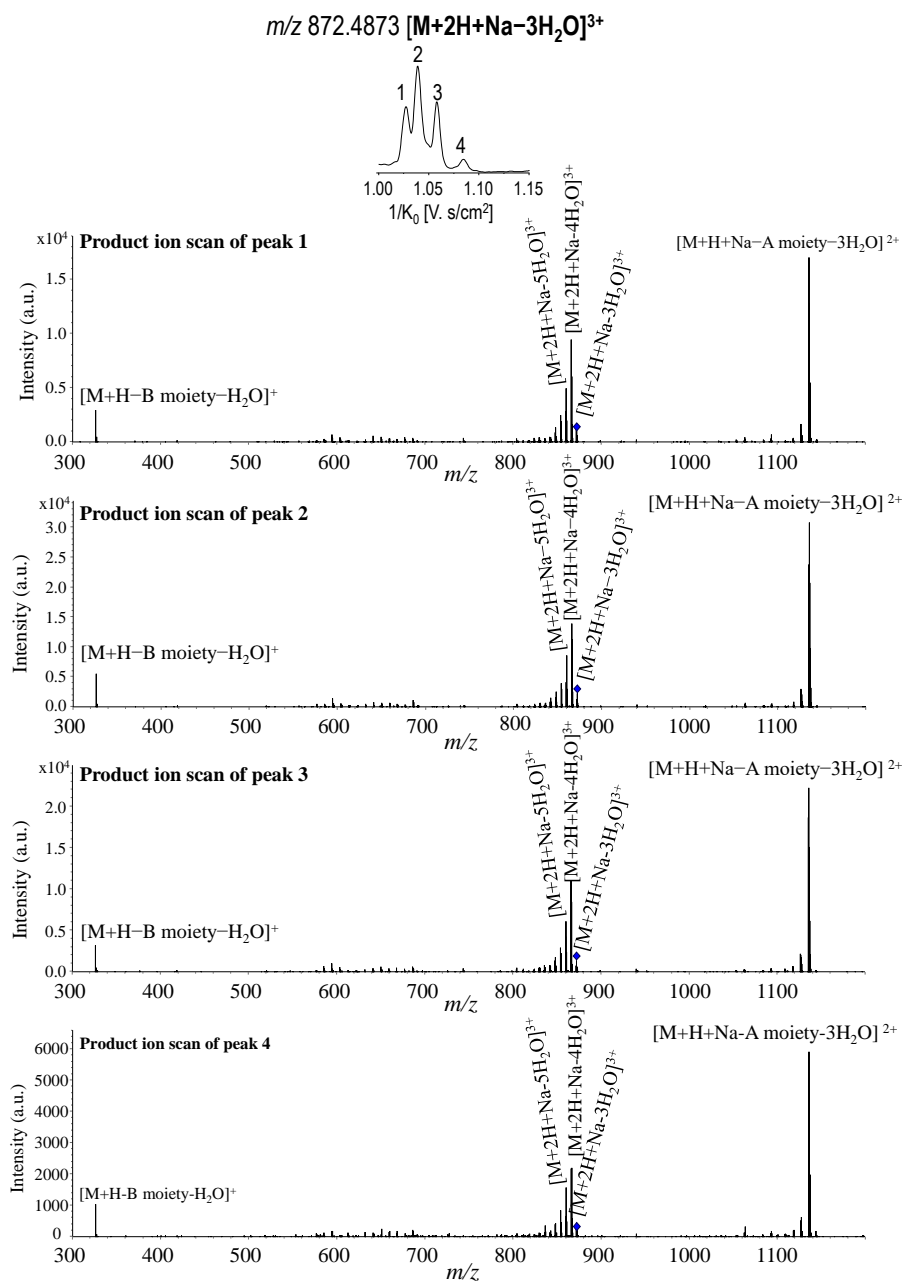


Figure S5. Fragmentation of the $[M+2H+Na-3H_2O]^{3+}$ (blue diamond) at CE 35 V for the different ion mobility peaks observed for the OVTX-a using TIMS.

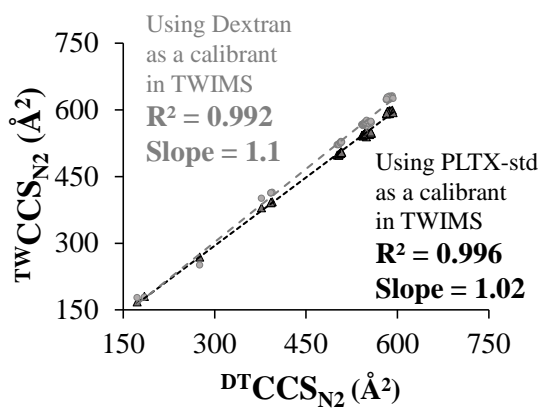


Figure S6. Correlation between CCS values measured in traveling wave or in the drift tube instrument and using Dextran or PLTX standard as a calibrants.

2.3. Discusión

La discusión de los resultados del trabajo experimental (Artículos #1 y #2) incluidos en la Sección 2.2 se centra en 5 grandes temas: I) toma y tratamiento de las muestras (sección 2.3.1), II) métodos de ionización (sección 2.3.2), III) análisis cuantitativo por UHPLC-HRMS (sección 2.3.3), IV) movilidad iónica (sección 2.3.4) y, V) defecto de masa de Kendrick (sección 2.3.5).

2.3.1. Toma y tratamiento de las muestras

El seguimiento de la presencia, abundancia y la producción de toxinas de la especie *Ostreopsis cf. ovata* es importante para comprender sus impactos ecológicos y biológicos en la salud humana, la salud de los ecosistemas y la economía, y para identificar los impactos potenciales del cambio climático en los ecosistemas marinos. Además de los impactos en la salud, las proliferaciones de *Ostreopsis* también pueden tener impactos en los servicios ecosistémicos, concretamente, los relacionados con el turismo o la pesca, ya que la presencia de proliferaciones de algas nocivas puede provocar el cierre de playas y restricciones en la pesca, lo que puede tener importantes consecuencias económicas para los residentes o trabajadores en la localidad afectada. Por ello, a lo largo de esta Tesis ha sido de gran importancia el seguimiento de las proliferaciones observadas a lo largo de los años 2018–2021 en una zona rocosa de Sant Andreu de Llavaneres (Figura 2.11). Durante este periodo de tiempo se han llevado a cabo muestreos regulares con el fin de realizar el seguimiento de la presencia de los análogos de la PLTX en el agua de mar y en los aerosoles. La zona afectada y donde se han llevado a cabo los muestreos está cerca del restaurante Pins Mar (PM) y de los apartamentos Blau Mar (BM). Los habitantes/visitantes de estas localizaciones se han visto afectados de alguna manera u otra durante las proliferaciones de la microalga *O. cf. ovata* (sección 1.4). La zona PM es una zona muy abierta y poco profunda, y con un oleaje moderado dependiendo de las condiciones meteorológicas. Sin embargo, la zona BM es una zona ligeramente más profunda y con un oleaje constante e intenso, lo que dificultó el muestreo. Normalmente, se recolectaron muestras en 3 puntos diferentes de la zona PM, separados aproximadamente 10 metros entre sí (PMA, PMB, PMC). No obstante, los resultados obtenidos (Artículo #1), indicaron que, las abundancias celulares de *O. cf. ovata* a lo largo de las proliferaciones de 2019, eran muy similares en estos puntos. Por ello, en el muestreo de experimentos posteriores (2020/2021) se recolectaron muestras de manera aleatoria por toda la zona de muestreo, las cuales se combinaron en una única muestra combinada (PMABC) para llevar a cabo los análisis posteriores (resultados en el Artículo #1).

La Figura 2.12 muestra imágenes de la zona de muestreo, y del proceso de medición de parámetros como la temperatura y la salinidad del agua (parámetros de seguimiento adicionales).



Figura 2.11. Ubicación de las zonas de muestreo durante las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata* en Llanerres. Fuente: Google Maps (<https://www.google.com/maps/@41.5529636,2.4925767,281m/data=!3m1!1e3>).



Figura 2.12. Imágenes de la zona de muestreo y del proceso de medición de temperatura y salinidad durante las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata*.

El sustrato sedimentario, que se extiende desde la línea de costa hasta al menos 5–7 m hacia el mar, está densamente colonizado por una alfombra de macroalgas (Figura 2.13), principalmente *Jania* spp., *Padina pavonica*, *Ellisolandia elongata*, *Dictyota dichotoma* y *Halopteris scoparia* (Figura 2.14). *Ostreopsis* cf. *ovata* (microalga) prolifera preferentemente adherida a estas macroalgas en el fondo del mar (células bentónicas) (Figura 2.13d) durante los meses de julio a octubre, y durante al menos 2 de estos meses lo hace a una elevada abundancia celular ($<10^6$ cells gPF⁻¹, células de *Ostreopsis* por gramos de peso fresco de macroalga). También se puede encontrar *Ostreopsis* en la columna de agua (células planctónicas) (Figura 2.13c) o en forma de agregados en la superficie del mar (Figura 2.13b). Por lo que respecta a las toxinas producidas por *Ostreopsis*, éstas pueden encontrarse tanto en el interior de las células (intracelular), como parte del mucílago (“moco”) que forman o incluso pueden encontrarse disueltas en el medio extracelular [56,84,87,242]. Teniendo en cuenta los estudios publicados hasta el momento, y que indican que solo el 5–26% de las toxinas podrían ser excretadas al medio extracelular [56,75,87], en esta Tesis nos hemos centrado en el muestreo de las células bentónicas y planctónicas para llevar a cabo la identificación de las toxinas intracelulares tanto durante las proliferaciones de *O. cf. ovata*, como en los cultivos en el laboratorio (Capítulo 2 y 3), así como en el estudio de aerosoles (Capítulo 4).

En primer lugar, para poder realizar el seguimiento de la comunidad bentónica es importante obtener las muestras de macroalgas donde las células de *O. cf. ovata* se encuentran adheridas. Concretamente, para este estudio se recolectó una mezcla de las macroalgas más abundantes en la zona de muestreo (entre unos 10–20 g). Estas macroalgas se depositaron en una botella de plástico con una cantidad conocida (200–300 mL) de agua de mar y se transportaron al laboratorio para su procesamiento (Figura 2.15). Antes del análisis fue necesario agitar cuidadosamente cada muestra durante 1 minuto con el fin de desenganchar las células de *O. cf. ovata* bentónicas de las macroalgas. A continuación, las muestras se filtraron utilizando una malla de 200 µm para separar las macroalgas de la fracción de agua con las células bentónicas de *O. cf. ovata* desprendidas. Seguidamente, se pesó la macroalga para obtener el dato de peso fresco (gPF), ya que la abundancia celular durante el seguimiento se expresa en células de *Ostreopsis* por gPF de macroalga (cél. gPF⁻¹). Por otro lado, una alícuota del agua filtrada (125 mL), que contenía las células bentónicas de *O. cf. ovata* y la microbiota que lo acompaña, se fijó con Lugol para el posterior recuento celular con un microscopio invertido (Leica DMi1) utilizando el método Sedgewick-Rafter o utilizando columnas de sedimentación. El Lugol es una disolución de yodo molecular (I₂) y yoduro potásico (KI) en agua destilada que reacciona con las células del dinoflagelado para causar la lisis celular (muerte) y hacerlas visibles al microscopio. La placa Sedgewick-Rafter utilizada fue de 1 mL con 1000 posiciones

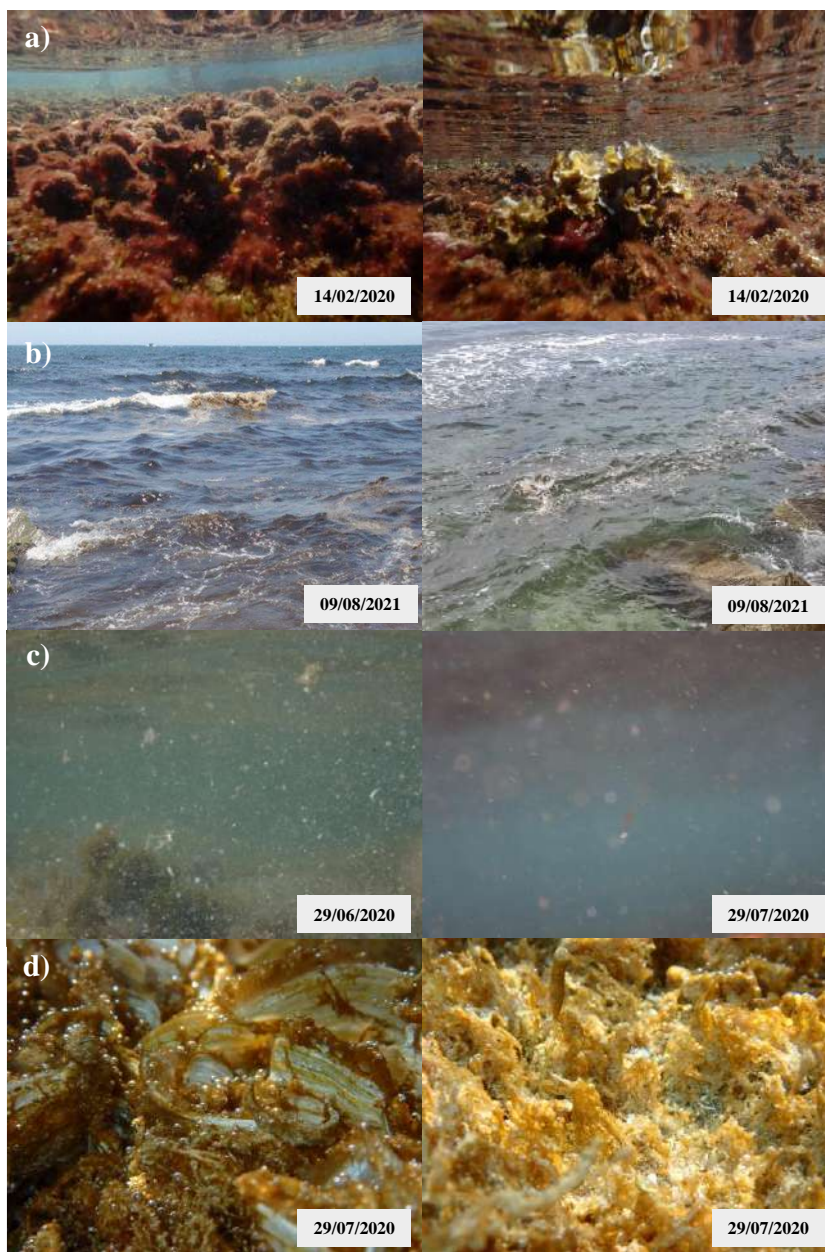


Figura 2.13. Imágenes durante la proliferación de *O. cf. ovata* en la playa de Sant Andreu de Llavaneres, Barcelona, Catalunya. **a)** Alfombra de macroalgas; **b)** agregados de células de *O. cf. ovata* en la superficie, **c)** columna de agua donde se pueden encontrar células de *O. cf. ovata* planctónicas; **d)** *O. cf. ovata* (células bentónicas), adherido a las macroalgas mediante el mucílago que secreta.

de 1 μL cada una. En los casos en los cuales la concentración de células no fue lo suficientemente elevada para aplicar este método de recuento, se recurrió al método de las columnas de sedimentación, siguiendo el procedimiento descrito por Guillard y Sieracki (2005) [243] y utilizando el mismo tipo de microscopio invertido Leica DMi1 para el recuento celular.

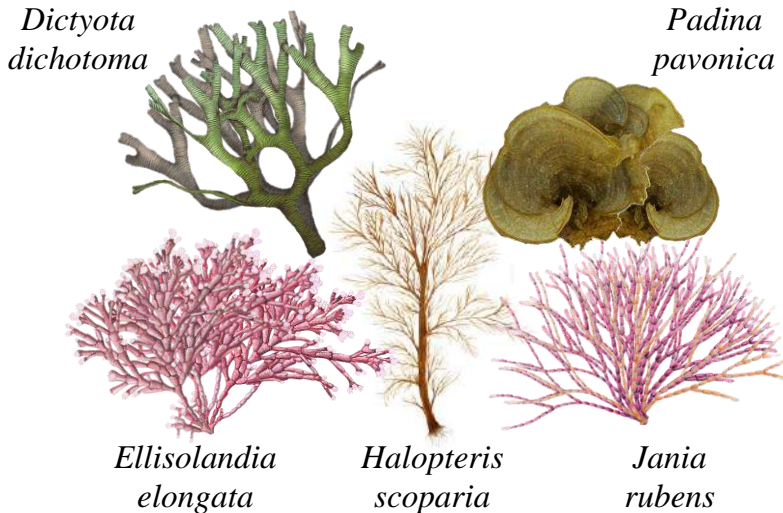


Figura 2.14. Ilustración de las principales macroalgas a las que se adhiere el dinoflagelado *O. cf. ovata* en St. Andreu de Llavaneres.

Otra alícuota del filtrado anterior se pasó a través de filtros de fibra de vidrio (GF/F) de 0,7 μm para retener las células de *Ostreopsis* (tamaño entre 20–60 μm) y extraer posteriormente las toxinas celulares utilizando una mezcla MeOH:H₂O (80:20, v/v) como disolvente de extracción (detalles del protocolo de extracción en la Figura 2.15 o Artículos #1/3/4/5). Este extracto es el que posteriormente se analizó por UHPLC-HRMS.

En segundo lugar, en esta Tesis también se ha realizado el muestreo de la comunidad planctónica de *O. cf. ovata*. Este procedimiento es más simple, una fracción del agua de mar recolectada se fija con Lugol para estimar la cantidad de células y otra alícuota de esta agua se filtra a través de un filtro GF/F para llevar a cabo la extracción de toxinas, de la misma manera que se realizó para la comunidad bentónica (Figura 2.15).

Simultáneamente a la recolección de muestras durante cada una de las proliferaciones de *Ostreopsis*, también se llevó a cabo la medida de la temperatura y la salinidad del agua de mar en el momento del muestreo (Figura 2.12). Además,

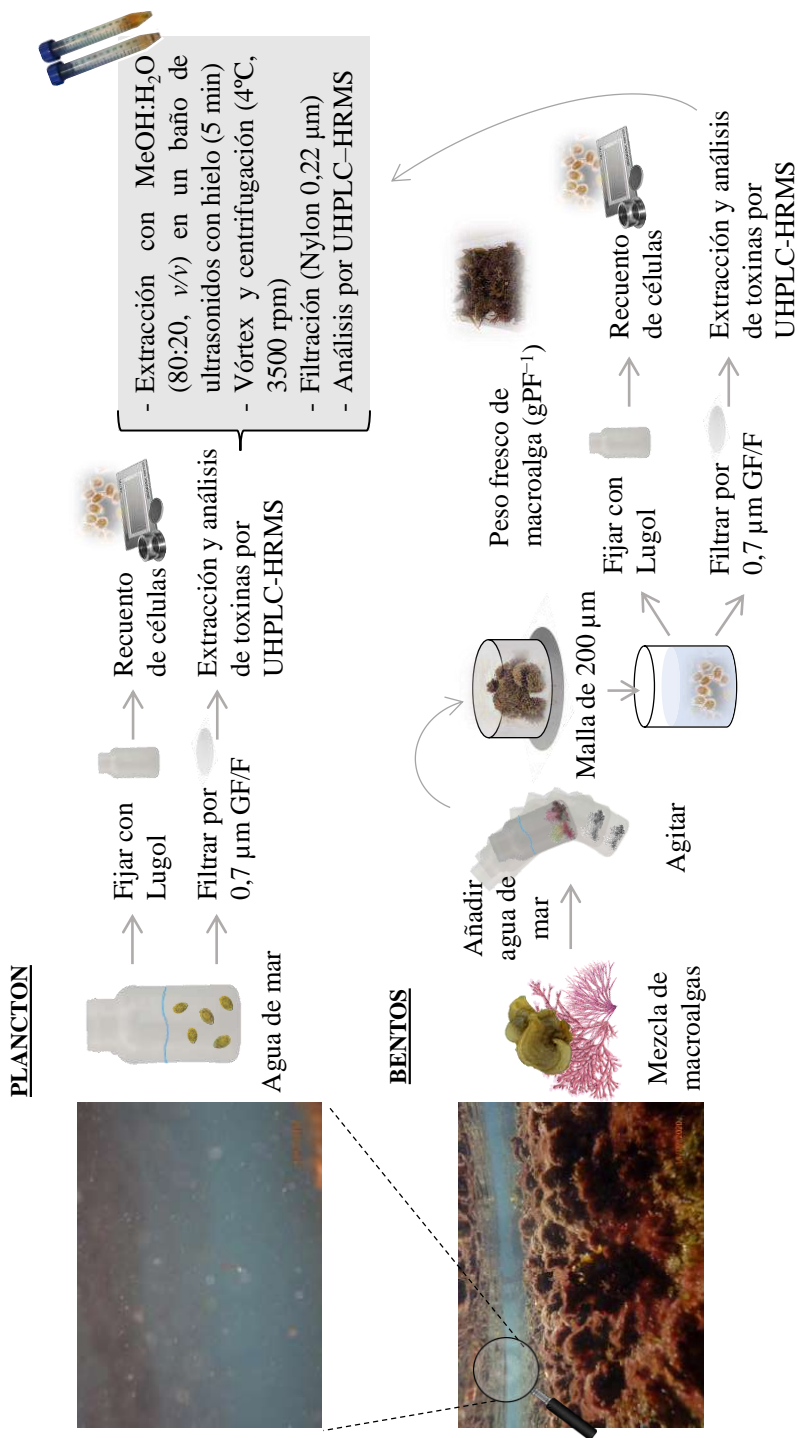


Figura 2.15. Esquema de la toma de muestra y del tratamiento de la muestra para el estudio de las comunidades bentónica y planctónica.

también se recolectaron muestras de agua de mar en tubos de policarbonato que se congelaron a -20°C para analizar posteriormente los nutrientes inorgánicos (nitrato, nitrito, amonio, fosfato y silicato) y orgánicos (nitrógeno y fósforo total) del medio.

Por otro lado, también se ha trabajado con cultivos en el laboratorio de *O. cf. ovata* (Capítulo 3) y de los cuales se tomaron también muestras para evaluar su crecimiento y toxicidad. Para este estudio fue necesario realizar el aislamiento de células de *O. cf. ovata* (obtenidas de la zona de muestreo) por el método de pipeteo capilar [244,245] y así poder obtener un cultivo puro, evitando la presencia de otros dinoflagelados o parte del fitoplancton. Estas células se hicieron crecer en microplacas y se mantuvieron posteriormente en frascos estériles de propileno (50–250 mL) para cultivos. Se hicieron crecer en un medio f/2 sin silicato [246], que simula el agua de mar natural con sus respectivos nutrientes (ver detalles en el Artículo #3), y bajo irradiación de luz durante 12h, seguidas de 12h más de oscuridad. La toma de muestra, para la evaluación del crecimiento y el análisis de las toxinas en estos cultivos, siguió un procedimiento similar al de la toma de muestra de la comunidad planctónica, ya que las células de *O. cf. ovata* se encontraban inmersas en el agua del cultivo (Figura 2.16).

CULTIVOS



Figura 2.16. Esquema de la toma de muestra de los experimentos con cultivos de *O. cf. ovata* (experimental y resultados en el Capítulo 3).

Por último, en la Tesis también se han realizado estudios de aerosolización de las toxinas (Capítulo 4). Estos estudios se llevaron a cabo en un tanque cilíndrico metálico (capacidad de 75 L) que se llenaba con agua de mar (55–60 L, previamente recogida en bidones de 20–40 L) y en el que se inyectaba aire durante un tiempo determinado (según el experimento a realizar). De esta manera se generaban aerosoles que posteriormente se recogían en un impactor ubicado en la parte superior del tanque/cámara de incubación. Este impactor contenía un filtro de membrana de cuarzo (47 mm, Whatman QM-A) y estaba conectado a una bomba de succión de aire ($38,3 \text{ L min}^{-1}$) para ayudar a la recolección de los aerosoles en dicho filtro. Para estimar la abundancia de células de *O. cf. ovata* en el interior del tanque y la concentración de toxinas intracelular, se utilizaba el método ya descrito para la

comunidad planctónica, tal y como se indica en la Figura 2.17. Además, las toxinas aerosolizadas y recolectadas en los filtros de cuarzo también se extraían utilizando el mismo procedimiento comentado anteriormente y detallado en la Figura 2.15.

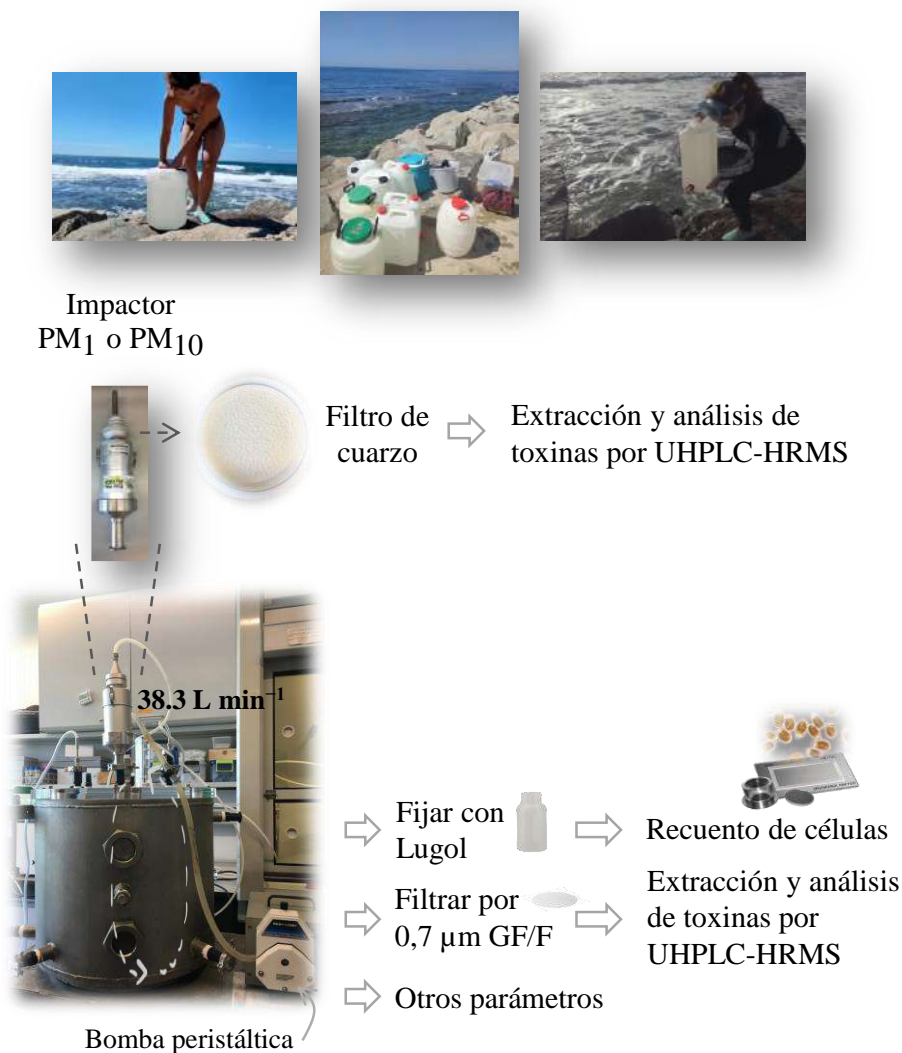


Figura 2.17. Esquema de la toma de muestra en los experimentos de aerosolización realizados (experimental y resultados en el Capítulo 4).

Como se ha comentado, todos los muestreos y pretratamiento de las muestras, terminan en la retención de las células en un filtro (de GF/F o de cuarzo) que posteriormente se somete a una extracción líquido-sólido para extraer-disolver las toxinas en el disolvente de extracción. Dicho extracto es el que a continuación se inyecta en el sistema UHPLC-HRMS para la detección y análisis cuantitativo de las

toxinas extraídas (sección 2.3.3). En los métodos que hay publicados hasta el momento, tanto las proporciones de disolvente orgánico, como el número de extracciones, varía de método a método y no parece que haya un protocolo armonizado y uniforme consensuado (Tabla 2.1). En esta Tesis se han evaluado diferentes procedimientos con el objetivo de optimizar la extracción de las toxinas a partir de las muestras de macroalgas (Artículo #1, sección 2.2). A la vista de los resultados obtenidos, se ha visto que era posible simplificar los procedimientos hasta ahora descritos, y que utilizaban más de una extracción. Así, se ha confirmado que una única y simple extracción utilizando MeOH:H₂O (80:20, v/v) como disolvente es suficiente para una extracción eficaz de las toxinas desde las células de *Ostreopsis*. Este simple procedimiento ha permitido obtener valores de recuperaciones del orden del 95–116% y un efecto matriz de tan solo –14–2%. Este método de extracción (detalles de las etapas en la Figura 2.15) es el que se ha utilizado en la extracción de las toxinas en los diferentes experimentos llevados a cabo durante el estudio de las proliferaciones de los años 2018–2021 (resultados en el Capítulo 3).

2.3.2. Técnicas de ionización

No existe un patrón comercial para cada una de las OVTXs. El único patrón comercial que existe es el de la PLTX (PLTX_{std}), comercializado por *Wako Chemicals*. Dicho patrón lo obtienen a través de un proceso en varias etapas en las que se extrae/purifica la PLTX a partir del coral *Palythoa tuberculosa*. Así, la optimización de las condiciones de ionización y el estudio del comportamiento con las diferentes fuentes de ionización se han llevado a cabo primero con la PLTX_{std} y posteriormente, las condiciones óptimas se han aplicado al estudio de las diferentes OVTXs detectadas en las muestras de *O. cf. ovata*.

Electrospray (ESI)

Los espectros de masas obtenidos con la técnica de ionización con ESI para cada uno de los análogos de la PLTX son complejos. La Figura 2.18 muestra el espectro de masas obtenido para la PLTX_{std} y en el cual se ha ampliado la escala del eje *m/z* para proporcionar una mayor definición del espectro de ESI. Tal y como se puede observar, se trata de un espectro de masas con un elevado número de iones múltiplemente cargados y entre los que se incluyen iones aductos con sodio, calcio, potasio, magnesio o hierro, así como iones generados a partir de las múltiples pérdidas de agua que experimentan las moléculas protonadas por fragmentación en la fuente de ESI (Figura 2.18). Además, también se observan algunas otras pequeñas fragmentaciones en la fuente como, por ejemplo, la generación de iones fragmento producidos por la pérdida de la Parte A de la estructura de la PLTX_{std} y sus consecutivas pérdidas de agua que dan lugar a los iones $[M+2H-\text{Parte A}-nH_2O]^{2+}$, donde *n* es el número de moléculas de aguas que se pierden (*n*=1–7). En la Figura

2.18 se indican los iones doble y triplemente cargados generados en ESI para la PLTX_{std}, y como se puede observar, los iones más abundantes son $[M+2H-H_2O]^{2+}$ y $[M+3H-H_2O]^{3+}$, comportamiento que también se observa en el perfil de iones observado para las OVTXs detectadas en las muestras. En la Figura 2.19 se han superpuestos los espectros de masas de las dos toxinas más abundantes (OVTX-a y -b) producidas por *O. cf. ovata* (extracto de una muestra natural durante la proliferación) con el espectro de ESI observado de la PLTX_{std}.

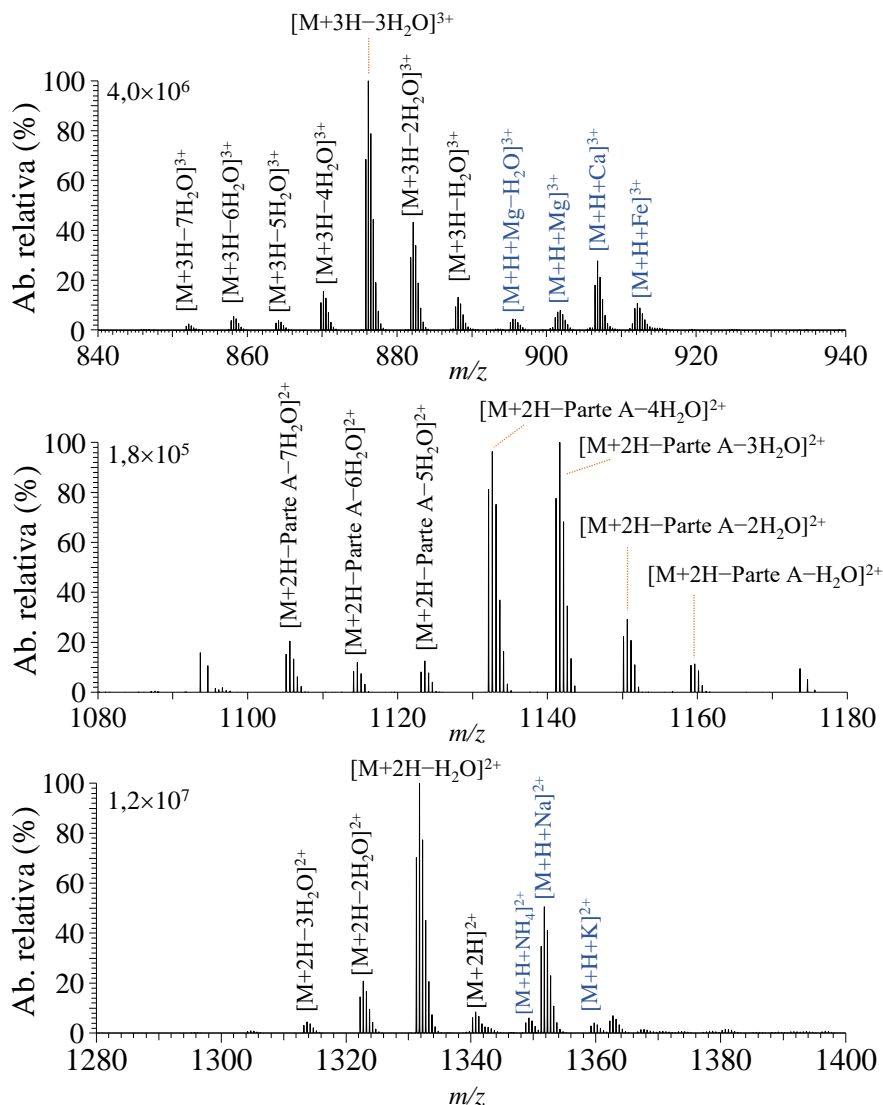


Figura 2.18. Espectro de masas obtenido durante el análisis UHPLC-HESI-HRMS de la PLTX_{std} (5 mg L^{-1}). El espectro de masas está segmentado en diferentes intervalos de m/z (espectro superior m/z 840–940, medio m/z 1080–1180, inferior m/z 1280–1400).

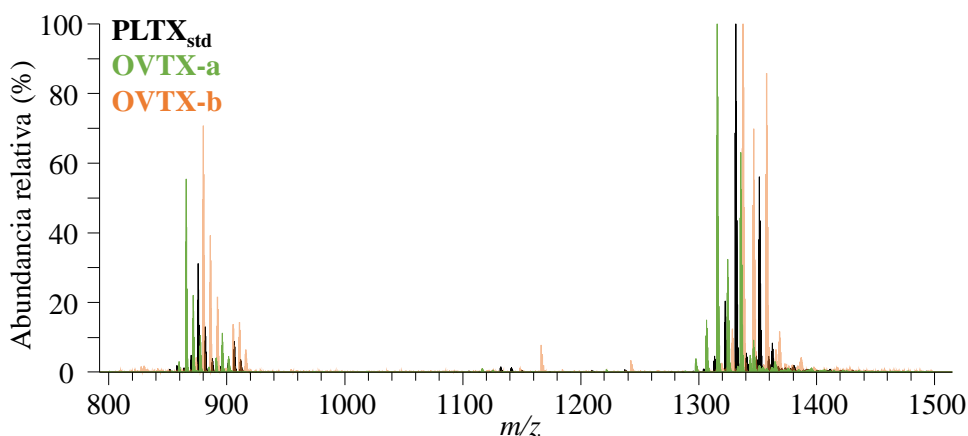


Figura 2.19. Solapamiento de los espectros de masas obtenidos en el análisis UHPLC-HESI-HRMS de un extracto de una muestra (rango m/z 800–1500): $PLTX_{std}$ (1 mg L^{-1}) (negro), OVTX-a (verde) y OVTX-b (naranja).

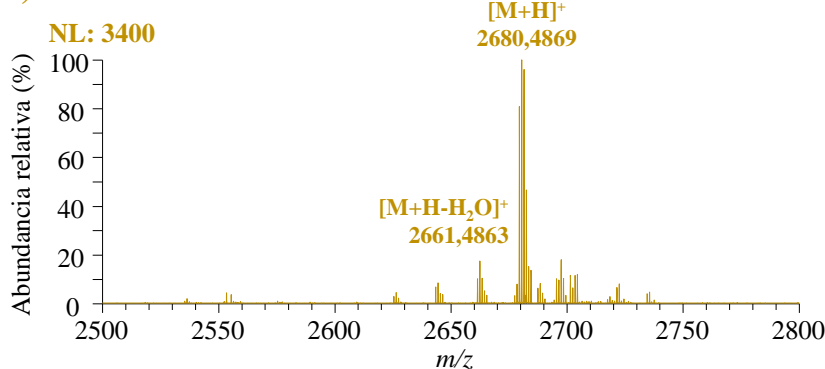
Ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI)

Debido al complejo espectro obtenido en ESI y a la ausencia de los iones monocargados de la $PLTX_{std}$ $[M+H]^+$, en esta Tesis se quiso evaluar la aplicabilidad de otras técnicas de ionización como el APCI o APPI para el análisis de los homólogos de la PLTX, ya que hasta ahora no se ha publicado ningún resultado positivo o negativo sobre la aplicación de estas fuentes de ionización en fase gas a este tipo de analitos. Estas dos técnicas basan su ionización en procesos de interacciones ion-molécula en fase gas y para ello requieren de la evaporación del eluyente cromatográfico para conseguir que las moléculas de interés pasen a la fase gas y dónde la aplicación de una descarga mediante un electrodo corona, en APCI, o la interacción de fotones emitidos por una lámpara de Kriptón, en el caso de APPI, inician una cascada de interacciones ion-molécula que terminan protonando las especies neutras de los analitos en fase gas.

En esta Tesis se han optimizado los parámetros de operación de la fuente de APCI en modo positivo y los valores óptimos fueron los siguientes: caudales del gas envolvente, 80 u.a. (unidades arbitrarias), y del gas auxiliar, 35 u.a.; voltaje del electrodo corona 5 V; temperatura del vaporizador 350°C . Bajo estas condiciones de trabajo se estudió el comportamiento de la $PLTX_{std}$ y únicamente se observó el ion monocargado $[M+H]^+$ a niveles de concentración de 40 mg L^{-1} , pero sólo a abundancias relativamente bajas. La Figura 2.20a muestra por primera vez el espectro de APCI obtenido para la $PLTX_{std}$. Así, a pesar de que el APCI, a través de una ionización suave en la fase gas, ha favorecido la generación del ión monocargado de

la PLTX_{std}, ha evitado la formación de los aductos y ha proporcionado un espectro más sencillo, la eficacia de esta ionización ha resultado ser muy inferior a la del ESI, dando lugar a un límite de detección mucho más elevado. Posiblemente, el peso molecular elevado de estas sustancias (2630–2707 Da), así como el elevado número de grupos hidroxilo, sean algunos de los factores que pueden haber afectado negativamente a la eficacia de este tipo de ionización en fase gas, la cual requiere de una primera etapa de volatilización de las sustancias desde la fase móvil.

a) APCI



b) APPI

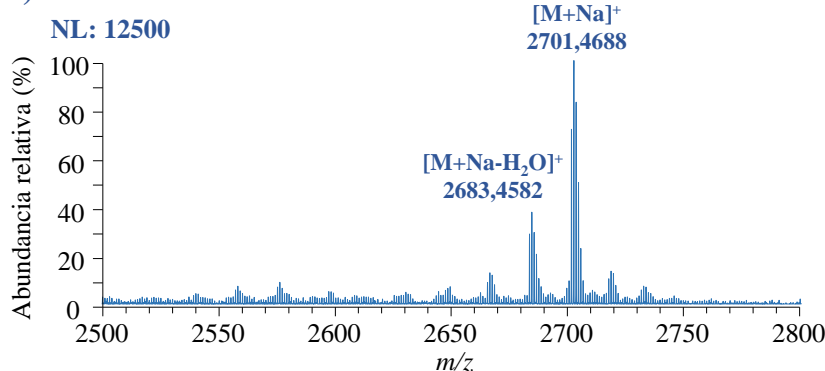


Figura 2.20. Espectro de masas obtenido durante el análisis por a) UHPLC-APCI-HRMS y b) UHPLC-APPI-HRMS de la PLTX_{std} (40 mg L⁻¹).

Por otro lado, también se optimizaron las condiciones de trabajo en APPI. Los valores óptimos de esta fuente de ionización fueron los siguientes: caudales del gas envolvente, 70 u.a. (unidades arbitrarias), y del gas auxiliar, 35 u.a.; temperatura del vaporizador 350°C. La Figura 2.20b muestra por primera vez el espectro de APPI obtenido para la PLTX_{std}, donde se observa el ion monocargado $[M+Na]^+$ a niveles de concentración superiores a 40 mg L⁻¹ y su respectiva pérdida de agua. Por lo general, la formación de aductos está más favorecida en la fuente ESI donde la

ionización tiene lugar en la fase líquida, que no en APCI o APPI, donde no es posible la formación de aductos metálicos en fase gaseosa. Sin embargo, el aducto con sodio observado podría deberse a la formación previa de este aducto en la fase líquida, posiblemente un complejo de coordinación. A pesar de ello, la ionización directa por interacción de los fotones con los analitos no fue tampoco suficiente para conseguir una ionización eficaz a dichos niveles de concentración (Figura 2.20b), indicando que el potencial de ionización de estas sustancias podría ser superior al de la energía de los fotones emitidos (10 eV) o que la presencia de otras especies iónicas/neutras en la fase gas pudieran estar interfiriendo en el mecanismo de fotoionización directa. Por otro lado, también se probó la adición de un agente dopante, técnica muy utilizada para favorecer la ionización de analitos en fase gas a través de las interacciones de éstos con las especies generadas por la fotoionización del agente dopante. El agente dopante, se introdujo en el eluyente cromatográfico en un proceso de adición postcolumna antes del proceso de ionización. De esta manera, se facilitaba que el analito y el agente dopante pudieran llegar juntos a la fuente de fotoionización donde los fotones (10 eV) generados por la lámpara de Kriptón interaccionan con el agente dopante. Se probaron diferentes agentes dopantes (anisol, acetona, tolueno, clorobenceno y tetrahidrofurfano), pero con ninguno de ellos se consiguió observar una señal satisfactoria en el espectro de masas de APPI.

Los resultados de la evaluación de las técnicas de ionización APCI y APPI indican que ambas técnicas no resultan ser una buena alternativa al ESI para la detección/determinación de los análogos de la PLTX a niveles de concentración relativamente bajos y, por lo tanto, se descartaron para los estudios de muestras en esta Tesis.

MALDI

Debido al elevado número de muestras que es necesario analizar durante la monitorización de las proliferaciones, muchas de ellas negativas (principio y final de las proliferaciones), se planteó el uso de la técnica MALDI-TOF como herramienta de cribado para la detección de las muestras positivas y así poder mejorar la productividad del laboratorio reduciendo el número de muestras (sólo positivas) a analizar por UHPLC-HESI-HRMS. En este contexto, en esta Tesis se llevaron a cabo algunos experimentos para estudiar la ionización de los análogos de la PLTX con MALDI-TOF. Para ello se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonik) y como técnica de preparación de las muestras se mezcló 1 μL de la PLTX_{std} (25 mg L⁻¹) o del extracto de toxinas (con una concentración aproximada de OVTX-a de 2 mg L⁻¹) con 0.5 μL de una matriz (Tabla 2.3) en la placa de análisis (AnchorChipTM, Bruker) y se dejó secar a temperatura ambiente. Por otro lado, se probó a mezclar previamente en un Eppendorf la matriz seleccionada con la PLTX_{std}

o el extracto de toxinas y luego añadir 1 μL de la mezcla en la placa MALDI para su análisis. La Tabla 2.3 muestra las matrices que se evaluaron a diferentes concentraciones y utilizando diferentes disolventes.

Tabla 2.3. Matrices (concentración y disolvente) evaluadas en el análisis de las toxinas por MALDI-TOF.

Matriz	Concentración	Disolvente
Ácido 2,5-dihydroxibenzoico (DHB)	10 y 20 mg mL^{-1}	Acetonitrilo / 0,1% Trifluoroacético (30:70, v/v)
Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA)	3 mg mL^{-1}	Etanol/acetona (1:1, v/v)
Ácido 4-cloro- α -cianocinámico / Ácido α -ciano-2,4-difluorocinámico (CICCA/DiFCCA)	10 mg mL^{-1} 30 mg mL^{-1}	Acetonitrilo / 0,1% Trifluoroacético (30:70, v/v) Acetonitrilo

La matriz que proporcionó una mejor señal MALDI-TOF para la PLTX_{std} fue el DHB a una concentración de 10 mg mL^{-1} (mezclando previamente matriz y muestra en un Eppendorf). La Figura 2.21 muestra los espectros MALDI-TOF obtenidos para la PLTX_{std} y para el extracto de toxinas en el que se observa la OVTX-a (toxina en mayor abundancia en las muestras). Los iones que se detectaron para la PLTX_{std} fueron $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$, mientras que para la OVTX-a se observaron los iones $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}+\text{K}]^+$. Hay que indicar que la intensidad de las señales observadas para las toxinas (PLTX_{std} y OVTX-a) fueron relativamente bajas. A pesar de que fue posible la detección de la OVTX-a en alguna de las muestras, éstas coincidían con las recolectadas durante el período de proliferación máxima y, por lo tanto, eran las que contenían las toxinas en concentraciones más elevadas.

Con el objetivo de aumentar la intensidad de señal observada, y así poder disminuir (mejorar) los límites de detección, se exploró la posibilidad de llevar a cabo algunos lavados de los *spots* de la placa MALDI después de depositar las mezclas matriz-muestra y proceder a su secado. Estos lavados se llevaron a cabo con 1 μL de $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM para conseguir eliminar las sales, sin embargo no se observaron diferencias significativas con los replicados analizados en ausencia de estos lavados. Tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios al preconcentrar el extracto de OVTXs $\times 50$ (utilizando un SpeedVac) antes del análisis con MALDI-TOF, incluso tampoco con etapas de lavados de los *spots* (muestras).

Por otro lado, el análisis de replicados (5–15) de patrones y de muestras positivas de toxinas mostró una gran variabilidad de la intensidad de señal, llegando en algunos casos a no detectarse señal en muestras positivas (por debajo del límite de detección). La baja señal (límites de detección relativamente elevados) y la gran

variabilidad en la intensidad de las señales hizo que se desestimara esta técnica para el análisis de toxinas durante la monitorización de las proliferaciones, ya que podría llevar a la obtención de falsos negativos.

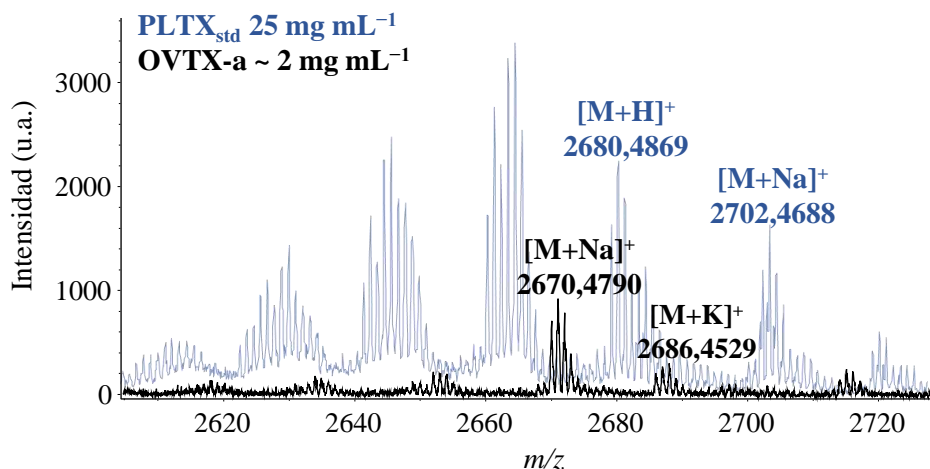


Figura 2.21. Espectros de masas obtenidos en el análisis por MALDI-TOF de la PLTX_{std} (25 mg L⁻¹, azul), y de un extracto de una muestra recolectada durante la proliferación de 2020 (negro).

2.3.3. Análisis cuantitativos por UHPLC-HRMS

La determinación (identificación/cuantificación) de las toxinas en agua de mar durante las proliferaciones de *Ostreopsis*, en los experimentos con cultivos, así como en los estudios de aerosolización, se ha realizado empleando la técnica de UHPLC-ESI-HRMS. Como se observó en la Figura 2.19, algunos de los clústeres isotópicos de los iones que generan las diferentes toxinas podrían solaparse. En este punto el uso del UHPLC ayuda a la separación cromatográfica y permite resolver alguno de estos problemas, pero es la combinación del UHPLC con la alta resolución (HRMS) lo que realmente hace posible la determinación-cuantificación de estas toxinas evitando la mayoría de las interferencias que podrían producir los iones de algunos análogos sobre los de otros. Además, la alta resolución (HRMS) ha sido necesaria para poder asignar/diferenciar los iones observados con un m/z similar (isobáricos) para una misma toxina (comentado en la sección 2.1.2, Figura 2.5).

Como ya se ha comentado en la introducción de este Capítulo 2, los métodos analíticos publicados hasta el momento llevan a cabo la determinación de estas toxinas utilizando únicamente dos de los iones más abundantes observados en el espectro de masas de los análogos de la PLTX. No obstante, durante esta Tesis se han venido observando diferencias significativas en las intensidades de los diferentes iones producidos por una misma disolución de PLTX_{std}. Estas variaciones se

producían entre días, en función de las condiciones de mantenimiento del equipo, o del tipo/generación de la fuente de ionización utilizada. Por ello, se estimó llevar a cabo un estudio más detallado (Artículo #1) utilizando dos sistemas diferentes de espectrometría de masas. El primer sistema (Sistema I) estaba equipado con un espectrómetro de masas Q-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) ubicado en el laboratorio del grupo de investigación ChroMS-EnviFood y únicamente a disposición de los proyectos del grupo. El segundo sistema (Sistema II) se trataba de un instrumento LIT-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) instalado en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB) y el cual está a disposición de la comunidad universitaria utilizándose en muchos y variados proyectos que comportan condiciones de trabajo muy diferentes y muestras de muy diferente naturaleza. Además, se utilizaron diferentes fuentes de ESI en estos sistemas. Los espectros de la PLTX_{std} se obtuvieron con el Sistema I utilizando una fuente de ESI de segunda generación que permitía trabajar con asistencia térmica (Método 1) o sin ella (temperatura ambiente) (Método 2). En cambio, en el Sistema II se utilizó una fuente de ESI de primera generación que no disponía de asistencia térmica y sólo permitía trabajar a temperatura ambiente en la fuente de ESI (Método 3). Tal y como se comenta en el Artículo #1, los diferentes métodos proporcionaron espectros de masas con diferencias significativas entre ellos, ya que las abundancias de los iones generados para la PLTX_{std} variaban según el método utilizado o según las condiciones instrumentales. Cabe remarcar que la intensidad de los iones variaba bastante según las condiciones instrumentales utilizando el Sistema II, que como se acaba de comentar estaba a disposición de un número muy amplio de investigadores y proyectos, mientras que el Sistema I se utilizaba siempre bajo unas condiciones de trabajo mucho más homogéneas y controladas por el propio grupo de investigación.

Se llevaron a cabo inyecciones de patrones (PLTX_{std}) y de muestras de manera similar en ambos sistemas, con las diferentes fuentes de ESI y utilizando las mismas condiciones cromatográficas. Para la determinación cuantitativa de las toxinas se utilizaron dos métodos, el método QM-A donde sólo se seleccionaron dos de los iones más abundantes, y el método QM-B en el que se seleccionaron hasta 13 iones diferentes para cada toxina y usando para la cuantificación la señal integrada de las abundancias de todos estos iones. La valoración de los resultados (Tabla S3-Artículo #1) indicó que el método QM-A proporcionaba resultados menos comparables (p -valor $< 0,05$, resultados significativamente diferente entre los Métodos 1–3). Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando el método QM-B eran más similares y comparables. Ello era debido a que al variar las condiciones instrumentales o de mantenimiento de los instrumentos, variaban las abundancias de los iones seleccionados para la determinación cuantitativa, lo que repercutía negativamente en los resultados del método QM-A. En cambio, el método QM-B resultó ser mucho más constante y robusto en la producción de datos, siendo los resultados

proporcionados por este método más comparables entre sí, a pesar de haber pequeñas diferencias en las condiciones instrumentales o realizar los análisis en espacios temporales muy distantes. Hay que tener en cuenta que cuando unos iones aumentaban su intensidad lo hacían a costa de la disminución de la abundancia de otros para una misma toxina. Por estas razones, la selección de un mayor número de iones que contemplan la mayoría de las especies iónicas más abundantes observadas para cada toxina, y un análisis cuantitativo que considera la señal integrada de todos estos iones, es capaz de proporcionar resultados mucho más comparables.

A la vista de estos resultados, en esta Tesis se propone, por primera vez, utilizar un método de análisis cuantitativo alternativo (método QM-B) para la determinación de los análogos de la PLTX y que proporciona resultados más robustos y confiables que los métodos que hasta ahora se han publicado. Este nuevo método se basa en la monitorización de 13 iones ($[M+3H-4H_2O]^{3+}$, $[M+3H-3H_2O]^{3+}$, $[M+3H-2H_2O]^{3+}$, $[M+3H-H_2O]^{3+}$, $[M+H+Mg]^{3+}$, $[M+H+Ca]^{3+}$, $[M+H+Fe]^{3+}$, $[M+2H-3H_2O]^{2+}$, $[M+2H-2H_2O]^{2+}$, $[M+2H-H_2O]^{2+}$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+K]^{2+}$) para cada una de las toxinas a analizar. Este método permite compensar las variaciones de intensidad de estos iones a lo largo del análisis y entre análisis, ya que siempre se trabaja con la señal integrada de todos ellos. Además, se recomienda el uso de fuentes de electrospray con asistencia térmica (Método 1) para conseguir una mejor eficacia en la ionización. La utilización de esta fuente de ionización con asistencia térmica (HESI) y el método de cuantificación QM-B es el que se ha utilizado en todos los análisis de las toxinas producidas durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en los años 2018–2021 y que se comentarán detalladamente en el siguiente Capítulo 3.

2.3.4. Movilidad iónica

La PLTX es una molécula que tiene una elevada posibilidad de presentar estereoisómeros conformacionales ($\sim 10^{21}$) debido a los 64 centros quirales que contiene [230]. Por ello, durante una estancia predoctoral en el *Institute of Chemistry and Biochemistry-Freie Universitat Berlin* (Berlín, Alemania), se ha explorado el potencial que la movilidad iónica puede proporcionar para el estudio de los análogos de la PLTX (Artículo #2). Se ha estudiado el comportamiento en movilidad iónica tanto de la PLTX_{std} como de las OVTX-a y -b, procedentes ambas de una muestra seleccionada de entre las estudiadas durante la proliferación del 2021. Hay que indicar que las OVTX-a y -b se aislaron mediante el fraccionamiento de las muestras utilizando un sistema de cromatografía de líquidos (detección espectrofotométrica, LC-UV). La movilidad iónica de estas toxinas se estudió empleando tres sistemas equipados con diferentes tecnologías (DTIMS, TWIMS y TIMS). Se calcularon los valores de CCS en DTIMS y TWIMS para cada uno de los iones observados y el TIMS sólo se empleó para obtener los espectros a una mayor resolución en movilidad

iónica con el objetivo de proporcionar algo más de información que ayudara a interpretar el comportamiento de estas moléculas.

En general, se observó un único pico en el moviligrama tanto de DTIMS como de TWIMS para cada uno de los iones observados en el espectro de masas. La mayoría de los tiempos de llegada o de deriva de los iones observados, como era de esperar, se correspondían con el número de cargas y con el volumen/aerodinámica de la molécula. Iones más cargados y compactos llegaban antes al TOF que iones menos cargados y más voluminosos, los cuales presentaban tiempos de deriva/llegada más elevados.

A partir de los tiempos de deriva/llegada se calcularon los valores de CCS para los iones observados en el sistema DTIMS ($^{DT}CCS_{N_2}$) y se compararon con los calculados en el TWIMS ($^{TW}CCS_{N_2}$). En el DTIMS los valores de CCS se estimaron directamente a partir de la movilidad calculada a partir de los tiempos de deriva. En cambio, en TWIMS fue necesario un calibrado del eje de tiempos de llegada utilizando patrones que proporcionaban iones para los cuales se conocían sus valores $^{DT}CCS_{N_2}$. No obstante, es importante indicar que el patrón a utilizar en este proceso de calibración es necesario que sea estructuralmente lo más parecido posible a los analitos en estudio. Entre los múltiples compuestos disponibles en ese momento en el laboratorio y que habitualmente se estaban utilizando en las calibraciones del TWIMS (glicanos, péptidos, proteínas, etc.), el Dextran pareció ser un buen candidato. El Dextran es un polisacárido complejo y ramificado formado por un número elevado de moléculas de glucosa (Glc_n), lo que proporciona iones (generalmente aductos con sodio en modo positivo) en un amplio intervalo de valores de m/z (m/z 200–2100) y de movilidades iónicas, permitiendo cubrir una amplia gama de valores de CCS (179 \AA^2 y 800 \AA^2) durante la calibración. No obstante, los valores de $^{TW}CCS_{N_2}$ obtenidos para las OVTX-a y -b empleando Dextran se compararon con los obtenidos utilizando la propia $PLTX_{std}$ en el proceso de calibrado.

Los resultados de estos trabajos mostraron que los valores de $^{TW}CCS_{N_2}$ para las OVTX-a y -b utilizando la $PLTX_{std}$ en la calibración eran mucho más concordantes (<2% diferencia) con los valores de $^{DT}CCS_{N_2}$, que los obtenidos cuando se utilizó el Dextran (0,4–7,7% diferencia). En la Tabla S2 del Artículo #2 se muestran, por primera vez, 102 valores de CCS correspondientes a los diferentes iones observados en el espectro de masas (UHPLC-ESI-IMS-HRMS) de la $PLTX_{std}$ y de las OVTX-a y -b con los sistemas DTIMS y TWIMS. Estos valores se proponen como valores de referencia para esta familia de compuestos y pueden ser incluidos en las bases de datos para ser utilizados como un parámetro adicional que permita mejorar la confianza en la identificación de los compuestos pertenecientes a esta familia de toxinas, así como para facilitar la identificación y búsqueda de futuros análogos de la

PLTX. Esta información puede ser de gran utilidad en estudios posteriores relacionados con la caracterización y análisis de toxinas y compuestos similares.

Sin embargo, durante la evaluación de los resultados de estos experimentos de movilidad iónica se identificaron algunas observaciones sorprendentes y difíciles de explicar. Por ejemplo, al aumentar la resolución en la movilidad iónica mediante la utilización del TIMS, los picos individuales que se observaron en los moviligramas de DTIMS y TWIMS, ahora aparecían algo distorsionados en el TIMS, y en algunos casos, se empezaban a diferenciar múltiples picos para cada uno de los iones generados en ESI, especialmente en aquellos iones que se generaban por pérdidas de moléculas de agua, como por ejemplo $[M+3H-2H_2O]^{3+}$ (Figura 6-Artículo #2). Por otro lado, se observó que los aductos $[M+H+2Na]^{3+}$ y $[M+H+Ca]^{3+}$, a pesar de tener una masa diferente, presentaban la misma movilidad en los diferentes instrumentos utilizados. Por ejemplo, los valores de $^{DT}CCS_{N_2}$ eran muy similares, $583,5 \text{ \AA}^2$ para $[M+H+2Na]^{3+}$ y $586,3 \text{ \AA}^2$ para $[M+H+Ca]^{3+}$ (diferencia $< 0,5\%$), sugiriendo que ambos iones debían tener un volumen molecular muy similar. Estas observaciones eran difíciles de explicar y justificar únicamente considerando los datos de IMS-HRMS. Por ello, se decidió llevar a cabo algunos estudios de simulación de dinámica molecular (detalles en la sección computacional del Artículo #2), en colaboración con el grupo *Modelado de Sistemas Biológicos y Diseño de Fármacos* de la Sección de Química Física (Universidad de Barcelona), que ayudasen a la interpretación de estos resultados.

Es importante destacar que hasta el momento de iniciar estos estudios de simulación no se tenía información previa sobre la estructura tridimensional de la $PLTX_{std}$ en fase gaseosa, por lo que la elección de una buena configuración inicial como punto de partida fue fundamental para los cálculos posteriores. Inicialmente, se generó una estructura 3D de las toxinas utilizando un programa de traducción de SMILES y se realizaron minimizaciones de energía iniciales para permitir la adaptabilidad conformacional de las moléculas tanto neutras como de los correspondientes iones aducto en estudio (detalles en la sección computacional del Artículo #2). Seguidamente, partiendo de la estructura obtenida tras los procesos de minimización y utilizando 15 dinámicas con posiciones arbitrarias, los cálculos de clusterización permitieron identificar la estructura más representativa durante las simulaciones (Figura 2.22). Además, se evaluaron los puentes de hidrógeno que podían establecerse en las moléculas de las toxinas, y para ello se consideraron las interacciones donador-aceptor con una ocupación superior al 20% durante la simulación. En este punto se obtuvieron las estructuras conformacionales más representativa para cada una de las toxinas y se observó que estas moléculas presentan una gran cantidad de formación de puentes de hidrógeno que hacían que la molécula adoptara una conformación plegada.

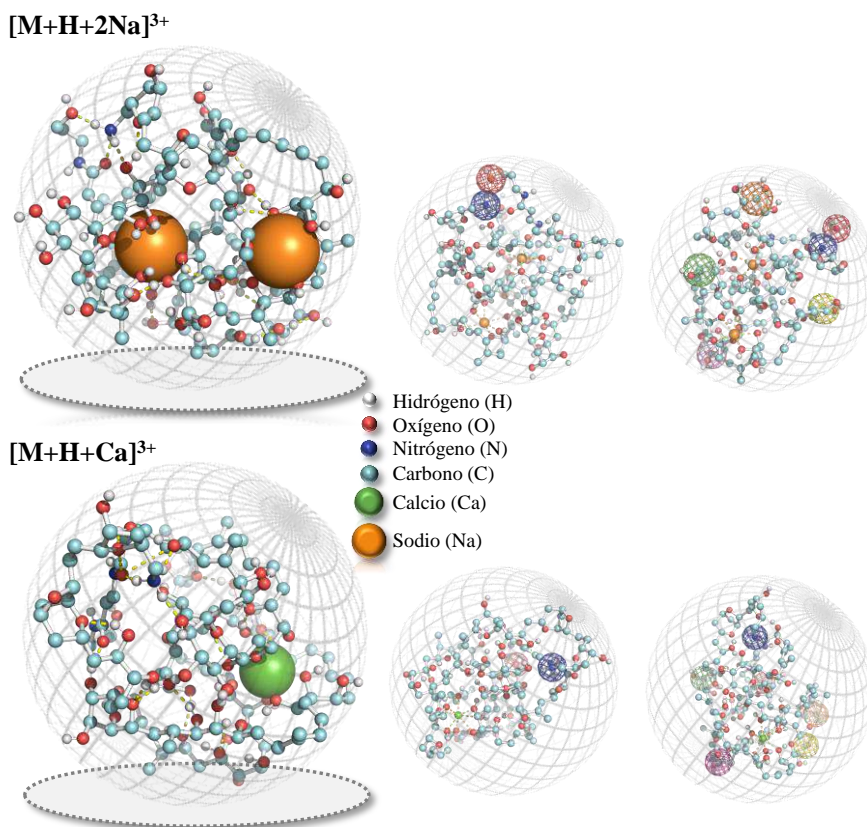


Figura 2.22. Estructura tridimensional representativa obtenida en la dinámica de simulación molecular de los aductos $[M+H+2Na]^{3+}$ y $[M+H+Ca]^{3+}$ (ejemplo OVTX-b). Las líneas discontinuas amarillas indican los puentes de hidrógeno. Las Figuras semitransparentes corresponden a diferentes puntos de vista de estas estructuras y las mallas incluidas (esferas de colores) corresponden a puntos de referencia siguiendo el patrón de la Figura S1 del Artículo #2.

En este procedimiento de simulación llevado a cabo para los aductos de interés ($[M+H+Ca]^{3+}$ y $[M+H+2Na]^{3+}$) en el cual se consideraron 15 posiciones iniciales aleatorias diferentes para el Ca^{2+} y los dos Na^+ en la preparación de cada uno de los sistemas, generó un total de 30 posibles conformaciones diferentes para cada una de las toxinas evaluadas. A lo largo de toda la dinámica de la simulación, la posición de los átomos de sodio y de calcio solía variar únicamente en la parte interna de la estructura, en los huecos que quedaban “libres”, sin provocar variaciones significativas en el volumen de la molécula. Además, la conformación más representativa (Figura 2.22) indicaba que no parecía haber una diferencia significativa entre el volumen de ambos aductos, $[M+H+Ca]^{3+}$ y $[M+H+2Na]^{3+}$. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos con movilidad iónica en TIMS,

así como en DTIMS y TWIMS, dónde ambos aductos, y para las diferentes toxinas, presentaban la misma movilidad iónica y consecuentemente los mismos valores de CCS.

Por otro lado, a partir de la hipótesis de una posible conformación plegada de estas moléculas, se puede sugerir que en proceso de las múltiples pérdidas de agua podrían estar involucrados los hidroxilos que se encuentran en la parte exterior de la molécula (Figura S4-Artículo #2), ya que son los únicos que podrían dar lugar a pequeños cambios en el volumen molecular (cambio del CCS) tras la pérdida de las moléculas de agua. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el TIMS donde en la zona de movilidad de los iones, generados por pérdidas de moléculas de agua, se observaba más de un isómero que presentaban pequeñas diferencias entre sus movilidades (Figura 6-Artículo #2). Estos resultados abren la puerta a futuros estudios en los que podrían llevarse a cabo trabajos más extensos y detallados de simulaciones de dinámica molecular, que tuviesen en cuenta las pérdidas de agua en diferentes posiciones periféricas de las moléculas con conformación plegada.

2.3.5. Defecto de masa de Kendrick

El uso del defecto de masa de Kendrick (KMD) es una herramienta útil que permite, a través de la conversión de la masa de un compuesto en la escala internacional ($C=12,0000$ Da) a la escala basada en la masa de una unidad de repetición concreta, que los compuestos orgánicos relacionados que presentan la misma unidad de repetición en su estructura química queden alineados/agrupados en series homólogas, lo que facilita su identificación. Por esta razón, en esta Tesis se ha explorado la aplicabilidad de los estudios de defecto de masa de Kendrick (KMD) para proporcionar información adicional que pueda ayudar en la detección no dirigida de los análogos de la PLTX. Esta familia de compuestos (PLTX_{std}, Iso-PLTX y OVTXs), contienen un número significativo de oxígenos (éteres e hidroxilos) y suelen diferir en el número de unidades de ^{16}O (15,9949 Da). Por tanto, el uso de la escala ^{16}O (masa monoisotópica de la toxina $\times 16/15,9949$) podría permitir visualizar las series homólogas que difieren en 16 Da y presentan un defecto de masa similar.

En una primera fase, se llevó a cabo la evaluación de KMD en base a las masas monoisotópicas calculadas para los iones que generalmente se observan en los espectros de los análogos de la PLTX (Iso-PLTX y OVTXs). Este estudio de carácter teórico tiene como objetivo explorar la aplicabilidad de los diagramas de Kendrick al estudio de la familia de análogos de la PLTX. Con las masas monoisotópicas teóricas (isótopo más ligero de cada clúster isotópico) de cada uno de los iones que suelen observarse en estos espectros de ESI-HRMS, se calcularon los valores teóricos de m/z a los cuales deberían observarse dichos iones. A partir de estos valores, se generaron

los gráficos KMD en los que se representó la relación masa-carga (m/z) de cada ion observado para cada toxina frente a la escala modificada de los defectos de masa de Kendrick, considerando ^{16}O como unidad de repetición (KMD-O). Por ejemplo, se generaron los gráficos de KMD-O para los iones $[\text{M}+\text{H}-n\text{H}_2\text{O}]^+$ ($n=0-3$) (Figura 2.23a), $[\text{M}+2\text{H}-n\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ ($n=0-3$) (Figura 2.23b), $[\text{M}+2\text{H}-\text{Parte A}-n\text{H}_2\text{O}]^+$ ($n=3-4$) (Figura 2.23c) y $[\text{M}+3\text{H}-n\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ ($n=1-3$) (Figura 2.23d), que son los que generalmente se observan en ESI para cada una de las toxinas en estudio (PLTX_{std}, iso-PLTX y OVTXs). Como se puede observar en estos gráficos KMD-O, los iones monocargados y doblemente cargados se alinean perfectamente formando subgrupos. Así mismo, los iones de series homólogas que difieren en el número de unidades ^{16}O se distribuyen en líneas horizontales en el gráfico KMD-O (Figura 2.23a,b). Por ejemplo, las OVTX-a/d/e/g, iso-PLTX y PLTX_{std} se alinean horizontalmente en el mismo KMD-O debido a que tienen el mismo número de carbonos (C_{129}) y únicamente difieren en una unidad de oxígeno. En cambio, las OVTX-b/c/f están alineadas horizontalmente en una línea paralela a las OVTX-a/d/e/g, ya que presentan en su estructura una cadena alquílica (C_2H_4) de más. Así, esta estrategia permitiría clasificar en dos subgrupos esta familia de toxinas, diferenciando aquellas toxinas que presentan una cadena alquílica en su estructura del resto que no la tienen. Además, el gráfico KMD-O para el ion $[\text{M}+2\text{H}-\text{Parte A}-n\text{H}_2\text{O}]^+$ ($n=3-4$) (Figura 2.23c) muestra como la OVTX-f, que presenta en su estructura la cadena alquílica (C_2H_4) en la Parte B de la molécula, aparece separada de las toxinas que presentan la cadena alquílica con oxígeno ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$) en la Parte A o que no contienen este grupo. En cambio, si nos fijamos en la Figura 2.23d que corresponde a los iones triplemente cargados, no se observa una tendencia clara. Esto podría deberse a un posible desajuste matemático cuando esta estrategia se aplica a iones múltiplemente cargados, ya que inicialmente es una herramienta desarrollada en base a iones monocargados. Finalmente, se observó que las toxinas que presentaban una cadena alquílica de más quedaban en diagonal en este último gráfico.

Vistas las posibilidades que esta práctica puede ofrecer al análisis de los análogos de la PLTX, se evaluó la aplicabilidad real mediante la aplicación de esta estrategia a una muestra recolectada en una de las proliferaciones de *O. cf. ovata*. El gráfico KMD-O obtenido a partir de los datos experimentales se muestra en la Figura 2.24. Sin embargo, antes de interpretar estos resultados ha sido necesario analizar los cambios que se podrían producir en las representaciones KMD-O al incluir en el procesamiento matemático todos los isótopos (clúster isotópico) de cada uno de los iones observados, ya que los estudios teóricos previos se llevaron a cabo utilizando únicamente un solo isótopo, el más ligero del clúster isotópico. Al entrar en juego los isótopos, hay que tener en cuenta que la diferencia en m/z entre cada uno de ellos del

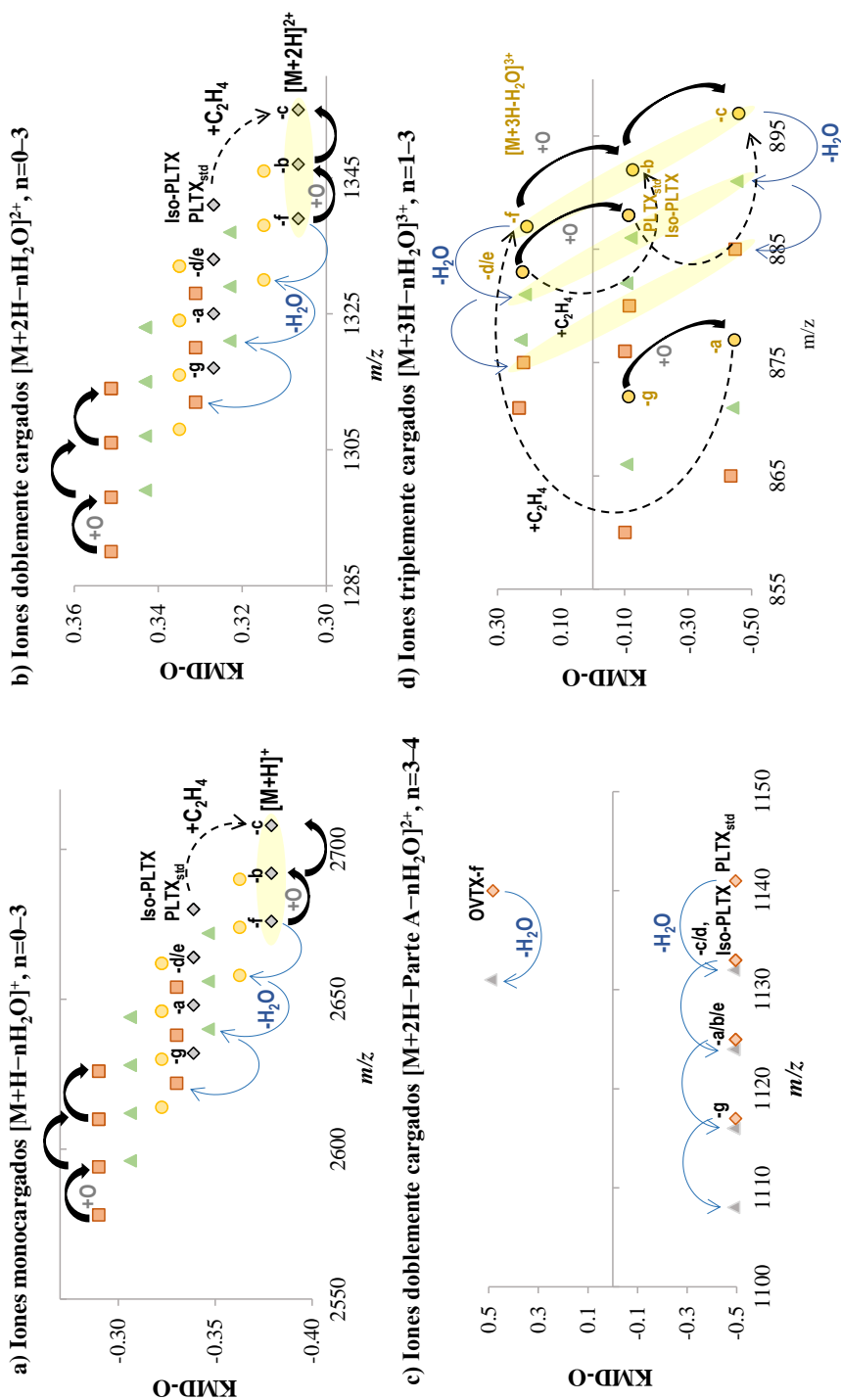


Figura 2.23. Gráficos teóricos de los defectos de masa de Kendrick (KMD-O) (simulación teórica) para los diferentes iones **a)** monocargados, **b y c)** doblemente y **d)** triplemente cargados de los análogos de la PLTX.

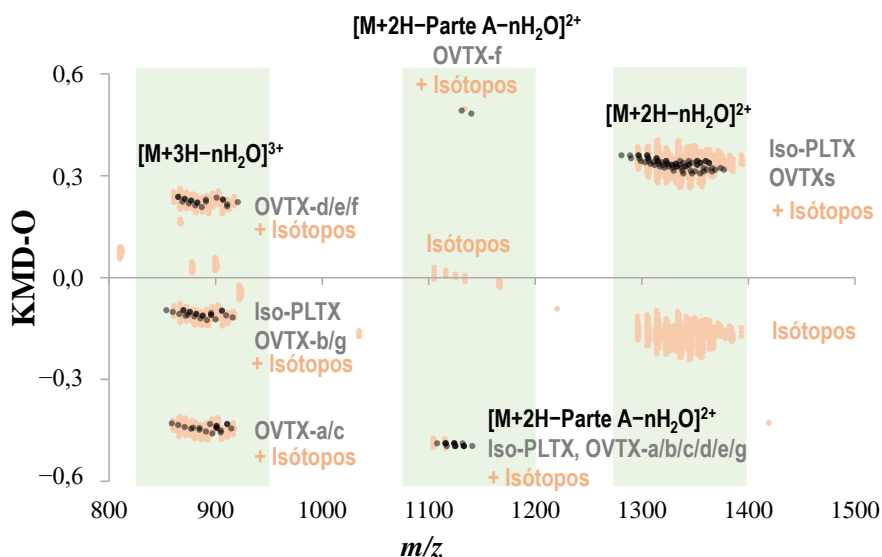


Figura 2.24. Gráfico de los defectos de masa de Kendrick (KMD-O) teórico (negro) y experimental (naranja) de los iones generados por los análogos de la PLTX.

mismo clúster depende del número de cargas que soporta el ion (monocargado, 1 m/z ; doblemente cargado, 0,5 m/z ; triplemente cargado, 0,33 m/z) (experimentalmente los iones monocargados no se observaron). Cuando se lleva a cabo el procesamiento matemático para generar el KMD-O teniendo en cuenta el total de los isótopos del clúster para cada ion, se observa una serie para los iones monocargados y varias series paralelas que distan en 0,5 (doblemente cargados) y 0,33 (triplemente cargados) unidades de KMD-O para los iones múltiplemente cargados. En la Figura 2.25 se ha simulado esta situación para los iones $[M+H-nH_2O]^+$, $[M+2H-nH_2O]^{2+}$ y $[M+3H-nH_2O]^{3+}$ donde n varía de 0 a 4. Este fenómeno es debido, como ya se ha comentado anteriormente, a que el procesamiento matemático de Kendrick está pensado para iones monocargados y durante los cálculos se llevan a cabo redondeos a la masa nominal, por lo que la distancia de una unidad de m/z genera una única serie de puntos (Serie 1 de color naranja, S1) en el KMD-O (Figura 2.25a). Sin embargo, para los iones doblemente cargados, la distancia de 1 m/z se da entre cada dos iones separados 0,5 unidades de m/z , generando 2 series de datos, la Serie 1 (color naranja, S1) con los isótopos $[M+2x]^{2+}$ ($x=0-3$) y la Serie 2 (color verde, S2) con los isótopos $[M+1+2x]^{2+}$ ($x=0-3$) (Figura 2.25b). Lo mismo sucede para los iones triplemente cargados, cuyos isótopos distan entre sí 0,33 unidades de m/z y, por lo tanto, dan lugar a 3 series, Serie 1 (color naranja, S1) con los isótopos $[M+3x]^{3+}$ ($x=0-3$), Serie 2 (color verde, S2) con los isótopos $[M+1+3x]^{3+}$ y Serie 3 (color negro, S3) con los isótopos $[M+2+3x]^{3+}$ ($x=0-3$) (Figura 2.25c). Una manera de corregir el desajuste matemático observado es

aplicar la corrección de la carga en el cálculo del KMD-O. Por ejemplo, para la OVTX-a (Figura 2.25, derecha), todas las series correspondientes a los iones múltiplemente cargados se alinean en una única serie en el gráfico KMD-O, al igual que se observaba con los monocargados. Aplicando esta corrección a todos los iones múltiplemente cargados de las OVTXs, iso-PLTX y PLTX_{std}, se observó que todas estas toxinas aparecerían en un intervalo estrecho de KMD-O que iba del $-0,25$ al $-0,40$. Correcciones parecidas se ha propuesto recientemente para el análisis de KMD de polímeros múltiplemente cargados [247].

Esta estrategia de los defectos de masa de Kendrick se aplicó finalmente a la muestra recolectada en una de las proliferaciones de *O. cf. ovata*. Los datos experimentales utilizados (*Raw Data*) incluían todos los isótopos de cada uno de los iones observados y al generar el correspondiente gráfico KMD-O se observaron,

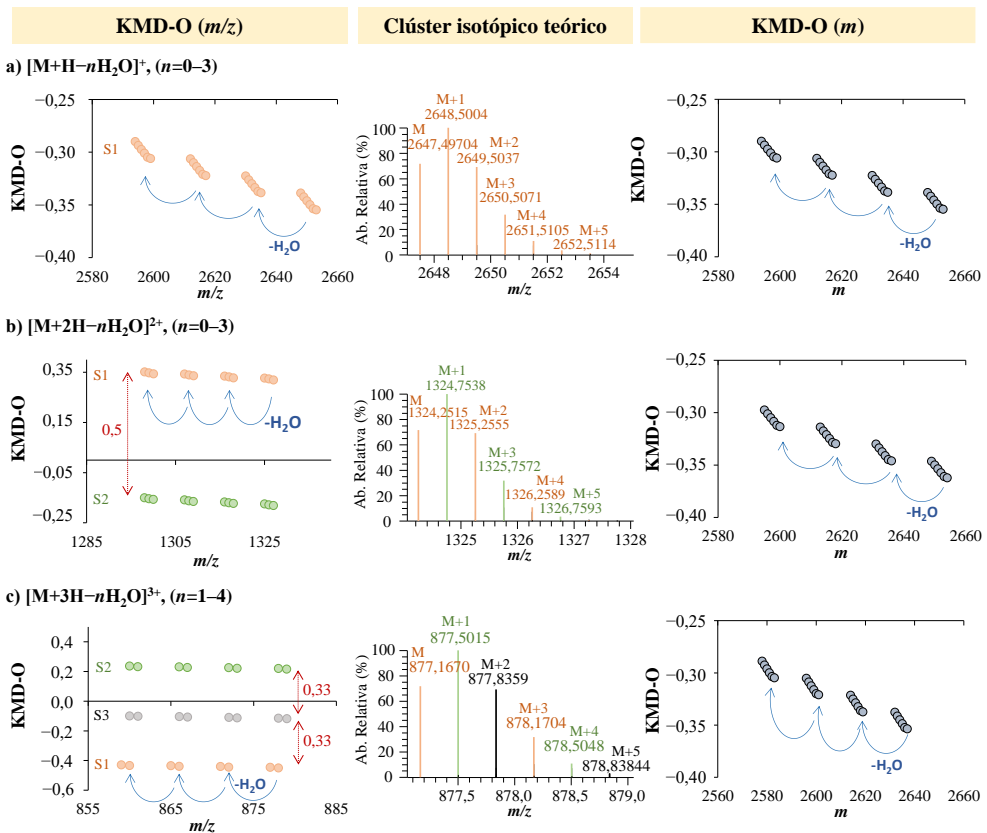
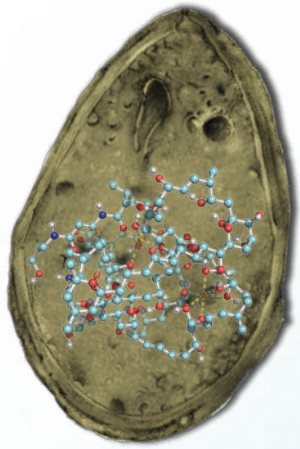


Figura 2.25. Gráfico teórico (ejemplo OVTX-a) de los defectos de masa de Kendrick (KMD-O) (izquierda), con los respectivos clústeres isotópicos (zona central/centro). En la derecha se observan los KMD-O para las masas una vez aplicada la corrección de la carga. **a)** Iones monocargados, **b)** doblemente y **c)** triplemente cargados.

como era de esperar, las diferentes series para los iones múltiplemente cargados. Si se compara el gráfico KMD-O teórico con el experimental de la muestra analizada, se puede observar que ambos gráficos concuerdan perfectamente (Figura 2.24).

En resumen, el parámetro KMD-O proporciona información relevante y complementaria a la información obtenida con los tiempos de retención, masas exactas, fragmentación (MS/MS) y valores de CCS, para ayudar a la correcta identificación y confirmación de las toxinas conocidas o para la identificación de sustancias relacionadas con la familia de los análogos a la PLTX. La información del KMD-O podría usarse como filtro para la búsqueda de esta familia de compuestos, haciendo que en el cromatograma afloren únicamente los picos cromatográficos correspondiente a la elución de los compuestos relacionados con los análogos de la PLTX.



CAPÍTULO 3.

Estudios de los análogos de la palitoxina en agua



CAPÍTULO 3: ESTUDIOS DE LOS ANÁLOGOS DE LA PALITOXINA EN AGUA

Los dinoflagelados, como todo organismo vivo, requieren de ciertos nutrientes para crecer y reproducirse. En consecuencia, la disponibilidad de tales nutrientes afecta de manera significativa al crecimiento de estos organismos en el ecosistema marino. En este capítulo se estudia la posible relación entre la disponibilidad de nutrientes y las proliferaciones de *Ostreopsis* cf. *ovata*, así como el efecto que ello pueda tener en la producción de toxinas por parte de la microalga. Con este objetivo, se realizó el seguimiento de las proliferaciones de *O.* cf. *ovata* en los veranos de 2018 a 2021 (en el caso de 2019, 2020 y 2021, se obtuvieron muestras para el estudio de la aerosolización de las toxinas, Capítulo 4), incluyendo la estimación de la concentración de toxinas en una zona concreta de Sant Andreu de Llavaneres (Barcelona; 41° 33,13' N; 2° 29,54' E). Además, se realizaron experimentos en el laboratorio con una cepa de *O.* cf. *ovata* que creció bajo diferentes condiciones controladas de nutrientes.

Este capítulo se compone de una *Introducción* con información sobre las proliferaciones de *O.* cf. *ovata* y sus efectos en la salud de las personas, documentados en el Mediterráneo y en nuestro país. También se describe la dinámica general de las proliferaciones de *Ostreopsis* y los factores medioambientales que pueden afectar su crecimiento y toxicidad. Se hace especial atención en las lagunas de conocimiento existente sobre la disponibilidad de nitrógeno y fósforo, que inspiraron los trabajos realizados en esta Tesis. Concretamente, en la sección *Experimental y resultados* de este capítulo se incluye una publicación científica (Artículo #3) en la que se evalúa el crecimiento y producción de toxinas de una cepa de *O.* cf. *ovata* aislada en la zona de Sant Andreu de Llavaneres y con la que se han llevado a cabo estudios con cultivos en el laboratorio bajo diferentes condiciones experimentales de nutrientes, así mismo se presentan los datos del seguimiento de las proliferaciones de *Ostreopsis*. Este capítulo termina con una discusión transversal de los resultados obtenidos y se comentan además las proliferaciones sucedidas en la zona de estudio a lo largo de los cuatro años (2018–2021).

3.1. Introducción

Cuando las condiciones son favorables y *Ostreopsis* cf. *ovata* prolifera, se pueden llegar a alcanzar concentraciones en el bentos del orden de varios millones de células por gramo de peso fresco de macroalga (cél. gPF⁻¹) [248]. Estas células también pueden desprenderse del sustrato (por una combinación de factores hidrodinámicos – corrientes – y de ritmos endógenos) [89] y encontrarse en el plancton en concentraciones del orden de 10⁵ células por litro de agua (cél. L⁻¹) o superiores. Teniendo en cuenta las consecuencias que estas proliferaciones pueden provocar en la salud humana, en base a la información del seguimiento (*monitoring*) y estudios científicos de los diferentes eventos en Italia, Francia, Mónaco y Catalunya se han propuesto umbrales de alerta [50,111,156,249]. Concretamente, las abundancias de 2×10⁵ células de *Ostreopsis* gPF⁻¹ en el bentos y de 3×10⁴ células de *Ostreopsis* L⁻¹ en el plancton representarían niveles de alerta de posible afectación para la salud humana. Estos niveles se han ido ajustando progresivamente de manera empírica combinando las concentraciones de *Ostreopsis* encontradas y los impactos documentados de salud [111,156]. En un principio, los niveles establecidos por las autoridades sanitarias fueron inferiores, lo cual conllevó cierres preventivos de playas sin que hubiera casos de afección en la salud y/o que ocurrieran proliferaciones importantes. Los cierres comportaron perjuicios económicos en las actividades recreativas asociadas al uso de las playas (restauración, deportes). El reciente estudio de Berdalet et al. (2022), en el que se combinó la epidemiología y la dinámica de las proliferaciones de *O. cf. ovata* durante seis años consecutivos, confirmaron como recomendables, los mencionados niveles de alerta [50].

3.1.1. Proliferaciones de *Ostreopsis*

En general, *Ostreopsis* suele proliferar durante los meses de verano donde la temperatura del agua en las zonas costeras tiende a ser más cálida, proporcionando condiciones óptimas para el crecimiento de *Ostreopsis* [184,186,187]. Además, como organismo fotosintético, *Ostreopsis* requiere la radiación de la luz solar para su crecimiento. Así, durante los meses de verano cuando los días son más largos, las horas de exposición a luz solar aumentan, favoreciendo la fotosíntesis de *Ostreopsis* [187]. Por otro lado, en las zonas donde prolifera se encuentran niveles altos de nutrientes en el agua, ya sea de origen agrícola (fertilizantes) o urbano, que favorecen tanto el crecimiento de las microalgas como de las macroalgas a las que se adhiere. Durante la proliferación, la dinámica de los demás componentes bióticos (bacterias, flagelados autótrofos y heterótrofos, otros grupos de microalgas) contribuyen al reciclado de los principales nutrientes [91,103,183,199,200]. Por ejemplo, la materia orgánica liberada por las microalgas es utilizada por bacterias, mientras que la ingestión de microalgas por el zooplancton conlleva la liberación de nitrógeno y

fósforo en el agua. Además, aguas costeras relativamente tranquilas o con una hidrodinámica moderada, especialmente en áreas confinadas, facilitan el crecimiento de *Ostreopsis* [14,86,105,196]. En general, la combinación de una temperatura moderada (templadas-cálidas), una irradiación solar prolongada, una mayor disponibilidad de nutrientes y una hidrodinámica moderada-baja (aguas tranquilas), entre otros factores, pueden hacer que los meses de verano sean un momento ideal para la proliferación del dinoflagelado *Ostreopsis* [36,37]. De todos modos, en otoño también se ha llegado a producir una segunda proliferación en ciertas playas de las costas del noroeste del Mediterráneo [36,49,200,248], mientras que en el mar Adriático, las proliferaciones siguen otra dinámica, teniendo lugar principalmente en otoño [86,94,114]. Tal vez, en verano, las temperaturas sean excesivamente elevadas en esa zona, aunque deben existir otros factores ecológicos implicados en esta diferente dinámica.

Desde inicio del siglo XXI, en los periódicos han ido apareciendo noticias referentes a las proliferaciones de *Ostreopsis* en nuestro país (Figura 3.1) incluyendo la zona de estudio de esta Tesis. Concretamente se documentaron casos de irritaciones respiratorias sufridas por pescadores durante el verano de 2012. También en Almería, la proliferación de *Ostreopsis* sp. se relacionó con problemas respiratorios que afectaron casi a un centenar de bañistas, lo cual obligó a cerrar las playas. Además, durante los veranos de 2020 y 2021 en la costa vascofrancesa (Golfo de Vizcaya) hasta 674 personas sufrieron algún tipo de irritación o trastornos respiratorios debido a la proliferación masiva de las dos especies, *O. cf. ovata* y *O. cf. siamensis*, que alcanzaron 5×10^5 cél. L^{-1} y 8×10^5 cél. gPF^{-1} [95]. En global, en los últimos años, la presencia de esta microalga tóxica ha causado preocupación y cierre de playas en varias zonas costeras de España (Cataluña, Andalucía, País Vasco y Canarias, Figura 3.1).

En la Tabla 3.1 se muestra un resumen de algunas de las proliferaciones de *Ostreopsis* (especialmente *O. cf. ovata*) observadas en el Mar Mediterráneo. Respecto a las abundancias celulares, en general, la concentración máxima de *O. cf. ovata* durante las proliferaciones en el Mar Mediterráneo osciló entre $3,3 \times 10^5$ y $7-9 \times 10^6$ cél. gPF^{-1} y entre $1,6 \times 10^4$ y $6,7 \times 10^6$ cél. L^{-1} , variando de un año a otro en la misma zona. Por ejemplo, en la costa catalana se detectaron concentraciones de hasta 4×10^6 cél. gPF^{-1} en 2009, $7,6 \times 10^5$ cél. gPF^{-1} en 2010 y hasta $\sim 9 \times 10^6$ cél. gPF^{-1} en 2017. También, en el Líbano en 2001 se detectaron concentraciones planctónicas de *O. fattorussoi* de hasta $1,1 \times 10^4$ cél. L^{-1} , mientras que en el 2015 las máximas abundancias detectadas fueron tan solo de 840 cél. L^{-1} (Tabla 3.1). Además, estas proliferaciones varían también de un lugar a otro en el mismo año. Por ejemplo, en 2009 en dos zonas diferentes del Mar Adriático en Italia, se encontraron abundancias

celulares máximas de *O. cf. ovata* de $6,7 \times 10^6$ cél. L^{-1} en el Golfo de Trieste (norte del Mar Adriático), mientras que en Conero de Riviera (noroeste del Mar Adriático) no superaron las $9,2 \times 10^4$ cél. L^{-1} . Por otro lado, otros estudios detectaron que los niveles podrían variar incluso durante el mismo día y según la fase de la proliferación. Así, durante la fase exponencial y estacionaria, las mayores abundancias de *O. cf. ovata* en el plancton se encontraron entre las 12:00 y las 16:00, y entre las 08:00 y las

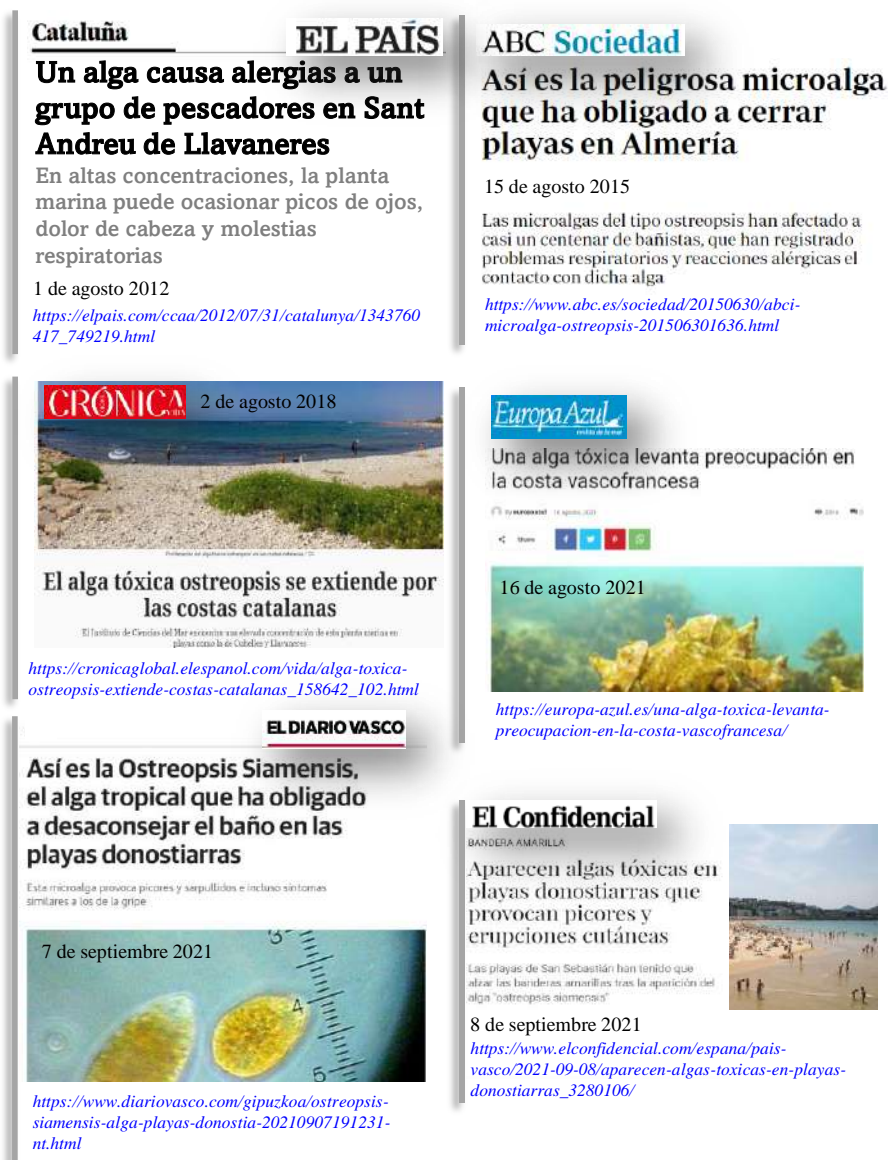


Figura 3.1. Noticias sobre proliferaciones de *Ostreopsis* en España.

12:00 en el bentos, encontrándose un patrón distinto durante la fase de senescencia de la proliferación [89]. En la costa catalana, Vila et al. (2001) observaron un valor máximo de $6,0 \times 10^5$ células de *Ostreopsis* sp. gPF^{-1} , en la zona de Palamós (Costa Brava, 1997–1998) [103]. Posteriormente, en un área algo más al sur (Sant Andreu de Llavaneres) se han ido realizando seguimientos anuales llevados a cabo por el Instituto de Ciencias del Mar junto con la Agencia de Salud Pública y la Agencia Catalana del Agua. Entre 2013 y 2018 se llegaron a encontrar valores de hasta $\sim 10^7$ células de *Ostreopsis* gPF^{-1} en el bentos (2017) y $\sim 10^5$ células de *Ostreopsis* L^{-1} en el plancton [50]. Esta concentración planctónica encontrada es de las más altas

NIUS

Los análisis confirman que las algas *Ostreopsis* causaron los picores de los bañistas en San Sebastián https://www.niusdiario.es/espana/euskadi/analisis-muestras-agua-mar-playas-sansebastian-biologia-upv-alga-ostreopsissiamensis_18_3200670607.html

10 de septiembre 2021

Canarias7

Prohibido el baño en la playa de Arinaga por microalgas

Salud pública detecta una abundante floración natural de *Ostreopsis ovata*, un fenómeno cada vez más habitual durante el verano en las costas de Italia, Francia y España y que está relacionado con factores climáticos y ambientales.

13 de mayo 2022



<https://www.canarias7.es/canarias/gran-canaria/prohibido-bano-playa-20220513202306-nt.html>

Capgròs 22 de agosto 2022

Detectan al Maresme una alga que genera problemas respiratorios

Vilassar y Llavaneres registraban niveles altos del alga *Ostreopsis*, que se genera en las zonas de rocas mientras El Masnou el registro es leve

https://www.capgros.com/es/actualidad/maresme/detectan-maresme-alga-genera-afeccion-respiratoria_807744_102.html

EL DIARIO VASCO

Gipuzkoa inicia la caza del alga tóxica

La Diputación y la UPV controlarán el agua de la costa para poder anticipar la presencia del organismo que el verano pasado causó picores a los bañistas



18 de mayo 2022

<https://www.diariovasco.com/gipuzkoa/alga-toxica-playas-20220519220747-nt.html>

EL DIARIO VASCO

Las algas invaden la costa

Solo en Donostia se ha retirado una tonelada de plantas, aunque el único rastro de toxicidad hallado por ahora ha sido en arenales de Iparraide

11 de julio 2022



<https://www.diariovasco.com/gipuzkoa/algas-invaden-costa-donostia20220712210549-nt-20220712211927-nt.html>

Figura 3.1 (cont.). Noticias sobre proliferaciones de *Ostreopsis* en España.

documentadas en la literatura. Además, durante la realización de estos estudios, que cubrían las proliferaciones ocurridas entre 2013 y 2018, se notificaron (según encuestas epidemiológicas realizadas en paralelo al seguimiento de la proliferación) los tres síntomas más comunes entre las personas expuestas a estas proliferaciones: malestar general, secreción nasal y dolor de ojos. El dolor de cabeza y la irritación de nariz fueron síntomas que se identificaron en cinco de los seis años estudiados. Estos síntomas fueron indicados por personas que trabajaban en el restaurante más próximo a la zona de proliferación y por aquellas que vivían en los apartamentos del paseo marítimo paralelo a la playa en dicha zona (detalles de la localización en la sección 2.3.1, Capítulo 2). En relación con el contenido de toxina celular (Tabla 3.1), como ya se ha comentado en el Capítulo 1, puede variar en función de la fisiología de las células y de factores ambientales como la temperatura, salinidad, iluminación y disponibilidad de nutrientes como se ha descrito en otros organismos tóxicos [250–252]. El rango de valores de la concentración de toxina celular a lo largo de las proliferaciones de *Ostreopsis* reportadas se encuentra entre 0,4 y 75 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$. Los valores más altos se encontraron en cepas de *O. cf. ovata* obtenidas en el Mar Adriático [93,133,253], aunque no coincidieron con los valores máximos de abundancia celular observados en el Mediterráneo. Considerando los diferentes casos, la mayoría de las abundancias celulares superan el umbral de alerta para el plancton ($3 \times 10^4 \text{cél. L}^{-1}$) y para el bentos ($2 \times 10^5 \text{cél. gPF}^{-1}$) comentado anteriormente. Por lo tanto, el control de las proliferaciones de *Ostreopsis* y de los niveles de toxinas es esencial para proteger la salud pública.

Tabla 3.1. Características de algunas proliferaciones de *Ostreopsis* que han tenido lugar en el Mar Mediterráneo, con indicación de la región concreta y año en que ocurrieron, especie identificada, máxima abundancia celular bentónica (cél. gPF^{-1}) o planctónica (cél. L^{-1}), máxima concentración de toxina encontrada durante la proliferación y referencia del estudio. Se presentan los datos ordenados cronológicamente.

Región y año	Especie	Máx. abundancia celular	Máx. conc. de toxina	Ref.
Palamós, Costa Brava, NO Mediterráneo, 1997–1998	<i>O. sp.</i>	$6,0 \times 10^5 \text{cél. gPF}^{-1}$ $2,0 \times 10^4 \text{cél. L}^{-1}$	-	[103]
Líbano, E Mediterráneo, 2001	<i>O. siamensis</i>	$1,1 \times 10^4 \text{cél. L}^{-1}$	-	[254]
Mar Egeo del Norte, Grecia, 2003–2004	<i>O. cf. siamensis</i> y <i>O. ovata</i>	$4,1 \times 10^5 \text{cél. gPF}^{-1}$ $1,6 \times 10^4 \text{cél. L}^{-1}$	-	[59]
Génova, 2005	<i>O. ovata</i>	-	$0,4 \text{pg} \text{cél.}^{-1}$	[117]

-: No hay datos; N: Norte; E: Este; NO: Noroeste.

Tabla 3.1 (cont.).

Región y año	Especie	Máx. abundancia celular	Máx. conc. de toxina	Ref.
Mar de Liguria, Génova, 2006	<i>O. ovata</i>	2,5×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 8,7×10 ⁴ cél. L ⁻¹	3,5 pg cél. ⁻¹	[118, 248]
Francia y Mónaco, (Villefranche, Marseille, Nice, Fréjus, Toulon), 2006–2009	<i>Ostreopsis</i>	>3,0×10 ⁴ cél. L ⁻¹	-	[47]
Bahía de Bizerte, Túnez, 2007	<i>O. cf. siamensis</i>	3,7×10 ⁴ cél. L ⁻¹	-	[255]
Playa de Larvotto, Mónaco, NO Mediterráneo, 2007–2008	<i>O. cf. ovata</i>	1,6×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹	-	[189, 200]
Conero Riviera, N Mar Adriático, 2007	<i>O. cf. ovata</i>	1,7×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹	-	[86]
Conero Riviera, NO Mar Adriático, 2009	<i>O. cf. ovata</i>	1,3×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 9,2×10 ⁴ cél. L ⁻¹	75 pg cél. ⁻¹	[133, 253]
Golfo de Trieste, N Mar Adriático, 2009	<i>O. cf. ovata</i>	6,7×10 ⁶ cél. L ⁻¹	71,7 pg cél. ⁻¹	[93]
St. Andreu de Llavaneres, Costa Catalana, NO Mediterráneo 2009	<i>O. cf. ovata y siamensis</i>	4,0×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 3,8×10 ⁵ cél. L ⁻¹	-	[36]
Costa Toscana, Italia, 2009–2010	<i>O. cf. ovata</i>	5,4×10 ⁵ cél. gPF ⁻¹ 1,8×10 ⁵ cél. L ⁻¹	-	[24]
St. Andreu de Llavaneres, Costa Catalana, NO Mediterráneo, 2010	<i>O. cf. ovata</i>	7,6×10 ⁵ cél. gPF ⁻¹ 1,1×10 ⁵ cél. L ⁻¹	1,2 pg cél. ⁻¹	[148]
Rovinj, Mar Adriático, Croacia, 2010	<i>O. cf. ovata</i>	3,3×10 ⁵ cél. gPF ⁻¹ 4,3×10 ⁴ cél. L ⁻¹	53,6 pg cél. ⁻¹	[48]
Villefranche-sur-Mer, 2011	<i>O. cf. ovata</i>	3,7×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 2,8×10 ⁴ cél. L ⁻¹	32,8 pg cél. ⁻¹	[135]
Delta del Ebro, Costa Catalana, NO Mediterráneo, 2013	<i>O. cf. ovata</i>	1,5×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 5,3×10 ⁴ cél. L ⁻¹	25 pg cél. ⁻¹	[96]

-: No hay datos; N: Norte; E: Este; NO: Noroeste.

Tabla 3.1 (cont.).

Región y año	Especie	Máx. abundancia celular	Máx. conc. de toxina	Ref.
St. Andreu de Llavaneres, Costa Catalana, NO Mediterráneo, 2013–2018	<i>O. cf. ovata</i>	2017: 6,9–9,0×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 2014: 3,0×10 ⁵ cél. L ⁻¹	-	[50]
Kastela Bay, Mar Adriático, 2015	<i>O. cf. ovata</i>	2,7×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 2,9×10 ⁴ cél. L ⁻¹	6,3 pg cél. ⁻¹	[114]
Líbano, Mar Mediterráneo, 2015	<i>O. fattorussoi</i>	2,8×10 ⁴ cél. gPF ⁻¹ 840 cél. L ⁻¹	0,9 pg cél. ⁻¹	[63]
Villefranche-sur-Mer, Francia, NO Mediterráneo, 2017	<i>O. cf. ovata</i>	1,8×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹ 1,7×10 ⁴ cél. L ⁻¹	9,2 pg cél. ⁻¹	[52]
Villefranche, Francia, NO Mediterráneo, 2020	<i>O. cf. ovata</i>	2,2×10 ⁶ cél. gPF ⁻¹	-	[89]
Gibraltar, 2019–2020	<i>O. spp</i>	2,5×10 ⁵ cél. gPF ⁻¹ 9,8×10 ³ cél. L ⁻¹	-	[7]

-: No hay datos; N: Norte; E: Este; NO: Noroeste.

A lo largo de las proliferaciones de *Ostreopsis*, como en las de otros microorganismos, se identifican tres fases principales, siguiendo la analogía de un cultivo en el laboratorio: exponencial, estacionaria y senescencia. Durante la fase de crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento es máxima y se produce un aumento logarítmico del número de células con el tiempo; en la zona de estudio, esta fase acostumbra a durar entre 10 y 15 días aunque puede alargarse en el tiempo si las condiciones son propicias, o puede ser más corta en otras zonas (ver por ejemplo, Drouet et al. 2022) [189]. Durante la fase estacionaria, ya no existe una tasa de crecimiento exponencial, la duplicación celular sigue a un ritmo más lento, pudiendo igualarse la cantidad de células nuevas que se producen a la de células que mueren. Finalmente, durante la fase de senescencia, la tasa de crecimiento de la población es negativa y el número de células de *Ostreopsis* va disminuyendo con el tiempo. Esta disminución puede deberse a factores como el agotamiento de nutrientes, cambios en las condiciones ambientales (menor temperatura, mayor agitación) y factores bióticos (infecciones por parásitos o virus). También, es importante tener en cuenta otros factores como la competencia con otras especies que pueden afectar tanto al momento en el que tiene lugar cada fase y a la duración de esta. Debemos tener en cuenta que,

en el medio natural nos referimos a la "tasa de crecimiento neta". Es decir, como se trata de sistemas abiertos (y no un recipiente cerrado de laboratorio), el número de células que se estiman en un momento concreto es también el resultado conjunto de la reproducción celular, la acumulación o dispersión por efecto de las corrientes marinas, la migración vertical y, en el caso de *Ostreopsis*, de su distribución entre los compartimentos del plancton y el bentos explicado anteriormente [89].

Por lo que respecta a la concentración de toxinas en el medio natural, los valores documentados son aún escasos e incluso contradictorios. Gemin et al. (2020) observaron que la concentración celular de toxina variaba según la fase de crecimiento. En concreto, durante la proliferación de *O. cf. ovata* en Villefranche-sur-Mer (2017) el contenido de toxina celular aumentaba durante las fases exponencial y estacionaria [52], hecho que está en concordancia con otros estudios realizados con cultivos en el laboratorio [56,92,135]. Sin embargo, en otros casos no se observaron diferencias significativas entre fases de crecimiento [256] e incluso se observaron tendencias contradictorias entre los diferentes estudios. Así, Accoroni et al. (2017) detectaron que la máxima concentración de toxina celular se producía antes del pico máximo de la proliferación de *O. cf. ovata* [257], mientras que otros estudios detectaron la concentración máxima de toxina después del pico de abundancia máxima de células [48].

En el laboratorio, la concentración de toxinas producidas por cepas de *O. cf. ovata* del Mediterráneo, también varía según el lugar de origen de las cepas y las condiciones de cultivo [56,75,87,121,122,135]. Se han estimado valores máximos de unos 300 pg_{tox} cél.⁻¹ en el noroeste del Mediterráneo (costa francesa), dentro de un rango similar al estimado en cultivos de cepas brasileñas de *O. cf. ovata* (60–468 pg_{tox} cél.⁻¹) [74].

En relación con el perfil de toxinas, el estudio en medio natural de Pfannkuchen et al. (2012) documentó una contribución relativamente constante de los análogos de toxinas en las células de *O. cf. ovata* a lo largo la proliferación. Concretamente, OVTX-a fue la más abundante, seguida de la OVTX-b, la suma de OVTX-d+e y la OVTX-c, contribuyendo, respectivamente, al 60%, 24%, 11% y 4% de la concentración celular de toxina total, mientras que la iso-PLTX sólo estuvo presente en un 0,7% [48]. Este perfil de toxinas es similar al documentado en otros estudios de proliferaciones de *O. cf. ovata* acaecidas en otras zonas geográficas [120,133,256]. En cambio, en estudios realizados con cultivos de células de *O. cf. ovata* aisladas en Río de Janeiro se obtuvieron perfiles diferentes de toxinas, donde la OVTX-b y las OVTX-d/e predominaban en algunos casos [74]. Por otro lado, en un estudio detallado realizado con 55 cepas de *O. cf. ovata* procedentes de la costa italiana y cultivadas bajo las mismas condiciones se observaron cuatro perfiles totalmente diferentes de toxinas. Así, el 67% de las cepas contenían OVTX-a/b/c/d/e/g y la iso-

PLTX; el 25% de ellas solo presentaron OVTX-a/d/e/g y la iso-PLTX; y un 4% de las cepas contenían únicamente OVTX-b y -c. Además, una cepa presentó un perfil muy particular, consistente en OVTX-f (50,1% respecto el total de toxina), OVTX-a (23,6%), -b (17,7%), -d (2,9%), -e (2,9%), -c (2,4%) e iso-PLTX (0,29%) [124]. Teniendo en cuenta los trabajos que hasta el momento se han publicado, no está aún clara la relación entre la variación del contenido de toxina celular y la fase de crecimiento, tanto en estudios de campo como en los realizados en cultivos en el laboratorio, puesto que hay diferentes factores que podrían modular la producción de toxinas.

3.1.2. Proliferaciones en Sant Andreu de Llavaneres

Los primeros problemas de salud registrados en la zona de Sant Andreu de Llavaneres se notificaron en 2004, cuando unas 200 personas que residían en unos apartamentos al sur de la playa de Sant Andreu de Llavaneres experimentaron la sintomatología que unos pocos años más tarde fue asociada a las proliferaciones de *Ostreopsis* [43,142]. En el momento en que ocurrió, se desconocían las causas de la afección que se atribuyó a la liberación del algún compuesto tóxico al aire. Fueron los fenómenos similares en Génova (Italia) y Frioul (Francia) los que se relacionaron con la presencia de *O. cf. ovata* en el agua [47,117] (tal y como se describe en Berdalet et al. 2022 [50]) a partir de los cuales se iniciaron los estudios con más detalle en Sant Andreu de Llavaneres. Desde entonces, estas proliferaciones se han ido repitiendo, observándose simultáneamente problemas de salud en las personas expuestas a los aerosoles marinos o en contacto directo con la microalga durante estos eventos [49,50]. Vila et al. (2016) estudió el efecto de algunos factores ambientales (temperatura del aire y del agua, y dirección e intensidad del viento) durante la proliferación de *O. cf. ovata* en el 2013 en relación con la sintomatología en humanos, sin encontrar un patrón claro de los factores estudiados. A lo largo de esta proliferación de *O. cf. ovata* se identificaron dos episodios claros de sintomatología en 13 personas; el primer episodio coincidió con la finalización de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria (7–21 de agosto de 2013), y el segundo episodio durante la fase estacionaria (8–16 de octubre de 2013) [49]. Sin embargo, entre el primer y segundo episodio (septiembre) los síntomas fueron negligibles a pesar de las elevadas concentraciones de *O. cf. ovata* durante la fase estacionaria.

La recurrencia de las proliferaciones en la playa de Sant Andreu de Llavaneres y la observación de sintomatología en las personas expuestas ha aumentado la preocupación en esta zona ya que puede llegar a tener efectos socioeconómicos. La población puede reducir las visitas a las playas afectadas y como consecuencia pueden verse perjudicadas las actividades recreativas y turísticas de la zona (bares, cafeterías o restaurantes). Por ello, se ha visto que es importante poder llegar a

establecer si hay una relación directa entre la exposición de las personas en la playa y los síntomas durante las proliferaciones de *Ostreopsis*. Entre 2014 y 2018 se realizó un estudio en la playa de Sant Andreu de Llavaneres consistente en el seguimiento de las proliferaciones de *Ostreopsis* (estudio ecológico) y simultáneamente un registro de la sintomatología en personas que trabajaban o vivían frente a la zona afectada por la proliferación [50]. Se realizaron encuestas a personas que estuvieron expuestas a aerosoles marinos durante 8–24 horas diarias, muchas de las cuales ya habían experimentado síntomas similares en años anteriores [43,142]. La sintomatología más recurrente de los encuestados (trabajadores del restaurante Pins Mar y personas que habitaban en los apartamentos Blau Mar) fue la irritación de la nariz, secreción nasal, malestar, dolor de cabeza, ojos llorosos y tos. Estos síntomas se producían principalmente en los meses de julio y agosto, coincidiendo con las etapas de mayor abundancia anual de *O. cf. ovata* y con la transición de la fase exponencial a la estacionaria de la proliferación. Estas observaciones llevaban a sugerir que en esta fase de la proliferación *Ostreopsis* estaría en un estado fisiológico particular en el que sintetizaría las sustancias tóxicas responsables de los síntomas. Esta hipótesis aparecía reforzada por el hecho de no haberse encontrado una relación de la sintomatología con el viento y la temperatura.

3.1.3. Importancia de la disponibilidad de nutrientes en las proliferaciones de *Ostreopsis* y en la producción de toxinas

Tal y como se ha comentado en la sección 1.5 (Capítulo 1), la proliferación de *Ostreopsis* y la producción de toxinas están influenciadas por una variedad de factores ambientales y entre todos ellos, la temperatura y el hidrodinamismo del mar parecen tener un papel importante. Además, el crecimiento y el mantenimiento de las poblaciones de microalgas también dependen directamente de las fuentes nutritivas que alimentan las células. El nitrógeno y el fósforo son dos elementos esenciales para el crecimiento y la supervivencia de las células de este dinoflagelado. *Ostreopsis* incorpora las formas inorgánicas de nitrógeno (principalmente nitratos y amonio) y fósforo (principalmente en forma de fosfatos) presentes en el agua. La incorporación del nitrógeno y fósforo inorgánicos se regula a través de proteínas de transporte específicas ubicadas en la membrana celular. El nitrógeno y el fósforo son utilizados por las células en diferentes procesos metabólicos: por ejemplo, el nitrógeno es esencial para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos y el fósforo para la de nucleótidos, ATP, ARN y ADN. Además, el nitrógeno es especialmente importante para el sistema fotosintético que fija el carbono (CO₂) en compuestos orgánicos (glucosa) y formando O₂, utilizando la energía lumínica.

La disponibilidad de nitrógeno y de fósforo en el entorno marino suele ser limitada, por lo que suele ser un factor clave para determinar las tasas de crecimiento

de los dinoflagelados. Por ejemplo, si el nitrógeno y el fósforo escasean en el agua, el crecimiento de dinoflagelados puede limitarse incluso en condiciones favorables de temperatura y de irradiación lumínica. En cambio, en costas afectadas por actividades humanas (urbanización, agricultura, descarga de aguas residuales, etc.), donde se produce un exceso de disponibilidad de nutrientes (eutrofización), el crecimiento de la proliferación de dinoflagelados como *Ostreopsis* se puede ver favorecido. Por ello, en los ecosistemas marinos la relación nitrógeno:fósforo (N:P) es un factor importante y que describe la disponibilidad relativa de estos dos nutrientes. El oceanógrafo Alfred Redfield, en la década de 1930, propone por primera vez una relación N:P de 16:1 (relación estándar de Redfield), la cual está basada en el análisis de la composición elemental de organismos marinos [258]. Redfield observó que la abundancia relativa de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) en los organismos marinos era cercana a una relación de aproximadamente 106:16:1. Las condiciones óptimas para el crecimiento algal se encontrarían cuando en el agua de mar, la relación N:P fuese de aproximadamente 16:1, mientras que valores superiores indicarían una deficiente disponibilidad de fósforo, y unos valores inferiores, indicarían una limitación de nitrógeno. De todos modos, la relación N:P varía en función de muchos factores, como han demostrado diferentes estudios [259]. En el caso de *Ostreopsis*, se ha explorado cuáles serían las condiciones nutricionales, en cuanto a nitrógeno y fósforo, en el medio natural que puedan explicar la variabilidad temporal de las proliferaciones [103,105,200,260,261]. Los datos disponibles son de difícil interpretación, ya que la concentración de nutrientes en un momento determinado es el balance entre los aportes, la dilución por efecto de la circulación marina, el consumo por parte de los microorganismos y el reciclado de los elementos a partir de las actividades metabólicas de la red microbiana. En algunos momentos, los valores altos de células de *Ostreopsis* coinciden con concentraciones relativamente altas de nutrientes, por ejemplo, entre 2,39 y 17,39 μM de nitrato y 0,32 μM de fosfato en la Riviera del Conero [133], y en otros momentos, será precisamente el consumo por parte de *Ostreopsis* y la comunidad microbiana acompañante la que haya consumido los nutrientes y por tanto los valores de nitrógeno y fósforo sean muy bajos [192,199].

En este marco, para poder estudiar mejor la modulación de las proliferaciones de *O. cf. ovata* según la disponibilidad de nutrientes, se utilizan cultivos bajo condiciones controladas en el laboratorio. Controlando la temperatura, la salinidad y la irradiación lumínica, es posible modificar la disponibilidad de nutrientes y estudiar su efecto en el crecimiento del cultivo de *Ostreopsis* y en la producción de toxinas. De esta manera, se evitan la intervención de otros factores que puedan afectar al crecimiento y comportamiento de la cepa. Así por ejemplo, Vanucci et al. (2012) realizó un estudio detallado con cultivos sobre el crecimiento de *O. cf. ovata* bajo diferentes condiciones de nutrientes (deficiencia de nitrato y fosfato) y observó lo

siguiente: 1) las células más pequeñas se obtenían bajo condiciones de deficiencia de nitrato (N:P=5) mientras que el volumen celular aumentaba bajo condiciones de deficiencia de fosfato (N:P=92), resultados en consonancia con los obtenidos también por Vidyarathna y Granéli (2010) [262]; 2) la tasa de crecimiento se redujo en 2,2 y 1,8 veces para los cultivos que se hallaban bajo deficiencia de nitrato y fosfato, respectivamente, en comparación con los cultivos que habían crecido en las condiciones estándar de Redfield (N:P=16); 3) el contenido de toxina celular aumentaba desde la fase exponencial a la estacionaria; 4) bajo deficiencia de nitrato y fosfato, la concentración de toxina celular decrecía en un 53 y 40%, respectivamente, en comparación con las condiciones estándar de Redfield, y 5) el perfil de toxinas (perfil cualitativo) observado era similar a lo largo de las diferentes fases de crecimiento siendo la OVTX-a la más abundante, seguida de la OVTX-b, -d/-e, -c y de la iso-PLTX [92]. En resumen, la deficiencia de nitrato parecía afectar en mayor medida al crecimiento y producción de toxinas. En cambio, en los trabajos de Pistocchi et al. (2014) y Ellwood et al. (2020) se indica que *O. cf. ovata* parece tener una mayor afinidad por la absorción de fósforo que por la de nitrógeno [263], siendo capaz de absorber tanto el fósforo inorgánico como el orgánico. Además, su crecimiento no se ve limitado bajo un aporte de tan sólo fósforo orgánico, puesto que parece capaz de asimilar una amplia gama de especies de fósforo [264]. Por otro lado, en los trabajos de Jauzein et al. (2017) se estudió por primera vez la asimilación del nitrógeno orgánico por *O. cf. ovata*. En estos estudios se comparó la asimilación entre tres fuentes de nitrógeno (amonio, nitrato y urea) y se observó que, aunque la urea era una buena fuente potencial de nitrógeno orgánico disuelto para las células de *O. cf. ovata*, la mayor afinidad se presentaba para la fuente de amonio seguida por la del nitrato [265]. Esta preferencia de utilización del amonio sobre el nitrito y el nitrato puede ser debida a los procesos que tienen lugar para la fijación del nitrógeno en las células. Mientras que el amonio es convertido en glucosamato (por medio de la glucosamato deshidrogenasa), los nitratos y los nitritos requieren una etapa adicional ya que deben ser reducidos previamente a amonio (por medio de la nitrato y nitrito reductasa) para ser incorporados en la célula [266,267].

3.2. Experimental y resultados

Este capítulo se centra en los estudios realizados para el seguimiento de la proliferación de *O. cf. ovata* en una zona rocosa de Sant Andreu de Llavaneres durante los años 2018–2021. Se ha estudiado tanto la dinámica de la población del dinoflagelado como la concentración de toxinas. Los resultados de los estudios llevados a cabo con estas proliferaciones se muestran en los diferentes artículos de esta Tesis. El Artículo #3 muestra resultados de la proliferación de *O. cf. ovata* ocurrida en el 2018, los Artículos #1 y #4 los del 2019, y finalmente, en el Artículo #5 se muestran los resultados de las proliferaciones que tuvieron lugar durante el 2020 y 2021. Por ello, en este capítulo se discuten de forma transversal todos estos resultados.

Además, se ha llevado a cabo un estudio sobre el crecimiento y producción de toxinas de una cepa de *O. cf. ovata* aislada en la zona de estudio, Sant Andreu de Llavaneres (noroeste del Mar Mediterráneo). Esta cepa se ha hecho crecer en cultivo (experimentos de laboratorio) bajo diferentes condiciones controladas (deficiencia de nitrato y fosfato, y aporte de fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas) y los resultados se presentan en el Artículo #3. En el primer conjunto de experimentos, las condiciones de nitrato y fosfato fueron las mismas que las utilizadas en un estudio anterior realizado por investigadores italianos con una cepa de *O. cf. ovata* del Mar Adriático (cultivo control y cultivos deficientes en nitratos y fosfatos). Se utilizó este diseño con el objetivo de poder comparar nuestros resultados utilizando la cepa del noroeste del Mar Mediterráneo. En el segundo conjunto de experimentos, se cultivó la cepa del noroeste del Mediterráneo (de Sant Andreu de Llavaneres) bajo diferentes fuentes de nitrógeno, incluidos nitrato, amonio, urea y un fertilizante rico en aminoácidos. Este estudio tiene como objetivos principales evaluar el papel de los nutrientes en la producción de toxinas, a la vez que se amplía el conocimiento de los perfiles de toxinas producidos por la cepa de *O. cf. ovata* del noroeste del Mar Mediterráneo y se analiza el contenido de toxina celular durante la proliferación de *Ostreopsis* en el área en estudio.

3.2.1. Parámetros adicionales determinados durante las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata*

Durante el muestreo de las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata*, además de la abundancia celular y de la concentración de toxinas medidos en las muestras de agua de mar o macroalga (explicados en la sección 2.3.1, Capítulo 2), también se han estudiado una serie de parámetros adicionales. A continuación, se detallan los procedimientos llevados a cabo para la determinación de estos parámetros.

- **Nutrientes inorgánicos y orgánicos disueltos.** Entre los nutrientes esenciales para el crecimiento algal, se incluyen los nutrientes inorgánicos disueltos (nitrato, nitrito, fosfato, amonio y silicato) y el nitrógeno y fósforo orgánicos. Para la determinación de estos compuestos se recolectaron muestras de agua de mar (10 mL en tubos de polipropileno) durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. La estimación de la concentración de los nutrientes disueltos en las muestras se realizó siguiendo los protocolos descritos por Grasshoff et al. (1983) [268]. Para ello se llevó a cabo una determinación espectrofluorimétrica (amonio) o espectrofotométrica (nitrato, nitrito, fosfato y silicato) con un Auto Analizador AA3 HR (SEAL-Analytical) para determinar los nutrientes inorgánicos y una determinación espectrofotométrica con un AA3 (SEAL-Analytical) con un módulo integrado para la digestión previa a la determinación de nitrógeno y fósforo totales. Las concentraciones se expresaron en micromoles de nutriente por L (μM).

- **Carbono orgánico total (TOC) disuelto.** Las muestras de agua de mar (30 mL en tubos de polipropileno) para la determinación del TOC se recolectaron durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* y se almacenaron a -20°C hasta su análisis [269]. Para la determinación de la concentración del TOC se llevó a cabo una oxidación catalítica a alta temperatura (680°C) en un analizador TOC-L Shimadzu y utilizando un agua de mar de Referencia (Hansell Laboratory, University of Miami, EE.UU.) durante el proceso de calibración. Las concentraciones se expresaron en micromoles de carbono por L ($\mu\text{M C}$).

- **Clorofila-a (Chl-a) en el agua de mar.** La clorofila es el pigmento que utiliza el fitoplancton para realizar la fotosíntesis y su nivel de concentración en el agua de mar es el indicador por excelencia de la abundancia de fitoplancton en la columna de agua. Para la estimación de la concentración de Chl-a, se recolectaron muestras de agua (10–50 mL) durante las proliferaciones de *O. cf. ovata*. El agua de mar se filtró a través de filtros de fibra de vidrio de $0,7\ \mu\text{m}$ de tamaño equivalente de poro y de 25 mm de diámetro (GF/F, Whatman) que posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Para la determinación de la Chl-a se procedió a la extracción de los filtros con acetona:agua (90:10) durante 24 horas en la oscuridad y a 4°C para evitar fotodegradaciones. La concentración en las diferentes muestras se determinó mediante fluorimetría utilizando un fluorímetro Turner 10-AU (calibración según Holm-Hansen y Riemann; 1978) [270]. Los resultados se expresaron en μg de Chl-a L^{-1} .

- **Temperatura y salinidad.** El muestreo durante la proliferación de *Ostreopsis* se completaba con la medida de la temperatura y la salinidad del agua (conductímetro WTW Modelo LF197).



3.2.2. Artículo #3

Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis cf. ovata*: Field and Laboratory Experiments

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Elena Cerdán-García, Francesc Rubió, Laia Viure, Marta Estrada, Encarnación Moyano, Elisa Berdalet

Toxins **2023**, 15(3), 188



Article

Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis cf. ovata*: Field and Laboratory Experiments

Noemí Inmaculada Medina-Pérez ^{1,2} , Elena Cerdán-García ³ , Francesc Rubió ², Laia Viure ², Marta Estrada ² , Encarnación Moyano ^{1,4} and Elisa Berdalet ^{2,*}

¹ Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

² Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, E-08003 Barcelona, Spain

³ Aix Marseille Université, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288 Marseille, France

⁴ Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Montalegre 6, E-08001 Barcelona, Spain

* Correspondence: berdalet@icm.csic.es

Abstract: This study aimed to improve the understanding of the nutrient modulation of *Ostreopsis cf. ovata* toxin content. During the 2018 natural bloom in the NW Mediterranean, the total toxin content (up to ca. 57.6 ± 7.0 pg toxin cell⁻¹) varied markedly. The highest values often coincided with elevated *O. cf. ovata* cell abundance and with low inorganic nutrient concentrations. The first culture experiment with a strain isolated from that bloom showed that cell toxin content was higher in the stationary than in the exponential phase of the cultures; phosphate- and nitrate-deficient cells exhibited similar cell toxin variability patterns. The second experiment with different conditions of nitrogen concentration and source (nitrate, urea, ammonium, and fertilizer) presented the highest cellular toxin content in the high-nitrogen cultures; among these, urea induced a significantly lower cellular toxin content than the other nutrient sources. Under both high- and low-nitrogen concentrations, cell toxin content was also higher in the stationary than in the exponential phase. The toxin profile of the field and cultured cells included ovatoxin (OVTX) analogues -a to -g and isobaric PLTX (isoPLTX). OVTX-a and -b were dominant while OVTX-f, -g, and isoPLTX contributed less than 1–2%. Overall, the data suggest that although nutrients determine the intensity of the *O. cf. ovata* bloom, the relationship of major nutrient concentrations, sources and stoichiometry with cellular toxin production is not straightforward.

Keywords: *Ostreopsis cf. ovata*; isobaric palytoxin; ovatoxins; nutrients

Key Contribution: The cellular toxin content of an *Ostreopsis cf. ovata* strain isolated from the NW Mediterranean was higher in the stationary than in the exponential or intermediate phases of the cultures. When grown with urea as a nitrogen source, the cellular toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* cultures was lower than when the source was nitrate, ammonium or a commercial fertilizer. The toxin profile of the NW Mediterranean strain included ovatoxins -a to -g and isobaric palytoxin; this toxin analogue never exceeded 2% of the total toxin content.



Citation: Medina-Pérez, N.I.; Cerdán-García, E.; Rubió, F.; Viure, L.; Estrada, M.; Moyano, E.; Berdalet, E. Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis cf. ovata*: Field and Laboratory Experiments. *Toxins* **2023**, *15*, 188. <https://doi.org/10.3390/toxins15030188>

Received: 9 January 2023

Revised: 27 February 2023

Accepted: 28 February 2023

Published: 2 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The biogeographic distribution of some harmful species of the benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* seems to be expanding from tropical to temperate waters, and recurrent blooms have been reported in certain beaches of the Mediterranean Sea since the end of the 20th century [1]. Impacts on marine fauna associated with *Ostreopsis* spp. blooms have been documented [2,3], and ecotoxicology studies are underway to elucidate the essential noxious mechanisms involved [4,5]. Palytoxin (PLTX) analogues (namely, putative or

isobaric PLTX (isoPLTX) and ovatoxins (OVTXs) synthesized by *Ostreopsis* species have been associated with sporadic but dramatic seafood-borne poisonings in the tropics [6–8] and, most commonly, with cutaneous and respiratory irritations in users of temperate beaches [9–11]. While a direct link between the toxic compounds and human health problems has not yet been clearly demonstrated [8], the recurrent *Ostreopsis* spp. blooms seem to be the most plausible cause of the respiratory diseases reported in certain beaches [12–14]. This fact, along with the detection of OVTXs and isoPLTXs in some marine fauna of the Mediterranean Sea [15–18], has encouraged active monitoring to prevent impacts on the health of beach users as well as intensive research to elucidate the factors influencing the blooms and toxicity of *Ostreopsis* [19,20].

On the Mediterranean coasts, *Ostreopsis* cf. *ovata* is the most abundant and bloom-prone species of the genus. Recurrent seasonal blooms of cells attached to biotic and abiotic benthic surfaces by a self-produced mucopolysaccharide substance occur during the summer (in the NW Mediterranean) and fall (in the Adriatic) seasons [21–25] in shallow, well-illuminated, and relatively sheltered waters. As part of the life cycle, in combination with a certain degree of water turbulence, cell aggregates are released from the benthos and float [26]. As in most natural events, different environmental factors are involved in the dynamics of *Ostreopsis* blooms, but a combination of temperature, water motion [27,28], and nutrients [29] appears to be the key players. Some studies also suggest that *O. cf. ovata* can grow in habitats subjected to anthropic pressures, including eutrophic waters [25,30,31]. Although a direct link with high nutrient concentrations has not yet been clearly demonstrated [3,25,28], in the bloom-affected areas, the presence of dense macroalgal carpets and high epiphytic microalgal cell densities are indicators of such nutrient availability.

It is widely recognized that the concentration of essential nutrients (i.e., nitrogen (N), phosphorus (P), silicate (Si)) and their ratios play a major role in the occurrence of high-biomass harmful algal blooms (HABs) [32–34]. However, how nutrients modulate toxin production is a complex, not very well understood process [35–39]. In a thorough revision of the available literature data, Van de Waal et al. (2014) found that N or P limitation promoted an increased cell quota of carbon-rich toxins (e.g., brevetoxin, karlotoxin) [39]. In that study, data on PLTX analogues, characterized by high molecular weight and carbon content, were not available. However, a more recent conceptual model by Pinna et al. (2015) suggested that the toxins produced by *O. cf. ovata* could increase under N- and P-limitation [40]. This model was based on the strong influence of the internal carbon (C) to N or P ratios (C:N or C:P, respectively) on toxin biosynthesis. Indeed, several studies with batch cultures of *O. cf. ovata* in the laboratory showed that cellular toxin content increased steadily from the exponential to the stationary phase, when nutrients become depleted [37,41–43]. Moreover, Vidyarthna and Granéli (2013) observed significantly higher toxicity (measured as hemolytic activity) in cultures grown in N-deficient conditions (N:P = 1.6) [44]. However, Vanucci et al. (2012) found that *O. cf. ovata* cells in the stationary phase of cultures grown under N and P-deficient conditions had, respectively, 53% and 40% lower toxin content than those in the same phase of nutrient-replete cultures [37]. These apparently contradictory results may be due to factors such as the different *O. cf. ovata* strains studied and the various experimental designs and toxin analytical methods used, as noted by the aforementioned studies. In this context, Pezzolesi et al. (2016) pointed out that the variability in toxicity and growth dynamics observed in blooms from different coastal areas could be due to the different regimes of nutrient supply [43]. This overall situation indicates the need to further investigate how nutrient conditions relate to cellular toxin content during natural *Ostreopsis* blooms and to explore the responses of different *Ostreopsis* strains.

With this aim, the present study examined in detail the variability and profile of the toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* in the field and in cultures grown under different nutrient conditions. First, a natural bloom in the NW Mediterranean was monitored in 2018. Determinations of nutrient concentrations in the seawater and of the toxin content of

the cells were conducted. In addition, a strain isolated from this bloom was used to perform experiments to investigate how nutrient conditions (including different concentrations of P and inorganic and organic forms of N) might affect its growth and toxin content. In the first series of experiments, the nitrate and phosphate conditions were the same as those used by Vanucci et al. (2012) with an *O. cf. ovata* strain isolated from the Adriatic Sea [37], with the aim to facilitate the comparison between the two studies. In the second series of experiments, the NW Mediterranean strain was grown on a variety of N sources, namely, nitrate, ammonium, urea, and a commercialized fertilizer rich in amino acids. This fourth treatment was included because high organic N concentrations, likely originating from agricultural activity and wastewater, were found in the seawater at the study site. The objectives of the present study are twofold: (1) to increase the knowledge of the toxin profiles in different *O. cf. ovata* strains from the Mediterranean Sea [45] and the role of nutrients in toxin production and (2) to estimate the toxin content in an area affected by recurrent *Ostreopsis* blooms and the subsequent potential risk of toxin transfer through the food web, ultimately affecting humans.

2. Results

2.1. *Ostreopsis cf. ovata* Bloom 2018

Taking as reference the epiphytic concentrations of *Ostreopsis cf. ovata* (Figure 1a), the bloom started at the end of June 2018 and developed exponentially through July with a peak (up to ca. 2×10^6 cells gFW⁻¹) between July 24th and August 1st. Thereafter, the bloom entered a stationary phase until mid-September, with oscillations in cell numbers, reaching some high values in the 1×10^5 – 8×10^5 cells gFW⁻¹ range. The bloom decreased progressively in autumn. The highest *O. cf. ovata* concentrations (around 10^5 cells L⁻¹) in the plankton samples (not shown) coincided with the highest abundances of the epiphytic cells. In the water, high nitrate (22.1–52.3 μM) and ammonium (2.8 μM) concentrations (Figure 1b and Figure 1c, respectively) were found at the initial stage of the bloom and gradually decreased thereafter, with organic N levels remaining between 8.4 and 12.3 μM throughout the bloom (Figure 1b). Concentrations of phosphate (Figure 1c) and organic P (not shown) did not exceed 0.11 μM and 0.23 μM, respectively, throughout the whole sampling period. The resulting N:P ratios, considering the inorganic and organic forms, were mostly above 16.8, i.e., higher than the Redfield ratio. Total organic carbon (TOC) fluctuated throughout the bloom (between 78.0 and 123.6 μM, Figure 1d), resulting in C:N ratios always below 11.

The total cell toxin content of the epiphytic *O. cf. ovata* population was below detection at the start and the end of the samplings and fluctuated between 12.2 and 64.7 pg_{tox} cell⁻¹ throughout the proliferation (Figure 1a) with several concentration peaks during the exponential, early, and late stationary phases of the bloom.

The total toxin content in the macroalgal surface covered by the epiphytic population (expressed as μg total toxin gFW⁻¹) increased in parallel ($r = 0.78$) to the *O. cf. ovata* cell concentration (expressed as cells gFW⁻¹).

The statistical relationships among toxin content, cell abundance, and environmental variables were explored by means of correlation coefficients (Figure S1). Although the results must be interpreted with caution, given the reduced number of data points, some patterns stand out. The toxin content per cell was significantly negatively correlated with inorganic nutrient concentrations, in particular those of silicate and nitrate, and positively correlated with the ratio between inorganic N and P (N inorg/P inorg), temperature, and the logarithm of cell abundance. Concerning this last variable, it must be noted that, since cell abundance appears as a denominator in the calculation of toxin content per cell, the null hypothesis would be a negative rather than a null correlation; in our case, the relationship was positive. No link was observed between TOC (total organic carbon) and the cell toxin content.

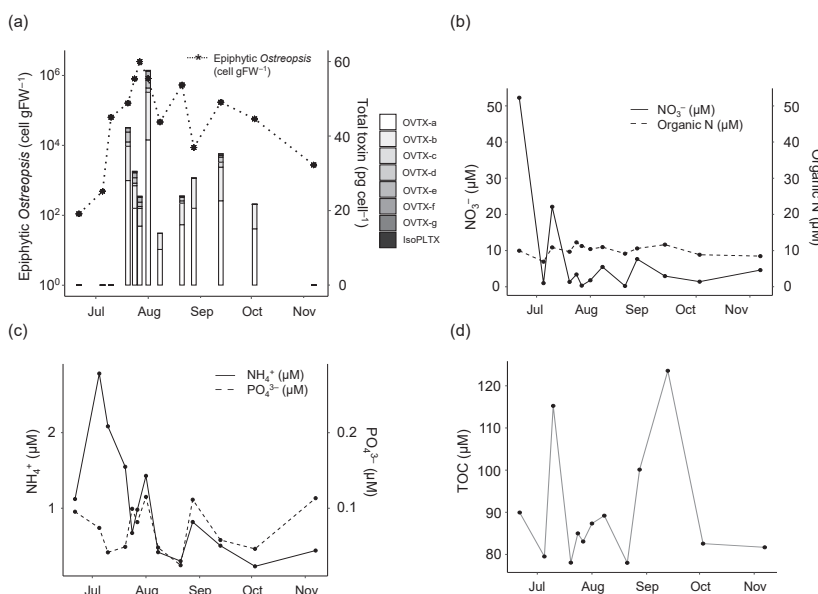


Figure 1. *Ostreopsis cf. ovata* 2018 bloom. (a) *Ostreopsis* epiphytic cell abundance per gram of macroalgal fresh weight (line, cell gFW⁻¹) and cellular concentration of the different toxin analogues (OVTX-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, and isoPLTX) detected (bars, pg_{tox} cell⁻¹). Small horizontal lines at the first three and the last sampling days indicate toxin levels below detection. (b–d) Main nutrient concentrations (expressed in μM): (b) Nitrate (NO₃⁻) and organic Nitrogen; (c) Ammonia (NH₄⁺) and Phosphate (PO₄³⁻); (d) Total Organic Carbon (TOC).

Concerning the toxin analogues detected in the *O. cf. ovata* bloom (Figure 2), OVTX-a and -b were present in all the samples between July 20th and October 3rd with concentrations ranging from 8.7 to 34.0 and from 3.5 to 14.1 pg_{tox} cell⁻¹, respectively (Figure 2a). OVTX-c, -d, and -e appeared between July 20th and September 13th (except on August 8th and 28th) with concentrations up to 3.1 pg_{tox} cell⁻¹ (Figure 2b,c). OVTX-f and -g were detected only on July 24th and 27th, with concentrations between 0.21 and 0.38 pg_{tox} cell⁻¹ (Figure 2c). Finally, isoPLTX was detected only between July 24th and August 1st, i.e., during the last period of the exponential phase of the bloom, with concentrations between 0.17 and 0.34 pg_{tox} cell⁻¹ (Figure 2e). The toxin profile (Figure 3a, Table S1) showed the dominance of OVTX-a as the most abundant toxin analogue, accounting for ca. 64–72% of the total content, followed by OVTX-b which represented 20–33% of total toxin abundance. OVTX-d was the third most abundant analogue, contributing less than 7%, followed by OVTX-c and -e, with a contribution of 1–6%. Note that these three analogues, OVTX-c, -d, and -e, were absent on three sampling days while OVTX-f, -g, and isoPLTX were detected in two or three samples and accounted for less than 2% of the toxin content.

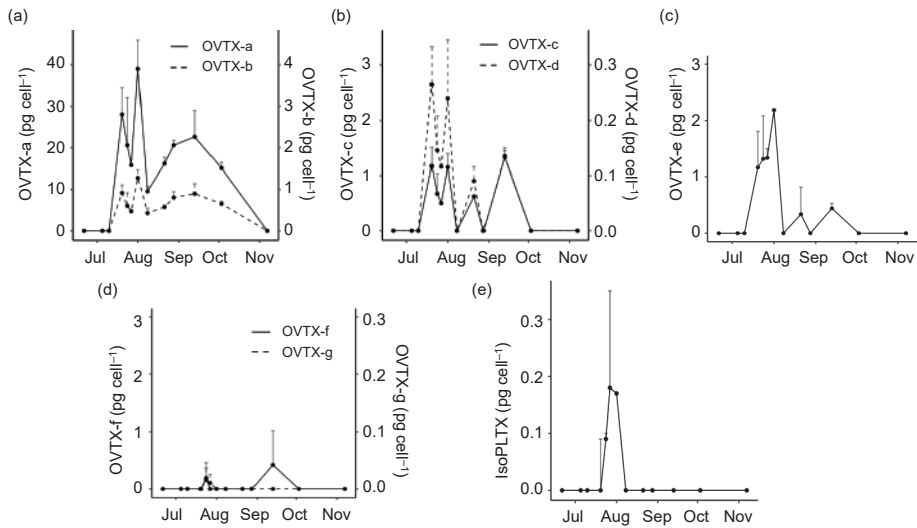


Figure 2. Cell concentration (average + standard deviation) of the different PLTX analogues ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$) throughout the *Ostreopsis* 2018 bloom. (a) OVTX-a and OVTX-b, (b) OVTX-c and OVTX-d, (c) OVTX-e, (d) OVTX-f and OVTX-g, (e) isoPLTX.

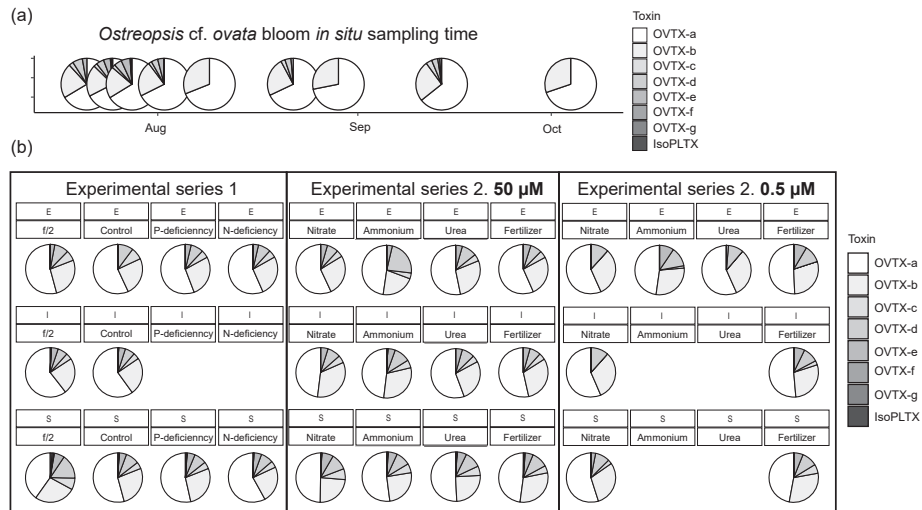


Figure 3. Pie charts of the toxin profiles of the samples collected (a) in the field throughout the *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2018 (each pie corresponds to the dot plot in Figures 1 and 2) and (b) in the first and second series of experiments (E, I, and S indicate the Exponential, Intermediate, and Stationary phases of the growth phase of the cultures from which the samples were taken, as indicated in Table S2). All profile data are presented in Table S1.



2.2. Experimental Series 1: Comparing the Responses of the NW Mediterranean and the Adriatic *Ostreopsis cf. ovata* Strains to P and N Deficiency

Under f/2, control, and P-deficiency conditions, *O. cf. ovata* cultures (strain OOBM18) grew exponentially until day 7, while in the N-deficiency treatment, the exponential phase lasted only until day 4 (Figure 4a). Later, all cultures entered the stationary phase. The exponential growth rate (d^{-1}) and the maximum cell yield (cells mL^{-1}) were different in each treatment (Table 1). The highest growth rate was estimated in the f/2 treatment ($0.39 d^{-1}$), followed by the control and the P-deficiency ones ($0.32 d^{-1}$), with the lowest rates measured in the N-deficiency medium ($0.17 d^{-1}$). The maximum cell yield was obtained in the f/2 medium, while the lowest was found in the N-deficiency treatment. Compared to the Adriatic strain (Figure 4b, Table 1), the NW Mediterranean *O. cf. ovata* strain had a lower growth rate and cell yield in the control and the N-deficiency media and similar values in the P-deficiency one.

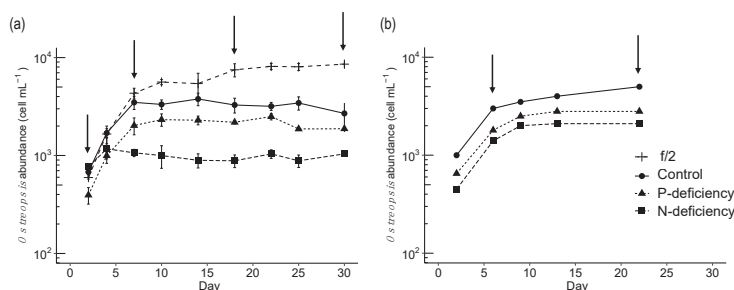


Figure 4. Experimental series 1. (a) Growth curves of the *Ostreopsis cf. ovata* strain from the NW Mediterranean under the different nutrient conditions in the first series of experiments of this study. Vertical bars indicate the standard deviation of the cell numbers, n = 2. Arrows point at the day when toxin content was estimated (see Figure 5). (b) Growth curves of the *O. cf. ovata* strain from the Adriatic Sea (redrawn from Figure 2 in [37]).

Table 1. Nutrient conditions in the different treatments, including the initial nitrate and phosphate concentrations of each culture medium and the corresponding N:P ratios. Summary of the growth characteristics of *O. cf. ovata* in each treatment, including growth rate (μ, d^{-1}), maximum cell yield (average of the cell concentrations in all the samples obtained during the stationary growth phase of each culture), biovolume ($\mu m^3 cell^{-1}$, average \pm standard deviation of the cell size measurements estimated during the experiments as described in Section 5.2 and Figure S2), and total toxin concentration per cell (average \pm standard deviation of all samples analyzed per treatment).

Treatment	N Source (μM)	P Source (μM)	N:P	Growth Rate (μ, d^{-1})	Maximum Yield (cell mL^{-1})	Biovolume (μm^3)	Cell Toxin Content ($pg_{tox} cell^{-1}$)
Series 1. Comparing the responses of the NW Mediterranean and the Adriatic strains to P and N deficiency							
f/2	883	36.3	24	0.39	8058 \pm 873	18,019 \pm 8704	104 \pm 43
Control	105	6.56	16	0.32	3299 \pm 578	31,546 \pm 9252	153 \pm 91
Control ([37])	105	6.56	16	0.39	5000	30,000 \pm 25,000	25 \pm 4
P deficiency	105	1.14	92	0.32	2118 \pm 321	32,105 \pm 13,013	140 \pm 50
P deficiency ([37])	105	1.14	92	0.30	2800	30,000 \pm 25,000	15 \pm 3
N deficiency	30	6.56	5	0.17	935 \pm 166	30,185 \pm 9551	175 \pm 62
N deficiency ([37])	30	6.56	5	0.23	2100	27,000 \pm 15,000	13 \pm 2

Table 1. Cont.

Treatment	N Source (μM)	P Source (μM)	N:P	Growth Rate (μ, d ⁻¹)	Maximum Yield (cell mL ⁻¹)	Biovolume (μm ³)	Cell Toxin Content (pg _{tox} cell ⁻¹)
Series 2. Exploring the use of different inorganic and organic N sources at two different concentration levels							
Nitrate 50 μM	50	7.26	6.87	0.44	2950 ± 524	14,718 ± 9705	22 ± 9
Ammonium 50 μM	50	7.26	6.87	0.49	3074 ± 591	14,861 ± 10,384	24 ± 15
Urea 50 μM	50	7.26	6.87	0.53	4549 ± 1437	8326 ± 8317	11 ± 8
Fertilizer 50 μM	50	7.26	6.87	0.34	1285 ± 196	11,888 ± 7053	21 ± 10
Nitrate 0.5 μM	0.5	7.26	0.07	0.15	267 ± 10	9640 ± 6577	11 ± 2
Ammonium 0.5 μM	0.5	7.26	0.07	0.09	460 ± 75	7522 ± 5188	7 ± 1
Urea 0.5 μM	0.5	7.26	0.07	0.08	287 ± 24	8850 ± 5603	11 ± 3
Fertilizer 0.5 μM	0.5	7.26	0.07	0.15	604 ± 122	9243 ± 7088	9 ± 1

As revealed by plotting the cell numbers that described the growth curves (Figure 4a), samplings for toxin and biovolume determination were conducted during different culture phases, i.e., exponential, intermediate, and stationary, which varied among treatments. This resulted in a different number of samples obtained per growth phase in the different treatments (Table S2). Note that the comparison among treatments is made considering the physiological growth phase and not the sampling day.

In general, *O. cf. ovata* cells had the typical drop shape of the species during the exponential growth phase, when cells divide fast, and became round and aberrant (cyst-like forms) in the stationary phase, especially under P or N deficiency (not shown). In all the treatments, cell size parameters (dorsoventral (DV) and cell width (W)) showed a wide range of values, which always exhibited a unimodal distribution (DV median data in Table S3). Within each treatment, DV and biovolume (Table 1) did not show marked differences between the different culture phases. Among treatments, there were also no noticeable differences in DV and biovolume, except for the f/2 culture, with lower cell size and biovolume parameters than the other culture media.

Total cell toxin content increased from the exponential to the stationary phase in all the treatments (Figure 5a). Overall, on a per-cell basis, under the f/2 high-nutrient condition, cells showed less toxin content (104 ± 43 pg_{tox} cell⁻¹) than in the P-deficiency or N-deficiency treatments (Table 1). The control treatment gave the lowest average toxin content per cell in the exponential phase but presented similar values to the others in the stationary phase (Figure 5). An analysis of variance of toxin content per cell (after log transformation) with treatment (f/2, control, P-def, and N-def) and culture phase (exponential or stationary) as factors gave significant results for both ($p < 0.0001$ and $p < 0.0005$, respectively), with higher overall toxin content in the stationary than in the exponential phase. During the exponential phase, P-def and N-def presented significantly higher toxin content than the f/2 and control treatments.

Toxin analogues OVTX-a, -b, -c, -d, and -e were detected in most phases (Figure 5b–f) while OVTX-f and -g were only identified in the stationary period (Figure 5g–h) with cell toxin concentrations up to 1.0 and 2.1 pg_{tox} cell⁻¹, respectively. IsoPLTX was detected in the stationary phase of all treatments and in the intermediate phase of the f/2 and control treatments, with estimated toxin concentrations up to 2.1 pg_{tox} cell⁻¹ (Figure 5i). With respect to biovolume, the toxin concentrations were 6.4 ± 5.7 fg μm⁻³ in the f/2 medium, 4.3 ± 4.0 fg μm⁻³ in the control, 5.2 ± 5.3 fg μm⁻³ in the P-deficiency, and 5.4 ± 3.0 fg μm⁻³ in the N-deficiency treatments, respectively (not shown).

Strain comparison experiments

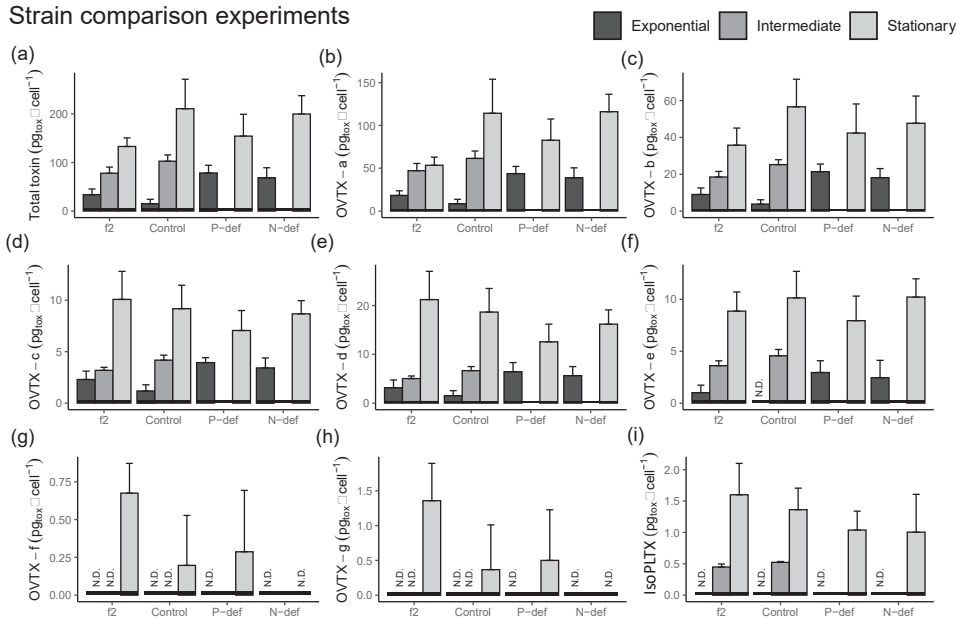


Figure 5. Experimental series 1. Toxin concentrations per cell ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$) of the *O. cf. ovata* cells grown in f/2, control, and P- and N-deficiency cultures in the present study. (a) Total toxin (sum of all analogues); (b–h) OVTX-a to -g. (i) IsoPLTX. The three culture phases (identified in Figure 4 and with samples listed in supplementary Table S2) are represented by bars in each treatment: Exponential (black), Intermediate (gray), and Stationary (light gray). N.D.: toxins not detected, i.e., below the detection limit. Vertical bars indicate the standard deviation; n varied as indicated in supplementary Table S1b. Note: There was no intermediate phase in either the P-def or N-def treatments.

2.3. Experimental Series 2: Exploring the Effect of Different Inorganic and Organic N Sources at Two Different Concentration Levels on *Ostreopsis cf. ovata* Growth and Toxin Content

In the 50 μM N concentration series, the highest exponential growth rate (0.53 d^{-1}) and cell yield ($4549 \pm 1437 \text{ cell mL}^{-1}$) were measured in the cultures using urea as a N source (Table 1, Figure 6a). Slightly lower values were found in the cultures grown on ammonium (0.49 d^{-1} ; $3074 \pm 591 \text{ cell mL}^{-1}$), nitrate (0.44 d^{-1} ; $2950 \pm 524 \text{ cell mL}^{-1}$), and fertilizer as N sources (0.34 d^{-1} ; $1285 \pm 196 \text{ cell mL}^{-1}$). Due to the low cell densities attained in the 0.5 μM N treatment series, the experiments lasted 7 days only and showed a poorly defined growth curve (Figure 6b). In consequence, in these treatments, the terms “growth rate” and “cell yield” (Table 1) should be considered as an approximation. The highest growth rate and cell yield were observed in the cultures with fertilizer (0.15 d^{-1} , exponential growth on days 0–4, $604 \pm 122 \text{ cell mL}^{-1}$) and ammonium (0.09 d^{-1} , exponential growth on days 0–7, $460 \pm 75 \text{ cell mL}^{-1}$). In the nitrate and urea media, after an initial decrease in cell abundance, a small exponential growth phase occurred (0.15 d^{-1} , days 2–4; 0.08 d^{-1} , days 4–7, respectively), but cell yield was poor (less than 300 cell mL^{-1}). Overall, the growth rates and the cell yields in the 0.5 μM series were 3- to 4- and 10-fold lower than in the 50 μM N series, respectively.

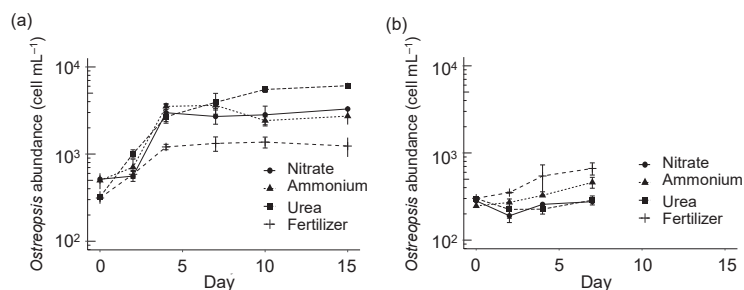


Figure 6. Experimental series 2. Growth curves of *Ostreopsis cf. ovata* in different N sources at (a) 50 μM and (b) 0.5 μM . Vertical bars indicate the standard deviation ($n = 3$ in (a), $n = 2$ in (b)). Note the shorter duration of the 0.5 μM series due to the scarcity of biomass.

As in the first series of experiments (Section 2.2), the cells exhibited a high diversity of cell sizes and forms. In this second series, no relevant temporal differences in biovolume (Table 1) or DV values (Table S3) were found within treatments. Overall, the cells in the 0.5 μM N series were smaller than in the 50 μM N series, and these, in turn, were smaller than in experimental series 1 (Section 2.2). Cultures grown on 50 μM urea had the smallest biovolume range and average values compared to the other 50 μM treatments.

In both the 50 μM and 0.5 μM series of experiments, total toxin content showed a similar temporal trend when expressed either per biovolume (not shown) or per cell (Figures 7 and 8). In the 50 μM N series, the total toxin content (Figure 7a) was lower in the exponential than in the stationary phase with concentrations in the latter up to 32.2 ± 15.1 pg cell^{-1} in the ammonium treatment, followed by the nitrate (27.3 ± 4.9 pg cell^{-1}), fertilizer (26.3 ± 8.9 pg cell^{-1}), and urea (15.4 ± 6.8 pg cell^{-1}) ones. OVTX-a to -e were detected in the three different phases and treatments with concentrations between 0.18 and 29.3 pg cell^{-1} (Figure 7b–f), while OVTX-f and -g were only detected in the stationary period (Figure 7g–h) with estimated cell toxin concentrations between 0.04 and 0.22 pg cell^{-1} . IsoPLTX was detected in the stationary phase of all treatments and in the intermediate phase of the ammonium medium with the estimated cell toxin content up to 0.32 pg cell^{-1} (Figure 7i). In the 0.5 μM N series, the total toxin content (Figure 8a) showed minor variations throughout the sampled days, with a slight increasing trend in the nitrate and fertilizer treatments over time and with estimated cell toxin concentrations between 5.4 and 15.5 pg cell^{-1} , 3- to 4-fold less than in the 50 μM series. OVTX-a and -b were detected with levels up to 8.1 pg cell^{-1} (Figure 8b–c), while OVTX-c, -d, and -e were detected with cell concentrations up to 1.5 pg cell^{-1} (Figure 8d–f). OVTX-f, -g, and isoPLTX were not detected in any of the 0.5 μM N series samples. An analysis of variance with high (50 μM) or low (0.5 μM) nitrogen levels, two nutrient sources (nitrate and fertilizer; urea and ammonium were excluded from this analysis because their samples were only from the exponential phase), and culture phases (exponential, intermediate, and stationary) as factors, gave significant results for nutrient level and phase ($p < 0.0001$) but not for nutrient source. A post hoc Tukey test corroborated the significantly higher toxin content per cell in the 50 μM group ($p < 0.0001$) and indicated that toxin content was highest in the stationary phase and lowest in the intermediate one ($p < 0.05$). An additional analysis of variance performed for the high-nutrient-level group, with four nutrient sources (nitrate, urea, ammonium, fertilizer) and culture phases (exponential, intermediate, or stationary), was significant for both factors ($p < 0.0001$), with the toxin content highest in the stationary phase and lowest in the intermediate one and urea leading to less toxin content per cell than the other nutrient sources (post hoc Tukey tests, $p < 0.05$).

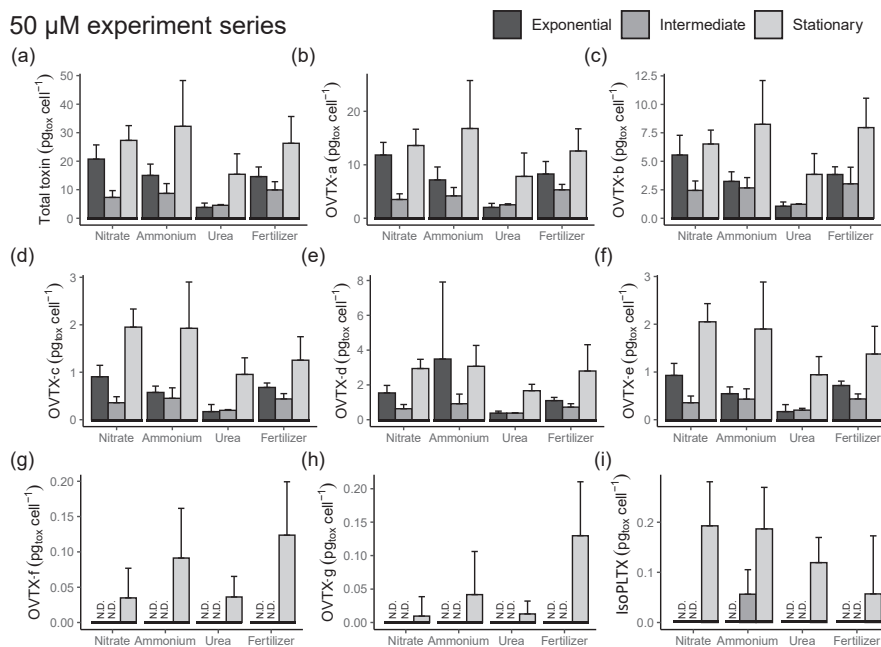


Figure 7. Experimental series 2. Toxin concentrations of *O. cf. ovata* cells grown on different N sources at 50 μM ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$). (a) Total cellular toxin content per cell, (b) OVTX-a, (c) OVTX-b, (d) OVTX-c, (e) OVTX-d, (f) OVTX-e, (g) OVTX-f, (h) OVTX-g, (i) IsoPLTX. N.D. indicates that the toxin levels were below detection. Vertical bars indicate the standard deviation; n varied as indicated in supplementary Table S1b.

The average total toxin concentrations expressed per biovolume in the 50 μM treatment series were $2.3 \pm 2.2 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ in the nitrate, $1.9 \pm 1.5 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ in the urea, $2.5 \pm 3.3 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ in the ammonium, and $2.5 \pm 2.4 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$ in the fertilizer cultures. In the 0.5 μM treatment series, the results were $1.5 \pm 0.7 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$, $1.7 \pm 1.0 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$, $1.4 \pm 1.0 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$, and $1.5 \pm 0.9 \text{ fg } \mu\text{m}^{-3}$, respectively, in the nitrate, urea, ammonium, and fertilizer media (data not shown).

Taken globally (Figure 3b, Table S1b), in the series 2 experiments, OVTX-a was the most abundant analogue, accounting for 30 to 64% of the total toxin content, followed by OVTX-b, which contributed ca. 16–36%. OVTX-d was the third most abundant analogue, accounting for ca. 7 to 16% of the total toxin content. OVTX-c and -e contributed with 3–12% in all cultures with lower values in the case of the OVTX-c in the 0.5 μM tests. OVTX-f and -g contributed to less than 0.8% in all samples but were not detected in the 0.5 μM N series.

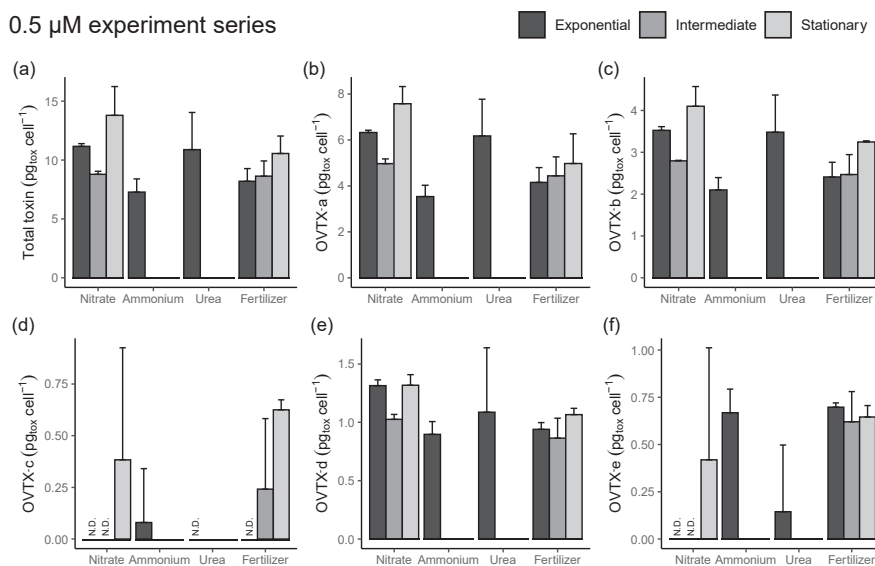


Figure 8. Experimental series 2. Toxin concentrations of *O. cf. ovata* cells grown on different N sources at 0.5 μM ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$). (a) Total cellular toxin content per cell, (b) OVTX-a, (c) OVTX-b, (d) OVTX-c, (e) OVTX-d, (f) OVTX-e. N.D. indicates that the toxin levels were below detection. Vertical bars indicate the standard deviation; n varied as indicated in supplementary Table S1b. Note: In the ammonium and urea 0.5 μM treatments, the intermediate and stationary phases were not reached.

3. Discussion

The general aim of the present study was to increase understanding on whether, and if so, how, nutrient conditions can modulate toxin production during natural *Ostreopsis* blooms. To do this, the proliferation of *O. cf. ovata* in a hot spot in the NW Mediterranean was monitored in 2018. Overall, as shown by Figures 1 and 2 and by the relationships presented in Figure S1, increases in the toxin content per cell coincided with the consumption of the major inorganic nutrients and with increases in temperature and cell abundance. Interestingly, silicate was the nutrient exhibiting the strongest (negative) correlation with toxin content; however, this relationship should not be interpreted as an indication of direct effects but rather as a reflection of the general changes in the coastal ecosystem that accompany the development of the *Ostreopsis* bloom throughout the summer season. The positive correlation of toxin content per cell with cell abundance and the negative relationship with nutrient availability agree with the experimental findings (see below) of higher toxin content per cell in the stationary phase of the cultures.

We also found that toxin concentration was negatively correlated with the ratio N inorg/P inorg (Figure S1). Variations in the inorganic nutrient ratio have often been linked to changes in cell toxicity [29]. However, it is difficult to disentangle the influence of the various factors in the field.

Temperature has been shown to be a key factor in the proliferation of *O. cf. ovata* in temperate waters [28,46,47], but the effect of temperature on toxin production is not fully understood, due to the few available data and inconsistencies in the results obtained [48,49]. In our field study, the positive correlation of toxin content per cell with temperature could

reflect the seasonal increase in temperature throughout the period of bloom development, potentially in combination with some direct effect on toxin production.

A strain isolated from the 2018 bloom was used in laboratory experiments under different nutrient-controlled conditions. The experiments included, on the one hand, a design similar to that described by Vanucci et al. (2012), using an *O. cf. ovata* strain isolated from the Adriatic Sea, in order to allow, as far as possible, a comparison between strains. On the other hand, the response of the NW Mediterranean *O. cf. ovata* strain was studied in detail in a series of experiments using inorganic and organic nutrient concentrations within the range found during the natural bloom. Although multiple combinations of nutrients occur in nature, only some possibilities were considered here. The discussion of the study will first begin by analyzing the experimental results. With the insight obtained, a final discussion focused on natural blooms will be presented.

3.1. Comparing the Responses of the NW Mediterranean and the Adriatic Strains to P and N Deficiency: Cell Growth, Cell Size, and Toxin Content in Experimental Series 1

As expected, the *Ostreopsis cf. ovata* strain OOBM18 isolated from the 2018 bloom in the NW Mediterranean exhibited optimal growth in the high-nutrient conditions of the f/2 medium, which presented the highest growth rate and maximum cell yield among all treatments (Table 1). However, although the f/2 medium had eight times more N and five times more P than the control medium, the cell yield in f/2 was only 2.4-fold higher than in the control. This fact suggests that the growth of this strain in f/2 may be limited by other elements and will not only depend on the absolute levels of nitrate and phosphate.

The OOBM18 strain, growing in experimental series 1 under the same conditions (control, P and N deficiency, Table 1) used by Vanucci et al. (2012) [37] for the Adriatic strain, exhibited similar growth patterns but differed on the biovolume and cell toxin content responses to nutrient availability.

The two strains showed the same trends of exponential growth rate and maximum cell yield related to the nutrient conditions. Overall, the results indicate that the *O. cf. ovata* cell growth was affected more severely by N than by P deficiency, in agreement also with Vidyaratna and Granéli (2010) and Accoroni et al. (2015) [29,50].

In contrast, the response of the two strains in terms of cell size was different. While the cell volume of the Adriatic strain increased throughout the growth curve under P deficiency (Vanucci et al. 2012) [37], no significant differences in biovolume were observed within the exponential, intermediate, and stationary phases of each particular treatment in experimental series 1 and 2 conducted here with the OOBM18 strain (Table S3). In addition, the OOBM18 cell size distribution was always unimodal, and no size class distinction could be made, in contrast with the Adriatic strain in Vanucci et al. (2012) and other field and laboratory studies where distinct small and large cell populations, likely with different reproductive capacity, had been observed [37,51]. This finding, obtained in all treatments, including those in experimental series 1 (Table 1) using the culture media tested in Vanucci et al. (2012) [37], could indicate certain physiological differences between strains. In any case, the OOBM18 *O. cf. ovata* strain presented a great variety of cell sizes and shapes also documented in the strains isolated in 2009 from the same beach of Sant Andreu de Llavaneres, Lopud bay (Croatia) [51], and North Aegean coasts (Table 2) [52]. In addition, the values of the morphometric parameters of the OOBM18 *O. cf. ovata* under the different experimental conditions and growth culture phases (details of DV and W presented in Table S3) fell within the range found in other studies (Table 2).

Table 2. Morphometric characteristics of *Ostreopsis cf. ovata* taken from different references. Nd, no data; DV, dorsoventral diameter (length); W, width; AP, anteroposterior diameter (height); DV/AP, mean values.

DV (μm)	W (μm)	DV/AP	Sample Type	Reference
55–72	35–50	nd	Natural population from the French Atlantic Coast	[53]
14–62	14–44	nd	Cultures from natural population in NW Spain (Catalonia)	[54]
21–77	16–51	nd	Natural population from the NW Mediterranean Sea	[55]
19–75	13–60	2.31 \pm 0.37	Natural population from the NE Adriatic Sea	[56]
24–85	17–65	nd	Cultures from natural population in NE Spain and Croatia	[51]
24–87	13–53	nd	Natural population from NE Spain and Croatia	[51]
29–68	17–46	nd	Cultures from natural population from the NW Adriatic Sea	[37]
40–65	18–45	nd	Natural population from Brazil (Rio de Janeiro)	[57]
48–65	31–46	nd	Natural population from the NW Adriatic Sea	[58]
28–76	18–51	nd	Cultures from natural population in the Adriatic Sea	[41]
22–59	14–44	nd	Cultures from natural population in the Tyrrhenian Sea	[41]
36–60	24–45	3.1	Natural population from the sea in Japan	[59]
30–71	18–53	2.4 \pm 0.4	Natural population from the NW Adriatic Sea	[60]
26–62	13–48	14–36	Natural population from North Aegean Sea, Greece	[61]
19–60	17–52	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: f/2 23 °C	Present experiment
33–69	24–55	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Control 23 °C	Present experiment
39–71	25–61	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: P deficiency 23 °C	Present experiment
27–68	28–62	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: N deficiency 23 °C	Present experiment
24–69	14–56	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Nitrate 50 μM	Present experiment
20–68	12–56	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Ammonium 50 μM	Present experiment
24–58	14–48	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Urea 50 μM	Present experiment
21–60	13–48	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Fertilizer 50 μM	Present experiment
28–60	15–52	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Nitrate 0.5 μM	Present experiment
17–57	11–43	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Ammonium 0.5 μM	Present experiment
21–55	15–47	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Urea 0.5 μM	Present experiment
19–64	11–57	nd	Cultures from natural population in the NW Mediterranean Sea: Fertilizer 0.5 μM	Present experiment

The total cellular concentration of toxins in the OOBM18 strain increased from the exponential to the stationary phase (expressed as toxins per cell or biovolume) in experimental series 1, as found in Vanucci et al. (2012) and other studies [41–43]. In general, the different analogues also increased from the exponential to stationary phase, although some of them (OVTX-e, -f, -g, and isoPLTX) were not detected at the beginning of the experiments when the cell abundance was low. Although toxins are generally considered to constitute a variety of secondary metabolites that tend to accumulate as growth slows or ceases [62], it cannot be concluded that OVTX-e, -f, -g, and isoPLTX were absent during the exponential phase. Their concentration could have been below detection level due to the low biomass of the cultures at the beginning of the experiment. More studies should be conducted to explore this question.

Unexpectedly, the f/2 treatment, with higher nutrient availability, showed lower total toxin content per cell than the control treatment in the stationary phase. In addition, the trends observed in the control vs. P- and N-deficiency treatments in series 1 were markedly

different from the results obtained by Vanucci et al. (2012) [37]. While that study on an Adriatic strain reported a 40% and 53% decrease in cell toxin content under P and N deficiency, respectively, compared to the control treatment, we found a higher toxin content in the exponential (but not in the stationary) phase of the P- and N-deficiency treatments of the NW Mediterranean OOBM18 strain experiments. The present results agree with those reported for several harmful flagellates, which increased their cell toxin content mainly under P deficiency, e.g., *Prymnesium parvum* [63], *Chrysochromulina polylepis* [64], *Protoceratium reticulatum* [65], *Gambierdiscus toxicus* [66], or *Prorocentrum lima* [67,68]. Thus, from experimental series 1, it can be concluded that the different *O. cf. ovata* strains exhibit different responses to nutrient conditions, a finding that highlights the complexity of understanding the underlying processes and the difficulties involved in experimental approaches that attempt to mimic nature.

3.2. Use of Different Inorganic and Organic N Sources at Two Different Concentration Levels in Experimental Series 2

The 0.5 μM N concentration in these experiments, chosen to match the low N levels estimated in the natural seawater throughout the natural bloom, was too low to support sufficient culture growth and did not allow for clear conclusions. In the 50 μM N treatments, the experiments revealed a similar growth of *Ostreopsis cf. ovata* in urea, ammonium, and nitrate, while the amino acid-rich fertilizer resulted in lower growth. The toxin content was highest in the stationary phase, as found in the series 1 experiment, and was curiously lower in the intermediate than in the exponential one; the reason for this latter observation is unclear. Overall, the results of the 50 μM series agree with those of Jauzein et al. (2017), which showed that an *O. cf. ovata* strain from Villefranche-sur-Mer presented a strong affinity for ammonium [69]. Interestingly, the lowest toxin concentrations were detected in the urea medium. The experiments reported here also corroborate the ability of *O. cf. ovata* to use different sources of inorganic and organic N, which allows the proliferation of the microalga in environments affected by urban wastewater and leachates from agriculture. Our findings also suggest that cell growth does not necessarily work in parallel with toxin production under the different (and variable) nutritional conditions that *Ostreopsis* may face in nature.

3.3. Toxin Profiles and Nutrients

As expected, the toxin profiles of the OOBM18 strain and the field samples were similar, containing OVTX-a to -g and isoPLTX analogues, with OVTX-a as a major contributor to the total cell toxin content (>46% in the experiments and >60% in the field samples). These profiles correspond to Profile #1 in Tartaglione et al. (2017) [45], with slight variability. The maximum total toxin concentrations were around 147, 244, 190, and 237 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$, in the f/2, control, P- and N-deficient treatments, respectively. These toxin contents on a per-cell basis were higher than the values reported for other Mediterranean *O. cf. ovata* strains (7.5 to 75 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$) [4,58,70,71] and quite similar to those found for a French Mediterranean strain (up to 300 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$) [18] and the NW Mediterranean strain studied in García-Altres et al. (2015) (up to 250 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$) [72]. Furthermore, it should be noted that the NW *O. cf. ovata* strain is 5-10-fold more toxic than the Adriatic strain studied in Vanucci et al. (2012) [37], an observation that constitutes another difference between them in addition to those mentioned above (Section 3.1).

OVTX-f, -g, and isoPLTX were detected mainly in the stationary phases of the cultures, when cell abundance was high, but only accounted for less than 2% of the total toxin concentration. This suggests that their concentration may often be close to the detection limit and can only be estimated when enough biomass is collected (as already pointed out in Section 3.1). In all the 0.5 μM culture media, OVTX-f, -g, and isoPLTX were not detected, probably because *O. cf. ovata* growth and cell yield were too low under the imposed nutrient conditions. However, the hypothesis that their detection could have been possible if a higher number of cells had been collected needs to be tested. Since no

differences in the toxin profile among different phases were found (OVTX-a being a major component), no hypothesis can be formulated about the potential biosynthesis order of the different toxin analogues based on the presented results. Future studies are needed to progress in this direction, as presented by Han et al. (2016) on saxitoxin congeners produced by *Alexandrium fundyense*.

In order to understand the potential role of nutrient availability, a principal component analysis (PCA) was performed by pooling all experimental data together (Figure 9); the field data were not included because an important number of analogues were absent. The first two components of the PCA, PC1, and PC2 explained most of the variance, 84.4% and 14.3%, respectively (Figure 9a). PC1 was positively correlated with all toxin analogues. PC2 was positively correlated with OVTX-a to -e (with the highest values for OVTX-a and -b), negatively correlated with OVTX-f and -g, and slightly negatively correlated with isoPLTX.

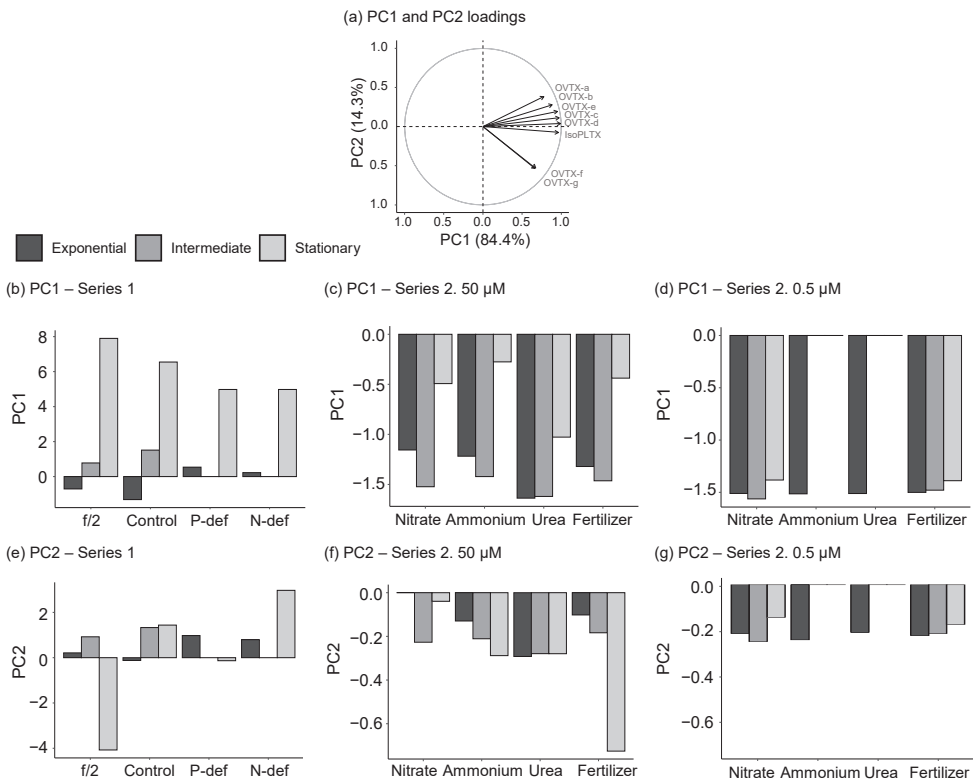


Figure 9. PCA analysis of toxin analogue concentrations in the different samples in culture experiments. (a) Loadings of the different toxin analogues on PC1 and PC2. The toxin contribution to each component is represented by the relative length of the arrows. (b–g) Scores of all samples (from the different treatments and growth phases) for PC1 (b–d) and PC2 (e–g). Note the different y-axis scales in (b–g). Notes: There were no intermediate phases in either the P-def or the N-def treatments. No intermediate or stationary phase was reached in the ammonium and urea (0.5 µM) treatments.

High positive scores of PC1 were found in the stationary phase of series 1 (Figure 9b), which presented the highest toxin content of the data set. In the 50 μM series 2 treatments (Figure 9c), the lower toxin-per-cell content compared to series 1 was reflected in negative PC1 scores; in the stationary phase, with comparatively higher cell content than in the exponential and the intermediate phases, the scores were less negative. Consistently with this trend, PC1 scores were negative in all the treatments and growth phases of the 0.5 μM series 2 treatments, given their estimated lower biomass and toxin content (Figure 9d). In general, within each series, the scores of PC2 were similar among treatments and growth phases (Figure 9e–g). This trend could be understood as showing a lack of influence of nutrient availability on the qualitative composition (profile) of the cell toxin content. The only exception was the markedly negative PC2 score of the stationary-phase samples of f/2 (Figure 9e); the reason for this finding is unclear but could be related to some imbalances in the composition of this high-nutrient medium.

Apparently, the results obtained in this study may seem contradictory to other publications. However, direct comparisons cannot be made, given the different approaches used in each case. The model of *Ostreopsis* toxin production elaborated by Pinna et al. (2015) [40] was based, among others, on the experiments by Vanucci et al. (2012), and the differences between the Adriatic strain and that used here have been discussed above. Finally, a comparison with Pezzolesi et al. (2016) [43] is unreliable due to the use of different experimental setups and designs. Probably, the modulation of toxin production is a complex process, not directly controlled by the essential nutrients N and P. It is also important to determine the role of the high-molecular-weight, C-rich toxins produced by *Ostreopsis* and how they relate to photosynthetic pathways and the storage of C products. We hypothesize that these toxins could be precursors of the mucopolysaccharides involved in cell attachment to substrates. Specific studies on this issue are required.

3.4. Risk of Exposure to *Ostreopsis cf. ovata* Toxin Analogues

The bloom of *Ostreopsis cf. ovata* in 2018 showed a temporal variability in the total toxin content and in the presence of the PLTX analogues (Figures 1, 2 and 4, and Table S1). However, the positive correlation ($r = 0.78$) between the logarithms of the total toxin content expressed per macroalgal biomass (i.e., μg total toxin per gram of fresh weight, gFW^{-1}) and the epiphytic *O. cf. ovata* cell abundance (cells gFW^{-1}) indicates that the toxicity in the natural environment was highest when the abundance of the microalga was high. Based on the experiments performed with the isolated strain OOBM18, it could be hypothesized that, although the nutrient source or stoichiometry may not play a major role in determining the toxin production per cell in the blooming area, a major factor to be considered is the spatial dimension of the *Ostreopsis* bloom and the cell concentrations attained. This points to the need to explore strategies to minimize the occurrence of *Ostreopsis cf. ovata* proliferations.

One necessary next step, although difficult to address, is to investigate how the different toxin analogues can be transferred from herbivores to upper levels of the food webs (e.g., carnivorous fish) and how toxins are bioaccumulated and potentially transferred to humans.

4. Conclusions

The potential link between nutrient availability and toxin production by *Ostreopsis cf. ovata* is explored by combining the monitoring of a natural bloom of this toxic microalga in a NW Mediterranean coastal site in 2018 with experiments using a strain (OOBM18) from this bloom. Although nutrients fuel *Ostreopsis* biomass, the cellular profile of toxin analogues does not appear to be strongly linked with N and P availability. The temporal variability in the concentrations of the different toxin analogues observed in the field and the laboratory does not allow us to hypothesize a biosynthesis order. Probably, some analogues, including isoPLTX, could be present below detection limits. It is hypothesized that the high-molecular-weight, C-rich toxins produced by *Ostreopsis* are related to photosynthetic pathways and to the storage of C products and could be precursors of the mucopolysaccharides involved in

cell attachment to substrates. Specific studies to investigate the biosynthetic pathways of PLTX analogues and their physiology role are required.

The potential risk of food-borne poisonings through a hypothetical food web transfer will depend on the dimension of the surface colonized by the benthic microalgae and the cell concentrations attained during the blooms. Compared with other *O. cf. ovata* strains, the OOBM18 NW Mediterranean strain has a relatively high toxin content, which qualitatively fits in Profile #1 described by Tartaglione et al. (2017) [45]. Still, some physiological differences among Adriatic and NW Mediterranean strains are expressed in their responses to similar experimental nutrient conditions.

Finally, the present study corroborates the capacity of *O. cf. ovata* to grow using organic N sources and suggests that this organism can be considered as an indicator of anthropogenically altered coastal ecosystems in particular in relationship to eutrophication.

5. Materials and Methods

5.1. Field Study

The *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the 2018 summer was monitored on the rocky beach of Sant Andreu de Llavaneres, located on the Catalan coast of Spain (41°33.13' N; 2°29.54' E). Sampling for the characterization of the bloom was carried out following the regular monitoring procedures applied since 2007 in the area as described, for instance, in Vila et al. (2016) and Berdalet et al. (2022) [12,13].

Plankton samples were collected in 1 L plastic bottles. For the estimation of *O. cf. ovata* cell abundance, ca. 200 mL was immediately fixed with neutral iodine Lugol's solution while the rest was processed in the laboratory for toxin determination. For the characterization of the *O. cf. ovata* epiphytic benthic population, 5 to 20 g of the dominant macroalgae (usually consisting of a mixture of *Ellisolandia elongata* (J.Ellis and Solander) K.R. Hind and G.W. Saunders, *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau, *Jania rubens* (Linnaeus) J.V.Lamouroux and *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy) was carefully collected and transferred into a 250 mL plastic bottle, to which ca. 180 mL of in situ GF/F glass fiber (0.7 µm nominal pore) filtered seawater was added. These samples, along with those for nutrient analysis (see below) were placed in a cooler box filled with in situ seawater to avoid warming during the 90 min transport to the laboratory where the subsequent processing was conducted.

In the laboratory, the macroalgal samples containing the *O. cf. ovata* epiphytic populations were vigorously shaken for one minute and subsequently sieved through a 200 µm mesh. The exact volume of the percolated seawater was measured with a cylinder because this parameter is required to estimate the epiphytic cell concentration. The macroalgae were slightly dried to remove excess water, and the fresh weight was determined. A percolated water subsample, ca. 60 mL, containing the epiphytic microalgae community was fixed with neutral iodine Lugol's solution for cell number estimation, and the rest of the water was filtered through duplicate GF/F glass fiber filters (between 10 and 100 mL per sample) to estimate toxin concentration.

For estimation of nutrient concentrations, seawater samples were collected in situ in 30 mL polypropylene plastic tubes (for nitrate, nitrite, ammonium, phosphate, total N and P) and in polycarbonate bottles for TOC (total organic carbon) determinations. The samples were frozen upon arrival in the laboratory and stored at −20 °C until analysis. Determinations of nitrate, nitrite, ammonium, and phosphate were conducted with an AA3 HR autoanalyzer (Seal Analytical) following Grasshoff et al. (1983) [73]. Total N and P were estimated with an AA3 autoanalyzer after previous digestion, and TOC concentration was measured by high-temperature catalytic oxidation using a TOC-L (Shimadzu) following Salgado and Miller (1998) [74].

5.2. Laboratory Cultures and Experiments

Strain isolation and stock culture. Culture experiments were conducted with the *Ostreopsis cf. ovata* strain OOBM18 isolated by the capillary pipette method [75] from the

benthic samples collected during the 2018 bloom. After an initial growth on microplates, cells were maintained in sterile 50 mL tissue culture flasks (polypropylene, vented, treated, from BD Corning) standing horizontally in a thermostatic room at 23 °C with ca. 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiance under 12 h:12 h Light:Dark cycle. The temperature was chosen as the optimal for *O. cf. ovata* isolated from our sampling area. Stock cultures were grown with micronutrients added at an f/2 minus Si (hereafter referred to as f/2) concentration [76]. Selenium, commonly used in dinoflagellate cultures, was not included in the medium because it did not improve the growth of this strain.

Experimental series 1: comparing the responses of the NW Mediterranean and the Adriatic *Ostreopsis cf. ovata* strains to P and N deficiency. In this first series of experiments, four treatments were established following Vanucci et al. (2012) [37] (Table 1, Figure S2): control, P- and N-deficiency treatments. Because the OOBM18 strain had been maintained in f/2 medium since its isolation, a fourth treatment in this medium was included to compare the responses with the other three media. The control medium contained, respectively, 8- and 5-times lower N and P concentrations than f/2, rendering a balanced 16:1 Redfield N:P ratio, slightly lower than the 24:1 N:P ratio in f/2. The concentrations of P and N were, respectively, 5 times lower in the P- and N-deficient treatments than in the control ones, to ensure P or N limitation, respectively, of the post-exponential phases of the culture growth. Vitamins and the rest of the microelements were added at concentrations proportional to the non-deficient N or P concentrations in each treatment, as in f/2. Cells were adapted to each culture medium treatment through four weekly sequential transfers (from a first culture in f/2) before the experiments were run. All transfers were conducted during the exponential phase of the growth curve, usually between days 4th and 7th, and the initial cell density in the transferred flasks was about 300–350 cells mL^{-1} . The experimental vessels consisted of 250 mL tissue culture flasks containing 200 mL of each medium, placed horizontally in the same temperature and light-controlled incubator as the strain stock culture.

Five replicate culture flasks were grown in parallel for each nutrient treatment (Figure S2): three flasks were used for determining cell numbers and obtaining the growth curves (on days 2, 4, 7, 10, 14, 18, 22, 25, and 30) and two flasks for toxin concentration and biovolume determinations (on days 2, 7, and 18). On day 30, the three first flasks were used for estimation of all the parameters, since they had more biomass. For toxin estimations, between 15 and 45 mL of culture was filtered through duplicate GF/F glass fiber filters and stored frozen at -80 °C until analysis. For cell number and biovolume determinations, 10 mL culture aliquots were fixed on neutral iodine Lugol's solution.

Experimental series 2: exploring the use of different inorganic and organic N sources at two different concentration levels for *Ostreopsis cf. ovata* growth and toxin content. This second series of experiments was designed taking as reference the inorganic and organic N concentration range found in the bloom area (see Results, Section 2.1). Nitrate and ammonium were chosen as inorganic N sources and urea and a commercial fertilizer as organic N sources (Table 1, Figure S2). The fertilizer (with a high amino acid concentration, according to the manufacturer) was analyzed in the laboratory before running the experiments; it contained ca. 15% nitrate, ca. 40% ammonium, and ca. 45% organic N with negligible P content. Two series of treatments, starting with 50 μM or 0.5 μM of each N source, were conducted, corresponding to the maximum and minimum concentrations estimated in the field study. The inorganic P concentration was fixed at 1/5th of the P content in f/2, i.e., 7.26 μM , in order to avoid any P deficiency and impose N as the main limiting element. All treatments were conducted with cells adapted to the culture media, following an approach similar to that in experimental series 1 for the P- and N-deficient treatments. The experimental flasks contained 200 mL of medium, and the initial cell densities were 300–250 cells mL^{-1} . For each 50 μM N form condition (Figure S2), 15 initial replicate flasks were grown to allow five samplings in triplicate on days 2, 4, 7, 10, and 15, for determining cell growth, biovolume, and toxin concentration. In contrast, in the 0.5 μM N conditions, tests conducted previously to the experiment evidenced the extremely limited growth of

Ostreopsis in these treatments, which did not provide enough biomass to inoculate 15 flasks as done in the 50 μM series. For this reason, for each 0.5 μM N form condition, only six replicate flasks were grown, with two replicates per sampling day of the experiments (days 2, 4, and 7) to determine the same parameters as in the first series of experiments. For toxin estimations, between 100 and 180 mL was filtered through duplicate GF/F glass fiber filters and stored frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. For cell number and biovolume determinations, 10 mL culture aliquots was fixed on neutral iodine Lugol's solution.

5.3. Chemicals

PLTX standard (from *Palythoa tuberculosa*) was purchased from Wako Chemicals GmbH (Germany). For quantitative analysis, concentrations of the target compounds (isoPLTX and OVTX -a to -g analogues) were determined as their respective PLTX equivalents. The stock standard solution ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) was individually prepared by weight in MeOH:H₂O (80:20, v/v) in a precision balance (Mettler Toledo AG425, Columbus, OH, US). For quantification, calibration solutions of PLTX were prepared from the stock standard solution at concentrations ranging from 0.005 to $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in MeOH:H₂O (80:20, v/v). All standard solution aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. LC-MS grade (>99%) water and organic solvents (acetonitrile and formic acid) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The mobile phases were filtered through 0.22 μm Nylon membrane filters (Whatman, Clifton, NJ, USA) before use. Nitrogen gas (99.95%, from Linde, Barcelona, Spain) was used as sheath gas and auxiliary gas in the ionization source. The 25 mm GF/F glass fiber filters were purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA). The Lugol solution used to fix culture samples for *Ostreopsis* cell counts was prepared following Andersen and Throndsen (2004), with potassium iodide (KI) and iodine (I₂) from Merck (Darmstadt, Germany) [77].

5.4. *Ostreopsis cf. ovata* Cell Counts, Growth Rate, and Biovolume Estimations

Ostreopsis cf. ovata cell counting was conducted in a Leica DMi1 inverted microscope following the Utermöhl method [78]. Different sedimentation chambers were used depending on the cell densities: 50 mL or 10 mL for the plankton samples (expressed as cells L⁻¹) and 10 mL or 1 mL Sedgewick–Rafter for the benthic ones (expressed as cells per gram of fresh weight of macroalgae, cells gFW⁻¹). In the experiments, cell numbers and biovolume were measured with 1 mL Sedgewick–Rafter counting chambers. The sampling and counting method in the study had an estimated global coefficient of variation (CV%) of 20%.

The specific growth rate (μ , d⁻¹) was calculated from the least-squares regression line of the natural logarithm of cell numbers versus time during the exponential phase of the cultures, identified in the semi-log plot [79,80]. When the exponential phase was identified between only two days, the formula $\mu = (\text{Ln}N_i - \text{Ln}N_0)/(t_i - t_0)$ was applied, N_1 and N_0 being the cell concentrations at time i (t_i) and 0 (t_0), respectively.

Cell biovolume was measured in the experimental samples in order to have an additional parameter to compare the Adriatic and NW Mediterranean strains. Cell size parameters were measured from images captured with a camera connected to the Leica DMi1 inverted microscope and processed with the free computer program ImageJ [81]. For each treatment and selected sampling day (Table S3), the dorsoventral diameter (DV) and width (W) of 100 cells were measured. The anteroposterior diameter (AP) was calculated using a fixed DV/AP factor based on the data presented by Guerrini et al. (2010), given that the DV and W of the cells in the present experiments fell in the range of that study [41]. The mean of the DV and AP of the Adriatic (57.2 μm and 24.5 μm , respectively) and Tyrrhenian (40.2 μm and 22.8 μm , respectively) strains rendered an average factor (48.7 $\mu\text{m}/23.6\text{ }\mu\text{m} = 2.06 = f$) which was applied to each cell in order to estimate the corresponding AP (AP = DV/f). Calculation of biovolume ($\mu\text{m}^3\text{ cell}^{-1}$) was made with the assumption of ellipsoid shape using the following equation [82]:

$$V = (\pi/6) \cdot \text{DV} \cdot \text{W} \cdot \text{AP}$$

5.5. Toxin Extraction and Analysis

Toxin extraction was conducted on 2 mL of MeOH:H₂O (80:20, *v/v*) (previously cooled down to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) with two 5 min ultrasonic pulses in an ice-cooled bath and final vortex shaking. After centrifugation of the extract (4500 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min), the supernatant was filtered through $0.22\text{ }\mu\text{m}$ Nylon membranes and stored in amber glass vials at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until their analysis by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC–HRMS) following essentially Medina-Pérez et al. 2021 [83]. Extracted ion chromatograms for PLTX and OVTXs were obtained by selecting the most intense peaks of the toxin ion cluster.

5.6. Statistical Analysis

Principal component analysis (PCA) [84] of the experimental data set was conducted to summarize the relationships among the variability of the different toxin analogue concentrations in the laboratory experiments. First, the concentration values of each toxin analogue (OVTX-a to -g and isoPLTX) estimated in the exponential, intermediate, and stationary phases of each treatment were averaged. Then, the concentration data (x_i) were transformed using the expression $y_i = \log(x_i + 0.1)$, where 0.1 is the minimum non-zero concentration measured. The PCA analyses were based on the correlation matrix among these average log-transformed concentrations of the toxin analogue content per cell in each culture growth phase and treatment. PCA was not conducted on field samples due to the low number of toxin analogues detected (Table S1). Total toxin content (+0.1, as for the PCA) and cell abundance values were also log-transformed before correlation and analysis of variance calculations. Data analysis and statistical methods were performed with Systat and with R (4.0.3) packages “ggplot”, “corrplot”, “pheatmap”, “ggpubr”, “tidyverse”.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins15030188/s1>, Table S1: Toxin profiles (cellular content of the different PLTX analogues expressed as % of the total cell content) detected in the samples (a) obtained throughout the *Ostreopsis cf. ovata* 2018 bloom and (b) in the different growth phases of the experimental cultures (E = Exponential; I = Intermediate; S = Stationary). The corresponding pie charts are shown in Figure 3, Table S2: Culture growth phase corresponding to the toxin and biovolume sampling days (indicated by numbers) for the different experimental conditions. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2, Table S3: Average, standard deviation, and median (in all cases $n = 100$) of the DV measured in the different phases of the growth curves (Exponential, Intermediate, and Stationary) of each experimental treatment. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2, Figure S1: Pearson correlation coefficients between all the variables measured in the field during the 2018 *O. cf. ovata* bloom. N: nitrogen, P: phosphorus, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus, TOC: total organic carbon. The critical value for $p < 0.05$ (two-tailed test) and 11 degrees of freedom ($n-2$) is 0.55, Figure S2: Scheme of the design of experimental series 1 and 2. The replicate flasks are labeled from I to V. t_i indicates the sampling day for each experimental condition as described in Section 5.2.

Author Contributions: Conceptualization, N.I.M.-P., L.V. and E.B.; Data curation, N.I.M.-P. and E.B.; Formal analysis, N.I.M.-P., E.C.-G., M.E. and E.B.; Funding acquisition, N.I.M.-P., E.M. and E.B.; Methodology, N.I.M.-P., E.C.-G., F.R., L.V. and E.B.; Software, N.I.M.-P., E.C.-G. and M.E.; Supervision, E.M. and E.B.; Writing—original draft, N.I.M.-P. and E.B.; Writing—review and editing, N.I.M.-P., E.C.-G., M.E. and E.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was conducted with the financial support received by N.I.M.-P. through the fellowship FISDUR2020-00254 (AGAUR, Government of Catalonia), project PGC2018-095013-B-I00 (Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities), and project 2017SGR-310 (Agency for Administration of University and Research Grants, Government of Catalonia, Spain). N.I.M.-P. is also grateful for the Ph.D. research financial assistance of the Water Research Institute (IdRA) of the University of Barcelona. The study was also supported by the Ostreorisk project (CTM2014-53818-R, Ministry of Economy, Industry and Competitiveness) and CoCLiME project funded by the ERA4CS

Network (ERA-NET) initiated by JPI Climate and co-funded by EPA (IE), ANR (FR), BMBF (DE), UEFISCDI (RO), RCN (NO), FORMAS (SE), and the European Union (Grant No. 690462). CoCliME is endorsed by the international program on harmful algal blooms GlobalHAB (www.globalhab.info). The authors are grateful for the comments of anonymous reviewers that contributed to the improved version of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: We are grateful to Rafael Abós-Herrándiz, Liang Chen, Esther Homs, Marc Mascaró-Triay, and Magda Vila that contributed to some samplings of the *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2018.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tester, P.A.; Litaker, R.W.; Berdalet, E. Climate Change and Harmful Benthic Microalgae. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shears, N.T.; Ross, P.M. Blooms of Benthic Dinoflagellates of the Genus *Ostreopsis*; an Increasing and Ecologically Important Phenomenon on Temperate Reefs in New Zealand and Worldwide. *Harmful Algae* **2009**, *8*, 916–925. [[CrossRef](#)]
3. Accoroni, S.; Romagnoli, T.; Colombo, F.; Pennesi, C.; di Camillo, C.G.; Marini, M.; Battocchi, C.; Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; et al. *Ostreopsis cf. ovata* Bloom in the Northern Adriatic Sea during Summer 2009: Ecology, Molecular Characterization and Toxin Profile. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62*, 2512–2519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pavau, A.S.; Terner, E.; Dufour, L.; Marro, S.; Gémin, M.P.; Thomas, O.P.; Lemée, R. Efficient, Fast and Inexpensive Bioassay to Monitor Benthic Microalgae Toxicity: Application to *Ostreopsis* Species. *Aquat. Toxicol.* **2020**, *223*, 105485. [[CrossRef](#)]
5. Pavau, A.S.; Berdalet, E.; Lemée, R. Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*, 498. [[CrossRef](#)]
6. Onuma, Y.; Satake, M.; Ukena, T.; Roux, J.; Chanteau, S.; Rasolofonirina, N.; Ratsimaloto, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T. Identification of Putative Palytoxin as the Cause of Clupeotoxism. *Toxicol.* **1999**, *37*, 55–65. [[CrossRef](#)]
7. Taniyama, S.; Mahmud, Y.; Terada, M.; Takatani, T.; Arakawa, O.; Noguchi, T. Occurrence of a Food Poisoning Incident by Palytoxin from a Serranid *Epinephelus* Sp. in Japan. *J. Nat. Toxins* **2002**, *11*, 277–282.
8. Tubaro, A.; Durando, P.; Del Favero, G.; Ansaldi, F.; Icardi, G.; Deeds, J.R.; Sosa, S. Case Definitions for Human Poisonings Postulated to Palytoxins Exposure. *Toxicol.* **2011**, *57*, 478–495. [[CrossRef](#)]
9. Pelin, M.; Zanette, C.; De Bortoli, M.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Florio, C. Effects of the Marine Toxin Palytoxin on Human Skin Keratinocytes: Role of Ionic Imbalance. *Toxicology* **2011**, *282*, 30–38. [[CrossRef](#)]
10. Tichadou, L.; Glaizal, M.; Armengaud, A.; Grosse, H.; Lemée, R.; Kantin, R.; Lasalle, J.L.; Drouet, G.; Rambaud, L.; Malfait, P.; et al. Health Impact of Unicellular Algae of the *Ostreopsis* Genus Blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean Coast Surveillance Network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 839–844. [[CrossRef](#)]
11. Durando, P.; Ansaldi, F.; Oreste, P.; Moscatelli, P.; Marensi, L.; Grillo, C.; Gasparini, R.; Icardi, G.; Collaborative Group for the Ligurian Syndromic Algal Surveillance. *Ostreopsis ovata* and Human Health: Epidemiological and Clinical Features of Respiratory Syndrome Outbreaks from a Two-Year Syndromic Surveillance, 2005–2006, in North-West Italy. *Eurosurveillance* **2007**, *12*, 3212.
12. Vila, M.; Abós-Herrándiz, R.; Isern-Fontanet, J.; Álvarez, J.; Berdalet, E. Establishing the Link between *Ostreopsis cf. ovata* Blooms and Human Health Impacts Using Ecology and Epidemiology. *Sci. Mar.* **2016**, *80*, 107–115. [[CrossRef](#)]
13. Berdalet, E.; Pavau, A.S.; Abós-Herrándiz, R.; Travers, M.; Appéré, G.; Vila, M.; Thomas, J.; de Haro, L.; Estrada, M.; Medina-Pérez, N.I.; et al. Environmental, Human Health and Socioeconomic Impacts of *Ostreopsis* Spp. Blooms in the NW Mediterranean. *Harmful Algae* **2022**, *119*, 102320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gallitelli, M.; Ungaro, N.; Addante, L.M.; Procacci, V.; Silver, N.G.; Sabbà, C. Respiratory Illness as a Reaction to Tropical Algal Blooms Occurring in a Temperate Climate. *JAMA* **2005**, *293*, 2595–2600.
15. Amzil, Z.; Sibat, M.; Chomerat, N.; Grosse, H.; Marco-Miralles, F.; Lemee, R.; Nezan, E.; Sechet, V. Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to *Ostreopsis cf. ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 477–496. [[CrossRef](#)]
16. Biré, R.; Trottereau, S.; Lemée, R.; Delpont, C.; Chabot, B.; Aumond, Y.; Krysz, S. Occurrence of Palytoxins in Marine Organisms from Different Trophic Levels of the French Mediterranean Coast Harvested in 2009. *Harmful Algae* **2013**, *28*, 10–22. [[CrossRef](#)]
17. Biré, R.; Trottereau, S.; Lemée, R.; Oregioni, D.; Delpont, C.; Krysz, S.; Guérin, T. Hunt for Palytoxins in a Wide Variety of Marine Organisms Harvested in 2010 on the French Mediterranean Coast. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5425–5446. [[CrossRef](#)]
18. Brissard, C.; Herrenknecht, C.; Séchet, V.; Hervé, F.; Pisapia, F.; Harcouet, J.; Lémée, R.; Chomérat, N.; Hess, P.; Amzil, Z. Complex Toxin Profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* Strains, Seafood Accumulation and Ovatoxins Prepurification. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 2851–2876. [[CrossRef](#)]

19. Funari, E.; Manganeli, M.; Testai, E. *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms in Coastal Water: Italian Guidelines to Assess and Manage the Risk Associated to Bathing Waters and Recreational Activities. *Harmful Algae* **2015**, *50*, 45–56. [[CrossRef](#)]
20. Vila, M.; Viure, L.; Lemée, R.; Berdalet, E. Developing an *Ostreopsis* Early Warning System: The Joint Engagement of Environmental Agencies, Beach Users and Scientists. In Proceedings of the 19th International Conference on Harmful Algae, La Paz, Mexico, 10–15 October 2021.
21. Brescianini, C.; Grillo, C.; Melchiorre, N.; Bertolotto, R.; Ferrari, A.; Vivaldi, B.; Icardi, G.; Gramaccioni, L.; Funari, E.; Scardala, S. *Ostreopsis ovata* Algal Blooms Affecting Human Health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Eurosurveillance* **2006**, *11*, 3040. [[CrossRef](#)]
22. Totti, C.; Accoroni, S.; Cerino, F.; Cucchiari, E.; Romagnoli, T. *Ostreopsis ovata* Bloom along the Conero Riviera (Northern Adriatic Sea): Relationships with Environmental Conditions and Substrata. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 233–239. [[CrossRef](#)]
23. Mangialajo, L.; Ganzin, N.; Accoroni, S.; Asnaghi, V.; Blanfuné, A.; Cabrini, M.; Cattaneo-Vietti, R.; Chavanon, F.; Chiantore, M.; Cohu, S.; et al. Trends in *Ostreopsis* Proliferation along the Northern Mediterranean Coasts. *Toxicon* **2011**, *57*, 408–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pistocchi, R.; Pezzolesi, L.; Guerrini, F.; Vanucci, S.; Dell’Aversano, C.; Fattorusso, E. A Review on the Effects of Environmental Conditions on Growth and Toxin Production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* **2011**, *57*, 421–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cohu, S.; Mangialajo, L.; Thibaut, T.; Blanfuné, A.; Marro, S.; Lemée, R. Proliferation of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in Relation to Depth, Biotic Substrate and Environmental Factors in the North West Mediterranean Sea. *Harmful Algae* **2013**, *24*, 32–44. [[CrossRef](#)]
26. Pavaux, A.S.; Velasquez-Carjaval, D.; Drouet, K.; Lebrun, A.; Hiroux, A.; Marro, S.; Christians, E.; Castagnetti, S.; Lemée, R. Daily Variations of *Ostreopsis* cf. *ovata* Abundances in NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* **2021**, *110*, 102144. [[CrossRef](#)]
27. Drouet, K.; Jauzein, C.; Gasparini, S.; Pavaux, A.S.; Berdalet, E.; Marro, S.; Davenet-Sbirrazuoli, V.; Siano, R.; Lemée, R. The Benthic Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the NW Mediterranean Sea: Relationship between Sea Surface Temperature and Bloom Phenology. *Harmful Algae* **2022**, *112*, 102184. [[CrossRef](#)]
28. Accoroni, S.; Totti, C. The Toxic Benthic Dinoflagellates of the Genus *Ostreopsis* in Temperate Areas: A Review. *Adv. Oceanogr. Limnol.* **2016**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)]
29. Accoroni, S.; Glibert, P.M.; Pichierrri, S.; Romagnoli, T.; Marini, M.; Totti, C. A Conceptual Model of Annual *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms in the Northern Adriatic Sea Based on the Synergic Effects of Hydrodynamics, Temperature, and the N:P Ratio of Water Column Nutrients. *Harmful Algae* **2015**, *45*, 14–25. [[CrossRef](#)]
30. Meroni, L.; Chiantore, M.; Petrillo, M.; Asnaghi, V. Habitat Effects on *Ostreopsis* cf. *ovata* Bloom Dynamics. *Harmful Algae* **2018**, *80*, 64–71. [[CrossRef](#)]
31. Ungano, N.; Assennato, G.; Blonda, M.; Cudillo, B.; Petruzzelli, M.R.; Mariani, M.; Pastorelli, A.M.; Aliquò, M.R.; D’Angela, A.; Aiello, C.; et al. Occurrence of the Potentially Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis ovata* along the Apulian Coastal Areas (Southern Italy) and Relationship with Anthropogenic Pollution. *Fresenius Environ. Bull.* **2010**, *19*, 1813–1821.
32. Parsons, M.L.; Dortch, Q. Sedimentological Evidence of an Increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) Abundance in Response to Coastal Eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 551–558. [[CrossRef](#)]
33. Gilbert, P.M.; Burford, M.A. Globally Changing Nutrient Loads and Harmful Algal Blooms: Recent Advances, New Paradigms, and Continuing Challenges. *Oceanography* **2017**, *30*, 58–69. [[CrossRef](#)]
34. Heisler, J.; Glibert, P.M.; Burkholder, J.M.; Anderson, D.M.; Cochlan, W.; Dennison, W.C.; Dortch, Q.; Gobler, C.J.; Heil, C.A.; Humphries, E.; et al. Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harmful Algae* **2008**, *8*, 3–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kudela, R.M.; Hayashi, K.; Caceres, C.G. Is San Francisco Bay Resistant to *Pseudo-nitzschia* and Domoic Acid? *Harmful Algae* **2020**, *92*, 101617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. John, E.H.; Flynn, K.J. Growth Dynamics and Toxicity of *Alexandrium Fundyense* (Dinophyceae): The Effect of Changing N:P Supply Ratios on Internal Toxin and Nutrient Levels. *Eur. J. Phycol.* **2000**, *35*, 11–23. [[CrossRef](#)]
37. Vanucci, S.; Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Tartaglione, L.; Guerrini, F. Nitrogen and Phosphorus Limitation Effects on Cell Growth, Biovolume, and Toxin Production in *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* **2012**, *15*, 78–90. [[CrossRef](#)]
38. Han, M.; Lee, H.; Anderson, D.M.; Kim, B. Paralytic Shellfish Toxin Production by the Dinoflagellate *Alexandrium Pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in Axenic, Nutrient-Limited Chemostat Cultures and Nutrient-Enriched Batch Cultures. *Mar. Pollut. Bull.* **2016**, *104*, 34–43. [[CrossRef](#)]
39. Van de Waal, D.B.; Smith, V.H.; Declerck, S.A.J.; Stam, E.C.M.; Elser, J.J. Stoichiometric Regulation of Phytoplankton Toxins. *Ecol. Lett.* **2014**, *17*, 736–742. [[CrossRef](#)]
40. Pinna, A.; Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Vanucci, S.; Ciavatta, S.; Polimene, L. Modelling the Stoichiometric Regulation of CRich Toxins in Marine Dinoflagellates. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139046. [[CrossRef](#)]
41. Guerrini, F.; Pezzolesi, L.; Feller, A.; Riccardi, M.; Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Tartaglione, L.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; et al. Comparative Growth and Toxin Profile of Cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* **2010**, *55*, 211–220. [[CrossRef](#)]
42. Pezzolesi, L.; Pistocchi, R.; Fratangeli, F.; Dell’Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Tartaglione, L. Growth Dynamics in Relation to the Production of the Main Cellular Components in the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* **2014**, *36*, 1–10. [[CrossRef](#)]

43. Pezzolesi, L.; Vanucci, S.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Tartaglione, L.; Pistocchi, R. Effects of N and P Availability on Carbon Allocation in the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* **2016**, *55*, 202–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vidyarthana, N.K.; Granéli, E. Physiological Responses of *Ostreopsis ovata* to Changes in N and P Availability and Temperature Increase. *Harmful Algae* **2013**, *21–22*, 54–63. [[CrossRef](#)]
45. Tartaglione, L.; Dello Iacovo, E.; Mazzeo, A.; Casabianca, S.; Ciminiello, P.; Penna, A.; Dell'Aversano, C. Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 13920–13928. [[CrossRef](#)]
46. Mangialajo, L.; Bertolotto, R.; Cattaneo-Vietti, R.; Chiantore, M.; Grillo, C.; Lemée, R.; Melchiorre, N.; Moretto, P.; Povero, P.; Ruggieri, N. The Toxic Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of Proliferation along the Coastline of Genoa, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* **2008**, *56*, 1209–1214. [[CrossRef](#)]
47. Accoroni, S.; Romagnoli, T.; Pichierrri, S.; Totti, C. New Insights on the Life Cycle Stages of the Toxic Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* **2014**, *34*, 7–16. [[CrossRef](#)]
48. Vidyarthana, N.K.; Granéli, E. Influence of Temperature on Growth, Toxicity and Carbohydrate Production of a Japanese *Ostreopsis ovata* strain, a Toxic-Bloom-Forming Dinoflagellate. *Aquat. Microb. Ecol.* **2012**, *65*, 261–270. [[CrossRef](#)]
49. Pezzolesi, L.; Guerrini, F.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Pistocchi, R. Influence of Temperature and Salinity on *Ostreopsis cf. ovata* Growth and Evaluation of Toxin Content through HR LC-MS and Biological Assays. *Water Res.* **2012**, *46*, 82–92. [[CrossRef](#)]
50. Vidyarthana, N.K.; Granéli, E. Impact of Temperature and Nutrients on the Growth and Toxicity of *Ostreopsis ovata*. In Proceedings of the 14th International Conference of Harmful Algae, Hersonissos-Crete, Greece, 1–5 November 2010; p. 82.
51. Bravo, I.; Vila, M.; Casabianca, S.; Rodriguez, F.; Rial, P.; Riobó, P.; Penna, A. Life Cycle Stages of the Benthic Palytoxin-Producing Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* **2012**, *18*, 24–34. [[CrossRef](#)]
52. Aligizaki, K.; Katikou, P.; Nikolaidis, G.; Panou, A. First Episode of Shellfish Contamination by Palytoxin-like Compounds from *Ostreopsis* Species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* **2008**, *51*, 418–427. [[CrossRef](#)]
53. Chomérat, N.; Antajan, E.; Auby, I.; Bilien, G.; Carpentier, L.; de Casamajor, M.N.; Ganthy, F.; Hervé, F.; Labadie, M.; Méteigner, C.; et al. First Characterization of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Carnicer, O.; García-Altare, M.; Andree, K.B.; Tartaglione, L.; Dell'Aversano, C.; Ciminiello, P.; de la Iglesia, P.; Diogène, J.; Fernández-Tejedor, M. *Ostreopsis cf. ovata* from Western Mediterranean Sea: Physiological Responses under Different Temperature and Salinity Conditions. *Harmful Algae* **2016**, *57*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Carnicer, O.; Guallar, C.; Andree, K.B.; Diogène, J.; Fernández-Tejedor, M. *Ostreopsis cf. ovata* Dynamics in the NW Mediterranean Sea in Relation to Biotic and Abiotic Factors. *Environ. Res.* **2015**, *143*, 89–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Accoroni, S.; Romagnoli, T.; Pichierrri, S.; Colombo, F.; Totti, C. Morphometric Analysis of *Ostreopsis cf. ovata* Cells in Relation to Environmental Conditions and Bloom Phases. *Harmful Algae* **2012**, *19*, 15–22. [[CrossRef](#)]
57. Nascimento, S.M.; Corréa, E.V.; Menezes, M.; Varela, D.; Paredes, J.; Morris, S. Growth and Toxin Profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful Algae* **2012**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)]
58. Honsell, G.; De Bortoli, M.; Boscolo, S.; Dell'Aversano, C.; Battocchi, C.; Fontanive, G.; Penna, A.; Berti, F.; Sosa, S.; Yasumoto, T.; et al. Harmful Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo: Detection of Ovatoxins in Field Samples and Cell Immunolocalization Using Antipalytoxin Antibodies. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 7051–7059. [[CrossRef](#)]
59. Selina, M.S.; Orlova, T.Y. First Occurrence of the Genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. *Bot. Mar.* **2010**, *53*, 243–249. [[CrossRef](#)]
60. Monti, M.; Minocci, M.; Beran, A.; Iveša, L. First Record of *Ostreopsis cf. ovata* on Macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, *54*, 598–601. [[CrossRef](#)]
61. Aligizaki, K.; Nikolaidis, G. The Presence of the Potentially Toxic Genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* **2006**, *5*, 717–730. [[CrossRef](#)]
62. Granéli, E.; Flynn, K. Chemical and Physical Factors Influencing Toxin Content. In *Ecology of Harmful Algae*; Granéli, E., Turner, J.T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; Volume 189, pp. 229–241. ISBN 9783540773405.
63. Johansson, N.; Granéli, E. Influence of Different Nutrient Conditions on Cell Density, Chemical Composition and Toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in Semi-Continuous Cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1999**, *239*, 243–258. [[CrossRef](#)]
64. Edvardsen, B.; Moy, F.; Paasche, E. Hemolytic Activity in Extracts of *Chrysochromulina polylepis* Grown at Different Levels of Selenite and Phosphate. In *Toxic Phytoplankton*; Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Andersen, D.M., Eds.; Elsevier: New York, NY, USA, 1990; pp. 284–289.
65. Guerrini, F.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Fattorusso, E.; Boni, L.; Pistocchi, R. Influence of Temperature, Salinity and Nutrient Limitation on Yessotoxin Production and Release by the Dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in Batch-Cultures. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 707–717. [[CrossRef](#)]
66. Tindall, D.R.; Morton, S.L. Community Dynamics and Physiology of Epiphytic/Benthic Dinoflagellates Associated with Ciguatera. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*; Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1998; pp. 219–313.
67. Tomas, C.R.; Baden, D.G. Detection of Gymnodinium Breve in Natural Waters by Using an ELISA Detection Technique. In Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Nantes, France, 18–22 October 1993.

68. Vanucci, S.; Guerrini, F.; Milandri, A.; Pistocchi, R. Effects of Different Levels of N- and P-Deficiency on Cell Yield, Okadaic Acid, DTX-1, Protein and Carbohydrate Dynamics in the Benthic Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 590–599. [[CrossRef](#)]
69. Jauzein, C.; Couet, D.; Blasco, T.; Lemée, R. Uptake of Dissolved Inorganic and Organic Nitrogen by the Benthic Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* **2017**, *65*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ciminiello, P.; Dell’Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Grauso, L.; Tartaglione, L.; Guerrini, F.; Pistocchi, R. Complex Palytoxin-like Profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of Four New Ovatoxins by High-Resolution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 2735–2744. [[CrossRef](#)]
71. Ciminiello, P.; Aversano, C.D.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Battocchi, C.; Crinelli, R.; Carloni, E.; Magnani, M.; et al. Unique Toxin Profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* Strain: HR LC-MSn Characterization of Ovatoxin-f, a New Palytoxin Congener. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1243–1252. [[CrossRef](#)]
72. García-Altare, M.; Tartaglione, L.; Dell’Aversano, C.; Carnicer, O.; De La Iglesia, P.; Forino, M.; Diogène, J.; Ciminiello, P. The Novel Ovatoxin-g and Isobaric Palytoxin (so Far Referred to as Putative Palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural Insights by LC-High Resolution MSn. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 1191–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Grasshoff, K.; Ehrhardt, M.; Kremling, K. Methods of Seawater Analysis, Second Revised and Extended Edition. *Chem. Oceanogr.* **1983**, *8*, 398.
74. Álvarez-Salgado, X.A.; Miller, A.E.J. Simultaneous Determination of Dissolved Organic Carbon and Total Dissolved Nitrogen in Seawater by High Temperature Catalytic Oxidation: Conditions for Precise Shipboard Measurements. *Mar. Chem.* **1998**, *62*, 325–333. [[CrossRef](#)]
75. Hoshaw, R.W.; Rosowski, J.R. Methods for Microscopic Algae. In *Handbook of Phycological Methods*; Cambridge University Press: London, UK, 1973; pp. 53–67.
76. Guillard, R.R.L. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*; Smith, W.L., Chanley, M.H., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 1975; pp. 29–60.
77. Andersen, P.; Thronsen, J. Estimating Cell Numbers. In *Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides*; Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., Eds.; UNESCO: Paris, Italy, 2003.
78. Utermöhl, H. Zur Vervollkommnung Der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Mitt.* **1958**, *9*, 1–38. [[CrossRef](#)]
79. Guillard, R.R.L. Division Rates. In *Handbook of Phycological Methods*; Stein, J.R., Ed.; Cambridge University Press: London, UK, 1973; pp. 289–312.
80. Wood, A.M.; Everroad, R.C.; Wingard, L. Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In *Algal Culturing Techniques*; Andersen, R.A., Ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 280–296.
81. Rueden, C.T.; Schindelin, J.; Hiner, M.C.; DeZonia, B.E.; Walter, A.E.; Arena, E.T.; Elieciari, K.W. ImageJ2: ImageJ for the next Generation of Scientific Image Data. *BMC Bioinform.* **2017**, *18*, 529. [[CrossRef](#)]
82. Sun, J.; Liu, D. Geometric Models for Calculating Cell Biovolume and Surface Area for Phytoplankton. *J. Plankton Res.* **2003**, *25*, 1331–1346. [[CrossRef](#)]
83. Medina-Pérez, N.I.; Dall’osto, M.; Decesari, S.; Paglione, M.; Moyano, E.; Berdalet, E. Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air-Sea Interactions. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 468–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Legendre, P.; Legendre, L. *Numerical Ecology*, 2nd ed.; Elsevier Science BV: Amsterdam, The Netherlands, 1998; p. 853.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Supplementary Materials

Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis cf. ovata*: Field and Laboratory Experiments

Noemí Inmaculada Medina-Pérez ^{1,2}, Elena Cerdán-García ³, Francesc Rubió ², Laia Viure ², Marta Estrada ², Encarnación Moyano ^{1,4} and Elisa Berdalet ^{2,*}

¹ Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona. Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

² Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, E-08003 Barcelona, Spain

³ Aix Marseille Université, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288, Marseille, France

⁴ Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Montalegre 6, E-08001 Barcelona, Spain

- **Table S1:** Toxin profiles (cellular content of the different PLTX analogues expressed as % of the total toxin cell content) detected in the samples **(a)** obtained throughout the *Ostreopsis cf. ovata* 2018 bloom and **(b)** in the different growth phases of the experimental cultures (E = Exponential; I = Intermediate; S = Stationary). The corresponding pie charts are shown in Figure 3.
- **Table S2:** Culture growth phase corresponding to the toxin and biovolume sampling days (indicated by numbers) for the different experimental conditions. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2.
- **Table S3:** Average, standard deviation, and median (in all cases $n=100$) of the DV measured in the different phases of the growth curves (Exponential, Intermediate, and Stationary) of each experimental treatment. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2.
- **Figure S1:** Pearson correlation coefficients between all the variables measured in the field during the 2018 *O. cf. ovata* bloom. N: nitrogen, P: phosphorus, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus. TOC: total organic carbon. The critical value for $p<0.05$ (two-tailed test) and 11 degrees of freedom ($n-2$) is 0.55.
- **Figure S2:** Scheme of the design of experimental series 1 and 2. The replicate flasks are labeled from I to V. t indicates the sampling day for each experimental condition as described in Section 5.2.



Table S1: Toxin profiles (cellular content of the different PLTX analogues expressed as % of the total toxin cell content) detected in the samples **(a)** obtained throughout the *Ostreopsis cf. ovata* 2018 bloom and **(b)** in the different growth phases of the experimental cultures (E = Exponential; I = Intermediate; S = Stationary). The corresponding pie charts are shown in Figure 3.

a) Toxin profiles in the *Ostreopsis cf. ovata* bloom samples (two replicate filters per sampling day)

Date	Julian day	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	OVTX-g	IsoPLTX
2018/06/21	172								
2018/07/05	186								
2018/07/10	191								
2018/07/20	201	66.5±0.4	21.8±0.4	2.8±0.1	6.2±0.1	2.7±0.6			
2018/07/24	205	67.4±0.1	20.1±0.7	2.2±0.1	5.0±0.1	4.3±0.1	0.9±0.2	0.7±0.1	0.4±0.1
2018/07/27	208	66.2±0.9	20.0±0.3	2.1±0.1	4.9±0.1	5.6±0.2		0.9±0.2	0.8±0.1
2018/08/01	213	67.6±0.3	22.2±0.4	2.0±0.1	4.1±0.8	3.8±0.4			0.7±0.1
2018/08/08	220	69.2±2.2	30.8±2.2						
2018/08/21	233	68.1±1.1	24.2±0.5	2.6±0.1	3.8±0.5	2.6±0.1			
2018/08/28	240	71.9±3.3	28.1±3.3						
2018/09/13	256	64.3±0.2	25.6±0.2	3.9±0.5	3.9±0.5	1.3±0.1	2.0±0.1		
2018/10/03	276	69.8±0.1	30.2±0.1						
2018/06/21	311								

b) Toxin profiles in the experiments, by treatment and growth phase; the number of filters (n) varied as detailed in Table S2.

Treatment	Phase	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	OVTX-g	IsoPLTX
f/2	E (n=4)	55.2±3.2	26.3±1.4	6.8±0.2	8.9±1.8	2.9±1.8			
	I (n=4)	60.4±1.2	23.7±0.6	4.1±0.3	6.5±0.4	4.6±0.1			0.58±0.05
	S (n=13)	40.2±5.1	26.8±4.9	7.6±1.9	16.0±4.1	6.7±1.2	0.5±0.1	1.0±0.4	1.2±0.3
Control	E (n=4)	56.9±2.5	24.8±0.8	8.3±1.3	10.0±1.5				
	I (n=4)	59.9±1.2	24.6±0.9	4.1±0.1	6.5±0.3	4.4±0.1			0.51±0.05
	S (n=13)	53.4±5.3	27.2±2.8	4.4±0.5	9.1±1.6	4.9±0.6	0.4±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1
P-deficiency	E (n=4)	55.9±1.2	27.3±0.5	5.1±0.4	8.1±0.7	3.7±0.7			
	S (n=17)	54.0±5.8	27.0±4.5	4.6±0.4	8.2±0.8	5.2±0.6	0.5±0.1	0.8±0.4	0.6±0.2
N-deficiency	E (n=4)	56.8±1.6	26.8±1.3	5.1±0.5	8.2±0.5	4.2±0.3			
	S (n=17)	58.4±4.2	23.4±5.0	4.4±0.5	8.2±0.9	5.2±0.6			0.5±0.3



Nitrate 50 μ M	E (n=3)	57.3 \pm 2.1	26.5 \pm 1.5	4.3 \pm 0.2	7.4 \pm 0.4	4.5 \pm 0.2			
	I (n=3)	48.3 \pm 1.0	33.5 \pm 0.4	4.9 \pm 0.2	8.5 \pm 0.5	4.8 \pm 0.3			
	S (n=9)	49.6 \pm 2.6	23.9 \pm 0.9	7.2 \pm 0.9	10.9 \pm 1.3	7.6 \pm 0.7	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3
Ammonium 50 μ M	E (n=3)	49.5 \pm 13.5	22.2 \pm 4.6	3.9 \pm 0.6	6.9 \pm 0.1	3.7 \pm 0.7			
	I (n=3)	48.5 \pm 1.6	31.4 \pm 2.5	5.0 \pm 0.6	9.9 \pm 2.7	4.7 \pm 0.6			0.5 \pm 0.4
	S (n=9)	50.6 \pm 3.2	26.4 \pm 2.0	5.9 \pm 0.5	10.4 \pm 1.9	5.8 \pm 0.6	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1
Urea 50 μ M	E (n=3)	53.9 \pm 2.0	28.6 \pm 2.0	5.5 \pm 0.1	10.3 \pm 1.1	5.5 \pm 0.2			
	I (n=3)	55.7 \pm 0.8	27.2 \pm 0.7	4.4 \pm 0.1	8.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.5			
	S (n=9)	49.0 \pm 4.3	25.1 \pm 2.0	6.5 \pm 1.2	12.1 \pm 3.1	6.3 \pm 1.0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Fertilizer 50 μ M	E (n=3)	56.1 \pm 2.7	26.6 \pm 1.4	4.7 \pm 0.4	7.6 \pm 0.5	5.0 \pm 0.5			
	I (n=3)	54.5 \pm 4.1	29.4 \pm 4.4	4.4 \pm 0.1	7.3 \pm 0.2	4.4 \pm 0.2			
	S (n=9)	48.2 \pm 1.7	30.6 \pm 1.3	4.7 \pm 0.2	10.2 \pm 2.0	5.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3
Nitrate 0.5 μ M	E (n=2)	56.7 \pm 0.2	31.6 \pm 0.1		11.8 \pm 0.1				
	I (n=2)	56.5 \pm 0.5	31.8 \pm 0.6		11.7 \pm 0.1				
	S (n=2)	55.3 \pm 3.1	29.9 \pm 1.3	4.9 \pm 0.1	9.6 \pm 0.7	5.4 \pm 0.1			
Ammonium 0.5 μ M	E (n=8)	47.8 \pm 1.0	28.7 \pm 0.7	7.3 \pm 0.2	12.7 \pm 1.0	9.5 \pm 1.5			
Urea 0.5 μ M	E (n=6)	57.4 \pm 3.1	32.4 \pm 1.9		10.9 \pm 0.7	6.2 \pm 0.2			
Fertilizer 0.5 μ M	E (n=2)	50.6 \pm 0.9	29.4 \pm 0.3		11.5 \pm 0.6	8.6 \pm 0.6			
	I (n=2)	51.3 \pm 1.3	28.5 \pm 0.9	6.2 \pm 0.2	10.0 \pm 0.3	7.1 \pm 0.6			
	S (n=2)	46.7 \pm 4.0	31.0 \pm 2.9	5.9 \pm 0.3	10.2 \pm 0.6	6.1 \pm 0.2			



Table S2: Culture growth phase corresponding to the toxin and biovolume sampling days (indicated by numbers) for the different experimental conditions. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2.

Treatments	Growth culture phase		
	Exponential	Intermediate	Stationary
f/2	2	7	18, 30
Control	2	7	18, 30
P-deficiency	2	-	7, 18, 30
N-deficiency	2	-	7, 18, 30
Nitrate 50 μ M	2	4	7, 10, 15
Ammonium 50 μ M	2	4	7, 10, 15
Urea 50 μ M	2	4	7, 10, 15
Fertilizer 50 μ M	2	4	7, 10, 15
Nitrate 0.5 μ M	2	4	7
Ammonium 0.5 μ M	2, 4, 7	-	-
Urea 0.5 μ M	2, 4, 7	-	-
Fertilizer 0.5 μ M	2	4	7

Table S3: Average, standard deviation, and median (in all cases $n=100$) of the DV measured in the different phases of the growth curves (Exponential, Intermediate, and Stationary) of each experimental treatment. The Exponential, Intermediate, and Stationary phases were identified based on the growth curves plotted in Figure 4. Details of the experimental design are shown in Figure S2.

	Exponential DV (μ m)		Intermediate DV (μ m)		Stationary DV (μ m)	
	avg \pm std	median	avg \pm std	median	avg \pm std	median
f/2	47 \pm 5	47	42 \pm 6	42	40 \pm 7	39
Control	55 \pm 5	55	56 \pm 6	57	56 \pm 7	57
P-deficiency	56 \pm 6	56	-	-	54 \pm 9	56
N-deficiency	53 \pm 6	53	-	-	53 \pm 7	53
Nitrate 50 μ M	42 \pm 7	43	40 \pm 8	39	41 \pm 8	39
Ammonium 50 μ M	42 \pm 8	43	40 \pm 9	38	41 \pm 10	41
Urea 50 μ M	32 \pm 5	31	31 \pm 6	30	32 \pm 6	31
Fertilizer 50 μ M	40 \pm 7	42	37 \pm 7	37	37 \pm 7	35
Nitrate 0.5 μ M	36 \pm 7	34	35 \pm 6	34	36 \pm 6	35
Ammonium 0.5 μ M	33 \pm 7	32	-	-	-	-
Urea 0.5 μ M	35 \pm 6	34	-	-	-	-
Fertilizer 0.5 μ M	35 \pm 8	33	36 \pm 7	35	34 \pm 5	34

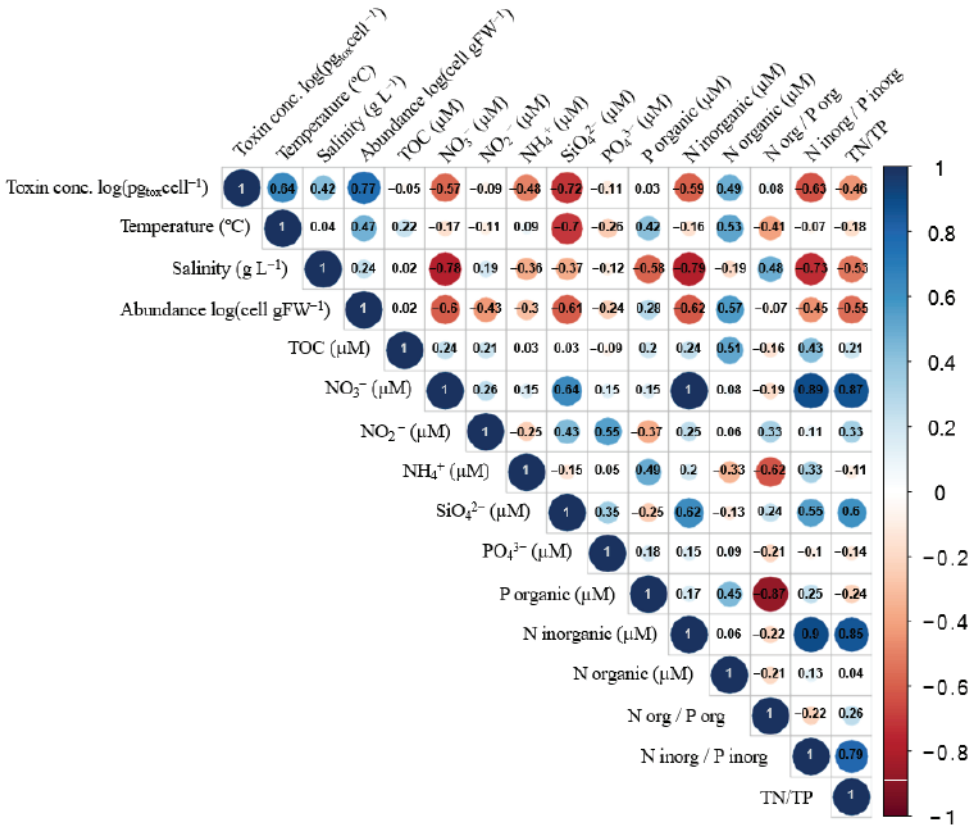


Figure S1: Pearson correlation coefficients between all the variables measured in the field during the 2018 *O. cf. ovata* bloom. N: nitrogen, P: phosphorus, TN: total nitrogen, TP: total phosphorus. TOC: total organic carbon. The critical value for $p < 0.05$ (two-tailed test) and 11 degrees of freedom ($n-2$) is 0.55.

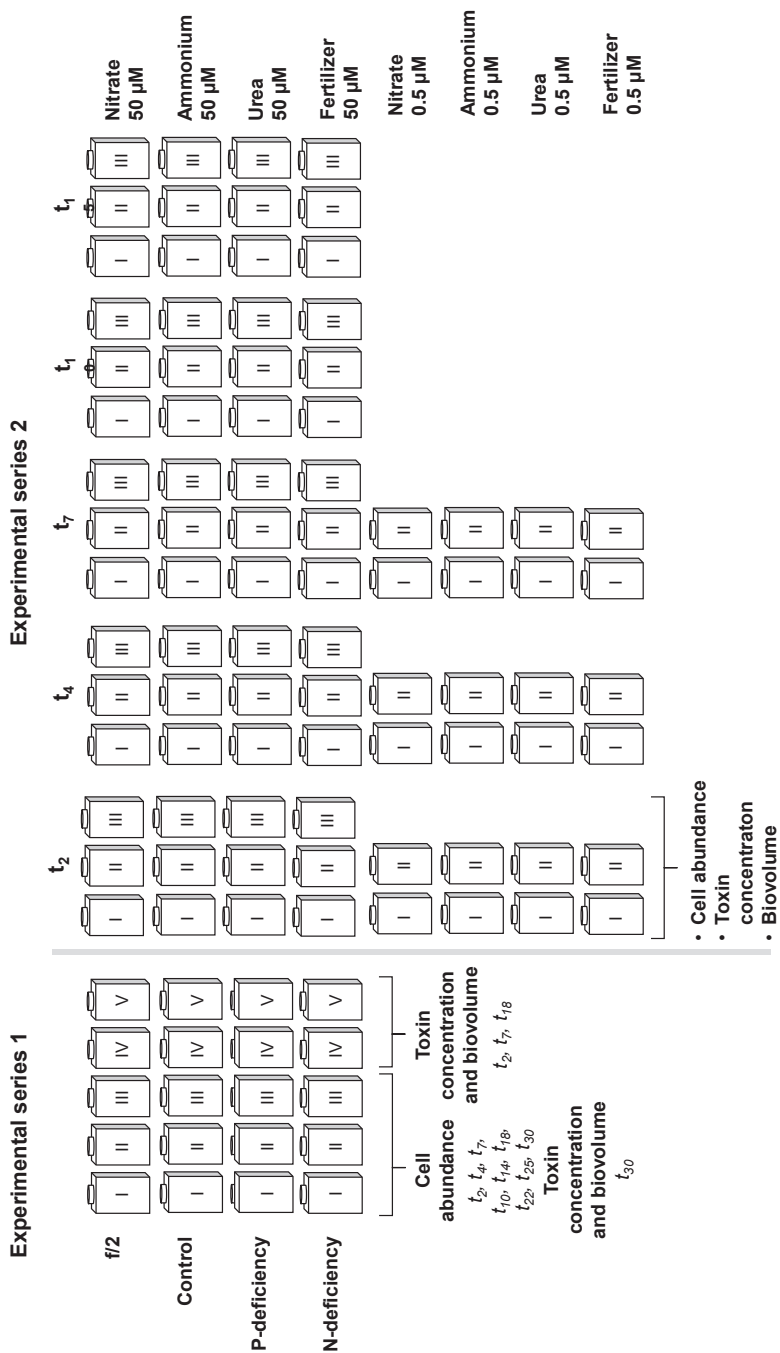


Figure S2: Scheme of the design of experimental series 1 and 2. The replicate flasks are labeled from I to V. t indicates the sampling day for each experimental condition as described in Section 5.2.

3.3. Discusión

La discusión de los resultados incluidos en el trabajo experimental de este capítulo y que han dado lugar a la publicación del Artículo #3 (sección 3.2) aborda dos aspectos principales: I) evaluación de los estudios de las proliferaciones de *O. cf. ovata* llevados a cabo a lo largo de 4 años (2018–2021) en Sant Andreu de Llavaneres, desde el punto de vista del crecimiento celular y de la producción de toxinas (sección 3.3.1) y II) análisis de los factores medioambientales que pueden estar afectando estas proliferaciones (sección 3.3.2).

3.3.1. Proliferación anual de *Ostreopsis cf. ovata* (2018–2021)

Se estudiaron las abundancias celulares y la concentración de toxinas en el agua durante las proliferaciones anuales recurrentes (2018–2021) de *O. cf. ovata* en la zona de Sant Andreu de Llavaneres. Los muestreos se realizaron siguiendo la toma de muestra y tratamiento experimental descritos en el anterior Capítulo 2 (sección 2.3.1). El muestreo a lo largo de la proliferación se realizó 1 o 2 veces por semana, dependiendo de la disponibilidad del equipamiento (equipos de muestreo y de transporte) del Instituto de Ciencias del Mar. En la Figura 3.2 se muestran los resultados de la comunidad bentónica (expresada en células por gramo de peso fresco de macroalga, cél. gPF⁻¹) y de la planctónica (expresada en células por litro de agua de mar, cél. L⁻¹), ambos en el eje izquierdo, observados durante las proliferaciones anuales de *O. cf. ovata* en los diferentes años. Además, en estos gráficos también se muestra la concentración de toxina total por célula medida a lo largo de las proliferaciones y expresada en picogramos de toxina total por célula de *O. cf. ovata* (pg_{tox} cél.⁻¹) (eje derecho).

A partir de estudios realizados anteriormente por el equipo de trabajo [50] y aprovechando la experiencia del laboratorio en este tipo de muestreo, se decidió empezar el muestreo anual en junio y acabarlo hacia octubre-noviembre, ya que se conocía que las proliferaciones de *O. cf. ovata* en Sant Andreu de Llavaneres solían empezar a partir de mayo–junio. No obstante, en 2021 se empezó a muestrear antes (mayo) con el objetivo de poder realizar un estudio más amplio de la aerosolización de los análogos a la PLTX en la fase de latencia y el inicio de la fase exponencial de la proliferación (resultados que se muestran y discuten en el Capítulo 4).

Tal y como se comentó en la sección 2.3.1 (Capítulo 2), el área de muestreo constaba de 3 zonas (PMA, PMB y PMC) separadas entre ellas aproximadamente unos 10 metros. En este contexto, hay que indicar que los resultados de la proliferación de 2018 corresponden a las muestras tomadas en la zona de muestreo PMA. Sin embargo, a partir de los resultados de 2019 en los que se hizo un estudio de las tres zonas (Artículo #1) observándose que los tres puntos de muestreo

proporcionaban resultados similares, se decidió que la mejor opción era estudiar una muestra combinada de los tres puntos (PMABC). Así, los resultados mostrados en 2019, 2020 y 2021 corresponden a los obtenidos a partir de estas muestras combinadas (PMABC).

Como se puede observar en la Figura 3.2, *O. cf. ovata* empieza a proliferar aproximadamente a mediados de junio, iniciándose la fase exponencial, con el consecuente aumento del número de células debido a la reproducción. La abundancia celular por macroalga sigue aumentando hasta que llega a la fase estacionaria (agosto aproximadamente), donde la tasa de crecimiento se ralentiza o paraliza. Este comportamiento se repite a lo largo de los cuatro años de estudio y estos resultados

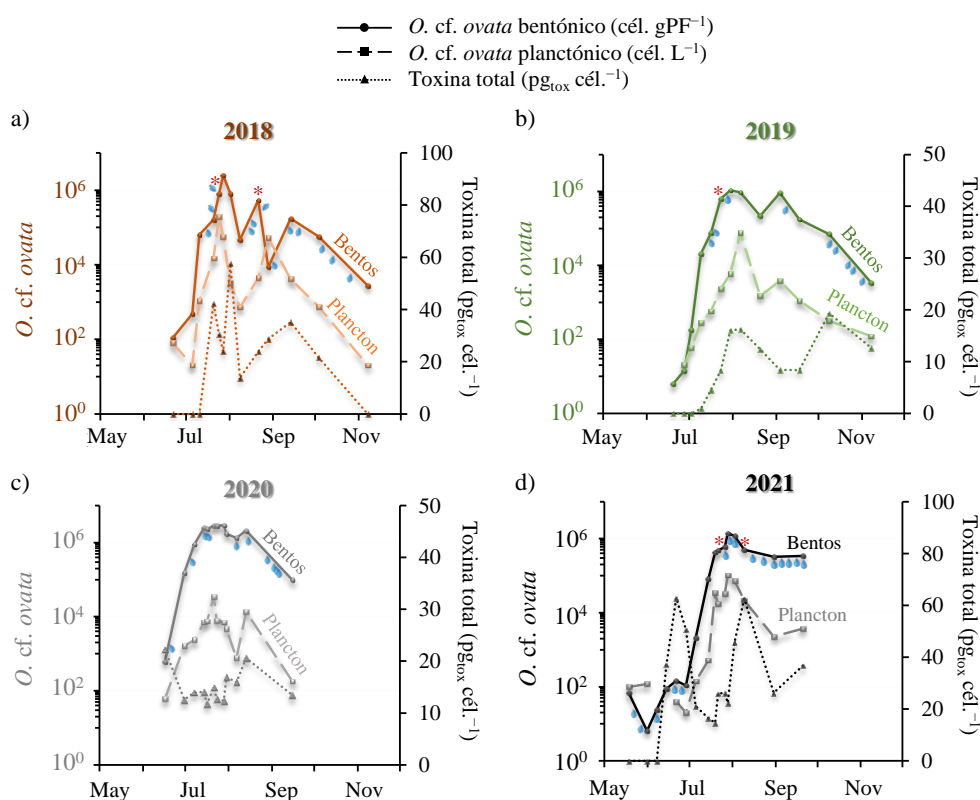


Figura 3.2. Proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata* en Sant Andreu de Llavaneres (41° 33,13' N; 2° 29,54' E) tanto de la comunidad bentónica (cél. gPF⁻¹) como de la planctónica (cél. L⁻¹) y toxina total por célula bentónica (pg_{tox} cél.⁻¹) producida durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en **a)** 2018, **b)** 2019, **c)** 2020 y **d)** 2021. Nota: las desviaciones de cada valor debido a los replicados durante los muestreos (respecto a las abundancias o concentración de toxinas) se encuentran en las respectivas figuras publicadas en los artículos. *Días de sintomatología. 💧Días de lluvia.

están en concordancia con los trabajos publicados hasta ahora sobre las cepas de *O. cf. ovata* del Mediterráneo [36,49,50]. Finalmente, se entra en una fase de senescencia donde la tasa neta de crecimiento de *O. cf. ovata* es negativa, momento que, por motivos logísticos, finalizaron los muestreos (noviembre aproximadamente). Durante los cuatros años de estudio, las máximas abundancias celulares del dinoflagelado superaron los umbrales de alerta recomendados para el bentos (2×10^5 cél. gPF⁻¹) y el plancton (3×10^4 cél. L⁻¹). Así, en la comunidad bentónica se detectaron valores máximos de $2,5 \times 10^6$ cél. gPF⁻¹ en el 2018, de $1,1 \times 10^6$ cél. gPF⁻¹ en el 2019, de $2,9 \times 10^6$ cél. gPF⁻¹ en el 2020 y de $1,4 \times 10^6$ cél. gPF⁻¹ en el 2021, y para la comunidad planctónica no superaron los $1,9 \times 10^5$ cél. L⁻¹ en el 2018, los $7,6 \times 10^4$ cél. L⁻¹ en el 2019, los $3,4 \times 10^4$ cél. L⁻¹ en el 2020 y los $1,0 \times 10^5$ cél. L⁻¹ en el 2021. Las abundancias de células bentónicas presentan menos variación, mostrando aumentos y disminuciones más regulares durante el período de proliferación y las abundancias de células planctónicas muestran cambios más repentinos y una tendencia menos regular, probablemente debido a las condiciones meteorológicas o el movimiento del mar. Por esta razón, el seguimiento de la abundancia de células bentónicas, el cual contiene el reservorio de la proliferación, es el más indicado para evaluar el seguimiento de dichas proliferaciones.

Durante los cuatro años las tasas de crecimiento se mantienen de manera similar, observando valores entre $0,27-0,30$ d⁻¹ (todas ellas calculadas durante la fase exponencial observada entre el 15 de junio y el 30 de julio, aproximadamente). Esta fase de crecimiento dura un mes o mes y medio y siempre viene seguida de la fase estacionaria que también dura aproximadamente un mes y medio en todos los casos, hecho que concuerda con otros resultados publicados durante las proliferaciones de este dinoflagelado en el noroeste del Mediterráneo [49,271]. De los resultados observados, podríamos destacar que en el 2020 la proliferación empezó a mediados de junio, mientras que no fue hasta principios de julio cuando se observó para el resto de los años (2018, 2019 y 2021), donde la fase de crecimiento comenzó unas 2 semanas más tarde. Sin embargo, no parece que se produjera un cambio notable en la temperatura durante el 2020 que permita explicar este efecto. Por otro lado, en todas las proliferaciones se suele detectar un segundo pico de máxima abundancia (Figura 3.2a-c) a excepción del 2021, probablemente debido a que en ese año se finalizaron los muestreos antes que en los otros años, impidiendo la visualización de ese segundo pico. Es decir, en términos generales, las proliferaciones siguieron los patrones generales descritos en el noroeste del Mediterráneo [36,50].

Otro aspecto relevante fue la variabilidad temporal observada en la abundancia y distribución de las especies de macroalga en la zona de estudio. Por consiguiente, durante el 2020 se realizó un pequeño estudio para evaluar la capacidad de carga (número máximo de células de *O. cf. ovata* detectadas por gramo de peso fresco de

macroalga) que cada especie de macroalga podría soportar respecto a células de *O. cf. ovata* y así poder observar si existía una dependencia con el sustrato muestreado. Para ello, durante la proliferación del 2020 se muestrearon individualmente y durante varios días tres de las macroalgas más abundantes en la zona de estudio (*Jania spp.*, *Padina pavonica* y *Dictyota dichotoma*) (Figura 3.3), determinándose la abundancia celular de *O. cf. ovata* en cada una de ellas. Las especies de *Halopteris scoparia* y *Ellisolandia elongata* también se encontraban presentes en la zona de muestreo, pero en menor abundancia en comparación al resto y, por ello, no se consideraron en este estudio. La Figura 3.4 muestran los resultados obtenidos para cada una de las macroalgas estudiadas junto con la desviación estándar, resultado de los replicados utilizando 3 cámaras de Sedgwick-Rafter. Por un lado, la capacidad de carga fue similar globalmente para las tres macroalgas sin diferencias significativas entre las especies muestreadas (Figura 3.4; ANOVA unifactorial realizada con Rstudio 1.2.5019). Sin embargo, a lo largo del tiempo, se observaron diferencias en la concentración de *Ostreopsis* que podrían ser debidas a la variabilidad de la dinámica (sucesión temporal) de las diversas especies de macroalgas. Por ejemplo, la menor concentración de la microalga sobre *Jania spp.* podría estar relacionada con la menor presencia de la macroalga en comparación con *Padina pavonica* y *Dictyota dichotoma*. Este aspecto quedó fuera de los objetivos de la Tesis, y requiere estudios detallados de la cobertura de las macroalgas y la sucesión de las diferentes especies en la zona de proliferación. Por otro lado, la variabilidad temporal de la proliferación fue similar en base a cada una de las tres macroalgas muestreadas separadamente, como en base a las muestras que contenían una mezcla de macroalgas (Figura 3.4). Por todo ello, se recomienda obtener una muestra combinada de las macroalgas dominantes en la zona de estudio, principalmente, *Jania spp.*, *Padina pavonica* y *Dictyota dichotoma* para el seguimiento de la proliferación de *O. cf. ovata* en Sant Andreu de Llavaneres.

En las Tablas A1–A4 (anexos) podemos observar las concentraciones celulares determinadas de cada toxina según la fecha de muestreo (2018–2021), junto con los datos de abundancias celulares, así como otros factores de interés analizados (temperatura, salinidad, clorofila y nutrientes). Como puede observarse, la cantidad de toxina celular producida a lo largo de las proliferaciones varió entre 0,88 y 62,81 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$ (Figura 3.2), datos que se encuentran dentro del rango de valores detectados para otras cepas del Mediterráneo (6–75 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$) (ver Tabla 3.1 de la introducción del presente capítulo). Aunque esporádicamente y en algunos estudios experimentales con cepas de la costa catalana se han llegado a detectar hasta 250 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$ [122], en cepas de la costa francesa se han estimado hasta 300 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$ y en cepas procedentes del Brasil se han alcanzado valores de hasta 468 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$ [74,135]. En los experimentos realizados en la presente Tesis (Artículo #3) las máximas concentraciones de toxina celulares encontradas en células de *O. cf. ovata*

estuvieron alrededor de 61–244 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$ (N:P=16 y 24, tratamientos Control y f/2 mencionados en el Artículo #3). Se puede considerar que todos estos valores son del mismo orden de magnitud.



Figura 3.3. Fotografías de las macroalgas seleccionadas durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* de 2020.

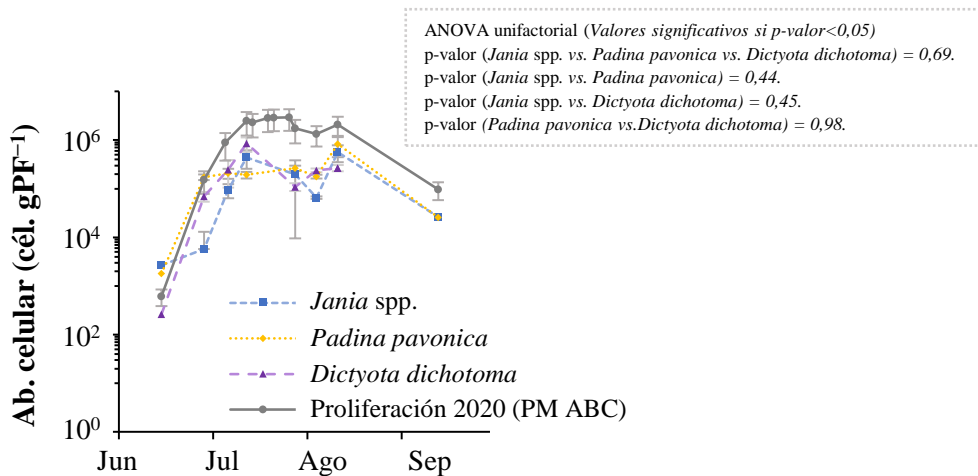


Figura 3.4. Abundancia celular de *O. cf. ovata* (cél. gPF^{-1}) determinadas en las especies de macroalgas muestreadas durante la proliferación del 2020. Se ha añadido la proliferación del 2020 (PMABC, mezcla de macroalgas). Se realizaron tres recuentos (utilizando 3 cámaras de Sedgwick-Rafter) de las muestras obtenidas en cada macroalga; se presentan los resultados como valor medio más desviación standard ($n = 3$).

Respecto a la variabilidad temporal de la concentración de toxina (durante las proliferaciones), se observó que en algunos momentos el pico máximo de toxina celular ocurría en los días posteriores a la aparición del pico máximo de abundancia celular bentónica. Por ejemplo, en 2018 el máximo se observó entre el 27 de julio y el 1 de agosto. Esta tendencia fue observada también en otros estudios [48]. En algunos momentos de la proliferación, concentraciones elevadas de toxina celular llegaron a coincidir con una elevada abundancia bentónica como, por ejemplo, en el 13 de septiembre de 2018 ($1,7 \times 10^5$ cél. gPF^{-1} ; $35,2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$), el 30 de julio de 2019 ($9,5 \times 10^5$ cél. gPF^{-1} ; $16,2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$) o el 9 de agosto del 2021 ($5,0 \times 10^5$ cél. gPF^{-1} ; $62,6 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$). Por otro lado, el pico máximo de toxina celular se observó en otros casos a valores algo más bajos de abundancia celular bentónica como, por ejemplo, el 8 de octubre de 2019 ($7,1 \times 10^4$ cél. gPF^{-1} ; $19,3 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$), o durante el primer pico observado en la fase exponencial de crecimiento en el 2021 (21 de junio de 2021; $1,5 \times 10^2$ cél. gPF^{-1} ; $62,8 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$). Durante la proliferación del 2020 no se observaron concentraciones de toxina destacables, detectándose valores entre 11,7 y $22,3 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ cél.}^{-1}$.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la concentración de toxina producida por las células de *O. cf. ovata* puede variar dentro de la misma especie en función de la cepa, bajo diferentes condiciones medioambientales y también según el periodo de proliferación [48,257].

En la Figura 3.5 se muestran los perfiles de toxinas observados a lo largo de los 4 años (sólo se indican los resultados de las muestras en las que se detectaron más de 5 análogos de la PLTX diferentes). Como se puede observar, la OVTX-a es siempre la mayoritaria (51–67%), seguida en abundancia de la OVTX-b (22–30%), las OVTX-d y -e (3,4–7,9%) y la OVTX-c (2,6–3,4%). Por último, las OVTX -f/-g e iso-PLTX se encuentran en menor proporción con una contribución total inferior al 2,8%. Hay que indicar que estos perfiles de toxinas se asemejan bastante a los encontrados en otras cepas de *O. cf. ovata* en el Mediterráneo [108,122,135] y en Brasil [41].

Para ayudar a interpretar los resultados sobre la concentración de las diferentes toxinas en el campo a lo largo de las diferentes proliferaciones estudiadas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de la concentración de toxina celular estimada (Figura 3.6a). Se agruparon todos los datos experimentales a lo largo de los 4 años de estudio y el análisis estadístico mostró que los componentes principales PC1 y PC2 eran los que permitían explicar la mayor parte de la varianza, 70,05% y 13,77%, respectivamente. El componente principal PC1 era el que proporcionaba una correlación positiva entre todos los análogos de la PLTX, mientras que el PC2 mostraba una correlación positiva entre las OVTX-a, -b-, -c-, -d-, y -e (con los valores

más altos para las OVTX-a y -b) y una correlación negativa entre las OVTX-f, -g, y la iso-PLTX. Estos resultados del PCA concuerdan con los obtenidos en los experimentos en cultivos (Figura 3.6b o Figura 9-Artículo #3); únicamente la iso-PLTX parece tener un comportamiento ligeramente diferente, más similar a las OVTX-f y OVTX-g en el campo, que son los análogos menos abundantes.

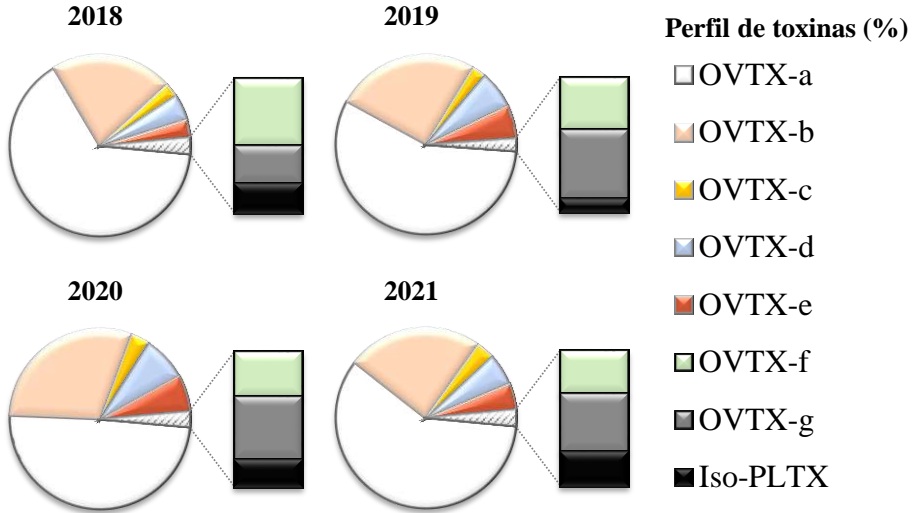
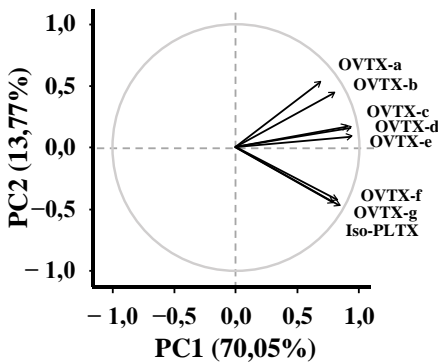


Figura 3.5. Perfil de toxinas celulares observado durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en los 4 años estudiados.

a) Cargas PC1 y PC2 en los experimentos de campo (2018–2021)



b) Cargas PC1 y PC2 en los experimentos de cultivos (Artículo #3)

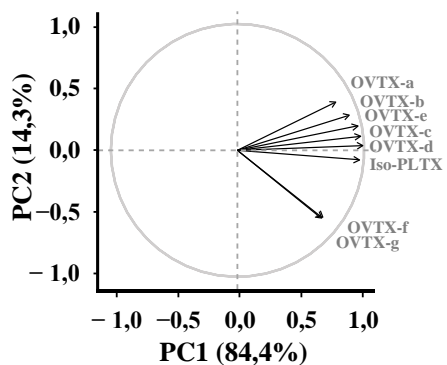


Figura 3.6. Análisis de componentes principales (PCA) de las concentraciones de los análogos de la PLTX en **a)** las diferentes muestras de campo (2018–2021) y **b)** en los experimentos de cultivos (resultados Artículo #3). Cargas (*loadings*) de los diferentes análogos de la PLTX en PC1 y PC2. La contribución de la toxina a cada componente está representada por la longitud relativa de las flechas.

En cambio, en los experimentos, su variabilidad sería más parecida a las 5 OVTX más abundantes (OVTX-a a -e). Este patrón puede sugerir un diferente metabolismo de la iso-PLTX en el campo y en los experimentos, debido probablemente, a determinadas condiciones de crecimiento, desde la presencia o ausencia de algún microelemento en el medio de cultivo, el tipo de recipiente de cultivo, los niveles de luz artificial, o la diferente función que las toxinas pueden jugar en el medio natural, que puedan quedar inhibidas o potenciadas en el mar. Ciertamente, son aspectos que deben estudiarse en el futuro.

En relación con la sintomatología observada durante las proliferaciones estudiadas, es necesario tener como referencia el artículo publicado por Berdalet et al. (2022), en el que se describen las proliferaciones de años anteriores (hasta el 2018) (comentado en la sección 3.1.2) y se proporcionan los datos de síntomas reportados en la zona estudiada (encuestas realizadas a los habitantes expuestos) [50]. Este estudio indicaba que los síntomas solían empezar a notarse al comienzo de la fase exponencial de la proliferación (en particular, a finales de junio y la primera semana de julio en 2015, 2017 y 2018) cuando la abundancia de células empezaba a aumentar, acercándose a valores de 2×10^5 cél. gPF⁻¹. El pico de incidencias sanitarias coincidía con la fase estacionaria temprana, cuando las concentraciones celulares se estabilizaban y fluctuaban en torno a los valores mencionados o incluso a niveles algo superiores (hasta $6,9 \times 10^6$ cél. gPF⁻¹). En las proliferaciones estudiadas en esta Tesis (2018–2021) se disponía únicamente del estudio epidemiológico realizado en 2018 en la zona. En los años, 2019, 2020 y 2021, no se realizaron estudios epidemiológicos y, por ello, se han señalado con un asterisco rojo aquellos días en los que se nos notificó algún caso. Durante la proliferación de 2018, aunque se distribuyeron 43 cuestionarios individuales, solamente 5 personas retornaron las encuestas epidemiológicas [50]. Sin embargo, se sabe que muchos otros habitantes también sufrieron algún síntoma. En 2019, el 27 de julio una de las personas encargadas del muestreo junto con 3 trabajadores del restaurante Pins Mar presentaron síntomas del tipo mucosidad y/o picor de garganta. En 2021 el 26 de julio se informó que 3 personas de los apartamentos que paseaban por delante de donde tenía lugar la proliferación, coincidiendo además con el proceso de muestreo, nos comunicaron que también presentaron mucosidad y picor de ojos. Además, el 9 de agosto de ese mismo año, tuvo lugar una "rissaga" ("resaca" o "meteotsunami") documentada en varios puertos del Mediterráneo occidental (<https://foro.latabernadelpuerto.com/showthread.php?t=193005>). Durante unos breves minutos se produjo una repentina bajada (retirada) y subida (regreso) del nivel del mar. Ello comportó el "barrido" de la plataforma rocosa sobre la que crecen las macroalgas y a las cuales se adhiere *Ostreopsis*. Ese movimiento de la masa de agua comportó la resuspensión de grandes cantidades de células de *Ostreopsis* que confirió un color marrón/rojizo a las olas, y

una acumulación inusual de las microalgas en la orilla. En la Figura 3.7 se muestran imágenes de este episodio. Ese mismo día, las dos personas que llevaban a cabo el muestreo presentaron síntomas moderados (picor de ojos, malestar, mucosidad) que perduraron a lo largo de todo el día. No podemos descartar que no hubiera más afección ese día. A pesar de que no pudieron realizarse estudios epidemiológicos en los años 2019, 2020 y 2021, la sintomatología de las muestreadoras confirma que la afección tuvo lugar principalmente al final de la fase exponencial y principios de la fase estacionaria, como se observó en Vila et al. (2016) y Berdalet et al. (2022) [49,50].



Figura 3.7. Imágenes de la acumulación de células de *O. cf. ovata* en las olas durante la proliferación de 2021 en la zona rocosa de Sant Andreu de Llavaneres (9 de agosto del 2021).

3.3.2. Factores medioambientales relacionados con la proliferación de *Ostreopsis cf. ovata* y la producción de toxinas

En esta sección se explora la posible relación de la proliferación de *O. cf. ovata* con factores medioambientales diversos. En primer lugar, consideraremos el posible efecto de la lluvia. En la Figura 3.2, la gota azul indica los días en los que se registraron precipitaciones en la estación meteorológica más próxima (<https://freemeteo.es/>), aunque no disponemos de los valores de agua dulce que aportaron a la zona de la proliferación de *Ostreopsis*. Nuestra percepción en los días de muestreo fue que las lluvias que acompañaron las proliferaciones no fueron intensas, y en cualquier caso no comportaron un descenso marcado de la salinidad, la

cual se mantuvo entre 35,6 y 38,2. Este es un rango en el que normalmente se encuentra *Ostreopsis* en el Mediterráneo noroccidental [96]. Tal vez, un efecto de la lluvia en la proliferación podría ser indirecto. Las lluvias podrían haber contribuido a mantener aportes de nutrientes procedentes de aguas residuales urbanas o de los invernaderos próximos (Tablas A1–A4 de los anexos), que sostuvieron la biomasa de macroalgas y microalgas en la zona, es decir, las proliferaciones de *Ostreopsis*. También, las lluvias, y más concretamente, las tormentas con la consiguiente agitación del agua de mar, sí que podrían estar relacionadas con las oscilaciones de las concentraciones absolutas de *Ostreopsis* a lo largo del verano. Globalmente, podemos considerar que no habría una relación directa entre el factor lluvia y la abundancia de *O. cf. ovata* durante su proliferación, ni con la concentración de toxinas.

La temperatura registrada durante las fases exponencial y estacionarias varió entre 19,1 y 27,4°C (Tablas A1–A4, anexos). En la fase de senescencia de esta especie, las temperaturas registradas bajaron hasta los 18 y 17,3°C en los años 2018 y 2019, respectivamente, hasta la finalización de la proliferación. El crecimiento de la fase exponencial sigue el aumento de la temperatura, pero una vez se alcanzan los niveles altos y se inicia la fase estacionaria, las variaciones de temperatura no son moduladoras de la proliferación. Es a medida que avanza el otoño, con la combinación de la disminución de la temperatura y las tormentas más frecuentes, que la proliferación irá disminuyendo progresivamente.

Para explorar la existencia de una posible relación entre los diferentes factores analizados en el campo y el crecimiento y producción de toxinas del dinoflagelado *O. cf. ovata*, en el Artículo #3 se llevó a cabo un análisis estadístico considerando únicamente los datos del año 2018. Sin embargo, para completar el conocimiento sobre las relaciones entre las diferentes variables, en esta Tesis se ha creído oportuno analizar conjuntamente todos los datos obtenidos a lo largo de los 4 años de estudio. El análisis estadístico de todos estos datos mostró una distribución no normal, por lo que fue necesario llevar a cabo un análisis estadístico de Spearman.

Esta correlación (ρ) es una medida no paramétrica de la dependencia estadística del ranking entre dos variables (parámetros), ya que mide la fuerza y la dirección de la asociación entre dichas variables. Este parámetro ρ se calcula de la siguiente manera:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_i d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

donde n es el número de datos de las dos variables y d_i es la diferencia de rango de cada elemento de la pareja de datos.

El coeficiente de correlación de Spearman (ρ) puede tomar valores entre +1 y -1. Así, un valor de $\rho > 0$ y próximo a +1 indica que hay una asociación positiva de rangos. Sin embargo, valores de ρ cercanos a cero suponen que la asociación entre los dos rangos es más débil o inexistente. Finalmente, valores de $\rho < 0$ y próximos a -1 indican una asociación negativa entre los rangos de las variables. El nivel de significación aplicado en estos estudios es 0,05. Si $\rho < \alpha$ se rechaza la hipótesis nula; en el caso contrario se acepta, siendo α el valor crítico según el nivel de significación aplicado y el número de muestras (n).

La Figura 3.8 muestra las correlaciones de Spearman entre los diferentes factores examinados, observándose que la concentración de toxina celular ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{cél.}^{-1}$) muestra una correlación inversamente proporcional con la relación $\text{N}_{\text{total}}:\text{P}_{\text{total}}$ (TN:TP), la relación $\text{N}_{\text{orgánico}}:\text{P}_{\text{orgánico}}$, el TN y el nitrato (en orden de significación estadística, $\rho = -0,23 - -0,55$). Estos resultados indican que en condiciones de disponibilidad de nitrógeno la producción de toxina celular sería menor, probablemente debido a que ese nitrógeno estaría siendo utilizado mayoritariamente en otros procesos que lo requieren, como la síntesis de proteínas y reproducción celular. Esta relación negativa con la concentración de nitrógeno en el medio y sabiendo que *O. cf. ovata* puede absorber diferentes formas de nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) (Artículo #3), podría indicar que un exceso de nitrógeno (eutrofización) no conllevaría un aumento de la producción de toxinas por parte del dinoflagelado. Este efecto observado en los estudios de campo refuerza la hipótesis formulada a partir de los experimentos llevados a cabo con cultivos en el laboratorio bajo condiciones controladas, donde unos niveles relativamente altos de nitrógeno (tratamiento f/2, Artículo #3) no implicaron una mayor cantidad de toxina celular. En cambio, durante el tratamiento llevado a cabo en presencia de una deficiencia de nitrato sí que se observaron mayores concentraciones de toxina celular. Asimismo, los resultados obtenidos durante la segunda serie de experimentos (Figura 6-Artículo #3), donde se comparan diferentes concentraciones y fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, indican que esta especie tiene capacidad para incorporar las diferentes formas de nitrógeno (urea, fertilizante, amonio y nitrato) con una afinidad por el aporte de urea y de nitrato (tratamientos a 50 μM) que favorecen su crecimiento. Sin embargo, fue en los cultivos en presencia de urea donde se observó una producción menor de toxina celular (Figura 7-Artículo #3). El amonio resultó ser la fuente de nitrógeno que conllevó una mayor producción de toxinas. Globalmente, los resultados sugieren que el diferente metabolismo de asimilación de cada una de las fuentes de N debe tener efectos en cascada a nivel celular que acabarían teniendo una repercusión en la síntesis de toxina. Dilucidar los procesos metabólicos implicados requiere estudios sofisticados que no se pudieron abordar en la Tesis.

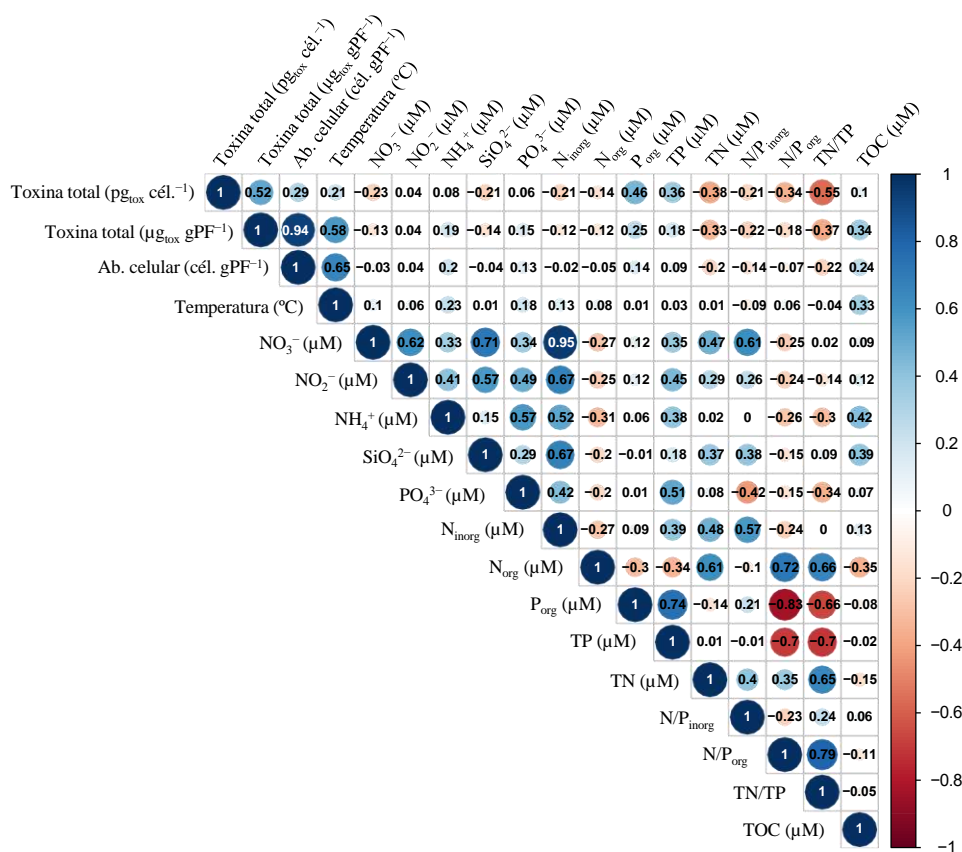


Figura 3.8. Correlación de Spearman entre las diferentes variables estimadas durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en Sant Andreu de Llavaneres en los años 2018 a 2021. Se analizaron un total de 54 muestras de todos los parámetros excepto del Carbono Orgánico Total (TOC) que fue determinado para un total de 34 muestras. *Nota: el valor crítico para n=54 es de $\alpha=0,226$ y para n=34 de $\alpha=0,287$, siendo *n* el número de muestras totales. Ab. = abundancia; N: nitrógeno; P: fósforo; TN: nitrógeno total; TP: fósforo total.

Por el contrario, en los estudios de campo se observó una relación positiva de la concentración de toxina por célula o por gramo de peso fresco de macroalga (pg_{tox} cél.⁻¹, µg_{tox} gPF⁻¹) y la presencia de fósforo orgánico (P_{org}) y fósforo total (TP) ($\rho = 0,25-0,46$, Figura 3.8). Como ya se ha comentado anteriormente, el fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de los dinoflagelados (debido principalmente a la elevada cantidad de ADN que contienen las células de este grupo de microalgas). La disponibilidad de fósforo parecería también afectar a los procesos metabólicos implicados en la producción de toxinas, si bien éstas no contienen este elemento. En el Mediterráneo, el fósforo es en general un elemento limitante por el que compiten todos los microorganismos [272]. Por ello, pequeños cambios en la

disponibilidad de este nutriente podrían tener un impacto significativo en el crecimiento y metabolismo de *O. cf. ovata*, y consecuentemente en la producción de los análogos de la PLTX. Sin embargo, como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente, la relación entre el fósforo y la producción de toxinas es compleja, y sus efectos específicos pueden variar según la especie o cepa de dinoflagelado y la toxina específica que se produzca. Así, algunos estudios indican que la limitación de fósforo puede aumentar la producción de saxitoxina en especies de *Alexandrium* [273–275], o disminuir la producción de brevetoxina en *Karenia brevis* [276], aunque otros autores obtuvieron resultados contrarios [277]. En el caso de estudio de esta Tesis, los resultados indican que una mayor concentración de fósforo orgánico parece inducir una mayor producción de toxinas (resultados observados en el campo, Figura 3.8). Por otro lado, en los estudios realizados con cultivos en el laboratorio, la deficiencia de fosfato llevó a una producción mayor de concentración de toxina celular durante la fase exponencial, en comparación con los resultados obtenidos durante el tratamiento control (Figura 5-Artículo #3). Sin embargo, esta tendencia no se observó durante la fase estacionaria del cultivo. Estos resultados son contradictorios a los observados en el estudio realizado por Vanucci et al. (2012) [92], en los que se utilizó una cepa de *O. cf. ovata* del Adriático y una deficiencia de fosfato y nitrato llevaron a una concentración menor de toxina celular.

Por otra parte, los estudios realizados en el campo indican que el único factor con el que la abundancia celular se encuentra significativa y positivamente relacionado es la temperatura ($\rho = 0,58-0,65$, Figura 3.8). Este hecho refuerza una vez más la hipótesis de que la temperatura es un parámetro relevante en las proliferaciones de *O. cf. ovata*. En esta línea, en esta Tesis se decidió realizar un pequeño estudio con un cultivo de *O. cf. ovata* inoculado a partir de la misma cepa del 2018 (Artículo #3) y el cual se hizo crecer en las mismas condiciones que el tratamiento f/2 del citado artículo, pero a 21°C (2°C menos) durante un año. Durante este estudio se evaluó el crecimiento y la producción de toxinas (igual que se hizo para la cepa de 23°C) observándose una tasa de crecimiento de 0,34 d⁻¹ similar a la observada a 23°C (0,39 d⁻¹). El valor máximo de abundancia celular encontrado fue de 7.610±404 cél. mL⁻¹ el día 30 de cultivo y el rango de toxinas producidas fue de 17–62 pg_{tox} cél.⁻¹, obteniéndose valores más elevados en la fase estacionaria (días 18–30 de cultivo) (Figura 3.9). La concentración de toxina indicada fue inferior a la producida a 23°C (Figura 5-Artículo #3) aunque se encuentran en el mismo orden de magnitud. Como no se observaron diferencias evidentes en el crecimiento o producción de toxinas entre los cultivos que crecieron a 23°C y a 21°C, y las temperaturas medidas en la zona de muestreo variaron entre 19,7°C al inicio de la proliferación y 27,4°C durante la fase estacionaria, se deberían realizar futuros estudios con cultivos a diferentes temperaturas, por ejemplo, 20, 24 y 27°C, valores

propios del verano en el Mediterráneo. Estos experimentos deberían realizarse con cepas adaptadas a cada una de las temperaturas experimentales durante un año aproximadamente, y evitar cambios bruscos de temperatura que reflejarían el estrés experimentado y la síntesis real de toxinas (o el crecimiento) en cada condición. Este tipo de estudios son esenciales para comprender la posible adaptación de *Ostreopsis* a un calentamiento progresivo del agua de mar debido al cambio climático.

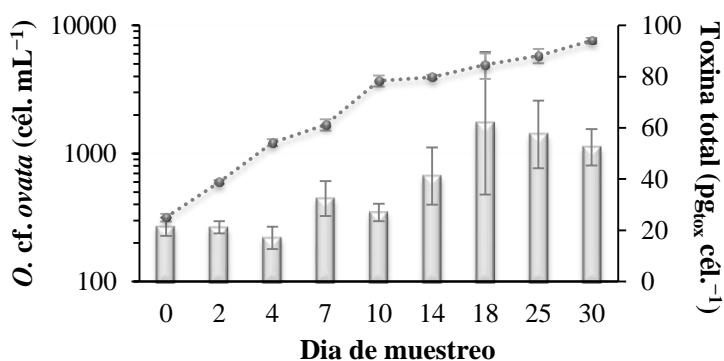
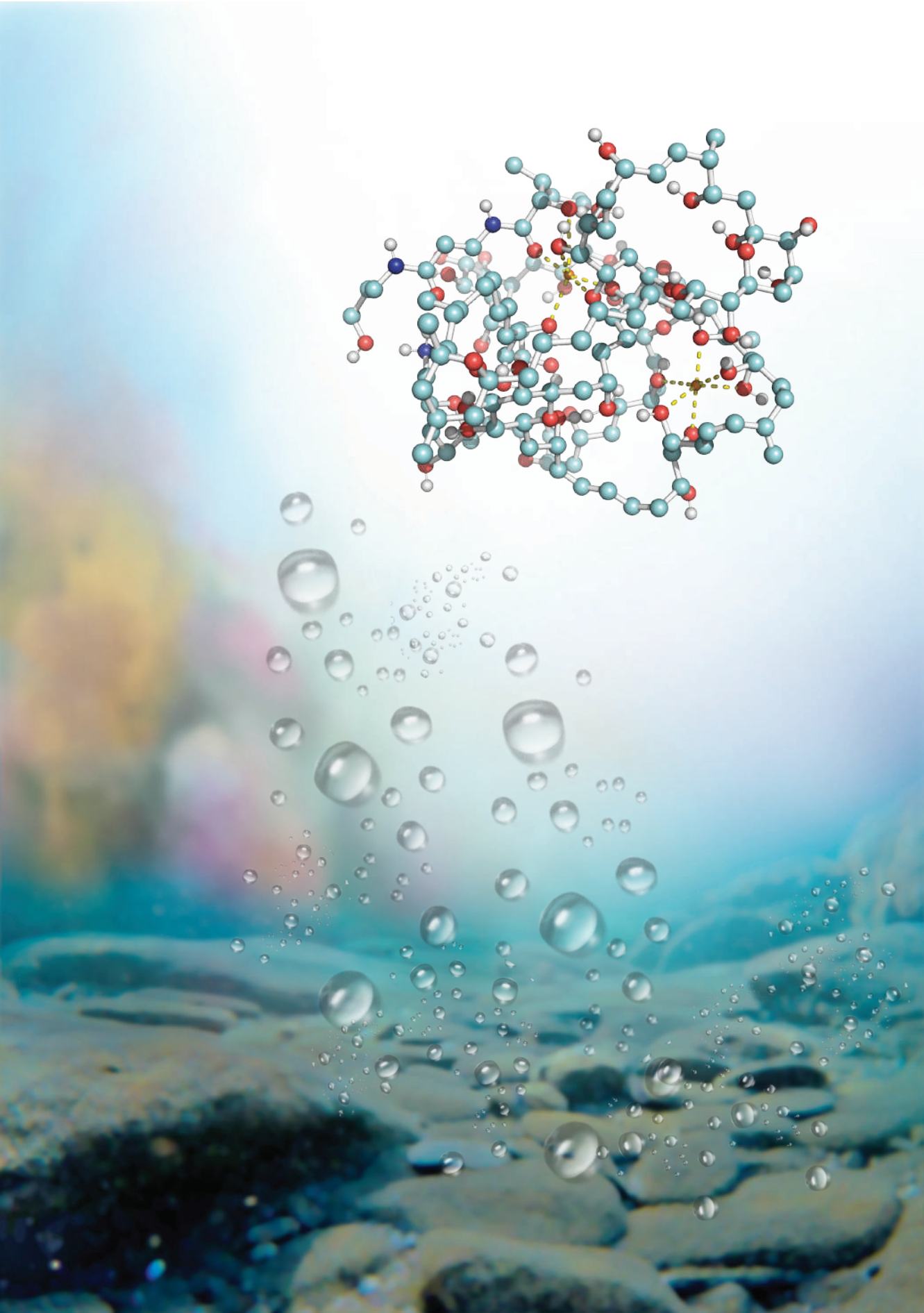


Figura 3.9. Crecimiento (línea discontinua, cél. mL⁻¹) y concentración de toxina total (gráfico de barras, pg_{tox} cél.⁻¹) producidas por el cultivo de *O. cf. ovata* a 21°C según el día de cultivo muestreado.

Los experimentos con cultivos en el laboratorio son herramientas importantes para comprender la biología y fisiología de los organismos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las condiciones de laboratorio son artificiales y no equivalentes al entorno natural complejo y dinámico en el que habita *O. cf. ovata*. Por lo tanto, los resultados obtenidos de los experimentos de laboratorio pueden no reflejar con precisión las respuestas de los organismos en la naturaleza. Sin embargo, pueden proporcionar información valiosa sobre cómo podrían comportarse bajo ciertas condiciones y cómo podría responder a los factores estresantes ambientales. Por lo tanto, aunque los experimentos de laboratorio no pueden reemplazar a los estudios de campo, sí que pueden servir como aproximaciones útiles para comprender mejor el comportamiento y la ecología de estos organismos. En esta Tesis se ha observado que la relación entre la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento de dinoflagelados y la producción de toxinas es compleja y difícil de entender. Una de las razones de esta complejidad puede residir en las estrategias complejas de incorporación y asimilación de los nutrientes por parte de estos microorganismos, los cuales pueden ajustar su crecimiento y actividad metabólica en respuesta a los cambios en la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la cepa de *O. cf. ovata* estudiada podría regular su crecimiento (rutas metabólicas) en respuesta a la

limitación de nutrientes, lo que le permite seguir creciendo y produciendo toxinas incluso en condiciones de escasez de nutrientes, tal y como se ha observado.



CAPÍTULO 4.

Estudios de los análogos de la palitoxina en aerosoles



CAPÍTULO 4: ESTUDIOS DE LOS ANÁLOGOS DE LA PALITOXINA EN AEROSOLES

Como ya se ha comentado en el Capítulo 1, la formación de aerosoles (aerosolización) y la potencial presencia de toxinas en ellos puede conllevar problemas de salud en las personas expuestas a dichos aerosoles.

Este Capítulo 4 se centra en el estudio de la posible aerosolización de los análogos de la PLTX. El capítulo incluye una introducción en la que se describen los aerosoles marinos, su formación y el riesgo que pueden comportar para la salud humana y el medio ambiente. Los estudios sobre aerosolización en general, son complejos y aún más en el caso de la aerosolización de las toxinas. Por ello, este tipo de estudios son escasos. En el presente capítulo se resumen los principales logros alcanzados hasta el momento sobre la aerosolización de algunos tipos de toxinas marinas, incluyendo los análogos de la PLTX. En la sección *Experimental y resultados* se incluyen dos publicaciones científicas. La primera de ellas (Artículo #4) se centra en unos primeros experimentos de aerosolización llevados a cabo en el año 2019 durante la proliferación de *O. cf. ovata*, y en los que se exploró, por primera vez, la aerosolización y captación de las toxinas producidas por *Ostreopsis cf. ovata*, empleando un dispositivo generador de aerosoles. En la segunda publicación (Artículo #5) se recopilan los resultados de un estudio mucho más detallado para comprender mejor la aerosolización de las toxinas producidas por *O. cf. ovata*, utilizando muestras obtenidas a lo largo de las proliferaciones de 2020 y 2021. La sección *Experimental* incluye información sobre parámetros ecológicos obtenidos en dichos experimentos, que complementan la investigación de las proliferaciones, aunque no fueron incluidos en el artículo. El capítulo finaliza con una discusión transversal de los resultados obtenidos en las dos publicaciones incluidas.

4.1. Introducción

4.1.1. Aerosoles marinos

Los aerosoles marinos son diminutas partículas, líquidas y/o sólidas, suspendidas en una masa de aire, que se originan en el océano. Pueden ser generados por procesos físicos, en los que el viento es el principal responsable de su formación. En la incidencia del viento sobre la superficie del océano se produce la transferencia de energía que ayuda a formar las olas. La rotura de éstas lleva consigo la agitación y la turbulencia del agua del mar que arrastra aire y forma burbujas bajo su superficie. Estas burbujas terminan liberándose al aire y estallando en infinidad de finas gotas al entrar en contacto con la atmósfera, lo que da lugar a la formación de una suspensión de agua de mar en el aire.

Los aerosoles marinos se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los aerosoles marinos primarios, ricos en materia orgánica, se generan directamente a través de la explosión de las burbujas en la superficie del mar, concretamente a través de la microcapa de la superficie del mar (SML) [278,279]. La SML varía en espesor de 1 a 1000 μm [279] siendo la capa más delgada y superior del océano que está en contacto directo con la atmósfera y que se encuentra enriquecida en materia orgánica, tanto disuelta (DOM) [280,281] como particulada (POM) [282–284]. También albergan en ella microorganismos, incluidos bacterias, virus y fitoplancton que pueden tener un impacto significativo en el ecosistema marino [282]. Algunas de las especies de fitoplancton pueden producir sustancias que pueden llegar a alterar la tensión superficial del agua de mar, fenómeno que puede facilitar o dificultar la formación de aerosoles marinos primarios, afectando a su tamaño y composición.

Por otro lado, los océanos son una fuente de aerosoles marinos secundarios, los cuales pueden formarse a partir de las reacciones de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que suelen generarse mediante procesos microbianos, y que son emitidos (aerosolizados) a la atmósfera a partir del agua de mar. La formación de estos aerosoles marinos secundarios puede tener lugar mediante la formación de nuevas partículas a través de fenómenos de nucleación o incluso se pueden generar mediante la condensación en partículas de aerosoles ya existentes en la atmósfera marina (por ejemplo, los aerosoles marinos primarios), provocando un cambio en su tamaño y composición química. Además, algunos microorganismos que han sido aerosolizados pueden también influir en la formación de los aerosoles marinos secundarios a través de la oxidación atmosférica de los VOCs.

Por otro lado, el fitoplancton juega un papel importante en la composición de los aerosoles marinos secundarios, por ejemplo, a través de la producción de dimetilsulfoniopropionato (DMSP) y su subsecuente escisión enzimática en sulfuro

de dimetilo (DMS, CH_3SCH_3) y acrilato [285]. El fitoplancton y las bacterias suelen liberar DMS y sus precursores en el agua del océano [286,287] pero una vez cerca de la superficie son aerosolizados y el DMS puede ser posteriormente oxidado para formar dióxido de azufre y sulfóxido de dimetilo (DMSO), lo que lleva a la formación de ácido sulfúrico y ácido metanosulfónico (MSA), los cuales pueden contribuir a la formación de otros aerosoles marinos secundarios que podrían actuar como núcleos de condensación de nubes (CCN) [288–291]. Además, estudios recientes indican que, en determinadas circunstancias, existe una correlación entre la biomasa de fitoplancton (concentraciones de clorofila-a) y la generación de aerosoles marinos secundarios (sulfato, amonio y otras especies orgánicas). Sin embargo, este tipo de correlación no se ha observado con los aerosoles marinos primarios [292].

Es importante, por lo tanto, caracterizar la composición, tamaño y propiedades de los aerosoles marinos puesto que juegan papeles importantes en el intercambio entre el océano y la atmósfera, participando de la modulación del clima, el transporte de microorganismos (patógenos o no) entre ecosistemas, y de sustancias con funciones diversas (hormonas vegetales y animales, elementos químicos que contribuyen la fertilización).

Para el muestreo de aerosoles marinos suele utilizarse colectores ("impactores"), que son dispositivos que permiten retenerlos en función de intervalos de tamaño de las microgotas/micropartículas (Figura 4.1). Estos impactores suelen estar equipados (en su interior) con filtros o con algún tipo de material adsorbente, dependiendo del objetivo del análisis [293–295], donde los aerosoles quedan retenidos para llevar a cabo posteriormente la determinación de su composición química y otras propiedades. En otras ocasiones suele utilizarse un fluido (agua marina filtrada, agua desionizada, solución tampón; esterilizadas) como medio para la recolección de aerosoles [296,297]. En este caso, el aire, que contiene los aerosoles objeto de estudio, se bombea y se hace burbujear a través de dicho líquido de manera que se disuelven o retienen en él los compuestos presentes en los aerosoles. La solución obtenida es posteriormente analizada para determinar su composición química.

Las técnicas analíticas que pueden utilizarse dependen de las características específicas de los aerosoles marinos que se quieren estudiar. Por ejemplo, una de las más utilizadas es la espectrometría de masas de aerosoles (AMS) en tiempo real, una técnica que permite obtener simultáneamente información sobre el tamaño y la composición química (compuestos orgánicos e inorgánicos) de los aerosoles [298–301]. La AMS se ha utilizado para determinar concentraciones traza de sustancias volátiles como el DMS en aerosoles marinos secundarios [302]. La espectroscopia Raman o de NMR, también se ha utilizado en el estudio de aerosoles marinos, para determinar, por ejemplo, el carbono orgánico, nitratos, sulfatos, a través de las vibraciones de los enlaces de estas moléculas [293,294,303].

Finalmente, para estudiar las toxinas marinas que pueden aerosolizarse se han utilizado técnicas de inmunoensayo como el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) que utiliza anticuerpos específicos para las biotoxinas de interés [304]. Además, las técnicas de biología molecular como los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido amplificar secuencias específicas de ADN haciendo posible la detección e identificación de organismos marinos productores de ciertas biotoxinas [24,148]. Por último, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es la técnica más ampliamente utilizada para la detección y cuantificación sensible y específica de las biotoxinas producidas por organismos como el *O. cf. ovata* o *Karenia brevis* en los filtros en los que se han recolectado los aerosoles [24,304].

4.1.2. Aerosolización de biotoxinas

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los aerosoles marinos debido a su potencial impacto en la salud humana (problemas respiratorios y cardiovasculares, entre otros) y el medio ambiente (contribución a la formación de lluvia ácida). Preocupa especialmente su potencial para facilitar el transporte de compuestos, como por ejemplo las biotoxinas, producidos por algunas especies marinas. Estas toxinas producidas durante HABs, pueden ser transportadas por los aerosoles, comportando así un riesgo para las personas que viven, trabajan y/o realizan actividades al aire libre en las zonas costeras durante las proliferaciones. A pesar de ello, las microalgas y cianobacterias transportadas por el aire son organismos poco estudiados en aerobiología. Aunque aquellos organismos que habitan en agua dulce y salada son bien conocidos, los que forman parte de los aerosoles son raramente objeto de investigación.

Por un lado, algunos microorganismos que viven en ambientes de agua dulce como lagos, ríos y estanques, producen toxinas que pueden aerosolizarse [305,306], las cuales han sido estudiadas más ampliamente que las biotoxinas marinas. Por ejemplo, las cianotoxinas producidas por cianobacterias, y concretamente las microcistinas, se han relacionado con irritaciones respiratorias, como la neumonía. Estudios realizados con ratones han mostrado que la sensibilidad a las microcistinas inhaladas es 10 veces superior a la ingerida por vía oral, observándose lesiones microscópicas en la cavidad nasal de los ratones que las han inhalado. Además, estudios realizados en lagos de Michigan y California durante proliferaciones nocivas de cianobacterias detectaron la presencia de microcistinas en el aire [305,306]. En este contexto, los estudios de Wood et al. (2011) muestran la detección de microcistinas en aerosoles a 20 m del lago y a 30 m de altura durante proliferaciones en agua dulce, demostrando el posible transporte vertical y horizontal de los aerosoles de agua dulce [307]. También se han realizado estudios de aerosolización en el

laboratorio en paralelo a los estudios de campo que han permitido corroborar la presencia de estas toxinas en los aerosoles generados [5]. Los mecanismos de aerosolización de las microcistinas son similares a los que se producen con las biotoxinas marinas, como las brevetoxinas y las saxitoxinas. En ambos casos, la acción del viento y la turbulencia en las olas hacen que las toxinas liberadas tanto por los dinoflagelados como por las cianobacterias puedan terminar siendo aerosolizadas [308,309].

Algunas de ellas, como las brevetoxinas y las saxitoxinas, pueden acumularse en la SML, a partir de la cual pueden aerosolizarse y ser transportadas a través de la atmósfera durante las proliferaciones de algas nocivas [304,309–311]. La inhalación de brevetoxinas puede causar síntomas adversos en las vías respiratorias, particularmente en personas con enfermedades respiratorias crónicas como, por ejemplo, el asma [8,23,312]. Otras biotoxinas marinas, como el ácido okadaico, las pectenotoxinas y las yesotoxinas, también han sido detectadas en aerosoles marinos [292,309].

Además, hay que tener en cuenta que las fracciones particuladas de los aerosoles marinos pueden comportar diferentes implicaciones en la salud en función de su tamaño. Así, las fracciones de partículas más pequeñas pueden penetrar más profundamente en el sistema respiratorio y potencialmente causar más daño. Por ejemplo, el material particulado con un diámetro inferior a 2,5 o 1 μm (recolectadas mediante impactores $\text{PM}_{2,5}$, PM_1) es el que puede llegar más fácilmente a los pulmones por inhalación. Incluso puede llegar al torrente sanguíneo representando aún un mayor riesgo para la salud humana. En cambio, las fracciones de partículas superiores a 2,5 μm pero inferiores a 10 μm suelen provocar irritación de ojos, nariz y garganta (partículas inferiores a 10 μm se recolectan en impactores PM_{10}).

En el caso concreto de las proliferaciones de *O. cf. ovata*, la aerosolización de los análogos de la PLTX producidos por esta especie se ha relacionado con las irritaciones respiratorias observadas en algunas de las personas expuestas a los aerosoles marinos durante la proliferación [50]. La Tabla 4.1 resume algunos de los casos notificados de proliferaciones de *O. cf. ovata* en las costas del Mediterráneo. En esta tabla se indica el período en el que ha tenido lugar la proliferación, la ubicación, y el número de personas afectadas y cuyos síntomas se han asociado a dicha proliferación. Los efectos que se han observado en la salud de la población expuesta incluyen irritación de la piel, problemas respiratorios y síntomas gastrointestinales, entre otros. Hay que destacar los eventos en las áreas alrededor de Génova (Italia) y de Argelia, donde cientos de personas acudieron al hospital después de la exposición a aerosoles durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* en los veranos del 2005 y 2009, respectivamente [44,45]. No obstante, en algunos casos el inicio de aparición de los síntomas no coincide exactamente con las máximas abundancias

celulares de *O. cf. ovata* reportadas, ya que en algunos casos los síntomas se notifican durante el último período de la fase exponencial de la proliferación (sin llegar a ser durante las máximas abundancias celulares) [48–50].

Tabla 4.1. Resumen de algunos estudios publicados en los que se han relacionado las proliferaciones de *O. cf. ovata* en el Mar Mediterráneo con algunos efectos adversos en la salud de habitantes expuestos. Las concentraciones celulares se refieren al número máximo de células detectado en la zona, aunque no siempre ha coincidido exactamente con el inicio del brote sanitario. Fuente: Tabla 1 de Vila et al. (2016) [49] con algunas modificaciones, actualización del estudio de Berdalet et al. (2022) [50].

Año y región	Personas afectadas	Abundancia celular de <i>O. cf. ovata</i> (cél. gPF ⁻¹)*	Ref.
1998, 200, 2001, norte del Mar Tirreno (Italia)	~100	-	[313]
2003, 2004, sur del Mar Adriático (Italia)	28	* $>1 \times 10^6$	[46]
2004, noroeste del Mar Mediterráneo (España)	74 (se estima hasta 200)	2×10^4	[43,142]
2005, 2006, norte del Mar de Liguria (Italia)	209, 19	-	[45,109]
2006, noroeste del Mar Mediterráneo (España)	37	2×10^3	[179]
2006–2009, noroeste del Mar Mediterráneo (Francia)	47	$>3 \times 10^4$	[47]
2006, suroeste del Mar Mediterráneo (España)	57	1×10^3	[110]
2009, suroeste del Mar Mediterráneo (Argelia)	>300	* $5,9 \times 10^3$	[44]
2010, norte del Mar Adriático (Croacia)	7	$3,34 \times 10^5$	[48]
2013, noroeste del Mar Mediterráneo (España)	13	5×10^4	[49]
2013–2018, noroeste del Mar Mediterráneo (España)	5–22/año	5×10^5 – $6,9 \times 10^6$	[50]

*: Unidades en célula. L⁻¹; -: No hay datos.

De especial interés para esta Tesis es el estudio ecológico y epidemiológico realizado en la zona de Sant Andreu de Llavaneres (costa catalana, noreste de España)

a lo largo de seis años (2013–2018) [50]. En este estudio se realizaron encuestas epidemiológicas durante los períodos de proliferación de *O. cf. ovata*. Estas encuestas iban dirigidas tanto al personal que trabajaba en el Restaurante Pins Mar como a los bañistas que solían frecuentar esta zona o a las personas que vivían en los apartamentos Blau Mar, edificios frente a la zona de proliferación. Se observó que cada año, y durante los meses de la proliferación, 5–22 personas presentaban algún tipo de síntoma (en general malestar, secreción nasal e irritación de ojos). En general, los síntomas solían perdurar durante unos 3–4 días, y sólo en algunos casos se prolongaba hasta los 7 días. Las personas expuestas comentaron que observaban un cierto alivio al cerrar las ventanas y usar el aire acondicionado. Además, tan sólo un reducido número de personas (probablemente más sensibles) requirió algún tratamiento médico, generalmente consistente en la administración de antihistamínicos, analgésicos y/o antiinflamatorios.

Estos datos sugieren que las proliferaciones *O. cf. ovata* pueden representar un riesgo importante para la salud humana y por lo tanto es necesario llevar a cabo más investigaciones y seguimientos para entender mejor los mecanismos de exposición, así como para poder establecer estrategias que permitan prevenir y mitigar los impactos en la población expuesta. Aunque se ha sugerido que los causantes de las irritaciones respiratorias podrían ser los análogos de la PLTX, este hecho aún no ha sido demostrado. Los estudios con ratones, ya comentados, indican que los efectos respiratorios observados podrían estar relacionados con la exposición a estas toxinas [155]. Sin embargo, los agentes causantes de las irritaciones no están todavía del todo claros debido a los escasos estudios de aerosolización de estas toxinas.

El primer estudio de aerosolización de las toxinas producidas por *O. cf. ovata* se realizó durante las proliferaciones de los veranos de 2009 y 2010 en Sant Andreu de Llavaneres [148]. En este estudio se presentó el uso de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para detectar y cuantificar la presencia del dinoflagelado tóxico *Ostreopsis* spp. en los aerosoles marinos. Se tomaron muestras de aire frente al mar en Sant Andreu de Llavaneres durante 3 días. Los aerosoles se recolectaron en una serie de filtros por los que circulaba el aire que se bombeó durante 6–7h. El ensayo qPCR permitió detectar una secuencia genética correspondiente al *Ostreopsis cf. ovata* en muestras recolectadas durante el período de proliferación. Sin embargo, no se detectaron toxinas en las muestras de aerosol por encima del límite de detección de la técnica utilizada [148]. En otro estudio, realizado en el mismo período en la costa Toscana, se detectó la OVTX-a en una de las muestra de aerosol a una concentración de $2,4 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ L}_{\text{aire}}^{-1}$, mientras que las OVTX-b, -d, y -e fueron detectadas a niveles por debajo del límite de cuantificación [24]. En este contexto, en el año 2010, las autoridades de Mónaco, Francia e Italia se unieron en una iniciativa colaborativa para abordar el problema de las proliferaciones

de *Ostreopsis* en sus costas dentro del Acuerdo RAMOGE (www.ramoge.org) para la protección del medio ambiente marino en las costas de estos tres países. En 2014, el Instituto de Ciencias del Mar (CSIC-ICM) fue invitado a participar en el proyecto sobre *Ostreopsis* (España no forma parte del Acuerdo RAMOGE) para contribuir al seguimiento de la problemática de las irritaciones respiratorias relacionadas con las proliferaciones de la microalga *Ostreopsis* y desarrollar investigaciones conjuntas.

4.2. Experimental y resultados

Como ya se ha comentado, la potencial relación entre síntomas y episodios de las proliferaciones de *O. cf. ovata*, así como su correspondencia con la producción de toxinas, no está aún demostrada. Por ello, los estudios de aerosolización de biotoxinas marinas como el que se lleva a cabo en este Capítulo 4 son importantes, ya que pueden aportar información valiosa y evidencias sobre la potencial aerosolización de las toxinas producidas por *O. cf. ovata*, y así mejorar la comprensión de las complejas interacciones entre la biología marina, la química atmosférica y la salud humana.

Este Capítulo 4 se centra en el estudio de la aerosolización de los análogos de la PLTX y evaluación de la concentración a la cual podrían encontrarse en los aerosoles marinos. Para ello se utiliza una cámara de incubación de aproximadamente 75 L de capacidad y que contiene el agua muestreada durante las proliferaciones de *O. cf. ovata*. Para generar los aerosoles marinos se hace burbujear el agua del incubador. Los aerosoles son posteriormente muestreados y analizados con el fin de detectar/cuantificar las toxinas aerosolizadas. El Artículo #4 incluye 5 experimentos realizados durante la proliferación de *O. cf. ovata* en el año 2019, mientras que el Artículo #5 recoge 21 experimentos llevados a cabo durante las proliferaciones de los años 2020 y 2021 y un estudio mucho más detallado de diferentes aspectos (tiempo de incubación, fisiología celular, concentración celular, etc.) que pueden contribuir de diferente manera a la aerosolización. Todo ello ayuda a entender algo más las complejas interacciones océano-atmósfera y que llevan a la aerosolización de los análogos de la PLTX.

4.2.1. Parámetros adicionales determinados durante los experimentos de aerosolización

Tal y como se indica en los Artículos #4 y #5 en los que se estudia la aerosolización de los análogos de la PLTX, a parte de los parámetros clave (abundancia celular en el agua contenida en el incubador y la concentración de toxinas tanto en el agua como en el aerosol, explicados en la sección 2.3.1, Capítulo 2), durante los experimentos llevados a cabo en 2020 y 2021 (Artículo #5) también se midieron una serie de parámetros adicionales en el seston (conjunto de la comunidad de organismos y la materia orgánica en el agua de mar) con el fin de disponer de más información sobre el proceso de aerosolización. A continuación, se detallan los procedimientos llevados a cabo para la determinación de dichos parámetros medidos en las muestras de agua de mar incubadas en los experimentos del presente Capítulo 4. La numeración utilizada para identificar los diferentes experimentos o filtros utilizados en la aerosolización está basada en la aplicada en el Artículo #5.

- **Partículas de exopolímeros transparentes (TEP) en el seston.** Las TEP son el conjunto de polisacáridos producidos por microorganismos marinos (fitoplancton, bacterias y diatomeas) que desempeñan un papel importante en la formación y agregación de partículas marinas y que pueden actuar como vehículo de transporte de compuestos químicos por acumulación en la SML [314,315]. Para la determinación de la concentración de TEP se recolectaron muestras durante los experimentos del año 2020, al inicio del experimento (#1), después del enriquecimiento con células bentónicas (#3, #5) y al final del experimento (#8). Dichas muestras se tomaron por triplicado y se filtraron a través de filtros de policarbonato de 0,4 μm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro (DHI, San Francisco, EE. UU.). A continuación, los filtros que contenían los compuestos proteoglicanos carboxilados y sulfatados, se tiñeron con una disolución de azul alcian (8GX) (500 μl , 0,02 %, pH 2,5) durante 5s, se limpiaron con agua Milli-Q y se almacenaron en viales de 2 mL a -20°C hasta su análisis. Además, se prepararon blancos diarios de los filtros por triplicado para utilizarlos, posteriormente, durante la etapa de determinación analítica. Para el análisis de TEP, se extrajo el colorante de todos los filtros descongelados sumergiéndolos en 5 mL de ácido sulfúrico al 80% durante 3h y con agitación intermitente. La concentración de TEP se determinó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Passow y Alldredge (1995) [316]. La medida de la absorbancia de las muestras y de los blancos se llevó a cabo a 787 nm utilizando el espectrofotómetro Varian Cary 100 Bio utilizando agua Milli-Q como disolución de referencia y restando a cada lote de muestras la absorbancia media de los blancos diarios de los filtros. Como método de cuantificación se siguió el original que normalmente se suele aplicar [301,317–319]. Para ello, se utilizó goma xantana (XG) para preparar los patrones de calibración, ya que es un polisacárido que tiene propiedades físicas similares a las del TEP. La concentración de TEP se expresó en microgramos de equivalentes de goma xantana por litro ($\mu\text{g XG eq L}^{-1}$).

- **Dimetilsulfoniopropionato (DMSP) en el seston.** Conocer la concentración de DMSP en el seston, tal y como se comenta en la introducción de este capítulo, es importante, ya que a partir de este compuesto tiene lugar la liberación de DMS a la atmósfera. Las muestras para la estimación de DMSP total se recolectaron en 2021 antes de comenzar cada experimento (#2–#13) y al final del período de incubación en los experimentos #12 y #13. Las muestras de agua de mar se recolectaron en viales de vidrio de 40 mL y se añadió 400 μL de ácido sulfúrico:agua (1:4) para evitar la hidrólisis del DMSP y su transformación en DMS [320]. Los viales se sellaron y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Para la determinación de la concentración de DMSP en el agua de mar se llevó a cabo su transformación equimolar en DMS mediante hidrólisis alcalina (200 $\mu\text{L NaOH 5M}$) y se utilizó la cromatografía de gases (Thermo Scientific TRACE 1300) con detección fométrica de llama (FPD: *flame photometric detector*) para la determinación del DMS total [321]. El sistema se

calibró con soluciones patrón de DMSP que se sometieron a la correspondiente hidrólisis con NaOH, al igual que las muestras.

4.2.2. Artículo #4

Aerosols Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air–Sea Interactions

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Manuel Dall'Osto, Stefano Decesari, Marco Paglione, Encarnación Moyano, Elisa Berdalet

Environmental Science & Technology **2021**, 55, 468–477

Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air–Sea Interactions

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Manuel Dall’Osto,* Stefano Decesari, Marco Paglione, Encarnación Moyano, and Elisa Berdalet*

Cite This: *Environ. Sci. Technol.* 2021, 55, 468–477

Read Online

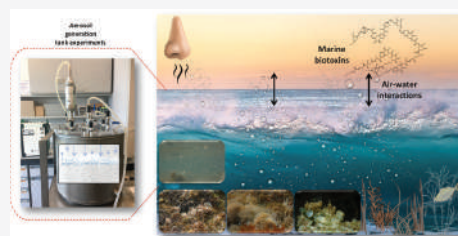
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Critical research is needed regarding harmful algal blooms threatening ecosystem and human health, especially through respiratory routes. Additional complexity comes from the poorly understood factors involved in the physical production of marine aerosols coupled with complex biogeochemical processes at ocean surfaces. Here—by using a marine aerosol generation tank—five bubble-bursting experiments (with contrasting incubation times and, likely, physiological microalgal states) were run to investigate simultaneously the concentrations of the toxins, synthesized by a natural *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom, in suspension in the water and in the atmosphere. The first two experiments (EXP1–2) were run with moderate levels of *O. cf. ovata* cell numbers (ca. 10^5 cells·L⁻¹) and total toxin in suspension (4×10^6 pg·L_{water}⁻¹) obtained at an early phase of the bloom. After 0.75–4 h incubation, toxin concentration in the aerosols accounted for 49–69 pg·L_{air}⁻¹. By striking contrast, three experiments (EXP3–5)—conducted with samples collected two weeks later with higher cell abundances and higher toxin concentration in the seston (respectively, about 1×10^6 cells·L⁻¹ and 2×10^8 pg·L_{water}⁻¹) and incubated for 21 h—showed about 15-fold lower atmospheric concentrations (3–4 pg·L_{air}⁻¹), while important foam accumulation was observed in the water surface in the tank. Offline spectroscopic analysis performed by proton-nuclear magnetic resonance spectroscopy showed that the particulate organic carbon in the water was drastically different from that of bubble-bursting aerosols from the tank experiments—suggesting a selective transfer of organic compounds from seawater into the atmosphere. Overall, the results suggest that aerosol production and diffusion of marine toxins in the atmosphere are regulated by complex interactions between biological processes and air-sea aerosol production dynamics.



1. INTRODUCTION

Harmful algal blooms (HABs) are proliferations of certain photosynthetic organisms that cause direct or indirect negative impacts to aquatic ecosystems, coastal resources, and human health.¹ Nowadays, blooms of the benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* constitute a particular challenge and paradigm of HABs because of its negative effects on marine fauna and the production of toxins potentially involved in mild respiratory and cutaneous irritation in humans and exceptional but dramatic seafood poisonings.^{2–4} This unicellular microalga grows in relatively shallow and well illuminated waters attached to benthic surfaces (macroalgae, corals, rocks, sands, etc.) by a self-produced mucopolysaccharide substance.⁵ Under suitable environmental conditions, *Ostreopsis* cells proliferate and the benthos appears covered by a rusty mucilaginous microfilm containing high *Ostreopsis* cell concentrations (between 10^5 and 10^7 cells·g⁻¹ fresh weigh of macroalgae).⁶ As part of the life cycle and with the help of certain water motion, aggregates are released from the benthos and float at surface as dense brown foams containing in the order of 10^6 to 10^7 cells·L⁻¹ of

water. In temperate coasts of the Mediterranean Sea, Brazil, and New Zealand, *Ostreopsis* blooms have been linked to massive mortalities of benthic organisms (starfish, sea urchins, crabs, and mussels).^{4,7,8} The involved noxious mechanisms are still poorly understood, but they could include a combination of low oxygen availability associated to the high biomass bloom and exposure to *Ostreopsis*-produced toxic compounds, with mucilaginous filaments playing a direct, possible active role in conveying toxicity.^{9,10}

Ostreopsis synthesizes palytoxin (PLTX) analogues, namely, putative PLTX (pPLTX), ostreocins, and ovatoxins (OVTX). PLTX is the most potent nonbacterial toxin attributed to particular seldom poisonings in tropical areas.^{2,11} OVTXs and

Received: August 28, 2020
 Revised: November 17, 2020
 Accepted: November 24, 2020
 Published: December 7, 2020





Figure 1. Left: *O. cf. ovata* hot spot (Sant Andreu de Llanerers beach) in the NW Mediterranean (red dot); center: detail of the rocky beach where macroalgal communities and *O. cf. ovata* proliferate; right: microscopy image of *O. cf. ovata* cells embedded in the mucilaginous matrix by which cells can attach to surfaces (photo credit: R. Duro, Science into Images). Cell length range: 20–60 μm .

pPLTX have been detected in some marine fauna in the Mediterranean Sea^{12,13} raising public health concern because of the recurrence of *Ostreopsis* blooms in this area reported in the last 20 years. Luckily, such seafood poisonings have not been detected yet in the Mediterranean. However, the mid-to-late summer massive blooms of *Ostreopsis* have been associated to mild respiratory illness (rhinitis, fever, and scratchy throat) and skin and mucosa irritation (eye and lips) on beach users after swimming and snorkelling.^{3,14–17} In order to prevent health impacts, regular monitoring is conducted in some Mediterranean countries and has driven beaches to be closed with subsequent loss revenue to tourist-dependent coastal communities.^{18–20} Concern has increased also among the scientific community because of the apparent expansion of the biogeographic distribution of this tropical genus to more temperate latitudes likely linked to global warming and anthropogenic forcing in the coastal areas.²¹

It has been hypothesized that pPLTX and OVTXs could be the causative agents of the respiratory disorders, and the toxic effects were observed in lungs of mice exposed to these aerosolized compounds.²² Also, *Ostreopsis* cells or fragments detected in the aerosols²³ could cause the irritative disorders, especially in more sensitive people. However, despite the recurrence of the *Ostreopsis* blooms during the summer vacation period in the Mediterranean, and the reported respiratory irritation cases, PLTX analogues have been rarely detected in the aerosol.²⁴ In the small-scale monitoring along the Tuscan coast (Italy) on 2010, 2.4 pg OVTX per liter of air was measured on August 11 and trace levels on August 12, concurrently to relatively low *Ostreopsis* cell numbers in the water (ca. 12,000 cells·L_{water}⁻¹ and 30,000 cells·g⁻¹ fresh weight (FW) of macroalgae) and *Ostreopsis* DNA detected in the filters used to sample aerosols. Although no human health symptoms were reported, this study constituted the first finding of *Ostreopsis cf. ovata*-produced toxins in the aerosol.²⁴ The simultaneous ecological and epidemiological approach explored by Vila et al. 2016 suggested that respiratory impacts in humans were not always directly related to high *O. cf. ovata* cell abundances during the blooms.¹⁷ In fact, the health impacts were noticed mainly during a short time window (ca. 10 days) at the end of the exponential phase of a long-lasting bloom (about 2 months). Hence, other factors including the physiology of the cells and the aerosolization mechanism of the toxic compounds from the water to the atmosphere may play an important role as well.

Understanding these factors and mechanisms are fundamental to assess the potential risk of human exposure to aerosolized *Ostreopsis*-produced toxins. However, addressing these studies in the field is complex as it is illustrated by the intensive and multidisciplinary research focused on the recurrent *Karenia brevis* (dinoflagellate) blooms in the Gulf of Mexico and Florida^{25–29} and *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) proliferations in lakes.^{30–32} Field studies showed that the intracellular and extracellular toxins (in the case of *K. brevis* brevetoxins released to the water due to cell rupture) may be transferred into the air through a bubble bursting with a wind-powered whitecapped wave mechanism.^{25,27,32} Recently, progress on the comprehension of the process governing the production of freshwater and marine aerosols and the qualitative and quantitative characterization of the generated particles is being gained by new experimental setups.^{33–35} In particular, microcystins were detected in aerosol particles generated in the laboratory by incubation of water collected during a *Microcystis* bloom in a lake.³⁵

With the objective to improve the understanding of the mechanisms involved on *Ostreopsis* toxin aerosolization, a series of experiments with a bubble-bursting aerosol generation tank were conducted. The experimental setup was previously used to investigate aerosol generation on different oceanic zones.^{36–38} The results presented in the next sections open new opportunities for the research of particular HAB aerosolized toxins and provide new hints on the distributions and transfer of the toxic organic material from the water into the atmosphere.

2. LOCATION, MATERIALS, AND METHODS

2.1. Water Samplings and Mediterranean Environmental Conditions.

Experiments were run on natural macroalgal epiphytic communities obtained along an *O. cf. ovata* bloom in the rocky beach of Sant Andreu de Llanerers, in the Catalan coast of Spain (41°33.13'N; 2°29.54'E; Figure 1). The bloom, which recurrently occurs along the summer–fall season, was monitored as described in previous studies.¹⁷ Briefly, samples for the estimations of epiphytic *O. cf. ovata* were collected from the dominant macroalgae, mainly *Jania rubens* (Linnaeus) J.V.Lamouroux, *Jania adherens* J.V.Lamouroux, and *Ellisolandia elongata* Ellis & Solander. Three groups of ca. 10 to 20 g fresh macroalgal samples, located within 10 m of each other, were collected and transferred to a 250 mL plastic bottle which was filled with a known volume of the surrounding seawater. Because benthic microalgae are strongly

attached to the macroalgae, cells are released from them by vigorous shaking of the sample for 1 min^{6,39} and subsequent sieving through a 200 μm mesh. A percolated water subsample, ca. 125 mL, containing *O. cf. ovata* and the accompanying microbiota was fixed with iodine Lugol's solution for cell number estimation (Section 2.3). Macroalgal FW was noted, and cell abundances were expressed as cells·g⁻¹ of FW of macroalga. When cell numbers were above 200,000 cells·g⁻¹, considered the alert value for human health and environmental risk, samples for the experiments were collected (see below). In particular, natural samples for EXP1 and EXP2 were obtained on 24 and 25 of July 2019, and those for EXP3, EXP4, and EXP5, on 5, 6, and 7 of August 2019, respectively.

For the experiments, macroalgae (ca. 200–500 g) were placed in several 8 L plastic beakers containing 5 L of natural seawater and transported to the laboratory within 1 h after collection. Microbenthic organisms were dislodged from the macroalgae by shaking each capped beaker for 1 min, with moderate motion to prevent excessive stress of the cells and subsequent filtration through a 200 μm sieve. A part of the percolated water was reintroduced in the beaker, and the agitation was repeated one or two more times to obtain enough biomass for the inocula. The percolated samples from each beaker were then merged into a single container, and *O. cf. ovata* cell numbers were estimated to calculate the inoculation volume in order to conduct the experiments with different initial *O. cf. ovata* abundance (Section 2.2). For each experiment, *O. cf. ovata* and the accompanying <200 μm microbiota were inoculated on 50 L of 0.2 μm -filtered seawater obtained from Sant Andreu de Llaveneres beach on the same day (24 cm air–water interface in the tank).

The bloom exhibited the typical pattern observed previously in the Mediterranean coast.^{6,17} Based on the curve shown in Figure 2, the experiments were conducted with samples collected, likely, at the end of the exponential growth phase and the beginning of the stationary period of the bloom, when epiphytic *O. cf. ovata* cell concentrations were between 2.5×10^5 and 9×10^5 cell·g⁻¹ FW of macroalgae. In the water,

maximum cell concentrations reached 75,000 cells·L⁻¹. Note that this value was measured on the sampling site and exposed to waves and currents that rapidly disperse plankton microalgae. For this reason, cells attached to the macroalgae constitute the reservoir of the bloom and are sampled to monitor benthic HABs.⁴⁰ Along the bloom, however, floating aggregates containing up to 2×10^6 cell·L_{water}⁻¹ were also found.

2.2. Aerosol Generation Tank and Experimental Setup.

Experiments were conducted in a temperature-controlled laboratory at ca. 24 °C \pm 1 °C. This temperature was slightly lower than the in situ temperature (26.3–27.0 °C) when the experimental samples were collected. It was chosen because it was the optimal temperature for long-term established *Ostreopsis* cultures isolated from the same location. The experimental incubator consisted on a 75 L airtight high-grade stainless-steel cylindrical tank (internal dimensions: 50 cm height, 44 cm diameter) designed to allow research on different marine ecosystems requiring high volume water for a variety of chemical and biological parameters.^{37,38} With a peristaltic pump, water was circulated at 50 rpm through a Teflon tube from the bottom to the top of the tank where it was dropped as a plunging jet over the water surface at a flow rate of 12 L min⁻¹: in this way, entrained air formed bubbles that—by bursting processes—produced spray aerosols. Particle-free compressed air was blown into the tank headspace (60 L min⁻¹), which had outlet ports including a PM₁ aerosol sampler with air pumped at 38.3 L min⁻¹ flux, a rotameter for air flux monitoring and because only one impactor was available, the rest of the air was eliminated as excess flow (Figure S1). PM₁ loadings in the experiments were in line with other marine chamber experiments and air quality studies.^{41,42} Before and after each experiment, cleaning protocols were applied including recirculation of 0.2 μm filtered seawater for an hour followed by tap water and two final 10 L deionized water rinsing.

The five experiments aimed to provide some insights into certain factors that could affect toxin aerosolization from the cells to the atmosphere. Two contrasting cell concentration ranges were chosen to start the incubation experiments. In EXP1 and EXP2, *O. cf. ovata* cells were inoculated in the range of 10^5 cells·L⁻¹, typically found in earlier phases of the proliferation, while EXP3, EXP4, and EXP5 started with the range of 10^6 *O. cf. ovata* cells·L⁻¹ corresponding to well-established blooms, when floating foam containing *O. cf. ovata* aggregates with these cell numbers are frequently observed. Before incubation started, duplicate samples for the estimation of cell numbers and duplicate filters for determination of total toxin concentration in suspension in the water were obtained.

Aerosol bubbling—bursting running time lasted for 0.75 h in EXP1, 4 h in EXP2, and 21 h in EXP3, EXP4, and EXP5. The shortest incubation allowed us to explore if toxins could be released at the beginning of the incubation, while the longest period provided a vision of the overall aerosolization within approximately one day. After the incubation, the PM₁ aerosol collecting filter for analysis of toxins (in all experiments) and chemical composition by proton-nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) (in EXP1 and EXP2) was frozen at -80 °C. The tank was open, water was carefully mixed, and samples for *O. cf. ovata* cell numbers and toxin concentration determination (duplicate GF/F filters) in the seston (suspended in the water) were obtained. In EXP1 and EXP2, additional water samples were also collected on GF/F

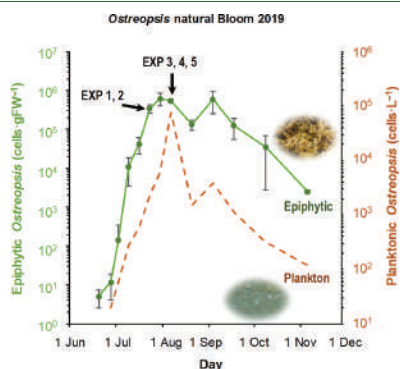


Figure 2. *O. cf. ovata* bloom in Sant Andreu de Llaveneres beach with the epiphytic (attached to macroalgae) cell concentrations (grey line) and plankton concentrations (orange line). Green vertical bars correspond to the standard deviation of three macroalgae sampled to estimate the *O. cf. ovata* benthic cell concentration in the field. Only one water sample was taken for the abundances in the plankton.

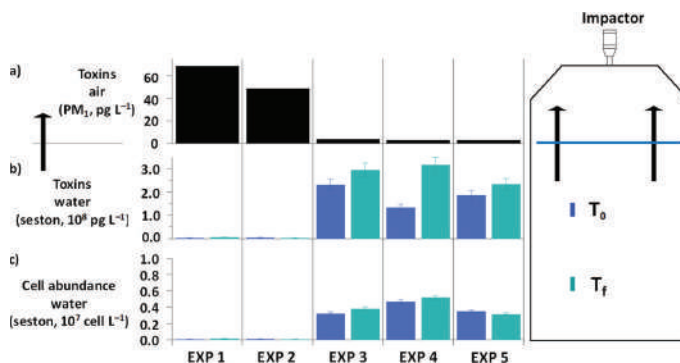


Figure 3. Total toxin concentrations in the air (a) retained in the PM₁ aerosol collecting filter during the time of the experiment (T_0 – T_f); total toxin concentration in water (seston, in suspension) (b) and *Ostreopsis* cell abundance in water (seston) (c) at the beginning (blue bars, T_0) and the end (green bars, T_f) of the experiments. Vertical bars correspond to the standard deviation of the two duplicate toxin samples in the water (seston) and cell counts. On the right is the scheme of the aerosol generation tank; black arrow lines help to visualize the sea–air interface.

filters to analyze the chemical composition by ¹H-NMR (Section 2.5). In a nutshell, given the complexity of the ocean-atmosphere system and the toxin production, two contrasting scenarios were chosen: EXP1–2 with low microalgal concentrations and short incubation times and EXP3–5 with high microalgal concentrations and long incubation times. This is by far not comprehensive; nevertheless it aims to show that complex air–sea aerosol production dynamics (often ignored) play an important role in the export of toxins from the sea to the air interface.

2.3. *O. cf. ovata* cell Counts. Water samples (10 mL) were fixed with iodine Lugol's solution, and *O. cf. ovata* cells concentrations were estimated by duplicate using a 1 mL Sedgwick-Rafter cell under a Leica-inverted light microscope. This is a suitable counting method for quantifying cell numbers in the range of 10³–10⁶ cells·L⁻¹·water⁻¹, with a 5% confidence limit.⁴³ The sampling and counting method in this study had an estimated global coefficient of variation (CV %) of 20%.

2.4. Toxin Collection, Extraction, and Analysis in Seawater and Aerosol Samples. Although *O. cf. ovata*-produced toxins occur mainly intracellularly, they can also be retained in the mucus but have never been detected in the dissolved phase.^{9,44} Seawater samples were filtered (<20 mmHg) through 25 mm GF/F filters (Whatman, Clifton, NJ, US) for estimation of toxin concentration in the *O. cf. ovata* cells. Because cells remain strongly attached to the mucilaginous matrix, this filtration procedure must have also retained toxins bound to the mucus. Accordingly, the toxins estimated in the filtered water samples are referred to as total toxins in suspension (seston). PM₁ aerosol was collected on 47 mm Whatman QM-A quartz filters, pretreated by washing twice on 1% nitric acid, followed by rinsing twice with Milli-Q deionized water, and subsequent drying at 30 °C.⁴⁵ Both water and aerosol samples were immediately frozen at –80 °C and kept in these conditions until analysis (one single freeze–thaw cycle). The PM₁ collecting filters were divided in two equal portions with sharp and ethanol-cleaned inox scissors, and toxin concentration was analyzed in one of them. In EXP1 and EXP2, the second half was used for ¹H-NMR analysis (Section 2.5).

Toxin extraction was conducted following Ciminiello et al. 2006 modified by Tartaglione et al. 2016, the most common method used in the last 15 years in the research of *Ostreopsis* species-produced toxins.^{46–48} Briefly, filters were extracted in 2 mL of MeOH/H₂O (1:1, v/v) (previously cooled down to –20 °C) and three 10 min ultrasonic pulses in an ice-cooled bath, with vortex shaking between ultrasound pulses. Then, the extract was centrifuged (4500 rpm, 4 °C, 5 min), the supernatant was transferred to a new tube and a second extraction was conducted on the pellet. The two extracts were merged, filtered through 0.22 μm nylon membranes (Whatman, Clifton, NJ, US), and stored in amber glass vials at –80 °C until their analysis by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC–HRMS) following essentially Ciminiello et al. 2014.²⁴ With this protocol, a recovery (extraction efficiency) of 91–98% for PLTX standard in natural marine phytoplankton cell pellets was reported.⁴⁶ Because recovery tests for quartz filter extraction will be conducted in future experiments, recovery corrections have not been applied and original (raw) data are presented here.

An UHPLC system (Accela; Thermo Fisher Scientific, San José, CA, US) equipped with an Accela 1250 quaternary pump, an Accela autosampler, and a column oven (Thermo Fisher Scientific) was used coupled to a Q-Exactive Orbitrap Fourier-transform mass spectrometer (FTMS) system (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray source operated in positive-ion mode. The vaporizer and ion transfer tube temperatures were set at 350 and 275 °C, respectively. Spray voltage was established at +3 kV, and an S-lens RF level of 70 a.u. was used. Chromatographic separation was performed in a Hypersil GOLD C18 column (100 mm × 2.1 mm i.d., 1.9 μm particle size) packed with totally porous silica particles from Thermo Fisher Scientific. The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and water (solvent B) both containing 0.1% formic acid. The gradient elution program was: 0–1.5 min, isocratic step at 30:70 (acetonitrile:water 0.1% formic acid, v/v); 1.0–13.5 min, linear gradient up to 35:65; 13.5–15.0 min, linear gradient up to 90:10, and then back to initial conditions. The mobile phase flow rate was 300 μL·min⁻¹, and the column temperature was held at 23 °C. The

UHPLC system was coupled to a Q-Exactive Orbitrap FTMS system operating in full scan MS mode (m/z 800–1500) at a mass resolution of 70,000 full width at half-maximum. The Xcalibur software v2.1 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the UHPLC–HRMS system and to acquire and process the MS data. Calculation of elemental formulae was performed on the mono-isotopic peak of each ion cluster with a mass tolerance of 5 ppm. The isotopic pattern of each ion cluster was taken into consideration in assigning molecular formula. Extracted ion chromatograms for PLTX and OVTXs were obtained by selecting the most intense peaks of the toxin ion cluster. The quantitative results are expressed as the sum of the pPLTX and all OVTX forms (a to g). With these instrumental conditions, the measured limit of detection and quantitation for PLTX standard was 1.6 ng·mL⁻¹ and 4.5 ng·mL⁻¹ of the extract, respectively.

The final concentration of toxins in the samples was calculated considering the extraction volume (4 mL) and the seawater volume filtered through GF/F filters or the liters of air circulated through the filter in the impactor.

2.5. ¹H NMR-Spectroscopy. The two water samples collected in GF/F glass fiber filters and the half filters corresponding to the two sea-spray PM₁ generated aerosols were extracted with deionized ultrapure water (Milli-Q) in a mechanical shaker for 1 h and the water extract was filtered through poly(tetrafluoroethylene) membranes (0.45 μm pore size) in order to remove suspended particles; details of the procedure can be found elsewhere.⁴⁹ On the basis of the range of frequency shifts, the signals can be attributed to H–C containing specific functionalities and/or identifying specific tracers.^{50–52}

2.6. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed using SPSS version 17.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, USA). The nonparametric Wilcoxon paired test was run to compare the toxin profile in the duplicate water samples at the beginning and the end of the incubation. The nonparametric Mann–Whitney U test was used to test the differences within the toxin profiles in the seston samples used in the five experiments.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Concentrations of Total Toxin in Suspension in Water and in Air. Figure 3 shows the changes in *O. cf. ovata* cell abundance and total toxin concentration in suspension in the seawater samples at the beginning and at the end of each experiment, as well as the toxin concentration retained in the PM₁ aerosol collecting filter during the duration of the experiment. The corresponding values are presented in Supporting Information, Table S1. In EXP1, the concentrations of both *O. cf. ovata* cell numbers and total toxin in suspension (i.e., including all OVTX forms and pPLTX) in the water increased during the incubation (from $0.72 \times 10^5 \pm 1.44 \times 10^4$ to $1.82 \times 10^5 \pm 3.64 \times 10^4$ cells·L_{water}⁻¹ and from $3.52 \times 10^6 \pm 7.58 \times 10^3$ to $6.23 \times 10^6 \pm 5.72 \times 10^5$ pg·L_{water}⁻¹, respectively), while the total toxin concentration in the bubble bursting generated PM₁ aerosol which accounted for 119 ng in the filter, corresponding to 69.01 pg per liter of circulated air. In EXP2, both cell numbers and total toxin in the seston decreased slightly (from $1.35 \times 10^5 \pm 2.70 \times 10^4$ to $1.05 \times 10^5 \pm 2.10 \times 10^4$ cells·L_{water}⁻¹ and from $4.86 \times 10^6 \pm 2.73 \times 10^5$ to $3.64 \times 10^6 \pm 6.02 \times 10^5$ pg·L_{water}⁻¹, respectively) with 664 ng of total toxin collected in the filter, corresponding to 49.13 pg per liter of circulated air. Overall different responses were

obtained in EXP3, EXP4, and EXP5 conducted 15 days later and run with higher cell concentrations in the tank which were incubated for 21 h. Interestingly, compared to EXP1 and EXP2, very low total toxin concentration was found to be retained in the PM₁ aerosol filters of the three experiments: a total toxin mass of 138–191 ng per corresponding filter (3–4 pg per liter of circulated air). During the incubation period, both *O. cf. ovata* cell numbers and total toxin concentration in suspension in the water increased slightly from $3.26 \times 10^6 \pm 6.52 \times 10^5$ to $3.83 \times 10^6 \pm 7.66 \times 10^5$ cells·L_{water}⁻¹ and from $2.30 \times 10^8 \pm 1.79 \times 10^5$ to $2.93 \times 10^8 \pm 3.00 \times 10^7$ pg·L_{water}⁻¹ in EXP3. In EXP4, *O. cf. ovata* cell abundance increased from $4.69 \times 10^6 \pm 9.38 \times 10^5$ to $5.21 \times 10^6 \pm 1.04 \times 10^6$ cells·L_{water}⁻¹ and total toxin concentration in the seston increased from $1.33 \times 10^8 \pm 1.43 \times 10^7$ to $3.15 \times 10^8 \pm 4.44 \times 10^7$ pg·L_{water}⁻¹. Finally, in EXP5, *O. cf. ovata* cell numbers slightly decreased from $3.52 \times 10^6 \pm 7.04 \times 10^5$ to $3.15 \times 10^6 \pm 6.30 \times 10^5$ cells·L_{water}⁻¹ and total toxin concentration in suspension in the water increased from $1.87 \times 10^8 \pm 2.83 \times 10^7$ to $2.34 \times 10^8 \pm 1.57 \times 10^7$ pg·L_{water}⁻¹. In EXP3, EXP4, and EXP5, important foam accumulation occurred at the water–air interface in the tank (Supporting Information, Figure S2). The total toxin concentrations in suspension in the water in EXP1 and EXP2 were in the same range of magnitude found in the hot spot of Sant Andreu de Llavaneres in floating aggregates during the peak of the blooms (Berdalet et al., in prep). Toxin concentrations in EXP3, EXP4, and EXP5 were 10 to 100 times higher, and were similar to those measured under experimental conditions in *Ostreopsis cf. ovata* cultures.

In all experiments, the observed temporal variation (increase or decrease) in cell numbers should be considered in relative terms, being the result of the uneven distribution of *O. cf. ovata* cell in dense aggregates, the reproduction by a part of the population during the night (as it is usual in dinoflagellates) in the case of the 21 h incubation experiments, and some biological processes (competition or grazing) involving the other components of the incubated natural microbial community. These factors may have also affected toxin concentrations in the seston, which were 1.3- to 2.4-fold higher after the incubation. On the whole, the temporal trend in the water during the bubble-bursting experiments should be taken as indicative that the cells were alive along the experiments and able to synthesize toxins.

The most relevant observation is that the experiments conducted with the low/moderate cell abundance and toxin concentrations in suspension in the water (EXP1 and 2) resulted in the highest toxin concentrations detected in the sea-spray bubble-bursting-produced aerosols. EXP1 and EXP2 were performed with samples obtained in an early phase of the bloom. Whilst this is only a laboratory study, this pattern could explain some similar results noted by Cimminiello et al. 2014; higher toxin concentrations in the air were found during days with low toxin abundance in suspension in the water, although no detailed explanation was provided. The toxins found in the five experiments were in the range of 3 to 69 pg·L⁻¹ of air (Figure 3). The lower values were in the range detected by Cimminiello et al. 2014, 2.4 pg·L⁻¹ of air using an SAS PCR air sampler for 3 h with artificial saltwater as collecting fluid. The present results are also consistent with the observations that high *O. cf. ovata* cell concentration in the water may not necessarily cause respiratory symptoms on beach users as described by Vila et al. 2016. This study suggested that the complex physiological processes influenced by environmental

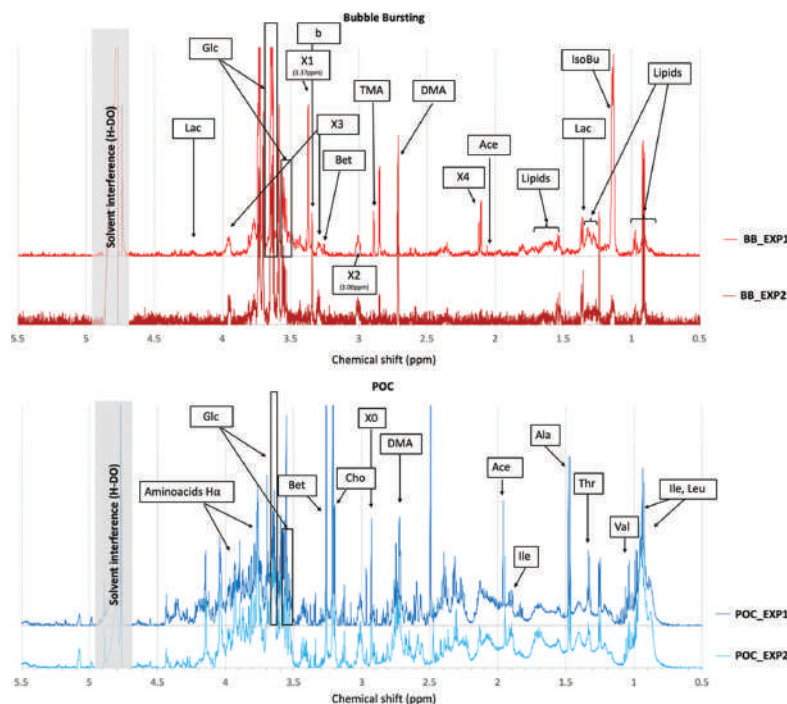


Figure 4. Aliphatic region of the $^1\text{H-NMR}$ spectra of the BB aerosol (upper reddish spectra) samples extracts in EXP1 and EXP2 and the two particulate samples (POC) in the water (lower blueish spectra). In the BB samples, specific $^1\text{H-NMR}$ resonances were assigned to lactic acid (Lac), acetic acid (Ace) isobutyric acid (IsoBu), di- and tri-methylamines (DMA and TMA), glycerol (Glc), *N*-osmolytes (only Bet: betaine) and to blank contaminations (b). In the POC, specific $^1\text{H-NMR}$ resonances were assigned to the residuals of amino acids (Ala, Thr, Val, Ile, and Leu) and their alpha hydrogen atoms, isobutyric acid (IsoBu), acetic acid (Ace), DMA, *N*-osmolytes (Bet: betaine; Cho: choline), and glycerol (Glc). A sharp peak at 2.92 ppm (labelled as X0) resembles the methyl of the Dimethylsulfoniopropionate (DMSP), not confirmed by the absence of the characteristic triplets at 2.8 and 3.49 ppm. Unresolved mixtures of aliphatic compounds were identified as lipids. Peaks or structures denoted as X# correspond to resonances not attributed yet to specific tracers but already identified in previous studies.^{48,54}

factors that vary along the bloom (e.g., nutrients, temperature, and water motion) may modulate toxin production by the cells, its release, and aerosolization. Interestingly, brevetoxins in the air were also high coinciding with low *K. brevis* cell abundance and the intracellular toxin content in the bloom studied by Pierce and Henry 2008.⁵³

In all experiments, the toxin profile in the duplicate water samples (corresponding to cells, cell debris, and mucus) did not change significantly from the beginning to the end of the incubation. In turn, no significant differences were found within the toxin profiles in the seston samples used in the five experiments (Figure S3). The overall toxin profile in suspension in seawater was constituted by $56 \pm 6\%$ OVTX-a, $28 \pm 4\%$ OVTX-b, $3 \pm 0.4\%$ OVTX-c, $6 \pm 1\%$ OVTX-d, $6 \pm 1\%$ OVTX-e, $0.7 \pm 0.2\%$ OVTX-f, $1.4 \pm 0.4\%$ OVTX-g, $0.5 \pm 0.1\%$ pPLTX. This pattern corresponds to profile #1 described by Tartaglione et al. 2017, the most common profile found in *Ostreopsis* strains collected in the Mediterranean Sea.⁴⁸

In the aerosol, the toxin profile in EXP1, 4 and 5, was characterized by ca. 68% OVTX-a and 31% OVTX-b, while the other toxin analogues, including pPLTX, were not detected

(Figure S3). OVTX-c was also detected in EXP3, resulting in a toxin profile composed by ca. 62% OVTX-a, 26% OVTX-b, and 12% OVTX-c. EXP2 presented the more diverse profile including a 53% OVTX-a, 28% OVTX-b, 4% OVTX-c, 8% OVTX-d, and 7% OVTX-e. The detection of OVTX-c, OVTX-d, and OVTX-e, which are usually found below ca. 8% in *Ostreopsis* toxin profile #1,⁴⁸ could have been possible especially in EXP2 because of high toxin mass collected in the filter (664 ng) (Table S1). Furthermore, it cannot be discarded that OVTX analogues may not be transferred from the water to the aerosol uniformly, as described for microcystins, but further research to confirm is required.³⁵ Still, it is important to keep in mind that incubations in EXP 1 and 2 were shorter (0.75 and 4 h, respectively) than in EXPs 3, 4, and 5 (21 h). Potential toxin degradation as well as saturation of aerosol load retention in the filters in the longer term incubations cannot be discarded and could have affected the quantitative (total toxin content) and qualitative (toxin profile) obtained results presented and discussed here. These aspects require careful and complex tests that will be addressed in future tests.

3.2. Organic Composition of POC in the Water and Bubble-Bursting Aerosols. Further insights from the primary aerosol production come from the chemical analysis of the particulate fraction in suspension in the water (seston) also referred to as particulate organic carbon (POC). POC contains *O. cf. ovata* cells, its mucilaginous matrix, as well as the accompanying microbial community retained in GF/F filters and in bubble-bursting (BB) aerosols collected in the impactor. Figure 4 (bottom, POC EXP1 and EXP2 spectra) shows the ¹H-NMR spectra of two water samples from EXP1 and EXP2, respectively. POC composition was dominated by peptides (traced by amino acids such as alanine, threonine, valine, isoleucine, and leucine) and sugars or polyols (with signals in the H–C–O region between 3.3 and 4.2 ppm of chemical shift).^{49–51} Other resonances of organic markers common to all POC samples are acetic acid, dimethylamine, and *N*-osmolytes (betaine and choline) as well as glycerol. A similar POC composition was found in surface open ocean water and from melted sea-ice samples investigated in studies carried out in the North Atlantic⁵⁴ and in the Weddell Sea⁴⁹ and analyzed with the same procedure used here. However, in contrast with these studies, specific signals of anomeric hydrogen atoms characteristic of most common monosaccharides (in the range 5.0 to 5.5 ppm of the chemical shift) were detected.^{49–51} These signals may reflect the occurrence of sugars as large polymers (polysaccharides) composing the *Ostreopsis* mucilaginous matrix. The specific ¹H-NMR resonances of PLTX analogues cannot be resolved from the complex matrix signal.

The spectra of the BB aerosolized seawater (BB EXP1 and EXP2 spectra, Figure 4 top) show little overlaps with the POC spectra, except for a few resonances (such as the triplet at 3 ppm, which however has never been identified unambiguously). The spectra of the bubble-bursting samples showed intense signals from isobutyric acid and glycerol. Glycerol occurred both in free form and chemically bound in esters. The glycerol resonances overlapped with a broader band in the H–C–O region between 3.4 and 3.9 ppm attributable to small oligo- and polysaccharides, pointing to likely aerosolized mucilage fragments. In the spectral region of alkyls (H–C, 0.7–1.9 ppm), the resonances of lactic acid and isobutyric acid overlapped with the broad bands of linear aliphatic compounds, such as short-chain fatty acids. These occurred in much smaller proportions with respect to sugars when compared to the bubble-bursting experiments conducted with a similar setup in the Weddell Sea. Another important difference is the scarcity of *N*-osmolytes (i.e., betaine, choline, etc.) which, in the Weddell Sea samples, were also associated to phospholipids in nascent sea-spray particles. These results suggest the peculiarity of *Ostreopsis*, a benthic, tropical-temperate microalga.

In summary, the NMR chemical profile results show that the process of aerosolization in the tank enriches primary marine aerosols with lipids and small oligosugars while depleting them of free amino acids and peptides in general. This points to the selectivity of the aerosolization processes, likely interfered by a foam layer continuously broken and recreated by a plunging jet (Figure S2), resulting in an aerosol population in the atmosphere with a very different chemical composition than the bulk water.

3.3. From the Benthic-Pelagic Compartments to the Atmosphere. This study examined the toxin content in experimentally generated aerosols from seawater samples

containing different cell concentrations of *O. cf. ovata* obtained on particular days along the bloom, and likely, under different physiological conditions. For the first time, *O. cf. ovata* toxin concentrations were simultaneously measured in suspension in the water and in the air using an experimental aerosol generating tank. Some clues about the combination of biological and physicochemical mechanisms potentially involved in the toxin transfer from the water to the atmosphere were also obtained.

A simple direct response between the water and the atmospheric phases could have been anticipated: the more toxins in the water, the more toxins in the air. By striking contrast, the opposite trend was found: the higher the cells and toxin concentrations in the water (seston) samples, the lower the amount of the toxin material sampled in BB aerosols produced in the sea-spray chamber. A first and simple reason was that the different cell concentrations were obtained during two distinct moments of the bloom as it was found in previous studies.^{17,24} Second, toxin aerosolization may have also depended on the mucilaginous matrix abundantly produced by *O. cf. ovata* to colonize benthic substrates, which would contribute to the buoyancy of the phytoplankton aggregates and, somehow, to the formation of toxic aerosols as well. However, the high cell abundance and associated mucilage in the floating foam would have limited the toxin emissions in agreement with other studies.⁵⁵

Jenkinson et al. (2018) reviewed the biological modification of mechanical properties of the sea-surface microlayer, influencing waves, ripples, foam, and air-sea fluxes.⁵⁵ Foams—including whitecaps and extensive foams—may have ecological functions but also play a major role in modulating global air–sea aerosol fluxes and are critical in the quantitative and qualitative production of sea-salt aerosols. However, foams have different organic compositions depending on the biological components of the aquatic communities and their physiological dynamics, which ultimately determines the amount of polysaccharide-rich and protein-rich particles in the surface microlayer.^{56–58} Overall, all these differences translate in drastic differences of aerosol mass particle production and different chemical characteristics of the organic component emitted in the atmosphere as it was also found in this study.

Finally, a main motivation for a better understanding of the mechanisms of aerosol production from wave breaking on freshwater lakes and sea spray are the known health impacts reported by exposure to aerosol-containing toxic organic materials during cyanobacteria proliferations^{31,34} and *K. brevis* blooms.^{26,53} Although HABs are essentially natural phenomena, they also have anthropogenic causes. Human societies in coastal and freshwater areas benefit from aquatic ecosystems, but high population density and activity also constitute major pressures to the environment. Excessive coastal use with natural habitat destruction, overfishing and eutrophication, and superimposed global anthropogenic warming seems to be favoring HAB events.⁵⁹

This set of laboratory experiments represent a new step forward in simultaneously determining the amount of HAB toxins both in suspension in seawater and air and they may also allow to address many uncertainties concerning ocean/atmosphere interactions. Concerning HAB toxins, some technical drawbacks must be clarified (e.g., potential toxin degradation and saturation of load retention of the filters). Furthermore, it is necessary to explore how the different

factors involved on HAB development—physicochemical (temperature, wind, waves, surface microlayer, and air–sea interactions) and biological (microalgal metabolism and physiology, predation, competition, and parasitism)—may contribute to aerosolized toxin production. In the case of *Ostreopsis*, experiments need to be conducted along different physiological states of the bloom, exploring the stress generated to the cells by bubbling–bursting incubation time to understand the toxin production and aerosolization. In addition, it is poorly understood how the interaction with other natural organic and inorganic components in the environment may also control marine aerosol production.^{36,38,60} A necessary step toward a better understanding of the ocean/atmosphere interactions consists in addressing the strong interdependence of multiple abovementioned biological, chemical, and physical processes. Inter- and transdisciplinary studies—widely advocated but yet still poorly developed—are needed in order to reduce gaps between ocean and atmospheric sciences.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.0c05795>.

Additional details of the bubble-bursting aerosol generation tank, image of the water surface of the experimental tank with foam accumulation toxin profile detected in the aerosol and seawater samples, cell abundance and toxin concentration in the water (seston) before and after the experiments, and mass and air concentrations of toxins on the obtained PM₁ aerosol (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Manuel Dall'Osto – Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0003-4203-894X; Email: dalosto@icm.csic.es

Elisa Berdalet – Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; Email: berdalet@icm.csic.es

Authors

Noemí Inmaculada Medina-Pérez – Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain; orcid.org/0000-0003-0208-1580

Stefano Decesari – Institute of Atmospheric and Climate Sciences, National Research Council of Italy (CNR), Bologna I-40129, Italy; orcid.org/0000-0001-6486-3786

Marco Paglione – Institute of Atmospheric and Climate Sciences, National Research Council of Italy (CNR), Bologna I-40129, Italy; orcid.org/0000-0002-4423-2570

Encarnación Moyano – Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry and Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain; orcid.org/0000-0002-1233-8864

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.0c05795>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support received by N.I.M-P. from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities through the project PGC2018-095013-B-I00 and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Government of Catalonia, Spain) through the project 2017SGR–310. N.I.M-P also thanks the PhD research financial assistance of Water Research Institute (IdRA) of the University of Barcelona. The study was supported by the CoClIME project, an ERA4CS Network (ERA-NET) initiated by JPI Climate and funded by EPA (IE), ANR (FR), BMBF (DE), UEFISCDI (RO), RCN (NO), and FORMAS (SE), with co-funding by the European Union (Grant no. 690462). CoClIME is endorsed to the international programme on harmful algal blooms GlobalHAB (www.globalhab.info). Funds were also provided by Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) to the PI-ICE (CTM2017–89117-R) project, and M.D.A. received a Ramón y Cajal fellowship (RYC-2012-11922). We thank Laia Viure Feliu and José Fernández Simón for their help in sampling *Ostreopsis* in the field and Dr. R. Abós-Herrandiz for his help with statistics. Finally, we acknowledge the positive and constructive comments of five anonymous reviewers that improved markedly the revised version of this manuscript.

■ REFERENCES

- (1) GEOHAB. *Global ecology and oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan*; Glibert, P., Pitcher, G., Eds.; SCOR, IOC: Baltimore, Paris, 2001; 87pp.
- (2) Alcalá, A. C.; Alcalá, L. C.; Garth, J. S.; Yasumura, D.; Yasumoto, T. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a Palytoxin-like toxin. *Toxicon* **1988**, *26*, 105–107.
- (3) Durando, P.; Ansaldo, F.; Oreste, P.; Moscatelli, P.; Marensi, L.; Grillo, C.; Gasparini, R.; Icardi, G.; Collaborative Group for the Ligurian Syndromic Algal Surveillance. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005–06, in north-west Italy. *Eurosurveillance* **2007**, *12*, No. E070607.1.
- (4) Shears, N. T.; Ross, P. M. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*: an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* **2009**, *8*, 916–925.
- (5) Honsell, G.; Bonifacio, A.; De Bortoli, M.; Penna, A.; Battocchi, C.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Sosa, S.; Yasumoto, T.; Tubaro, A. New Insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A multidisciplinary approach. *PLoS One* **2013**, *8*, No. e57291.
- (6) Mangialajo, L.; Ganzin, N.; Accoroni, S.; Asnaghi, V.; Blanfuné, A.; Cabrini, M.; Cattaneo-Vietti, R.; Chavanon, F.; Chiantore, M.; Cohu, S.; Costa, E.; Fornasaro, D.; Grosseil, H.; Marco-Miralles, F.; Masó, M.; Reñé, A.; Rossi, A. M.; Sala, M. M.; Thibaut, T.; Totti, C.; Vila, M.; Lemée, R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* **2011**, *57*, 408–420.
- (7) Ferreira, C. E. L. Sea urchins killed by toxic algae. *JMBA Glob. Mar. Environ.* **2006**, *3*, 22–23.
- (8) Sansoni, G.; Borghini, B.; Camici, G.; Casotti, M.; Righini, P.; Rustighi, C. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale* **2003**, *17*, 17–23.
- (9) Giussani, V.; Sbrana, F.; Asnaghi, V.; Vassalli, M.; Faimali, M.; Casabianca, S.; Penna, A.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Mazzeo, A.; Chiantore, M. Active role of the

mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* **2015**, *44*, 46–53.

(10) Carella, F.; Sardo, A.; Mangoni, O.; Di Cioccio, D.; Urciuolo, G.; De Vico, G.; Zingone, A. Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *127*, 130–140.

(11) Randall, J. E. Review of clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of clupeoid fishes. *Pac. Sci.* **2005**, *59*, 73–77.

(12) Amzil, Z.; Sibat, M.; Chomerat, N.; Grosseil, H.; Marco-Miralles, F.; Lemée, R.; Nezan, E.; Sechet, V. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 477–496.

(13) Biré, R.; Trotereau, S.; Lemée, R.; Delpont, C.; Chabot, B.; Amound, Y.; Kryš, S. Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. *Harmful Algae* **2013**, *28*, 10–22.

(14) Gallitelli, M.; Ungaro, N.; Addante, L. M. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *239*, 2599–2600.

(15) Tichadou, L.; Glaizal, M.; Armengaud, A.; Grosseil, H.; Lemée, R.; Kantin, R.; Lasalle, J. L.; Drouet, D.; Rambaud, L.; Malfait, P.; De Haro, L. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 839–844.

(16) Pfannkuchen, M.; Godrijan, J.; Pfannkuchen, D. M.; Iveša, L.; Kržić, P.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Godrijan, M. Toxin-producing *Ostreopsis cf. ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 5574–5582.

(17) Vila, M.; Abós-Herrándiz, R.; Isern-Fontanet, J.; Alvarez, J.; Berdalet, E. Establishing the link between *Ostreopsis cf. ovata* blooms and human health impacts using ecology and epidemiology. *Sci. Mar.* **2016**, *80*, 107–115.

(18) Lemée, R.; Mangialajo, J.; Cohe, S.; Amzil, Z.; Blanford, A.; Chomerat, N.; Ganzin, N.; Gasparini, S.; Grosseil, H.; Guidi-Guivard, L. D.; Hoareau, L.; Le Duff, F.; Marro, S.; Simon, N.; Nezan, E.; Pedrotti, M. L.; Sechet, V.; Soliveres, O.; Thibaut, T. Interactions between scientists, managers and policy makers in the framework of the French MediOs project on *Ostreopsis cf. ovata* blooms. *Cryptogam. Algal.* **2012**, *33*, 137–142.

(19) Vila, M.; Arin, L.; Battocchi, C.; Bravo, I.; Fraga, S.; Penna, A.; Reñé, A.; Riobó, P.; Rodríguez, F.; Sala, M. M.; Camp, J.; Torres, M.; Franco, J. M. Management of *Ostreopsis* blooms in recreational waters along the Catalan Coast (NW Mediterranean Sea): Cooperation between a research project and a monitoring program. *Cryptogam. Algal.* **2012**, *33*, 143–152.

(20) Funari, E.; Manganello, M.; Testai, E. *Ostreopsis cf. ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities. *Harmful Algae* **2015**, *50*, 45–56.

(21) Tester, P. A.; Wayne Litaker, R.; Berdalet, E. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101655.

(22) Poli, M.; Ruiz-Olvera, P.; Nalca, A.; Ruiz, S.; Livingston, V.; Frick, O.; Dyer, D.; Schellhase, C.; Raymond, J.; Kulis, D.; Anderson, D.; McGrath, S.; Deeds, J. Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats. *Toxicom* **2018**, *150*, 235–250.

(23) Casabianca, S.; Casabianca, A.; Riobó, P.; Franco, J. M.; Vila, M.; Penna, A. Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR assay in marine aerosol. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3788–3795.

(24) Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Benedettini, G.; Onorari, M.; Serena, F.; Battocchi, C.; Casabianca, S.; Penna, A. First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 3532–3540.

(25) Cheng, Y. S.; McDonald, J. D.; Kracko, D.; Irvin, C. M.; Zhou, Y.; Pierce, R. H.; Henry, M. S.; Bourdelais, A. J.; Abraham, W. M. Concentration and particle size of airborne toxic algae (brevetoxin) derived from ocean red tide events. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3443–3449.

(26) Fleming, L. E.; Kirkpatrick, B.; Backer, L. C.; Walsh, C. J.; Nierenberg, K.; Clark, J.; Reich, A.; Hollenbeck, J.; Benson, J.; Cheng, Y. S.; Naar, J.; Pierce, R.; Bourdelais, A. J.; Abraham, W. M.; Kirkpatrick, G.; Zaias, J.; Wanner, A.; Mendes, E.; Shalat, S.; Hoagland, P.; Stephan, W.; Bean, J.; Watkins, S.; Clarke, T.; Byrne, M.; Baden, D. G. Review of Florida red tide and human health Effects. *Harmful Algae* **2011**, *10*, 224–233.

(27) Pierce, R. H.; Henry, M. S.; Blum, P. C.; Hamel, S. L.; Kirkpatrick, B.; Cheng, Y. S.; Zhou, Y.; Irvin, C. M.; Naar, J.; Weidner, A.; Fleming, L. E.; Backer, L. C.; Baden, D. G. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae* **2005**, *4*, 965–972.

(28) Kirkpatrick, B.; Pierce, R.; Cheng, Y. S.; Henry, M. S.; Blum, P.; Nierenberg, K.; Pederson, B. A.; Fleming, L. E.; Reich, A.; Naar, J.; Kirkpatrick, G.; Backer, L. C.; Baden, D. Inland transport of aerosolized Florida red tide toxins. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 186–189.

(29) Kirkpatrick, B.; Fleming, L. E.; Bean, J. A.; Nierenberg, K.; Backer, L. C.; Cheng, Y. S.; Pierce, R.; Reich, A.; Naar, J.; Wanner, A.; Abraham, W. M.; Zhou, Y.; Hollenbeck, J.; Baden, D. G. Aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma: Continued health effects after 1 hour beach exposure. *Harmful Algae* **2011**, *10*, 138–143.

(30) Backer, L. C.; Carmichael, W.; Kirkpatrick, B.; Williams, C.; Irvin, M.; Zhou, Y.; Johnson, T. B.; Nierenberg, K.; Hill, V. R.; Kieszak, S. M.; Cheng, Y.-S. Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 389–406.

(31) Backer, L. C.; McNeel, S. V.; Barber, T.; Kirkpatrick, B.; Williams, C.; Irvin, M.; Zhou, Y.; Johnson, T. B.; Nierenberg, K.; Auel, M.; LePrell, R.; Chapman, A.; Foss, A.; Corum, S.; Hill, V. R.; Kieszak, S. M.; Cheng, Y.-S. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicom* **2010**, *55*, 909–921.

(32) Cheng, Y. S.; Zhou, Y.; Irvin, C. M.; Kirkpatrick, B.; Backer, L. C. Characterization of aerosols containing microcystin. *Mar. Drugs* **2007**, *5*, 136–150.

(33) Stokes, M. D.; Deane, G. B.; Prather, K.; Bertram, T. H.; Ruppel, M. J.; Ryder, O. S.; Brady, J. M.; Zhao, D. A Marine Aerosol Reference Tank system as a breaking wave analogue for the production of foam and sea-spray aerosol. *Atmos. Meas. Tech.* **2013**, *6*, 1085–1094.

(34) May, N. W.; Olson, N. E.; Panas, M.; Axson, J. L.; Tirella, P. S.; Kirpes, R. M.; Craig, R. L.; Gunsch, M. J.; China, S.; Laskin, A.; Ault, A. P.; Pratt, K. A. Aerosol emissions from Great Lakes Harmful Algal Blooms. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *52*, 397–405.

(35) Olson, N. E.; Cooke, M. E.; Shi, J. H.; Birbeck, J. A.; Westrick, J. A.; Ault, A. P. Harmful Algal Bloom toxins in aerosol generated from Inland Lake Water. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 4769–4780.

(36) Dall'Osto, M.; Ovadnevaitė, J.; Paglione, M.; Beddows, D. C. S.; Ceburnis, D.; Cree, C.; Cortés, P.; Zamanillo, M.; Nunes, S. O.; Pérez, G. L.; Ortega-Retuerta, E.; Emelianov, M.; Vaqué, D.; Marrasé, C.; Estrada, M.; Montserrat Sala, M.; Vidal, M.; Fitzsimons, M. F.; Beale, R.; Aurs, R.; Rinaldi, M.; Decesari, S.; Facchini, M. C.; Harrison, R. M.; O'Dowd, C.; Simó, R. Antarctic sea ice region as a source of biogenic organic nitrogen in aerosols. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6047.

(37) Park, J.; Dall'Osto, M.; Park, K.; Kim, J.-H.; Park, J.; Park, K.-T.; Hwang, C. Y.; Jang, G.; Gim, Y.; Kang, S. Arctic primary aerosol production strongly influenced by riverine organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 8621–8630.

(38) Park, J.; Dall'Osto, M.; Park, K.; Gim, Y.; Kang, H. J.; Jang, E.; Park, K.-T.; Park, M.; Yum, S. S.; Jung, J.; Lee, B. Y.; Yoon, Y. J. Shipborne observations reveal contrasting Arctic marine, Arctic terrestrial and Pacific marine aerosol properties. *Atmos. Chem. Phys.* **2020**, *20*, 5573–5590.

- (39) Vassalli, M.; Penna, A.; Sbrana, S.; Casabianca, S.; Gjerci, N.; Capellacci, S.; Asnaghi, V.; Ottaviani, E.; Giussani, V.; Pugliese, L.; Jauzein, C.; Lemée, R.; Açaç, L.; Hachani, M. A.; Turki, S.; Abboud-Abi Saab, M.; Fricke, A.; Mangialajo, L.; Bertolotto, R.; Totti, C.; Accoroni, S.; Berdalet, E.; Vila, M.; Chiantore, M. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecol. Indic.* **2018**, *85*, 1092–1100.
- (40) Mangialajo, L.; Fricke, A.; Perez-Gutierrez, G.; Catania, D.; Jauzein, C.; Lemece, R. Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms. *Harmful Algae* **2017**, *64*, 1–10.
- (41) Guillard, R. R. L.; Sieracki, M. S. Counting cells in cultures with the light microscope. In *Algal Culturing Techniques*; R. A., Andersen, Ed.; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, USA, 2005; Chapter 16, pp 239–252.
- (42) Facchini, M. C.; Rinaldi, M.; Decesari, S.; Carbone, C.; Finessi, E.; Mircea, M.; Fuzzi, S.; Ceburnis, D.; Flanagan, R.; Nilsson, E. D.; de Leeuw, G.; Martino, M.; Woeltjen, J.; O'Dowd, C. D. Primary submicron marine aerosol dominated by insoluble organic colloids and aggregates. *Geophys. Res. Lett.* **2008**, *35*, L17814.
- (43) Huang, R.-J.; Zhang, Y.; Bozzetti, C.; Ho, K.-F.; Cao, J.-J.; Han, Y. M.; Daellenbach, K. R.; Slowik, J. G.; Platt, S. M.; Canonaco, F.; Zotter, P.; Wolf, R.; Pieber, S. M.; Bruns, E. A.; Crippa, M.; Ciarelli, G.; Piazzalunga, A.; Schwikowski, M.; Abbaszade, G.; Schnelle-Kreis, J.; Zimmermann, R.; An, Z.; Szidat, S.; Baltensperger, U.; El Haddad, I.; Prévôt, A. S. H. High secondary aerosol contribution to particulate pollution during haze events in China. *Nature* **2014**, *514*, 218–222.
- (44) Guerrieri, F.; Pezzolesi, F.; Feller, A.; Riccardi, M.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Iacovo, E. D.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Pistocchi, R. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* **2010**, *55*, 211–220.
- (45) van Acker, E.; De Rijke, M.; Asselman, J.; Beck, I. M.; Huysman, S.; Vanhaecke, L.; De Schampelaere, K. A. C.; Janssen, C. R. Aerosolizable Marine Phycotoxins and Human Health Effects: In Vitro Support for the Biogenics Hypothesis. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 46.
- (46) Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G. S.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N. The Genoa 2005 Outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6153–6159.
- (47) Tartaglione, L.; Mazzeo, A.; Dell'Aversano, C.; Forino, M.; Giussani, V.; Capellacci, S.; Penna, A.; Asnaghi, V.; Faimali, M.; Chiantore, M.; Yasumoto, T.; Ciminiello, P. Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 915–932.
- (48) Tartaglione, L.; Iacovo, E. D.; Mazzeo, A.; Casabianca, S.; Ciminiello, P.; Penna, A.; Dell'Aversano, C. Variability in toxin profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in structural features of the produced ovatoxins. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 13920–13928.
- (49) Decesari, S.; Paglione, M.; Rinaldi, M.; Dall'Osto, M.; Simó, R.; Zanca, N.; Volpi, F.; Facchini, M. C.; Hoffmann, T.; Götz, S.; Kampf, C. J.; O'Dowd, C.; Ovadnevaite, J.; Ceburnis, D.; Tagliavini, E. Shipborne measurements of Antarctic submicron organic aerosols: an NMR perspective linking multiple sources and bioregions. *Atmos. Chem. Phys.* **2020**, *20*, 4193–4207.
- (50) Decesari, S.; Facchini, M. C.; Fuzzi, S.; Tagliavini, E. Characterization of water-soluble organic compounds in atmospheric aerosol: a new approach. *J. Geophys. Res.* **2000**, *105*, 1481–1489.
- (51) Decesari, S.; Mircea, M.; Cavalli, F.; Fuzzi, S.; Moretti, F.; Tagliavini, E.; Facchini, M. C. Source attribution of water-soluble organic aerosol by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 2479–2484.
- (52) Suzuki, Y.; Kawakami, M.; Akasaka, K. ¹H-NMR application for characterizing water-soluble organic compounds in urban atmospheric particles. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2656–2664.
- (53) Pierce, R. H.; Henry, M. S. Harmful algal toxins of the Florida red tide (*Karenia brevis*): natural chemical stressors in South Florida coastal ecosystems. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, 623–631.
- (54) Decesari, S.; Finessi, E.; Rinaldi, M.; Paglione, M.; Fuzzi, S.; Stephanou, E. G.; Tziaras, T.; Spyros, A.; Ceburnis, D.; O'Dowd, C. D.; Dall'Osto, M.; Harrison, R. M.; Allan, J.; Coe, H.; Facchini, M. C. Primary and secondary marine organic aerosols over the North Atlantic Ocean during the MAP Experiment. *J. Geophys. Res.: Atmos.* **2011**, *116*, D22210.
- (55) Jenkinson, I. R.; Seuront, L.; Ding, H.; Elias, F. Biological modification of mechanical properties of the sea surface microlayer, influencing waves, ripples, foam and air-sea fluxes. *Elementa* **2018**, *6*, 26.
- (56) Matrai, P. A.; Tranvik, L.; Leck, C.; Knulst, J. C. Are high Arctic surface microlayers a potential source of aerosol organic precursors? *Mar. Chem.* **2008**, *108*, 109–122.
- (57) Gao, Q.; Leck, C.; Rauschenberg, C.; Matrai, P. A. On the chemical dynamics of extracellular polysaccharides in the high Arctic surface microlayer. *Ocean Sci.* **2012**, *8*, 401–418.
- (58) Aller, J. Y.; Radway, J. C.; Kiltthau, W. P.; Bothe, D. W.; Wilson, T. W.; Vaillancourt, R. D.; Quinn, P. K.; Coffman, D. J.; Murray, B. J.; Knopf, D. A. Size-resolved characterization of the polysaccharidic and proteinaceous components of sea spray aerosol. *Atmos. Environ.* **2017**, *154*, 331–347.
- (59) Wells, M. L.; Karlson, B.; Wulff, A.; Kudela, R. M.; Trick, C.; Asnaghi, V.; Berdalet, E.; Cochlan, W.; Davidson, K.; De Rijke, M.; Dutkiewicz, S.; Hallegraef, G.; Flynn, K. J.; Legrand, C.; Paerl, H.; Silke, J.; Suikkanen, S.; Thompson, P.; Trainer, V. Future HAB Science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101632.
- (60) Quinn, P. K.; Collins, D. B.; Grassian, V. H.; Prather, K. A.; Bates, T. S. Chemistry and related properties of freshly emitted Sea Spray Aerosol. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 4383–4399.

SUPPORTING INFORMATION for

Aerosol toxins emitted by harmful algal blooms susceptible to complex air-sea interactions

Noemí Inmaculada Medina-Pérez¹, Manuel Dall'Osto^{2*}, S Decesari³, Marco Paglione³, Encarnación Moyano^{1,4} and Elisa Berdalet^{2*}

¹Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain

²Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta, 37-49, E-08003 Barcelona, Spain

³Institute of Atmospheric and Climate Sciences, National Research Council of Italy (CNR), I-40129, Bologna, Italy

⁴Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona. Montalegre 6, E-08001 Barcelona, Spain

Contents:

Supporting Figures

3 pages, 3 Figures

Supporting Table

1 page, 1 Table

Supporting Figures

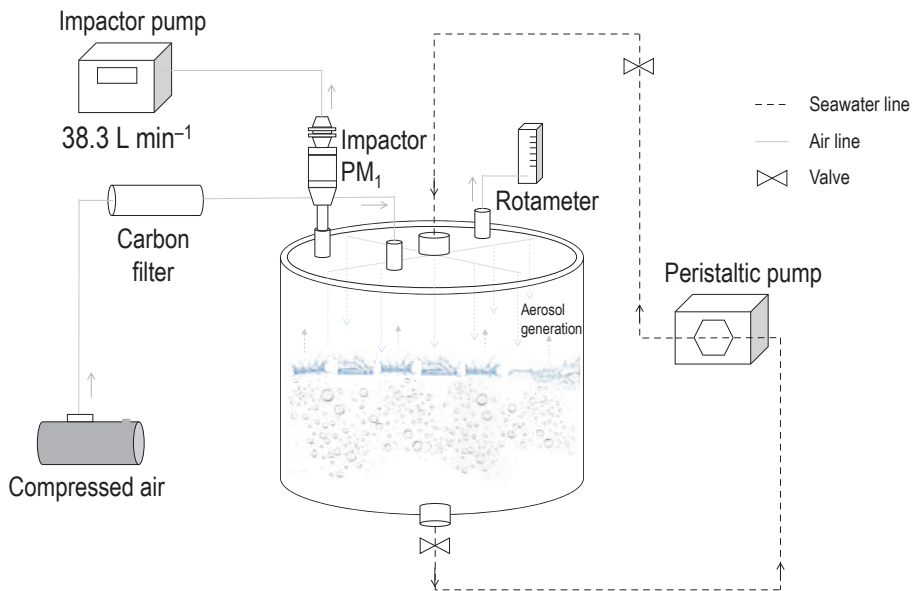


Figure S1: 75 L Bubble-bursting aerosol generation tank (plunging-water jet system, seawater and air flow).

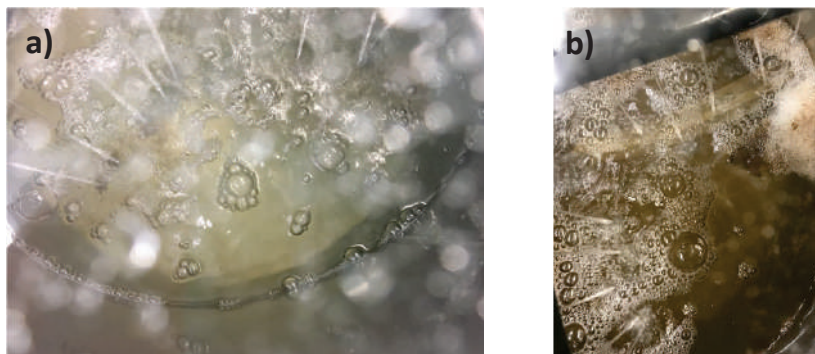


Figure S2. Image of the water surface of the experimental tank in EXP1,2 (a) and EXP3-5 (b). Note the higher amount of foam accumulated on the top right of the experiment conducted with the high biomass levels. These images are representative of the two groups of conducted experiments.

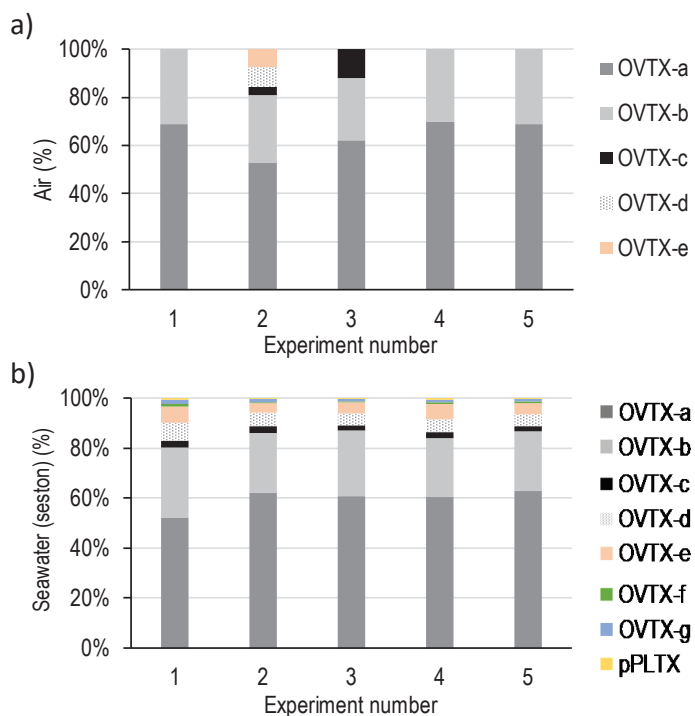


Figure S3: Toxin profile detected in the a) aerosol samples and b) seawater samples (seston) obtained at the end of the bubbling experiments.

Supporting Table

Table S1: Cell abundance and toxin concentration in the water before and after the bubble-bursting experiments and mass and air concentrations of toxins on the obtained PM₁ aerosol.

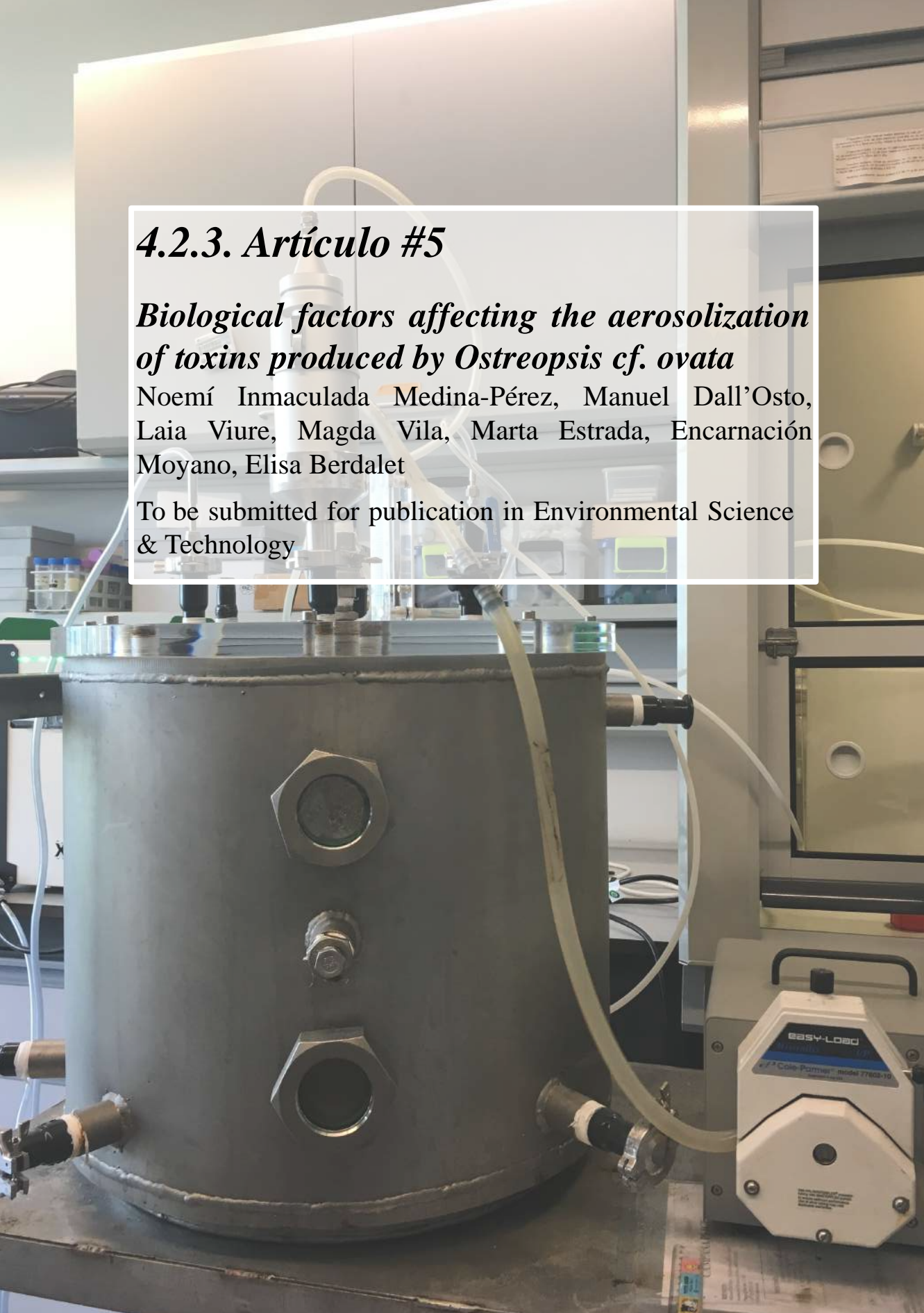
Experiment number	Running time	Water				Air	
		Before bubbling cell L _{water} ⁻¹ ± SD	After bubbling cell L _{water} ⁻¹ ± SD	Before bubbling pg _{toxin} L _{water} ⁻¹ ± SD	After bubbling pg _{toxin} L _{water} ⁻¹ ± SD	Mass of toxins in filter (ng)	Total toxin concentration pg _{toxin} L _{air} ⁻¹
1	0.75 hours	0.72 x 10 ⁵ ± 1.44 x 10 ⁴	1.82 x 10 ⁵ ± 3.64 x 10 ⁴	3.52 x 10 ⁶ ± 7.58 x 10 ³	6.23 x 10 ⁶ ± 5.72 x 10 ⁵	119	69.01
2	4 hours	1.35 x 10 ⁵ ± 2.70 x 10 ⁴	1.05 x 10 ⁵ ± 2.10 x 10 ⁴	4.86 x 10 ⁶ ± 2.73 x 10 ⁵	3.64 x 10 ⁶ ± 6.02 x 10 ⁵	664	49.13
3	21 hours	3.26 x 10 ⁶ ± 6.52 x 10 ⁵	3.83 x 10 ⁶ ± 7.66 x 10 ⁵	2.30 x 10 ⁸ ± 1.79 x 10 ⁵	2.93 x 10 ⁸ ± 3.00 x 10 ⁷	191	3.93
4	21 hours	4.69 x 10 ⁶ ± 9.38 x 10 ⁵	5.21 x 10 ⁶ ± 1.04 x 10 ⁶	1.33 x 10 ⁸ ± 1.43 x 10 ⁷	3.15 x 10 ⁸ ± 4.44 x 10 ⁷	144	3.03
5	21 hours	3.52 x 10 ⁶ ± 7.04 x 10 ⁵	3.15 x 10 ⁶ ± 6.30 x 10 ⁵	1.87 x 10 ⁸ ± 2.83 x 10 ⁷	2.34 x 10 ⁸ ± 1.57 x 10 ⁷	138	3.15

4.2.3. Artículo #5

Biological factors affecting the aerosolization of toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Manuel Dall'Osto, Laia Viure, Magda Vila, Marta Estrada, Encarnación Moyano, Elisa Berdalet

To be submitted for publication in Environmental Science & Technology



Biological factors affecting the aerosolization of toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Manuel Dall'Osto, Laia Viure, Magda Vila, Marta Estrada, Encarnación Moyano, and Elisa Berdalet

ACCESS |

 Metrics & More

|  Article Recommendations

|  Supporting Information

ABSTRACT. Marine aerosols may contain microbial particles and biogenic molecules including biotoxins. Among them, aerosolized palytoxin (PLTX) analogues produced by the marine dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* have been suggested, although not proven yet, to cause respiratory disorders and irritations and general malaise on humans exposed to aerosols during certain periods of this microalga proliferations. With the aim to better understand the factors involved in the toxins aerosolization process, as a follow up of a previous study carried out in 2019, 21 experiments were conducted by incubating natural microplankton and microbenthic communities obtained during *O. cf. ovata* blooms in 2020 and 2021, in a bubble-bursting aerosol generation chamber. The concentration of different PLTX analogues in the seston (seawater containing cells and organic matter) and in the aerosols collected on PM₁₀ impactors was estimated.

In the present studies ovatoxin analogues *a* to *g* and isobaric PLTX (iso-PLTX) were present in seston samples, while in the experimentally generated aerosols all the analogues were also detected except OVTX-f and iso-PLTX. Considering the whole experimental data set, toxin aerosolization occurred mainly during the first three-four hours of the incubation and decreased during the subsequent hours. This trend was observed in experiments with *Ostreopsis* cells collected under different physiological phases of the natural blooms, and with different cell concentrations incubated in the chamber. This pattern suggests, on one side, that toxins could be released as a response to the overall experimental manipulation, from collection to incubation. In addition, it could indicate that in nature, toxins would not be continuously produced but synthesized and released only under certain conditions. In this sense, the different physiologic states of benthic and planktonic cells during the blooms could be involved in the variability of the total toxin concentration in the aerosols collected on the impactors, while the contribution of dissolved toxins, not measured in this study, should be investigated in future research.

KEYWORDS. Marine aerosols, palytoxin, ovatoxin, *Ostreopsis cf. ovata*, aerosolized toxins.

1. INTRODUCTION

Palytoxin (PLTX) is a long carbon chain polyhydroxylated molecule, first isolated from the cnidarian zoanthid *Palythoa toxica* in the Hawaiian islands, that have been related to particular adverse effects on human health.¹ Dramatic, but rare food-borne poisonings after consumption of fish and crabs contaminated by PLTX were documented in certain tropical localities.^{2,3}

Also, serious skin, mucosa and ocular injuries and respiratory distress were suffered during maintenance of private home aquaria containing *Palythoa* corals (voluntarily or accidentally introduced).³⁻⁵ Since the end of the XXth century, the most common health impacts attributed to some PLTX analogues are caused by exposure to aerosols containing these compounds, in particular ovatoxins (OVTXs), produced by

the microalga *Ostreopsis*. In the summer of 2005, almost 200 people (with 20 of them requiring hospitalization) experienced symptoms of cough, rhinorrhoea, mild dyspnoea, fever and bronchoconstriction that were linked to the exposure to marine aerosols in a beach near Genoa, Italy (Mediterranean coast of Liguria) where an unusual bloom of *O. ovata* occurred.^{6,7} Since then, similar symptomatology has been reported in other Mediterranean beaches where *Ostreopsis* blooms have also become progressively recurrent (Berdalet et al. 2022 and references there in).⁸ Given the additional detection of *Ostreopsis*-produced PLTX analogues in marine fauna, suggesting the potential risk of food-borne poisoning, the recurrence of the proliferations in touristic areas raised concern in the regional authorities and the scientific community.^{9–11} The alarm has intensified given the biogeographic expansion of this microalga, likely due to global warming and anthropic pressures on the coastal zone where the blooms are reported.^{12,13} As a recent example, in 2021, a high number of cases of respiratory disorders and irritations were detected among beach users on the French Atlantic coast during the joint proliferation of *O. cf. ovata* and *O. cf. siamensis*.¹⁴ This situation promoted monitoring programs to prevent impacts on human health, and scientific-stakeholder collaboration as well as intensive research concerning the ecology^{15–17} and toxin production by *Ostreopsis* species, and epidemiology.¹⁸ In the Catalan coast (NW Mediterranean), a six-year study of *Ostreopsis* proliferations in a hot spot (Sant Andreu de Llavaneres, located 40 km north of Barcelona) revealed that acute but mild respiratory problems and other health disorders on beach users and people exposed to marine aerosols occurred during certain periods of the *O. cf. ovata* blooms,^{8,19} although the events could last for more than

two months. The main conclusion of these studies was that the toxic compound synthesis and release to the environment occurred under particular physiological conditions of the *Ostreopsis* cells along the bloom.

These findings are consistent with the fact that *Ostreopsis*-produced toxins have been rarely detected in the aerosol.^{20,21} The first study performed along the Tuscan coast (Italy) detected low or trace concentrations of OVTXs in the air, concurrent with relatively low *Ostreopsis* cell abundances in the seawater and in the absence of respiratory symptoms in beach users.²⁰ In part, technical questions can explain this finding as discussed by the authors. Also, recently, a study conducted on natural seawater collected from an *O. cf. ovata* bloom occurred in 2019 in the Sant Andreu de Llavaneres hot spot, and using an aerosol generation chamber,²² revealed the complexity of the toxin aerosolization process. In the experiments consisting of 0.75–4 hours incubation of ca. 10^5 *O. cf. ovata* cells L⁻¹ (obtained in a relatively early exponential phase of the natural bloom) and with a total toxin content in the seawater of ca. 4×10^6 pg L_{water}⁻¹, the toxin concentration in the aerosols was ca. 49–69 pg L_{air}⁻¹. Paradoxically, the toxin concentration in the aerosol was 15 times lower (i.e., 3–4 pg L_{air}⁻¹) after 21 hours of incubation of samples collected two weeks later, with higher *O. cf. ovata* cell numbers ($\sim 10^6$ cells L⁻¹), foam accumulation in the water surface of the chamber, and a total toxin concentration in the seawater of 2×10^8 pg L_{water}⁻¹. Additional spectroscopic analysis by nuclear magnetic resonance of the seawater and aerosol experimental samples showed a markedly different qualitative organic compound composition, suggesting the selective transfer of organic compounds from seawater into the atmosphere. Overall, the study concluded that the combination of

biological processes (physiological state of the bloom, internal cell toxin content, foam production), the responses of the *O. cf. ovata* cells to the experimental incubation set up, the aerosolization of different chemical compounds as well as technical issues (toxin loss or degradation in the aerosol) were involved in the obtained results and emphasized the need for further research.

The recurrency of the *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the above-mentioned hot spot area offered the opportunity to address some of the open questions from the 2019 experiments, through 21 new aerosol generation experiments conducted in the summers of 2020 and 2021. The outcome of these studies is presented here.

In 2020, the research addressed: 1) the effect of the incubation time on the toxin aerosolization process and, specifically, whether the toxins were preferentially aerosolized during the first hours, in order to understand the lower aerosolized toxin concentrations observed in 2019 in 21h incubations compared to shorter (0.75 to 4h) experiments; 2) the potentially differential contribution of planktonic and benthic cells to the aerosolized toxins; this issue was raised given that although *Ostreopsis* proliferates mainly attached to benthic substrates (macroalgae, rocks), it is also found in the plankton and as floating aggregates in the surface water, i.e. closer to the seawater-atmosphere interphase where aerosols are produced. In 2021, the specific objectives were: 1) to obtain a fine temporal resolution of the toxin aerosolization process along 15 hours of incubation in order to explore a potential degradation or loss during the experiments; 2) to explore the possible contribution of the toxins released by the *Ostreopsis* cells and dissolved in the seawater to the aerosol along the bloom. The overall study characterized the variability of the total toxin content and the different

PLTX analogues, in the natural seawater containing *Ostreopsis cf. ovata* cells and in the suspended organic matter (seston), and explored the potential aerosolization along the different phases of the blooms.

It should be emphasized that, in the present work, the term "seston" will be referred to the whole plankton community (including *O. cf. ovata* cells) with the suspended organic matter of the collected seawater.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Location and collection of natural samples for the experiments.

Experiments were run on natural plankton and macroalgal benthic communities obtained during *Ostreopsis cf. ovata* blooms that occurred in 2020 and 2021 on the rocky beach of Sant Andreu de Llavaneres, on the Catalan coast of Spain (41°33.13'N; 2°29.54'E). The blooms were monitored between June 15th and September 14th, 2020 (Figure 1a) and between May 18th and September 20th, 2021 (Figure 1b), essentially as described in previous studies in this area.^{19,23} Briefly, seawater and macroalgal samples were taken to estimate, respectively, the *O. cf. ovata* cell abundances in the plankton (cells L⁻¹) and in the benthos (cells per gram of macroalgae fresh weight - cells gFW⁻¹), as described in section 2.3. Samples to analyze toxin cell concentration were also collected (section 2.4).

For the experiments, seawater containing seston (ca. 60 L) was collected from July 6th and August 12th, 2020, and from June 7th to August 30th, 2021 (Table S1). The seawater was introduced in several 25 L plastic containers, while macroalgae (ca. 100–200 g) covered by dense benthic *O. cf. ovata* microfilms were distributed in several 1 L plastic containers with the surrounding natural seawater. All samples were

transported to the laboratory within 1 h after collection.

2.2. Aerosol generation chamber and experimental designs. Experiments were conducted with the same aerosol generation chamber used in the 2019 study described by Medina-Pérez et al. 2021 (see Supplementary Figure S1 of the cited article).²² The 75 L airtight high-grade stainless-steel cylindrical chamber (internal dimensions: 50 cm height, 44 cm diameter) was maintained at $24\pm 1^\circ\text{C}$, the optimal temperature for *Ostreopsis* strains previously isolated from the same location and maintained in the ICM laboratory.

With a peristaltic pump, seawater was circulated at 50 rpm through a Teflon tube from the bottom to the top of the chamber where it dropped as a plunging jet over the water surface at a flow rate of 12 L min^{-1} . The bubbles formed by the entrained air exploded in contact with the surface seawater and produced spray aerosols. The top of the chamber was covered with a colourless polycarbonate plate (3 cm thick). Particle-free compressed air was blown into the chamber headspace (60 L min^{-1}), which had outlet ports connected to a PM_{10} aerosol sampler with air pumped at 38.3 L min^{-1} flux and a rotameter for air flux monitoring; because only one impactor was available, the rest of the air was eliminated as excess flow. PM_{10} aerosols were retained on 47 mm Whatman QM-A quartz filters collected after the bubble-bursting incubation period chosen in the experiments.

For the 21 experiments (Table S1), designed to address different questions (sections 2.2.1 and 2.2.2), the aerosol generation chamber was filled with 57L of either $0.1\ \mu\text{m}$ filtered seawater - FSW - or seston (containing organic matter and plankton communities at two different

concentration ranges - EaS or EbS -, Table S1).

2.2.1. Aerosol experiments during the 2020 bloom (13th July – 12th August). A series of eight experiments were conducted between July 13th and August 12th, 2020 (Table S1a) to investigate 1) the effects of the incubation time on the toxin aerosolization process as well as 2) the potentially differential contribution to the aerosolized toxins by planktonic and benthic cells during the bloom. The general design consisted on a first incubation of the plankton community (hereafter referred to as “seston, S”) for 1 hour, followed by the inoculation of benthic *Ostreopsis* cells to reach ca. 10^5 cells L^{-1} (hereafter referred to as “enriched seston, EaS”) that were incubated for 15 additional hours. Several aerosol and water samples were collected along the incubations as detailed next.

After 1-hour incubation of the seawater containing seston (S) in the aerosol generation chamber, the aerosol retaining filter (#A, Table S1a) was collected. The seston was then enriched with benthic *Ostreopsis* cells up to ca. 10^5 cells L^{-1} (EaS), using the Teflon tube underneath the chamber and the peristaltic pump. During the aerosol filter collection and enrichment, the chamber remained closed, i.e. the polycarbonate cover was not lifted. Aerosols were then generated for one more hour and collected in a second filter (#B, Table S1a). In four tests (#1, #3, #5, and #8), a third filter was installed (#E, Table S1a) and the incubation continued for 15 additional hours. In four other experiments (#2, #4, #6, and #7), two supplementary one-hour incubations were conducted after extracting filter #B, and aerosols were collected in two new filters (#C and #D, Table S1a) before performing the last 15-hour incubation, from which the generated aerosols were collected

in filter #E (Table S1a). Overall, aerosols were gathered after 1 hour of incubation of the enriched seston (EaS), and subsequently, every one hour after 1h, 2h, 3h, and after 15 hours. Note that, in July, the two kinds of experiments (obtaining either three or five aerosol-retaining filters) were conducted during the same week, two days apart from each other. In August, storms allowed to conduct one experiment per week only.

Samples for the estimation of *Ostreopsis* cell abundance and toxin concentration in the incubated seston were collected i) at the beginning of the experiments, before starting bubbling to collect filter #A; ii) after enriching with benthic cells, without opening the cover of the chamber, using its underneath knob, before starting bubbling to collect filter #B; and, iii) at the end of the experiment, once filter #E was collected, after opening the chamber by removing the lid and thoroughly mixing the incubated seawater. Note that the chamber was not open during the experiments to avoid aerosol losses. For this reason, seawater samples were not collected before installing the aerosol collecting filters #C and #D.

2.2.2. Aerosol experiments during the 2021 bloom (7th June – 30th August). In 2021, a total of 13 experiments were performed (Table S1b). Three types of experiments were conducted. In the first and second type of experiments, #1 to #7, #9, and #11, explored the potential aerosolization of either toxins released by *Ostreopsis* cells or dissolved in the seawater. The third type of experiments, #8, #10, #12, and #13, aimed to obtain a fine resolution of the dynamics of toxin aerosolization along 15 hours of incubation. Natural plankton and benthic communities were collected as described in section 2.1.

In the first type of experiments, #1, #2, #3, #5, and #11, the seston (S) was incubated

for only one hour, and the aerosol-retaining filter (#A, Table S1b) was retrieved after bubbling. Then, the chamber was emptied, meticulously cleaned, and filled with 57 L of 0.1 μm filtered natural seawater (FSW). This particle-free seawater, potentially containing dissolved toxins only, was incubated and bubbled for one hour, and the generated aerosols were collected in filters #1B, #2B, #3B, #5B and #11B (Table S1b).

The second type of experiments, #4, #6, #7, and #9, followed essentially the same design than the first series. However, after collecting the #B filters, new filters were installed (#4C, #6C, #7C, and #9C) and bubbling of the FSW continued for 15 additional hours (Table S1b). Note that in the first and second type of experiments, in order to minimize the stress of the microorganisms due to transport and manipulation, the incubation of the plankton community was conducted immediately upon arrival to the laboratory; the 0.1 μm filtration process was performed in parallel to the incubation.

In the third series of experiments, the seston (containing *Ostreopsis* plankton cells) was enriched with benthic *Ostreopsis* cells, ca. 10^5 cells L^{-1} in tests #8 and #13, and ca. 10^6 cells L^{-1} in #10 and #12. To indicate these two different enrichment concentrations, the incubated seston is referred to as EaS and EbS, respectively (Table S1b). In these experiments, bubbling-bursting aerosol generation was conducted during one-hour intervals and the corresponding PM_{10} filters were collected every hour without opening the chamber. The experiments lasted for 15 additional hours, except #13 which lasted for three hours in total due to logistic reasons.

Samples for the estimation of *Ostreopsis* cells abundance and toxin concentration in the incubated seston were collected i) at the beginning of all the experiments, before

starting bubbling to collect aerosols in filter #A; ii) at the end of all the experiments, after opening the chamber by removing the lid and thoroughly mixing the incubated seawater. As in 2020, the chamber was not open during the experiments to avoid aerosol losses. Note that in the case of FSW samples for toxin and cell concentrations estimation were not collected based on the test described in section 2.5 (results in section 3.3).

2.3. *Ostreopsis* cf. *ovata* cell abundance during the bloom and in experimental samples. Samples for the determination of planktonic and benthic *Ostreopsis* cf. *ovata* cell concentrations, were collected and processed as described elsewhere.^{22,24} Briefly, for the estimation of planktonic microalgae, seawater (ca. 200 mL) was collected in plastic bottles and fixed with Lugol. For the estimation of benthic populations, three groups of ca. 10 to 20 g fresh macroalgal samples, located within 10 m of each other, were collected and transferred to a 250 mL plastic bottle, which was filled with a known volume of the surrounding seawater. The macroalgae were chosen following two criteria: they were dominant in the area, and they were covered by *Ostreopsis* biofilms. The main collected algae were *Jania rubens* (Linnaeus) J.V.Lamouroux 1816, *Jania adhaerens* J.V.Lamouroux 1816, *Ellisolandia elongata* (J.Ellis & Solander) K.R.Hind & G.W.Saunders 2013, *Halopteris scoparia* (Linnaeus) Sauvageau 1904, *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux 1809 and *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy 1960. Microphytobenthic cells were detached from the macroalgae by vigorous shaking of the sample for 1 minute, and subsequent sieving through a 200 μ m mesh. A percolated water subsample, ca. 125 mL, containing *O. cf. ovata* and the

accompanying microbiota was fixed with iodine Lugol's solution for cell number estimation. Macroalgal fresh weight was measured, and cell abundances were expressed as cells g^{-1} of fresh weight (FW) of macroalga. In the experiments, seston samples collected before the beginning of the experiments, after enriching with benthic *Ostreopsis*, and at the end of the experiments, were fixed with Lugol.

Cell counts were conducted within one month after collection, on a 1 mL Sedgewick-Rafter cell chamber or 10 mL sedimentation columns (depending on the cell densities) following the Utermöhl method as described, for instance, by Edler and Elbrachter (2005)²⁵ under a Leica inverted light microscope.

2.4. Toxin collection, extraction, and analysis in seston and aerosol samples. Toxin concentration was estimated in the plankton and benthic *Ostreopsis* cf. *ovata* cell populations during the bloom and in different moments of the experiments (Tables S1 and S2), as well as in the aerosol during the incubation experiments. Note that the toxin content in the plankton fraction during the blooms corresponded to the initial sample used on each experiment, referred to as "seston" in Table S1. The characterization of the toxins in the benthic populations was conducted on a non-fixed aliquot of the percolated subsample used to estimate *O. cf. ovata* cell numbers during the bloom (as described in section 2.3).

For the estimation of toxin concentration in *O. cf. ovata* cells, seawater samples (50–250 mL depending on the cell densities along the bloom or the experiments) were filtered (<20 mmHg), in duplicate, through 25 mm GF/F filters (0.7 μ m) (Whatman, Clifton, NJ, US). To estimate toxins in PM₁₀ aerosol samples, 47 mm Whatman QM-A

quartz filters were used; these filters were pre-treated by washing twice on 1% nitric acid, followed by rinsing twice with Milli-Q deionized water, and subsequently drying at 30°C as in Van Acker et al. 2020.²⁶ All filters were immediately frozen at -80°C and kept in these conditions until their extraction and analysis.

Toxin extraction was conducted following Medina-Pérez et al. 2023,²⁷ in 2 mL of MeOH:H₂O (80:20, v/v) (previously cooled down to -20°C) with one 5 min ultrasonic pulse in an ice-cooled bath and final vortex shaking. The extract was centrifuged (4500 rpm, 4°C, 5 min), filtered through 0.22 µm Nylon membranes (Whatman, Clifton, NJ, US), and stored in amber glass vials at -80°C until their analysis by ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC-HRMS). Extracted ion chromatograms for iso-PLTX and OVTXs were obtained selecting the most intense peaks of the toxin ion cluster following Medina-Pérez et al. 2023.²⁷

2.5. Determination of the presence of *Ostreopsis*-produced toxins in particulate and dissolved size fractions.

As indicated in section 2.2.2, experiments conducted in 2021, explored the potential aerosolization of toxins released by *Ostreopsis* cells and dissolved in the seawater. Previously, during the peak 2020 bloom, a test was performed to assess the distribution of *Ostreopsis*-produced toxins among particulate and dissolved fractions.

A seawater sample containing both planktonic and benthic *Ostreopsis* cells was successively filtered through 200 µm, 100 µm, 60 µm, 20 µm, and 5 µm mesh. Aliquots from each filtration step were filtered in duplicate through GF/F filters (nominal pore 0.7 µm) for toxin estimation in the corresponding particulate fraction (method described in section 2.4) and the GF/F-

filtered seawater was reserved. Then, these filtrates of all samples were merged (ca. 500 mL) to estimate the dissolved toxin fraction following Ciminiello et al. 2006.²⁸ Briefly, 100 mL of the seawater sample were extracted (by duplicate) five times with an equal volume of butanol. The butanol layer was evaporated to dryness and dissolved in 2 mL of MeOH:H₂O (50:50, v/v). The final extract was analyzed by UHPLC-HRMS.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in 2020 and 2021.

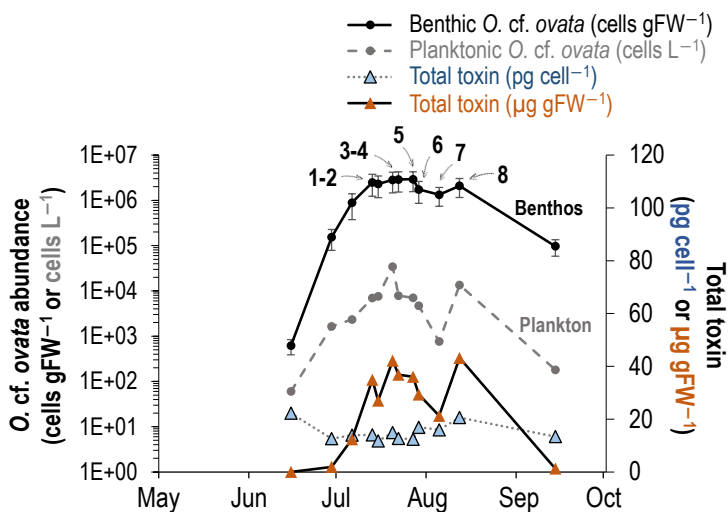
The temporal variability of the benthic and planktonic *Ostreopsis* cf. *ovata* cells during the blooms in 2020 and 2021 is shown in Figure 1, with an indication of collection time of the natural samples to conduct the different experiments (Table S1).

Taking as reference the benthic population, the *Ostreopsis* proliferation in 2020 grew exponentially from June until the 6th of July, when the stationary phase started, reaching concentrations up to 2.9×10^6 cells gFW⁻¹ (July 22–27th). In the plankton, the highest *O. cf. ovata* concentrations were also recorded during the stationary phase, with values up to 3.4×10^4 cells L⁻¹ (July 20th). Finally, the bloom decreased progressively in autumn. The total toxin cell content of the benthic *O. cf. ovata* population fluctuated between 11.7 and 22.3 pg_{tox} cell⁻¹ during the proliferation (Figure 1a), with concentration peaks during the exponential and late stationary phases of the bloom. Referred to the macroalgal surface covered by the benthic population, the total toxin content increased exponentially until July 13th, and then the toxin concentration fluctuated between 21.3 and 43.2 µg_{tox} gFW⁻¹. Note that the toxin content in the plankton population was estimated in the initial sample of each experiment (seston) and it is shown in Figure 2a, white bar (in pg_{tox}

L_{water}^{-1}); it oscillated between 28.5 and 84.7 $\mu\text{g}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$ (Table S1a).

In 2021 (Figure 1b) the *Ostreopsis* proliferation in the benthos grew exponentially between the 31th of May and

a) *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2020



b) *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2021

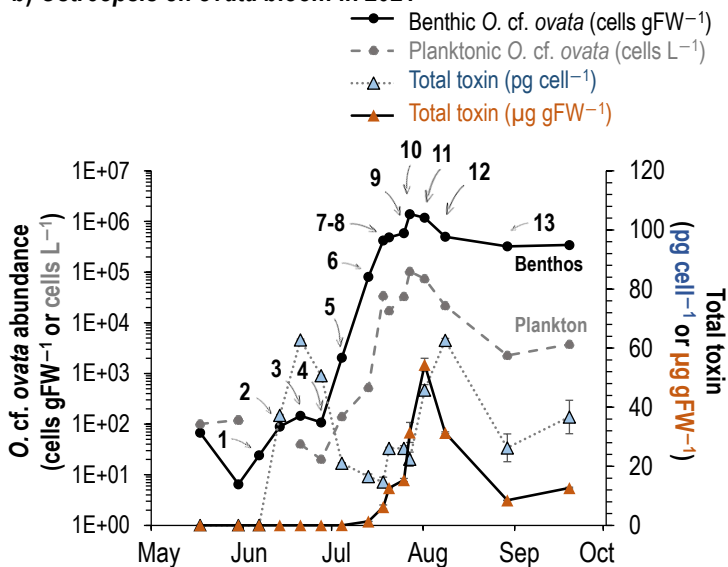


Figure 1. Temporal variability of the natural *Ostreopsis cf. ovata* bloom in 2020 (a) and 2021 (b). The plots show the benthic and planktonic *Ostreopsis cf. ovata* cell concentrations, and the total toxin concentrations in the benthos, expressed as toxin per cell or per gram of macroalgae fresh weight.

the 19th of July. Then, the stationary phase started, reaching up to 1.4×10^6 cells gFW^{-1} , similar to 2020 concentrations. In the plankton, the highest *O. cf. ovata* concentrations (1.0×10^5 cells L^{-1}) were recorded coinciding with the highest abundances of the benthic population. The total toxin cell content of the benthic *O. cf. ovata* population was below detection in May. Thereafter, the values fluctuated between 14.7 and 62.8 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$ during the proliferation (Figure 1b), with two peaks during the exponential ($62.8 \pm 0.2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$, June 21st) and the stationary ($62.6 \pm 0.7 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$, August 9th) phases of the bloom. The toxin concentrations referred to the macroalgal surface reached up to $54.4 \mu\text{g}_{\text{tox}} \text{gFW}^{-1}$. In the plankton (corresponding to the seston sample at the beginning of the experiments), toxins were not detected until the middle of July (Figure 3a; Table S1b). Thereafter, the values oscillated between 17.2 and 75.5 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{cell}^{-1}$, with maxima in the second half of July.

Overall, the blooms in 2020 and 2021 showed similar patterns concerning *Ostreopsis cf. ovata* cell concentrations and toxin content in the plankton and the benthos. Note that in 2021, samplings started earlier, in May, in order to detect the lag phase and the initiation of the exponential period of the bloom, which was missed in 2020. Thus, based on the *O. cf. ovata* cell abundances in the benthos, the experiments conducted in 2020 corresponded to the end of the exponential phase of the bloom (#1 and #2) and the rest of the incubations were done on samples collected mainly in the stationary phase. In 2021, experiments #1 to #3 were run during the lag phase; #4 to #7 during the exponential, and #8 to #13 during the stationary. The importance of the physiological state of the blooms in toxin aerosolization is described in the following section 3.3, after an analysis of the relevance

of the duration of the experiments in section 3.2.

3.2. Effect of the incubation time on toxin aerosolization. This section presents the results of the experiments conducted in 2020 (#1 to #8) and 2021 (#8, #10, and #12) with different *Ostreopsis* cell abundances and incubated for different periods of time to explore whether toxin aerosolization production occurred continuously or decreased overtime. Based on the trends of the blooms described in section 3.1, these experiments were conducted at the end of the exponential phase (#1 and #2 in 2020, #8 in 2021) and during the stationary period (#3 to #6 in 2020; #10 and #12 in 2021) of the blooms. Thus, experiments in the same physiological state of the blooms conducted in 2020 and 2021 can be compared.

In 2020, the natural communities contained toxins at the start of all the experiments, as represented by the blue bar in Figure 2a (data shown in Table S1a). The toxin content in the seston increased after the enrichment with benthic *Ostreopsis cf. ovata* cells (blue bars versus green bars, Figure 2a) and remained with similar levels until the end of the experiments (dashed bars, Figure 2a); the only exception was experiment #1, where lower toxin values in the seston were measured at the end of the incubation. Concerning the aerosolized toxins, all the experiments presented a similar pattern. Toxin was detected in all PM_{10} filters after the first incubation hour (blue bars in Figures 2b and 2c). After enrichment with benthic *Ostreopsis cf. ovata* cells and bubbling for one more hour, the concentration in the aerosol increased slightly in most experiments (green bars in Figure 2b) and remained constant in the three consecutive filters collected after one-hour incubation each (filters #B, #C, and #D, in experiments #2, #4, #6, #7, respectively). However, the

toxin concentrations in the air ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$) collected after 15-hour bubbling were 90–95% lower than after the first hour of incubation (Figures 2b, dashed bars; filters #E versus #A). The total toxin collected in the filter (expressed in $\text{ng}_{\text{tox aerosol}}$, Figure 2c) showed a coherent pattern, with constant values in all the filters; the only exception was experiment #3 where the total toxin collected in the 15-hour bubbling filter was twice the amount collected in one hour, for unknown reasons. The toxin concentration in the one-hour incubation filters was in the range 29.8 to 54.6 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ with the lowest values measured in experiment #7 (ca. 12 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$).

In 2021, experiments #8, #10, and #12 were designed as a continuation of those conducted in 2020 to gain more information about the temporal aerosolization process. In these tests, the incubated seston contained toxins from the beginning to the end of the experiments (Table S1b). *Ostreopsis* cells and the accompanying microbiota were incubated for 15 hours and filters in the PM₁₀ impactor were replaced every hour. The highest aerosolized toxin concentrations were estimated during the first three to four incubation hours (Table S1b, Figure 3b). The values decreased afterwards, remaining constant until the end of the experiment. In particular, at the beginning of experiment #8, the collected aerosol contained $19.46 \pm 2.13 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the #8A–#8D filters) while after the 4th hour, the concentration decreased to $8.20 \pm 0.35 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the #8E–#8O filters) (Figure 3b). Similarly, the concentration diminished within the first four hours, from $63.35 \pm 15.36 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the #10A–#10D filters) to $18.89 \pm 2.05 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the #10E–#10P filters) in experiment #10, and from $165.40 \pm 58.28 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the

#12A–#12D filters) to $74.46 \pm 16.14 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (average of concentrations in the #12E–#12P filters) in experiment #12. In base of the total amount of aerosolized toxin, i.e. the toxin collected in each filter ($\text{ng}_{\text{tox aerosol}}$ in Table S1b) a 42–52% was aerosolized within the first four hours. For instance, in test #8, 177.17 ng_{tox} were cumulatively collected in the first four filters, which corresponds to the 46.22% of the toxins collected in the 15 filters (#A to #O), i.e., 383.47 ng_{tox} . This trend was observed in the three experiments independently of the number of *Ostreopsis* cells incubated in the chamber, namely in the range of ca. 10^5 cells $\text{L}_{\text{water}}^{-1}$ in test #8, and ca. 10^6 cells $\text{L}_{\text{water}}^{-1}$ in #10 and #12.

The pattern observed in 2020 (#1 to #8) and 2021 (#8, #10, and #12) experiments can explain the results found in 2019 when lower toxin content in the aerosol (3–4 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$) after 21 hours of incubation was measured compared to the 0.75 – 4 hours incubation (49–69 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$). On one side, the overall results point to some technical issues. The aerosolized toxin might have not been adequately retained in the filter, and/or it could have been lost by the continuous air circulation through the filter, and/or it could also degrade in the filter after one hour of collecting aerosols. These technical questions require further research that was not addressed in the present study. On another side, *Ostreopsis* cells were observed attached to the walls and to the bottom, likely due to their preferentially benthic life. This could have resulted in a progressively lower number of cells being circulated by the peristaltic pump from inside the chamber to the seawater surface where bubble-bursting occurs, and with a subsequent lower concentration of toxin potentially released to the seawater. Based on these results, we recommend to run short (one to three hours) incubation tests if the objective is to investigate the toxin aerosolization

processes, at least when using similar aerosol generation chambers.

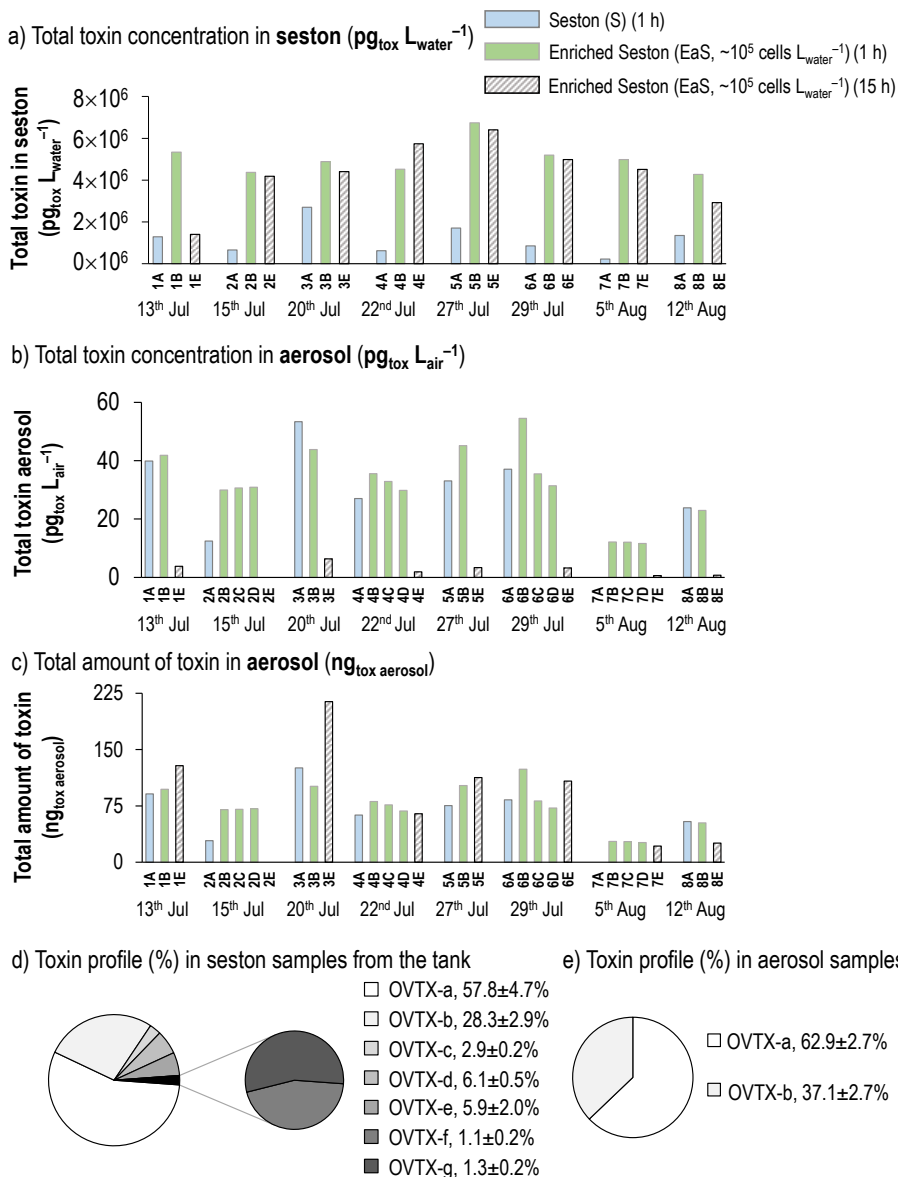


Figure 2. Toxin concentrations estimated in the seston and the aerosol in the experiments conducted in 2020. Total toxin concentration in the seston (a, $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$). Aerosolized toxin retained in the PM_{10} aerosol collecting filter expressed as $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$ (b) or as total amount in the filter (c, $\text{ng}_{\text{tox aerosol}}$). Average toxin profile in the seston (d, %) and the aerosol (e, %) samples of the whole data set reported in [Table S1a](#).

3.3. Variability of the potential toxin aerosolization by planktonic and benthic cells along the different phases of the blooms. Role of dissolved toxins.

In the experiments conducted in 2020 and 2021, the first-hour seston incubation ("S" series, containing plankton and organic matter, non-enriched with benthic *Ostreopsis* cells), allows analyzing the potential toxin aerosolization along the blooms by the plankton fraction. The aerosol data series corresponds to the #A filters in [Table S1](#) and blue bars in [Figures 2b,c](#) and [3b](#).

In 2020, aerosolized toxins were detected in most of the experiments, which were conducted by incubating seston samples obtained during the stationary phase of the blooms. The range of the aerosolized toxin concentrations oscillated between 12.46 and 53.40 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$, with a cell and toxin concentration in the water, respectively, in the ranges of $1.2 \times 10^4 - 5.7 \times 10^4 \text{ cells L}_{\text{water}}^{-1}$ and $6.2 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$ to $2.7 \times 10^6 \pm 9.6 \times 10^2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$ ([Figure 2](#), [Table S1a](#)). However, in experiment #7, with low cell and toxin concentrations in the seawater, $2.7 \times 10^3 \text{ cells L}_{\text{water}}^{-1}$ and $2.2 \times 10^5 \pm 6.7 \times 10^3 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$ respectively, no aerosolized toxins were detected after one-hour incubation.

In 2021, toxins were not detected in the aerosol during the lag and most part of the exponential phase of the bloom ([Table S1b](#), [Figure 3b](#)). At the end of the exponential phase (experiment #7) when planktonic *Ostreopsis* cells reached $3.0 \times 10^4 \text{ cells L}_{\text{water}}^{-1}$ contributing with $5.7 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^5 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$, aerosolized toxins were measured ($20.32 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$). Similar values of these three parameters were recorded in experiment #9, at the beginning of the stationary phase of the bloom. In the next experiment #11, also during the stationary

phase, with higher cell and toxin concentrations in the seawater than in experiment #9, the aerosolized toxin was also higher ($53.11 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$).

Considering the 2020 experiments, the total toxin concentration in the air (filter series #A) after one hour incubation (dotted blue line, blue circles, [Figure 4](#)) increased with the total toxin concentration in the seston, with a significant correlation. However, the analogous 2021 data, from experiments #7, #9 and #11, did not fit in the plotted line. A first hypothesis to explain this trend is that the cells, in the two years, had different physiological characteristics when collected for the experiments.

Similarly, the potential toxin aerosolization by the benthic community along the blooms was studied by incubating enriched seston, i.e., a plankton community that received an inoculum of benthic *Ostreopsis* cells at a fixed concentration, "EaS ($\sim 10^5 \text{ cells L}_{\text{water}}^{-1}$)" or "EbS ($\sim 10^6 \text{ cells L}_{\text{water}}^{-1}$)" series ([Table S1](#)). Note that with this design, the experiments included both planktonic and benthic cells. In 2020, toxin concentration in the seston increased consistently in all the experiments after enrichment ([Figure 2a](#), filters #A/blue bar versus #B/green bar; [Table S1a](#)). However, this trend was not observed regarding toxin aerosolization ([Figures 2b,c](#), filters #A/blue bar versus #B/green bar; and [Table S1a](#)).

In 2021, incubation of the enriched seston was conducted in experiments #8, #10, #12, and #13 (note that previous incubation of the plankton component alone was not done). Toxin aerosolization increased from the first to the third experiment ([Figure 3b](#), [Table S1b](#)), with the highest value measured in #12A ($234.24 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$). However, a direct link between the cell and toxins concentrations in the

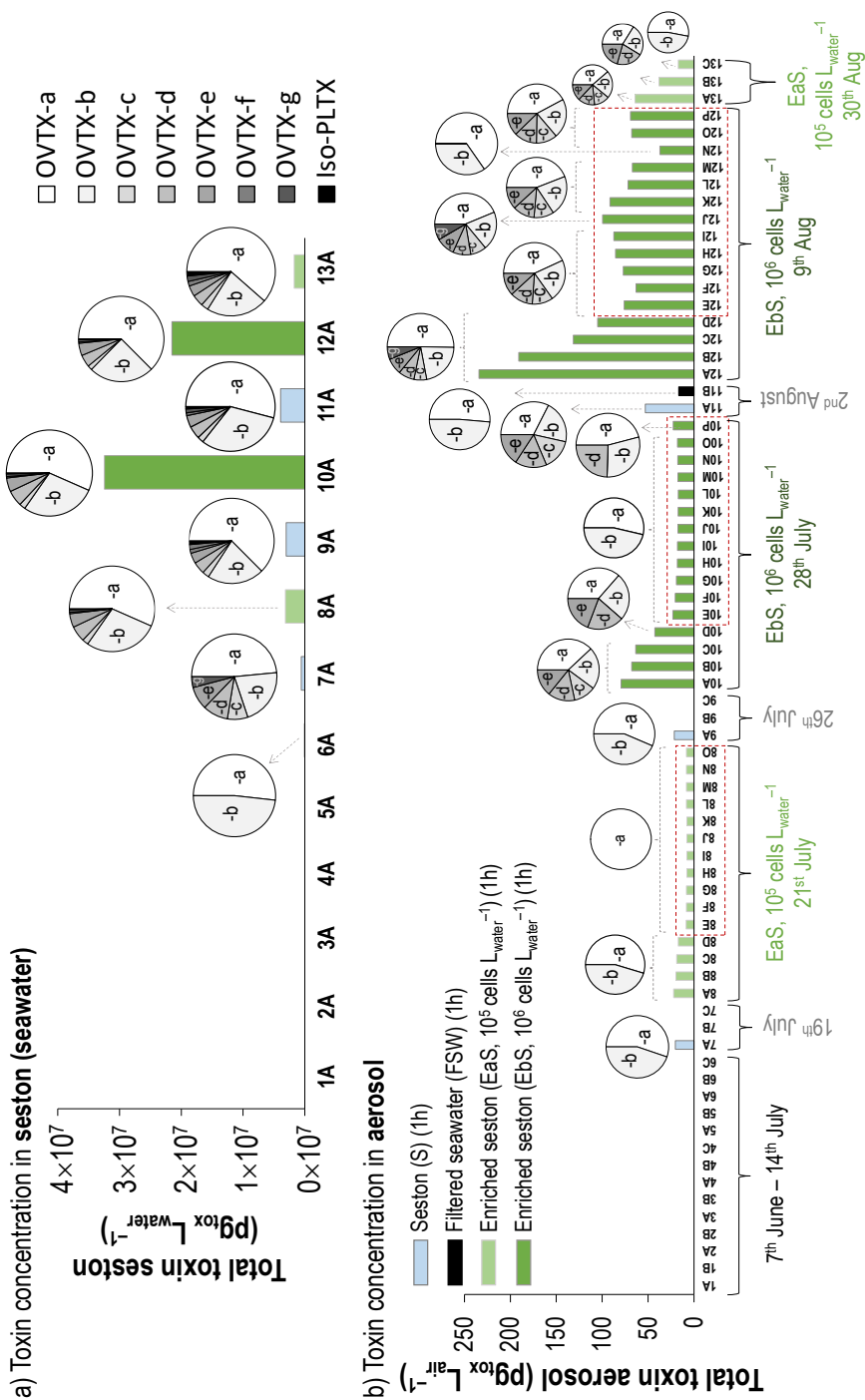


Figure 3. Toxin concentrations in the experiments conducted in 2021 estimated in the seston (a; $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$) and in the aerosol (b; $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$). In addition, the toxin profile (average % of the detected toxin analogues) for each group of samples is shown in pie charts. The whole data set reported in [Tables S2 and S3](#).

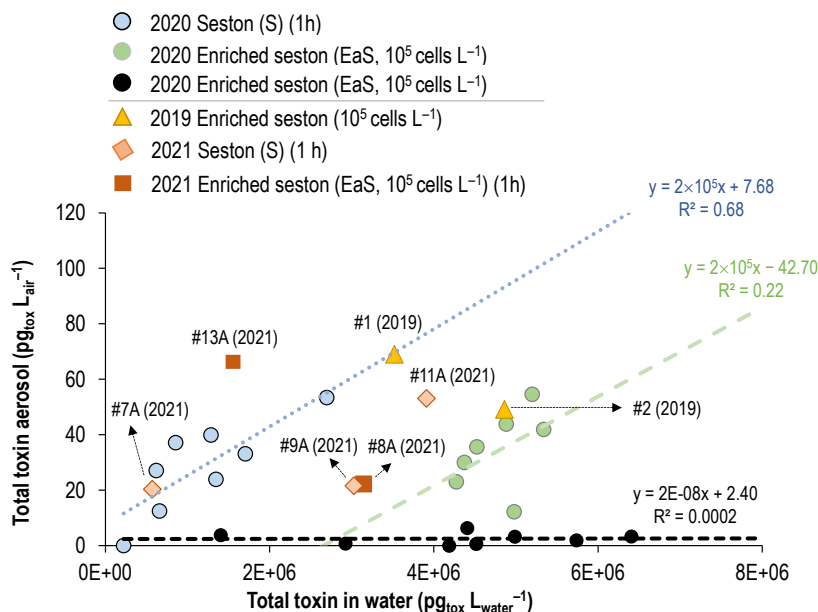


Figure 4. Total toxin concentration in the aerosol ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$) measured after one hour bubbling of the corresponding incubated seston (blue circles, S-1h) ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$), after one hour bubbling of the corresponding incubated enriched seston (green circles, EaS-1h) and after 15-hour incubation of the enriched seston (black circles, EaS-15h), in the 2020 experiments. Data from experiments in 2019 and 2021 were also plotted (yellow triangle and orange squares, respectively).

seawater and the aerosolized toxins was not straightforward. For instance, in experiment #10, with 10 times higher cell and toxin concentration in the seawater ($1.1 \times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$, $3.2 \times 10^7 \pm 4.9 \times 10^6 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$) than in experiment #8 ($8.9 \times 10^4 \text{ cells L}^{-1}$, $3.1 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^5 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$), the aerosolized toxins were only 3.5 times higher (Figure 3, Table S1). Moreover, although experiment #10 contained higher toxin concentration in the seston than experiment #12, the aerosolized toxins were lower. Likely, these contrasting patterns suggest that the cells in each experiment had, again, different physiological conditions.

This described variability is plotted in Figure 4 (dashed green line, green circles).

Although in the 2020 experiments the total toxin concentration in the air (filter series #B) after one-hour incubation tended to increase with the total toxin concentration in the seston enriched with ca. $10^5 \text{ cells L}^{-1}$, the correlation was not significant. Including the analogous 2021 data did not improve the trend. In Figure 4, only the #8 and #13 data are shown, while those from experiments #10 and #12 containing very high toxin concentrations in the water, were out of the chart scale. For comparison, the values from experiments #1 and #2 in 2019²² with cell and toxin concentrations similar to those in 2020 and 2021 are also plotted in Figure 4. The values did not match either with the trends observed in 2020. Figure 4 also plots, the low aerosolized toxin concentrations

estimated after 15 incubation hours that generate a line with a slope close to zero (black circles and horizontal dashed black line).

Interestingly, the two regression lines from the seston and enriched seston experiments from 2020 are parallel (despite the poor significance levels). This trend could indicate that adding benthic cells did not result in a higher toxin aerosolization. It could be hypothesized that benthic cells have a higher retention of the internal toxin concentration while the planktonic cells could tend to release them. However, to study the potential differences in the physiology of plankton and benthic *Ostreopsis* cells during the proliferation, would have required running experiments with FSW enriched with benthic cells (collected attached to the macroalgae) only. A different physiologic state of the benthic and plankton cells could also explain the variability of the toxin concentration in the seawater and thus in the aerosol along the blooms. At this point the experiments suggest that the released dissolved toxins constituted the main pool to the aerosolized toxins.

As noted by several authors, dissolved toxins may be relevant although field and experimental data are rare. For instance, in culture experiments reported by Giussani et al. (2015)²⁹ the toxin content in *Ostreopsis* pellet extracts accounted for 95% of the total toxin content with only around 5% of toxins detected in mucilage-containing growth medium. Here, we tested the potential role of dissolved toxins in the experiments run with 0.1 μm filtered seawater (2021, experiments #1–7, #9 and #11, "B" filters series). Only in one case of the 9 conducted experiments (#11B, August 2nd, 2021), in the middle of the stationary phase of the bloom, aerosolized toxin levels were measured in the incubated FSW (16.61 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{air}}^{-1}$), which

suggest the presence of dissolved toxins. These values correspond to 1/3 of the aerosolized toxins measured after one-hour incubation of the seston (containing plankton and organic matter) collected in filter #11A. These unique results in our experimental series point to the potential contribution of dissolved toxins in the aerosolized compounds. This result is also in agreement with Guerrini et al. (2010) study, which reported the highest toxin release in the growth medium at the end of the stationary phase.³⁰

Note that in the 2021 experiments, we did not collect samples for the estimation of the dissolved toxin concentrations when incubating FSW. The previous test conducted in 2020 (size fractionation; methods described in section 2.5), indicated that dissolved toxins ($<0.7 \mu\text{m}$) were below detection (Figure 5). The biggest size fractions, 100 μm to 200 μm , and 60 μm to 100 μm , containing *Ostreopsis* aggregates and other microorganisms retained in the mucus, contributed to the 11% and 24%, respectively, of the total toxin concentration in the seston. The highest toxin content (54%) was found in the 20 μm to 60 μm fraction, also dominated by *Ostreopsis* cells.

The size fraction smaller than 20 μm , consisting mainly of small diatoms (not shown), contained 10% of the total toxin.

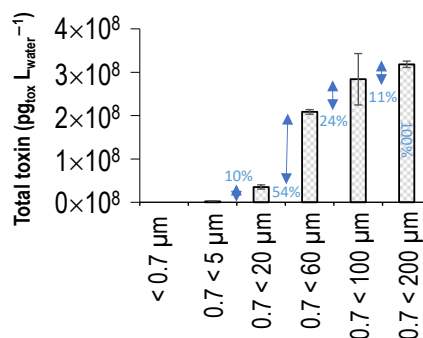


Figure 5. Toxin concentration ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{water}}^{-1}$) in different fractionated samples.

Based in this test, no sample for dissolved toxin analysis were collected when incubating FSW. The overall results discussed in this section indicate the necessity to measure dissolved PLTX analogues in seawater.

3.4. Toxin profile in aerosol and seawater samples. In our experiments, a main effort was conducted to characterize the toxin profile (% toxin analogues) in seston and aerosol samples (Figures 2d-e, 3a-b, details indicated in Table S2).

In 2020, all ovatoxin analogues (OVTX-a to -g) were detected in the seawater samples (enriched or non-enriched seston; Figure 2d, Table S2a); however, in the analyzed aerosol samples only OVTX-a and OVTX-b were detected (Figure 2e), with a proportion of $62.9 \pm 2.7\%$ and $37.1 \pm 2.7\%$, respectively. Iso-PLTX was not detected in any of the seston or air samples.

In 2021 (Figure 3a, Tables S1 and S2), toxins were first detected in the middle of July, towards the end of the exponential phase of the bloom (experiment #6), with a toxin profile composed of OVTX-a and -b only, and no toxins were aerosolized (Figure 3b, Tables S1, and S2). In the following experiments #7 and #9A, just a few days later, the toxin profile in the seston included all OVTX analogues except OVTX-f and iso-PLTX that were not found in the seston in experiment #7, while OVTX-a and OVTX-b were detected for the first time in the aerosol. In addition, when a higher concentration of toxins in the seston and air was observed (#11), OVTX-c, -d, and -e were also found in the PM₁₀ filter (#11A). However, after incubation for the next one hour (filter #B) the toxin in the air was lower ($16.61 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ L}_{\text{air}}^{-1}$), and only OVTX-a and -b were measured.

In the 2021 experiments conducted with benthic *Ostreopsis*-enriched seston (#8, #10,

#12, and #13), all the PLTX analogues were found in the seawater samples. In experiment #8, enriched with 10^5 cell L^{-1} range, OVTX-a and -b were detected in the aerosol samples only during the first four hours of incubation (Figure 3b, Table S2b). When higher cell concentrations (ca. 10^6 cell L^{-1}) were incubated (experiments #10 and #12), a greater amount of OVTXs was detected in the seston; and OVTX-a to -e were found in the aerosol during the first three - four bubbling periods (filters #A, #B, #C and #D) in experiment #10, and during most part of the incubations in experiment #12. Interestingly, OVTX-g was found in the earlier incubations in experiment #12, while in the case of experiment #10, OVTX-c was not detected in the fourth hour, and only OVTX-a and -b were found until the end of the experiment (Table S2b). In the last bubbling, which lasted for 1.5 hours, filter #10P, a relatively higher amount of toxin in the air was measured and this higher level in the filter allowed the detection of OVTX-d.

3.5. General comparison of experiments in 2019, 2020, and 2021.

The comparison of the experiments conducted in the three years will take into consideration incubation time, the kind of incubated seawater (plankton/seston only *versus* enriched seston), and total cells and toxins concentration.

Considering the whole experimental data set, the highest amounts of toxin detected in the aerosol after one-hour incubation of seston containing mainly *Ostreopsis* plankton cells, were similar in 2020 and 2021. Namely, $125.49 \text{ ng}_{\text{tox}}$ were measured in filter #3A, 2020, and $122.69 \text{ ng}_{\text{tox}}$ in filter #11A, 2021 (Table S1). Both experiments were conducted with samples collected during the stationary phase of the bloom. This range could be considered representative of the maximum aerosolized

toxin concentrations to be potentially produced by planktonic communities along the bloom, as estimated with this experimental setup and design.

Regarding the series of seston experiments (EaS) containing plankton communities enriched with benthic *Ostreopsis* cells up to ca. 10^5 cell L^{-1} concentration, the maximum amount of aerosolized toxins was 123.75 ng_{tox} (filter #6B, 2020) and 146.26 ng_{tox} (filter #13A, 2021). This range is close to the amount of toxin aerosolized in one hour in the 2019 experiment #2, i.e. 166 ng_{tox} (Table S1 in Medina-Pérez et al. 2021),²² conducted also with seston containing ca. 10^5 cell L^{-1} composed by a mixture of planktonic and benthic *Ostreopsis* cells. These values are in the same range estimated when incubating planktonic cells for one hour in 2020 and 2021, as discussed previously.

Finally, in the series of seston experiments enriched with up to ca. 10^6 cell L^{-1} (EbS series) performed in 2021, the maximum amount of aerosolized toxin after one-hour bubbling was 531 ng_{tox} (filter #12A). This value was higher than the level measured in the analogous 2019 experiment #3, in terms of cell concentration, when 191 ng_{tox} were aerosolized after 21 hours of bubbling. The lower aerosolized toxin level in 2019, can be due to the longer incubation period (21h) compared to the shorter 1-hour bubbling in 2021. Interestingly, the incubated seston in 2019 contained a higher toxin content ($1.3 \times 10^8 - 2.3 \times 10^8$ $pg L_{water}^{-1}$) than in the 2021 experiment ($2.1 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^6$ $pg L_{water}^{-1}$, experiment #12). It points to the potential role of dissolved toxins, that unfortunately were not estimated in our experiments, while it also strengthens the complexity of the toxin aerosolization process and the need to continue future research on the link between the toxin content in seawater and the atmosphere.

In the 2020 and 2021 experiments, the proportion of aerosolized toxins related to the content in the incubated seston was in the range 0.002 – 0.18%, using the PM_{10} impactor (Table S1) while in 2019 it was up to 0.25% using a PM_1 . On one side, the ovatoxins aerosolization proportion compared to the toxins in the seawater is similar to the values reported for other microalgal-produced toxins, such as brevetoxins³¹ and microcystins.³² On the other, these results indicate that the PM_1 impactor was equally effective in retaining the aerosolized toxins as the PM_{10} one, which could potentially collect 10^3 times higher toxin concentration in the aerosol, provided it was present, without the above mentioned technical issues (section 3.2). Indeed, in the 2019 #1 experiment, with enriched seston (ca. 10^5 cells L^{-1}) bubbled for 0.75–1 hours, 69.01 $pg_{tox} L_{air}^{-1}$ (corresponding to 119 ng_{tox} in total) were estimated. Similar numbers were found in analogous experiments with higher cell concentrations in 2020 (filters #3B and #4B) and 2021 (filter #8A), namely 22.22 and 43.82 $pg_{tox} L_{air}^{-1}$ (corresponding to 50.88 – 101.22 ng_{tox} in total), respectively. Similarly, in the 2019 experiment #2, 664 ng_{tox} were measured after 4 hours of incubation, within the range of the 2021 experiments #10 and #12, when adding the total toxin collected during the four successive one-hour incubations in the #A to #D filters, respectively, 579.36 and 1496.73 ng_{tox} in total (Table S1). These findings also suggest that most of the aerosolized toxins are present in the small size particle fraction (<1 μm equivalent diameter).

Finally, it is worth noting that in 2019, foam accumulation at the seawater surface in the aerosolization chamber occurred when incubating in the order of ca. 10^6 cells L^{-1} . However, when incubating similar abundances in 2020 and 2021, foam accumulation was not observed. This

observation points to the complexity of the chemical and biological aspects occurring during the natural blooms, which require further studies.

4. CONCLUSIONS

Several questions were addressed in this study to improve the understanding of the factors involved in the aerosolization of toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata*.

Concerning the importance of the incubation time, our results indicate that toxin aerosolization occurs mainly during the first 3–4 hours and decreases afterwards. While a combination of technical questions (potential loss or degradation, not enough retention) requires further investigation, it is recommended to incubate for short periods (i.e. one hour) to get further insights into the aerosolization process in experimental tests in the laboratory.

Both PM₁₀ and PM₁ impactors appeared to have similar retention capacities, indicating that most of the aerosolized toxins could be in the small size (<1µm) aerosol particles.

The response of the microalgal cells to the short and long-term incubations also suggests that biological and physiological processes may be playing a major role concerning toxins synthesis and thus potential toxin aerosolization. These factors could explain some variability or apparent contradictory results observed in the experiments conducted during three consecutive summer blooms. For instance, the toxin content of the cells varied within a narrow range in 2020, which was lower than in 2021. In addition, two clear peaks in toxin cell concentration were observed in the exponential and the stationary phase of the 2021 bloom. However, aerosolized toxins were not detected until the bloom was well established, i.e. at the end of the exponential

phase and the beginning of the stationary phase.

The potential presence of the dissolved toxins, bound or not to the mucilage, also needs further studies. Although dissolved toxin was not detected in our tests, it could be present in some of the conducted experiments, contributing to the aerosolized toxin.

In the present study, 234 pg_{tox} L_{air}⁻¹ was the maximum total toxin concentration estimated in the aerosol in 2021 experiments (filter #12A) when ca. 10⁶ cell L⁻¹ was incubated in the aerosol generation chamber for one hour. This value is ca. 100 times higher than previously measured in the natural environment, i.e. 2.4 pg_{tox} L_{air}⁻¹, after pumping air for 1.5 – 6 hours.²⁰ A direct comparison between the two studies cannot be made, given their main different characteristics: environmental *versus* experimental. However, our approach can help to understand the dynamics involved in toxin aerosolization and detection in natural conditions where air disperses and dilutes aerosols.

Finally, the studies carried out by Poli et al. 2018 on mice³³ estimated an aerosol LD₅₀ of 0.041 µg kg⁻¹ and 0.031 µg kg⁻¹ for PLTX and OVTX-a (mixed with a very low proportion of OVTX-d/e), respectively. In the 2020 and 2021 experiments, the highest toxin concentration determined in the air was 53.40 pg_{tox} L_{air}⁻¹ and 234.24 pg_{tox} L_{air}⁻¹, respectively. Considering an average person's weight of 60 kg inhaling 7 m³ day⁻¹,³⁴ the aerosol LD₅₀ could be reached after continuous breathing for 1.1 to 5 days. These calculations are based on inhalation in a closed system; in natural conditions, air will rapidly disperse and dilute the aerosolized toxins, decreasing the real exposure. Although these values may suggest a relatively low human health risk, the effects of ovatoxins have not been studied yet,

mainly due to the lack of these toxins standards, the difficulties inherent to human health studies and the collection/detection of these aerosolized toxins during natural harmful blooms of *Ostreopsis cf. ovata*.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at X. Additional details of the list of the experiments carried out in 2020 and 2021, and all the detailed results for each experiment (toxin seston concentrations, toxin aerosol concentrations and toxin profiles).

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Elisa Berdalet – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/ 0003-1123-9706; Email: berdalet@icm.csic.es*

Authors

Noemí Inmaculada Medina-Pérez – *Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain. Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0003-0208-1580*

Manuel Dall’Osto – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0003-4203-894X*

Laia Viure – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/0000-0002-7116-5609*

Magda Vila – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/ 0000-0002-6855-841X*

Marta Estrada – *Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (ICM-CSIC), Barcelona E-08003, Spain; orcid.org/ 0000-0001-5769-9498*

Encarnación Moyano – *Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, Barcelona E-08028, Spain. Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, E-08001 Barcelona, Spain; orcid.org/0000-0002-1233-8864*

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the different financing agencies that supported the study. N.I.M-P was granted by the fellowship FI-SDUR2020-00254 (AGAUR, Government of Catalonia) and M.D.A. received a Ramón y Cajal fellowship (RYC-2012-11922, Spain). The experimental study and field work was conducted by the project PID2021-122743NB-I00 (Ministry of Science and Innovation, Spain.), project 2021 SGR 00281 (AGAUR, Generalitat de Catalunya), the Water Research Institute (IdRA, University of Barcelona), and by the CoCliME project, an ERA4CS network (ERA-NET) initiated by JPI Climate and co-financed by FORMAS (SE) and the European Union (Grant n° 690462).

■ REFERENCES

- (1) Moore, R. E.; Scheur, P. J. Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate. *Science* **1971**, *172*, 495–498.
- (2) Deeds, J. R.; Schwartz, M. D. Human Risk Associated with Palytoxin Exposure.

- Toxicon* **2010**, *56*, 150–162.
- (3) Tubaro, A.; Durando, P.; Del Favero, G.; Ansaldi, F.; Icardi, G.; Deeds, J. R.; Sosa, S. Case Definitions for Human Poisonings Postulated to Palytoxins Exposure. *Toxicon* **2011**, *57*, 478–495.
 - (4) Schmitt, C.; Torrents, R.; Domangé, B.; Glaizal, M.; Simon, N.; de Haro, L. Palytoxin Poisoning with Soft Coral from a Tank in France: 3 Cases Reports. *Press. Medicale* **2018**, *47*, 178–180.
 - (5) Thomas, A.; Anses, C.; Anses, S. S.; Haro, L. De; Marseille, C. A. P. De; Anses, J. B. Exposition à La Palytoxine Des Personnes Manipulant Des Coraux Mous d'aquarium d'eau de Mer: Étude Des Cas Rapportés Au Réseau Des Centres Antipoison de 2000 à 2017 Palytoxin Exposure Induced by Soft Corals in Aquariums: Cases Report of French Poison Cente. *Toxicol. Anal. Clin.* **2019**, *31*, 64–76.
 - (6) Brescianini, C.; Grillo, C.; Melchiorre, N.; Bertolotto, R. M.; Ferrari, A.; Vivaldi, B.; Icardi, G.; Gramaccioni, L.; Funari, E.; Scardala, S. *Ostreopsis ovata* Algal Blooms Affecting Human Health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Euro Surveill.* **2006**, *11*.
 - (7) Durando, P.; Ansaldi, F.; Oreste, P.; Moscatelli, P.; Marensi, L.; Grillo, C.; Gasparini, R.; Icardi, G. *Ostreopsis ovata* and Human Health: Epidemiological and Clinical Features of Respiratory Syndrome Outbreaks from a Two-Year Syndromic Surveillance, 2005-06, in North-West Italy. *Euro Surveill.* **2007**, *12*.
 - (8) Berdalet, E.; Pavaux, A. S.; Abós-Herrándiz, R.; Travers, M.; Appéré, G.; Vila, M.; Thomas, J.; de Haro, L.; Estrada, M.; Medina-Pérez, N. I.; Viure, L.; Karlson, B.; Lemée, R. Environmental, Human Health and Socioeconomic Impacts of *Ostreopsis* Spp. Blooms in the NW Mediterranean. *Harmful Algae* **2022**, *119*, 102320.
 - (9) Biré, R.; Trotureau, S.; Lemée, R.; Delpont, C.; Chabot, B.; Aumond, Y.; Krys, S. Occurrence of Palytoxins in Marine Organisms from Different Trophic Levels of the French Mediterranean Coast Harvested in 2009. *Harmful Algae* **2013**, *28*, 10–22.
 - (10) Biré, R.; Trotureau, S.; Lemée, R.; Oregioni, D.; Delpont, C.; Krys, S.; Guérin, T. Hunt for Palytoxins in a Wide Variety of Marine Organisms Harvested in 2010 on the French Mediterranean Coast. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 5425–5446.
 - (11) Accoroni, S.; Colombo, F.; Pichierri, S.; Romagnoli, T.; Marini, M.; Battocchl, C.; Penna, A.; Totti, C. Ecology of *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms in the Northwestern Adriatic Sea. *Cryptogam. Algol.* **2012**, *33*, 191–198.
 - (12) Tester, P. A.; Litaker, R. W.; Berdalet, E. Climate Change and Harmful Benthic Microalgae. *Harmful Algae* **2020**, *91*, 101655.
 - (13) Drouet, K.; Jauzein, C.; Herviot-Heath, D.; Hariri, S.; Laza-Martinez, A.; Lecadet, C.; Plus, M.; Seoane, S.; Sourisseau, M.; Lemée, R.; Siano, R. Current Distribution and Potential Expansion of the Harmful Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *siamensis* towards the Warming Waters of the Bay of Biscay, North-East Atlantic. *Environ. Microbiol.* **2021**, *23*, 4956–4979.
 - (14) Chomérat, N.; Antajan, E.; Auby, I.; Bilien, G.; Carpentier, L.; Casamajor, M. N. de; Ganthy, F.; Hervé, F.; Labadie, M.; Méteigner, C.; Paradis, C.; Perrière-Rumèbe, M.; Sanchez, F.; Séchet, V.; Amzil, Z. First Characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a

- Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 461.
- (15) Lemée, R.; Mangialajo, L.; Cohu, S.; Amzil, Z.; Blanfune, A.; Chomerat, N.; Ganzin, N.; Gasparini, S.; Gossel, H.; Guidi-Guivard, L.; Hoareaw, L.; Duff, F. Le; Marro, S.; Simow, N.; Nezan, E.; Pedrotti, M. L.; Sechet, V.; Soliveres, O.; Thibaut, T. Interactions between Scientists, Managers and Policy Makers in the Framework of the French Medios Project on *Ostreopsis* (2008-2010). *Cryptogam. Algol.* **2012**, *33*, 137–142.
- (16) Funari, E.; Manganelli, M.; Testai, E. *Ostreopsis* Cf. *Ovata* Blooms in Coastal Water: Italian Guidelines to Assess and Manage the Risk Associated to Bathing Waters and Recreational Activities. *Harmful Algae* **2015**, *50*, 45–56.
- (17) Vila, M.; Viure, L.; Lemée, R.; Berdalet, E. Developing an *Ostreopsis* Early Warning System: The Joint Engagement of Environmental Agencies, Beach Users and Scientists. In *19th International Conference on Harmful Algae*; 2021.
- (18) Pavaux, A. S.; Berdalet, E.; Lemée, R. Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*, 498.
- (19) Vila, M.; Abós-Herrándiz, R.; Isern-Fontanet, J.; Álvarez, J.; Berdalet, E. Establishing the Link between *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms and Human Health Impacts Using Ecology and Epidemiology. *Sci. Mar.* **2016**, *80 SI*, 107–115.
- (20) Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Tartaglione, L.; Benedettini, G.; Onorari, M.; Serena, F.; Battocchi, C.; Casabianca, S.; Penna, A. First Finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* Toxins in Marine Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 3532–3540.
- (21) S.; Casabianca, A.; Riobó, P.; Franco, J. M.; Vila, M.; Penna, A. Quantification of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* Spp. by QPCR Assay in Marine Aerosol. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3788–3795.
- (22) Medina-Pérez, N. I.; Dall'osto, M.; Decesari, S.; Paglione, M.; Moyano, E.; Berdalet, E. Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air-Sea Interactions. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 468–477.
- (23) Medina-Pérez, N. I.; Cerdán-García, E.; Rubió, F.; Viure, L.; Estrada, M.; Moyano, E.; Berdalet, E. Progress on the Link between Nutrient Availability and Toxin Production by *Ostreopsis* cf. *ovata*: Field and Laboratory Experiments. *Toxins* **2023**, *15*, 188.
- (24) Mangialajo, L.; Ganzin, N.; Accoroni, S.; Asnaghi, V.; Blanfuné, A.; Cabrini, M.; Cattaneo-Vietti, R.; Chavanon, F.; Chiantore, M.; Cohu, S.; Costa, E.; Fornasaro, D.; Gossel, H.; Marco-Miralles, F.; Masó, M.; Reñé, A.; Rossi, A. M.; Sala, M. M.; Thibaut, T.; Totti, C.; Vila, M.; Lemée, R. Trends in *Ostreopsis* Proliferation along the Northern Mediterranean Coasts. *Toxicon* **2011**, *57*, 408–420.
- (25) Edler, L.; Elbrächter, M. The Utermöhl Method for Quantitative Phytoplankton Analysis. In Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. In *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*; Karlson, B., Cusack, C., Brenan, E., Eds.; UNESCO. IOC Manuals and Guides, no. 55. (IOC/2010/MG/55) 110 pages.: Paris, 2005.
- (26) van Acker, E.; de Rijke, M.; Asselman, J.;

- Beck, I. M.; Huysman, S.; Vanhaecke, L.; de Schampelaere, K. A. C.; Janssen, C. R. Aerosolizable Marine Phycotoxins and Human Health Effects: In Vitro Support for the Biogenics Hypothesis. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 46.
- (27) Medina-Pérez, N. I.; Santos, F. J.; Berdalet, E.; Moyano, E. Multiply Charged Ion Profiles in the UHPLC-HRMS Analysis of Palytoxin Analogues from *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms. *Anal. Methods* **2023**, *15*, 1355–1364.
- (28) Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Magno, G. S.; Tartaglione, L.; Grillo, C.; Melchiorre, N. The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6153–6159.
- (29) Giussani, V.; Sbrana, F.; Asnaghi, V.; Vassalli, M.; Faimali, M.; Casabianca, S.; Penna, A.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Mazzeo, A.; Chiantore, M. Active Role of the Mucilage in the Toxicity Mechanism of the Harmful Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* **2015**, *44*, 46–53.
- (30) Guerrini, F.; Pezzolesi, L.; Feller, A.; Riccardi, M.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Dello Iacovo, E.; Fattorusso, E.; Forino, M.; Pistocchi, R. Comparative Growth and Toxin Profile of Cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* **2010**, *55*, 211–220.
- (31) Backer, L. C.; Kirkpatrick, B.; Fleming, L. E.; Cheng, Y. S.; Pierce, R.; Bean, J. A.; Clark, R.; Johnson, D.; Wanner, A.; Tamer, R.; Zhou, Y.; Baden, D. G. Occupational Exposure to Aerosolized Brevetoxins during Florida Red Tide Events: Effects on a Healthy Worker Population. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 644–649.
- (32) Backer, L. C.; McNeel, S. V.; Barber, T.; Kirkpatrick, B.; Williams, C.; Irvin, M.; Zhou, Y.; Johnson, T. B.; Nierenberg, K.; Aubel, M.; LePrell, R.; Chapman, A.; Foss, A.; Corum, S.; Hill, V. R.; Kieszak, S. M.; Cheng, Y. S. Recreational Exposure to Microcystins during Algal Blooms in Two California Lakes. *Toxicon* **2010**, *55*, 909–921.
- (33) Poli, M.; Ruiz-Olvera, P.; Nalca, A.; Ruiz, S.; Livingston, V.; Frick, O.; Dyer, D.; Schellhase, C.; Raymond, J.; Kulis, D.; Anderson, D.; McGrath, S.; Deeds, J. Toxicity and Pathophysiology of Palytoxin Congeners after Intraperitoneal and Aerosol Administration in Rats. *Toxicon* **2018**, *150*, 235–250.
- (34) Kumpitsch, C.; Koskinen, K.; Schöpf, V.; Moissl-Eichinger, C. The Microbiome of the Upper Respiratory Tract in Health and Disease. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 87.

SUPPORTING INFORMATION for

Biological factors affecting the aerosolization of toxins produced by *Ostreopsis cf. ovata*

Noemí Inmaculada Medina-Pérez,^{a,b} Manuel Dall'Osto,^b Laia Viure,^b Magda Vila,^b Marta Estrada,^b Encarnación Moyano,^{a,c} and Elisa Berdalet^{*b}

^a Department of Chemical Engineering and Analytical Chemistry, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^b Department of Marine Biology and Oceanography, Institute of Marine Sciences (CSIC), E-08003 Barcelona, Spain

^c Water Research Institute (IdRA), University of Barcelona, E-08001 Barcelona, Spain

- Table S1:** Toxin concentration in the incubated seawater (seston) and in the aerosol in the experiments carried out in (a) 2020 and in (b) 2021. For each conducted experiment (labelled with number and date), the #A to #P line refers to the aerosol collected filter and the corresponding accompanying parameters measured in the incubated seawater. The "Incubation type" refers to Seston (S), Enriched Seston with $\sim 10^5$ cells L^{-1} (EaS) or $\sim 10^6$ cells L^{-1} (EbS) or Filtered Seawater (FSW). In the seawater, the estimation of the precise cell abundance (cell L^{-1}) and the total toxin per liter of water in the incubation chamber ($pg_{tox} L_{water}^{-1}$) were combined to estimate the total toxin concentration in the cells ($pg_{tox} cell^{-1}$). In the aerosol, the collected toxin is expressed per liter of filtered air in the different incubation periods ($pg_{tox} L_{air}^{-1}$), and as the total amount of toxin in the PM_{10} filter ($ng_{tox} aerosol$). The percentage of aerosolized toxin is calculated by considering the total toxin in the PM_{10} filter related to the total toxin content in the 57 L chamber ($pg_{tox} aerosol/pg_{tox} water \times 100$).
- Table S2:** Toxin profile (%) in seawater (grey colour) and the aerosol samples (white colour), **a**) 2020, **b**) 2021. Nd: Non detected; indicates that toxin concentrations were below detection.

Table S1: Toxin concentration in the incubated seawater (seston) and in the aerosol in the experiments carried out in (a) 2020 and in (b) 2021. For each conducted experiment (labelled with number and date), the #A to #P line refers to the aerosol collected filter and the corresponding accompanying parameters measured in the incubated seawater. The "Incubation type" refers to Seston (S), E-nriched Seston with $\sim 10^5$ cells L^{-1} (EaS) or $\sim 10^6$ cells L^{-1} (EbS) or Filtered Seawater (FSW). In the seawater, the estimation of the cell abundance (cell L^{-1}) and the total toxin per liter of water in the incubation chamber ($pg_{tox} L_{water}^{-1}$) were combined to estimate the total toxin concentration in the cells ($pg_{tox} cell^{-1}$). In the aerosol, the collected toxin is expressed per liter of filtered air in the different incubation periods ($pg_{tox} L_{air}^{-1}$), and as the total amount of toxin in the PM_{10} filter ($ng_{tox} aerosol$). The percentage of aerosolized toxin is calculated by considering the total toxin in the PM_{10} filter related to the total toxin content in the 57 L chamber ($pg_{tox} aerosol/pg_{tox} water \times 100$).

Exp. # 2020 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol			
			Cell abundance		Toxin concentration		Toxin concentration		
			Cells L^{-1}	$pg_{tox} L_{water}^{-1}$	$pg_{tox} cell^{-1}$	$pg_{tox} L_{air}^{-1}$	$ng_{tox} aerosol$	% Aerosolized	
1A – 13.07	S	1	2.2×10^4	$1.3 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^5$	59.9 ± 6.9	39.89	90.96	0.13	
1B	EaS	1	1.3×10^5	$5.3 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$	42.3 ± 1.5	41.89	97.19	0.03	
1E	EaS	15	3.2×10^4	$1.4 \times 10^6 \pm 8.3 \times 10^4$	44.3 ± 2.6	3.78	128.65	0.18	
2A – 15.07	S	1	1.4×10^4	$6.6 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$	48.9 ± 2.5	12.46	28.66	0.08	
2B	EaS	1	9.9×10^4	$4.4 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$	44.0 ± 2.2	29.93	70.05	0.03	
2C	EaS	1	9.5×10^4			30.64	70.47		
2D	EaS	1	9.5×10^4			30.94	71.16		
2E	EaS	15	9.0×10^4	$4.2 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$	46.5 ± 2.0	nd	nd		
3A – 20.07	S	1	4.8×10^4	$2.7 \times 10^6 \pm 9.6 \times 10^2$	56.2 ± 0.1	53.40	125.49	0.08	
3B	EaS	1	1.1×10^5	$4.9 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$	44.2 ± 1.0	43.82	101.22	0.04	
3E	EaS	15	1.1×10^5	$4.4 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$	39.0 ± 1.9	4.85	164.23	0.07	
4A – 22.07	S	1	1.3×10^4	$6.2 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$	48.2 ± 2.1	27.06	62.78	0.18	
4B	EaS	1	1.0×10^5	$4.5 \times 10^6 \pm 3.7 \times 10^5$	44.1 ± 3.6	35.57	80.75	0.03	

Exp. # 2020 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol			
			Cell abundance		Toxin concentration		Toxin concentration		
			Cells L ⁻¹	pg _{tox} L _{water} ⁻¹	pg _{tox} cell ⁻¹	pg _{tox} L _{air} ⁻¹	ng _{tox} aerosol	% Aerosolized	
4C	EaS	1	1.0×10 ⁵			32.90	76.33		
4D	EaS	1	1.0×10 ⁵			29.83	68.30		
4E	EaS	15	9.9×10 ⁴	5.7×10 ⁶ ± 4.1×10 ⁵	57.9 ± 4.1	1.90	64.67	0.02	
5A – 27/07	S	1	5.7×10 ⁴	1.7×10 ⁶ ± 7.1×10 ⁴	29.7 ± 1.2	33.11	75.48	0.08	
5B	EaS	1	1.2×10 ⁵	6.7×10 ⁶ ± 3.6×10 ⁵	54.7 ± 2.9	45.18	102.10	0.03	
5E	EaS	15	1.1×10 ⁵	6.4×10 ⁶ ± 1.0×10 ⁵	57.0 ± 0.9	3.32	112.79	0.03	
6A – 29/07	S	1	1.2×10 ⁴	8.6×10 ⁵ ± 5.0×10 ⁴	74.5 ± 4.3	37.12	83.15	0.18	
6B	EaS	1	9.5×10 ⁴	5.2×10 ⁶ ± 1.4×10 ⁵	54.9 ± 1.5	54.52	123.75	0.04	
6C	EaS	1	8.5×10 ⁴			35.51	81.68		
6D	EaS	1	8.5×10 ⁴			31.44	72.32		
6E	EaS	15	7.7×10 ⁴	5.0×10 ⁶ ± 1.4×10 ⁵	64.9 ± 1.8	3.21	108.05	0.04	
7A – 5/08	S	1	2.7×10 ³	2.2×10 ⁵ ± 6.7×10 ³	82.2 ± 2.5	nd	nd		
7B	EaS	1	1.1×10 ⁵	5.0×10 ⁶ ± 4.0×10 ⁵	46.8 ± 3.8	12.16	27.73	0.01	
7C	EaS	1	1.0×10 ⁵			12.09	27.56		
7D	EaS	1	1.0×10 ⁵			11.61	26.13		
7E	EaS	15	9.9×10 ⁴	4.5×10 ⁶ ± 1.2×10 ⁵	45.8 ± 1.2	0.64	21.52	0.01	
8A – 12/08	S	1	2.4×10 ⁴	1.3×10 ⁶ ± 4.2×10 ³	56.6 ± 0.2	23.85	54.14	0.07	
8B	EaS	1	6.9×10 ⁴	4.3×10 ⁶ ± 3.7×10 ⁴	61.6 ± 0.5	22.96	52.34	0.02	
8E	EaS	15	6.0×10 ⁴	2.9×10 ⁶ ± 1.6×10 ⁵	48.9 ± 2.6	0.75	25.46	0.02	

b)

Exp. # 2021 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol		
			Cell abundance	Toxin concentration	Toxin concentration	Toxin concentration	Toxin concentration	
			Cells L ⁻¹	pg _{tox} L _{water} ⁻¹	pg _{tox} cell ⁻¹	pg _{tox} L _{air} ⁻¹	ng _{tox aerosol}	% Aerosolized
1A - 7/06	S	1	0	nd	nd	nd	nd	
1B	FSW	1						
2A - 14/06	S	1	0	nd	nd	nd	nd	
2B	FSW	1						
3A - 21/06	S	1	0	nd	nd	nd	nd	
3B	FSW	1						
4A - 28/06	S	1	2.0×10 ¹	nd	nd	nd	nd	
4B	FSW	1						
4C	FSW	15						
5A - 5/07	S	1	1.2×10 ²	nd	nd	nd	nd	
5B	FSW	1						
6A - 14/07	S	1	7.8×10 ²	5.2×10 ⁴ ± 5.6×10 ²	67.2 ± 0.5	nd	nd	
6B	FSW	1						
6C	FSW	15						
7A - 19/07	S	1	3.0×10 ⁴	5.7×10 ⁵ ± 3.7×10 ⁵	19.1 ± 8.8	20.32	46.54	0.15
7B	FSW	1						
7C	FSW	15						
8A - 21/07	EaS	1	8.9×10 ⁴	3.1×10 ⁶ ± 2.3×10 ⁵	35.3 ± 1.9	22.22	50.88	0.03
8B	EaS	1				19.67	44.65	0.03
8C	EaS	1				18.87	42.83	0.02
8D	EaS	1				17.10	38.81	0.02
8E	EaS	1				8.70	19.74	0.01

Exp. # 2021 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol		
			Cell abundance	Toxin concentration		Toxin concentration		
			Cells L ⁻¹	pg _{tox} L _{water} ⁻¹	pg _{tox} cell ⁻¹	pg _{tox} L _{air} ⁻¹	ng _{tox} aerosol	% Aerosolized
8F	EaS	1				8.33	18.90	0.01
8G	EaS	1				8.34	19.02	0.01
8H	EaS	1				7.79	17.76	0.01
8I	EaS	1				7.55	17.21	0.01
8J	EaS	1				8.56	19.61	0.01
8K	EaS	1				7.75	17.82	0.01
8L	EaS	1				8.25	18.97	0.01
8M	EaS	1				8.29	19.08	0.01
8N	EaS	1				8.28	18.97	0.01
8O	EaS	1	5.1×10 ⁴	1.2×10 ⁶ ±1.1×10 ⁵	13.8 ± 0.8	8.36	19.22	0.03
9A – 26/07	S	1	4.2×10 ⁴	3.0×10 ⁶ ±2.1×10 ⁵	71.9 ± 3.6	21.56	48.95	0.03
9B	FSW	1						
9C	FSW	15						
10A – 28/07	EbS	1	1.1×10 ⁶	3.2×10 ⁷ ± 4.9×10 ⁶	28.9 ± 3.1	79.48	182.80	0.01
10B	EbS	1				67.78	154.53	0.01
10C	EbS	1				63.49	144.77	0.01
10D	EbS	1				42.66	97.26	0.01
10E	EbS	1				22.98	52.39	0.003
10F	EbS	1				20.48	46.90	0.003
10G	EbS	1				19.15	43.86	0.002
10H	EbS	1				18.14	41.37	0.002
10I	EbS	1				18.04	40.95	0.002
10J	EbS	1				17.50	39.72	0.002

Exp. # 2021 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol		
			Cell abundance	Toxin concentration		Toxin concentration		
				Cells L ⁻¹	pg _{tox} L _{water} ⁻¹	pg _{tox} cell ⁻¹	pg _{tox} L _{air} ⁻¹	ng _{tox aerosol}
10K	EbS	1				17.27	39.21	0.002
10L	EbS	1				17.22	39.09	0.002
10M	EbS	1				17.59	40.10	0.002
10N	EbS	1				17.71	40.02	0.002
10O	EbS	1				17.95	41.10	0.002
10P	EbS	1.5				22.69	76.94	0.004
11A – 2/08	S	1	8.9×10 ⁵	3.3×10 ⁷ ± 1.7×10 ⁶	37.6 ± 1.3	53.11	122.69	0.06
11B	FSW	1	1.5×10 ⁵	3.9×10 ⁶ ± 1.9×10 ⁵	25.4 ± 0.9	16.61	38.21	
12A – 9/08	EbS	1	5.6×10 ⁵	2.1×10 ⁷ ± 1.5×10 ⁶	38.4 ± 1.9	234.24	531.72	0.04
12B	EbS	1				190.89	429.50	0.04
12C	EbS	1				131.54	297.27	0.02
12D	EbS	1				104.93	238.20	0.02
12E	EbS	1				76.13	172.82	0.01
12F	EbS	1				63.19	142.82	0.01
12G	EbS	1				77.12	175.06	0.01
12H	EbS	1				85.48	193.18	0.02
12I	EbS	1				87.33	197.36	0.02
12J	EbS	1				99.49	226.84	0.02
12K	EbS	1				91.50	207.70	0.02
12L	EbS	1				71.85	162.38	0.01
12M	EbS	1				67.22	153.25	0.01
12N	EbS	1				37.11	84.98	0.01
12O	EbS	1				67.87	154.75	0.01

Exp. # 2021 date	Incub. type	Incub. time (h)	Seawater incubator			Aerosol		
			Cell abundance	Toxin concentration		Toxin concentration		
			Cells L ⁻¹	pg _{tox} L _{water} ⁻¹	pg _{tox} cell ⁻¹	pg _{tox} L _{air} ⁻¹	ng _{tox} aerosol	% Aerosolized
12P	EbS	1	8.4×10 ⁵	2.1×10 ⁷ ± 1.5×10 ⁶	25.7 ± 1.3	69.23	158.53	0.01
13A – 30/08	EaS	1	9.4×10 ⁴	1.7×10 ⁶ ± 8.3×10 ⁴	18.4 ± 0.6	64.15	146.26	0.15
13B	EaS	1				38.19	87.07	0.09
13C	EaS	1	5.1×10 ⁴	1.2×10 ⁶ ± 1.6×10 ⁴	23.5 ± 0.2	17.11	39.17	0.06

Table S2: Toxin profile (%) in seawater (grey colour) and the aerosol samples (white colour), **a)** 2020, **b)** 2021. Nd: Non detected; indicates that toxin concentrations were below detection.

a)

Exp. # 2020 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
1A – 13.07	65.50 ± 2.11	25.57 ± 1.42	nd	6.16 ± 0.38	2.76 ± 3.91	nd	nd	nd
1B	54.61 ± 0.13	30.79 ± 0.42	2.69 ± 0.06	6.42 ± 0.04	5.49 ± 0.19	nd	nd	nd
1E	66.47 ± 1.42	23.54 ± 0.89	nd	5.41 ± 0.31	4.58 ± 0.22	nd	nd	nd
1A – 13.07	63.31	36.69	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1B	63.98	36.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1E	66.89	33.11	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2A – 15.07	71.05 ± 0.75	28.95 ± 0.75	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2B	54.49 ± 0.38	30.25 ± 0.65	2.82 ± 0.11	6.28 ± 0.15	6.16 ± 0.24	nd	nd	nd
2C								
2D								
2E	55.14 ± 0.31	29.32 ± 0.52	2.93 ± 0.07	6.68 ± 0.22	5.92 ± 0.08	nd	nd	nd
2A – 15.07	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2B	59.96	40.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2C	60.13	39.87	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2D	61.44	38.56	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2E	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2020 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
3A – 20.07	52.35 ± 0.22	34.50 ± 0.53	2.60 ± 0.09	5.52 ± 0.25	5.03 ± 0.14	nd	nd	nd
3B	55.35 ± 0.64	28.42 ± 0.40	3.01 ± 0.02	6.71 ± 0.09	5.94 ± 0.13	nd	1.14 ± 0.01	nd
3E	55.45 ± 0.30	28.91 ± 0.26	2.96 ± 0.07	6.68 ± 0.10	6.01 ± 0.01	nd	nd	nd
3A – 20.07	65.84	34.16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3B	63.97	36.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3E	68.68	31.32	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4A – 22.07	70.37 ± 0.23	29.63 ± 0.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4B	55.62 ± 0.16	28.36 ± 1.01	3.03 ± 0.05	6.59 ± 0.06	5.85 ± 0.07	nd	1.11 ± 0.01	nd
4C								
4D								
4E	58.37 ± 0.17	25.26 ± 0.54	3.01 ± 0.01	6.18 ± 0.05	5.47 ± 0.14	0.92 ± 0.01	1.26 ± 0.03	nd
4A – 22.07	59.75	40.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4B	62.01	37.99	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4C	61.97	38.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4D	61.92	38.08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4E	62.05	37.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5A – 27.07	58.20 ± 0.18	29.10 ± 0.14	nd	6.51 ± 0.17	6.19 ± 0.15	nd	nd	nd
5B	58.10 ± 0.08	25.50 ± 0.20	2.87 ± 0.03	5.72 ± 0.01	5.72 ± 0.02	0.90 ± 0.05	1.20 ± 0.03	nd
5E	57.57 ± 0.16	25.86 ± 0.04	2.97 ± 0.02	5.90 ± 0.03	5.61 ± 0.10	0.95 ± 0.01	1.14 ± 0.07	nd
5A – 27.07	62.62	37.38	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5B	64.08	35.92	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5E	66.72	33.28	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2020 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
6A – 29/07	57.99 ± 0.71	26.80 ± 0.34	nd	7.77 ± 0.17	7.44 ± 0.20	nd	nd	nd
6B	57.17 ± 0.20	26.57 ± 0.34	2.96 ± 0.04	5.77 ± 0.25	5.59 ± 0.01	1.07 ± 0.02	1.40 ± 0.01	nd
6C								
6D								
6E	56.79 ± 0.03	26.24 ± 0.27	3.02 ± 0.03	5.83 ± 0.16	5.60 ± 0.01	1.11 ± 0.02	1.41 ± 0.08	nd
6A – 29/07	62.59	37.41	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6B	65.08	34.92	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6C	62.47	37.53	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6D	61.15	38.85	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6E	66.18	33.82	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7A – 5/08	64.54 ± 0.34	35.46 ± 0.34	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7B	56.51 ± 0.37	26.87 ± 0.18	2.94 ± 0.01	5.59 ± 0.06	5.57 ± 0.03	1.19 ± 0.03	1.33 ± 0.06	nd
7C								
7D								
7E	56.16 ± 0.06	27.14 ± 0.06	3.02 ± 0.01	5.71 ± 0.12	5.39 ± 0.17	1.19 ± 0.01	1.39 ± 0.07	nd
7A – 5/08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7B	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7C	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7D	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7E	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2020 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
8A – 12/08	59.48 ± 0.41	28.20 ± 0.35	nd	6.42 ± 0.05	5.90 ± 0.01	nd	nd	nd
8B	56.24 ± 0.82	27.25 ± 0.03	3.16 ± 0.02	5.82 ± 0.07	5.28 ± 0.16	1.33 ± 0.01	1.59 ± 0.06	nd
8E	54.81 ± 0.57	29.36 ± 0.60	3.43 ± 0.06	6.02 ± 0.04	5.43 ± 0.14	nd	0.94 ± 0.34	nd
8A – 12/08	57.91	42.09	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8B	57.78	42.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8E	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

b)

Exp. # 2021 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
1A – 7/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1A – 7/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2A – 14/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2A – 14/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3A – 21/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3A – 21/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4A – 28/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4A – 28/06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5A – 5/07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5A – 5/07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6A – 14/07	51.77 ± 0.05	48.23 ± 0.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6A – 14/07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2021 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
7A – 19/07	49.49 ± 8.82	21.82 ± 0.24	7.93 ± 4.09	9.81 ± 3.59	8.87 ± 3.86	nd	4.18 ± 0.12	nd
7A – 19/07	55.23	44.77	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8A – 21/07	62.64 ± 0.15	19.67 ± 0.50	2.97 ± 0.13	5.07 ± 0.13	4.04 ± 0.05	1.77 ± 0.13	2.08 ± 0.20	1.76 ± 0.11
8B–8N								
8O	63.23 ± 1.18	18.43 ± 0.15	3.30 ± 0.15	5.07 ± 0.01	4.25 ± 0.01	2.23 ± 0.18	2.44 ± 0.13	1.05 ± 1.49
8A – 21/07	56.88	43.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8B	55.22	44.78	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8C	54.39	45.61	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8D	52.18	47.82	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8E	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8F	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8G	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8H	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8I	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8J	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8K	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8L	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8M	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8N	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8O	100	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2021 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
9A – 26/07	62.53 ± 0.25	21.62 ± 0.61	2.58 ± 0.01	4.61 ± 0.06	3.95 ± 0.12	1.48 ± 0.10	1.83 ± 0.10	1.41 ± 0.08
9A – 26/07	56.41	43.59	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10A – 28/07	56.60 ± 4.49	28.09 ± 2.38	2.29 ± 0.30	5.99 ± 0.80	5.18 ± 0.79	0.53 ± 0.09	0.99 ± 0.09	0.33 ± 0.05
10B–100								
10P	62.02 ± 0.56	24.49 ± 0.61	1.92 ± 0.05	5.21 ± 0.04	4.72 ± 0.11	0.46 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.30 ± 0.01
10A – 28/07	43.37	22.32	10.49	11.87	11.95	nd	nd	nd
10B	39.00	22.21	12.23	13.25	13.31	nd	nd	nd
10C	37.80	21.53	12.96	13.84	13.87	nd	nd	nd
10D	36.42	25.02	nd	19.31	19.24	nd	nd	nd
10E	57.39	42.61	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10F	55.56	44.44	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10G	54.51	45.49	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10H	53.85	46.15	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10I	52.65	47.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10J	52.78	47.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10K	52.58	47.42	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10L	52.17	47.83	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10M	52.34	47.66	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10N	52.73	47.27	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10O	53.63	46.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10P	45.90	29.54	nd	24.56	nd	nd	nd	nd

Exp. # 2021 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
11A - 2/08	54.08 ± 0.53	31.53 ± 0.28	2.26 ± 0.02	4.58 ± 0.24	4.31 ± 0.08	1.01 ± 0.04	1.41 ± 0.04	0.83 ± 0.02
11A - 2/08	32.49	21.02	15.12	15.59	15.79	nd	nd	nd
11B	51.38	48.62	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12A - 9/08	62.53 ± 0.17	24.79 ± 0.07	1.75 ± 0.01	4.62 ± 0.06	4.67 ± 0.07	0.50 ± 0.01	0.87 ± 0.08	0.27 ± 0.01
12B-12O								
12P	61.80 ± 0.79	24.92 ± 0.71	1.71 ± 0.01	4.92 ± 0.14	5.03 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.81 ± 0.07	0.30 ± 0.01
12A - 9/08	56.54	22.20	4.45	6.13	6.66	nd	4.03	nd
12B	53.35	22.37	5.25	6.94	6.97	nd	5.11	nd
12C	48.13	21.28	6.87	8.23	8.57	nd	6.92	nd
12D	43.18	21.05	8.25	9.62	9.56	nd	8.35	nd
12E	42.61	22.31	10.92	11.96	12.20	nd	nd	nd
12F	38.04	21.63	13.06	13.74	13.53	nd	nd	nd
12G	43.42	22.23	10.87	11.94	11.53	nd	nd	nd
12H	44.92	22.26	10.04	11.40	11.37	nd	nd	nd
12I	46.54	22.10	9.77	10.96	10.62	nd	nd	nd
12J	43.74	20.25	8.32	9.41	9.88	nd	8.40	nd
12K	48.07	21.77	9.05	10.42	10.68	nd	nd	nd
12L	42.39	21.94	11.17	12.20	12.30	nd	nd	nd
12M	41.81	21.22	11.82	12.59	12.57	nd	nd	nd
12N	65.31	34.69	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12O	42.18	21.59	11.65	12.42	12.17	nd	nd	nd
12P	42.22	21.50	11.39	12.47	12.43	nd	nd	nd

Exp. # 2021 date	OVTX-a (%)	OVTX-b (%)	OVTX-c (%)	OVTX-d (%)	OVTX-e (%)	OVTX-f (%)	OVTX-g (%)	Iso-PLTX (%)
13A – 30/08 13B	61.49 ± 0.10	22.39 ± 0.37	2.69 ± 0.09	4.23 ± 0.09	3.95 ± 0.01	1.68 ± 0.06	1.97 ± 0.04	1.60 ± 0.07
13C	61.03 ± 0.01	22.14 ± 0.02	2.77 ± 0.01	4.32 ± 0.02	4.12 ± 0.01	1.80 ± 0.02	2.11 ± 0.01	1.72 ± 0.02
13A – 30/08	38.67	22.20	12.56	13.51	13.06	nd	nd	nd
13B	33.88	24.85	nd	20.65	20.62	nd	nd	nd
13C	53.02	46.98	nd	nd	nd	nd	nd	nd

4.3. Discusión

La discusión de los resultados incluidos en el trabajo experimental de este capítulo y que han dado lugar a las publicaciones del Artículo #4 y Artículo #5 (sección 4.2) se centra en tres temas principales: I) descripción del diseño de la cámara experimental de incubación utilizada y de la función del impactor en el proceso de recolección de los aerosoles (sección 4.3.1), II) discusión transversal de los resultados del trabajo experimental del presente capítulo (sección 4.3.2), III) relación de los niveles de toxina aerosolizados con la sintomatología en humanos (sección 4.3.3).

4.3.1. Cámara experimental de incubación: diseño y proceso de muestreo de los aerosoles

Para llevar a cabo los experimentos de aerosolización en el laboratorio se utiliza un tanque/cámara de incubación cilíndrico de 75 L de capacidad (Figura 4.1), de características similares a otros incubadores ya utilizados en otros trabajos en los que se ha estudiado la aerosolización de otros compuestos orgánicos [293,301,317]. Este incubador se carga con unos 55–60 L de agua de mar recolectada en la zona de Sant Andreu de Llavaneres siguiendo el procedimiento de muestreo descrito en la sección 2.3.1 (Capítulo 2). En función del tipo de experimento a realizar, el tanque se llena de agua de mar filtrada, agua de mar (sin filtrar) con células planctónicas (o seston) y el seston con adición de células bentónicas. El agua contenida en el tanque se hace recircular desde la parte inferior hacia la superior mediante la ayuda de una bomba peristáltica. Además, se inyecta aire comprimido limpio (previamente filtrado por un filtro de carbón) a unos 20 cm de la superficie del agua. El aire introducido se fuerza a ascender hacia la salida del tanque (parte superior) donde se ubica un impactor conectado a una bomba que se encarga de aspirarlo a una velocidad de $38,3 \text{ L min}^{-1}$ (Figura 4.1).

En el proceso de recirculación, el agua impulsada sale a través de unos tubos en forma de aspa situados en la parte superior del tanque. Los tubos presentan unos pequeños orificios por donde se hace salir el agua de manera que cae en forma de pequeñas gotas sobre la superficie del líquido. El impacto de estas gotas sobre el agua genera una serie de ondas en la superficie, provoca la agitación de la misma y la generación de pequeñas burbujas. Estas burbujas, al ascender hacia la superficie del agua y ayudadas por el aire inyectado sobre ella, explotan generando partículas líquidas más pequeñas en forma de aerosoles. Estos aerosoles pueden contener tanto microorganismos que ya se encontraban en el agua de mar, como los análogos de la PLTX producidos por el *O. cf. ovata*, proteínas, partículas de células y partículas orgánicas e inorgánicas, entre otros componentes.

Es importante indicar que la formación de aerosoles en un incubador como el descrito puede comportar la exposición de las personas que operan con él, por lo que, fue necesario tomar medidas de prevención y utilizar equipos de protección personal adecuados para minimizar la exposición a los aerosoles, además de ubicar el tanque cerca del extractor del laboratorio, para eliminar los gases que no fueron retenidos por el filtro del impactor.

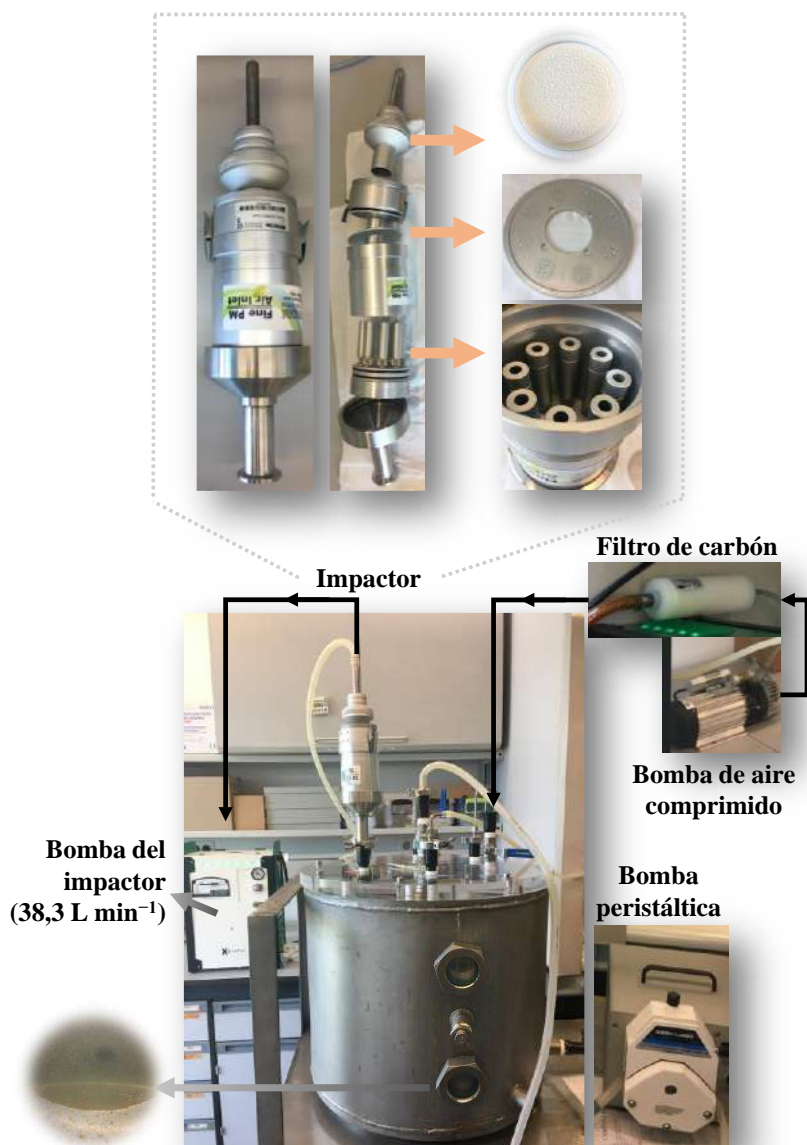


Figura 4.1. Diseño de la cámara experimental de incubación en el que se han realizado los experimentos de aerosolización.

El aire inyectado en el tanque ayuda a transportar los aerosoles hacia el impactor, ubicado en la parte superior de la cámara experimental (Figura 4.1), y que es el encargado de recolectar por impacto las partículas (PM₁ o PM₁₀) generadas. Este impactor consta de un preseparador que permite eliminar las partículas más grandes por cantidad de movimiento al hacer pasar el aerosol a través de 8 boquillas o rendijas a una alta velocidad y hacerlo impactar sobre un sustrato de recolección (filtro de cuarzo) previamente lavado (dos veces con 0,1% HNO₃ y 2 veces con agua) y acondicionado (secado 24h a 30°C) para eliminar posibles contaminaciones procedentes del propio filtro (trazas de metales u otras impurezas).

En el impactor se pueden recoger fracciones de los aerosoles que contienen partículas de diferente tamaño y para ello se suelen utilizar boquillas o rendijas de diámetro de corte adecuado. Por ejemplo, en los experimentos realizados en 2019 (Artículo #4) se utilizó un impactor PM₁, con el que se recogieron partículas con un diámetro equivalente inferior o igual a 1 µm. En cambio, en los experimentos realizados en 2020 y 2021 (Artículo #5) se utilizó un PM₁₀ con el objetivo de aumentar la cantidad de partículas de aerosol recolectadas y poder detectar una mayor cantidad de toxina que podría encontrarse en partículas aerosolizadas de mayor tamaño. Como se ha comentado anteriormente (sección 2.3.1, Capítulo 2) los análogos de la PLTX pueden encontrarse tanto en la fase disuelta del agua como en el interior de las células, pero también pueden formar parte del mucílago que produce *O. cf. ovata*. Aunque la intensidad del bombeo es suave, y está diseñado para evitar la rotura de los microorganismos, no es descartable que células de *O. cf. ovata*, que tienen un diámetro dorsoventral entre 14–87 µm, pudieran romperse (debido a la continua agitación del agua) produciendo la liberación de los análogos de la PLTX. Éstos pueden ser aerosolizados a partir de su forma disuelta en el agua o a partir de la aerosolización de pequeñas partículas de mucílago que pueden tener adheridas dichas toxinas. De todos modos, se considera que las microalgas excretan de manera natural sustancias que se disuelven en el agua, incluidas las toxinas [322]. Por tanto, *Ostreopsis* podría estar excretando toxinas que se encontrarían disueltas en el agua incubada.

Finalmente, para la realización de los experimentos, el incubador se cierra con una tapa transparente de cristal haciendo posible la visualización de la agitación producida en la microcapa superior del agua que es la que interviene en la formación de los aerosoles (Figura S2-Artículo #4). Además, el dispositivo cuenta con varias ventanas pequeñas (Figura 4.1) a distintos niveles para poder ver el interior del tanque.

4.3.2. Aerosolización de los análogos de la palitoxina en experimentos de incubación

Los experimentos de aerosolización se han llevado a cabo en el laboratorio bajo condiciones controladas. Tal y como se ha descrito en la sección 4.2.1, durante los experimentos de aerosolización, además de la determinación de parámetros claves como la abundancia celular y el nivel de concentración de toxinas, se llevaron también a cabo la determinación de parámetros adicionales, con el objetivo de disponer de más información que nos ayudara a entender los fenómenos que estaban teniendo lugar durante los procesos de aerosolización. Los resultados obtenidos, en las medidas de estos parámetros adicionales, se han comparado con el fin de explorar el vínculo potencial que pueden tener con el contenido de toxinas, tanto en el seston como en el aire. Para ello, con los resultados de todos los experimentos de aerosolización realizados durante las proliferaciones de 2020 y 2021, se han realizado estudios de correlación de Spearman, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito en la sección 3.3.2 (Capítulo 3). En la Figura 4.2 se muestran los valores ρ (correlación de Spearman) calculados entre las diferentes variables estudiadas.

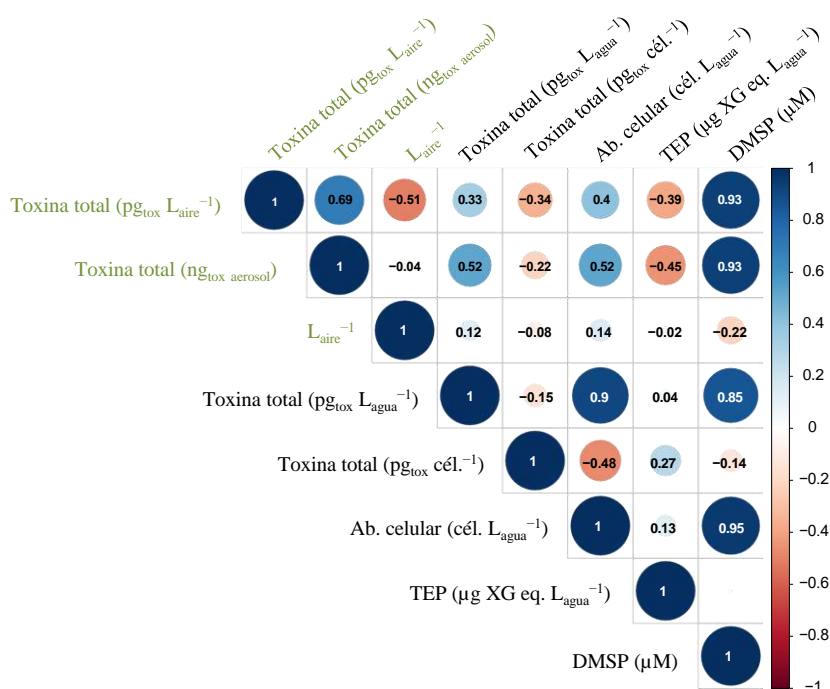


Figura 4.2. Correlación de Spearman entre los diferentes parámetros determinados en el seston (negro) y en el aerosol (verde) durante los experimentos de aerosolización de 2020 y 2021. *Nota: el valor crítico para $n=36$ es de $\alpha=0,279$, para $n=12$ (TEP) es de $\alpha=0,503$ y para $n=10$ (DMS) de $\alpha=0,564$, siendo n el número de muestras totales. Ab. = Abundancia.

En general, se observa una correlación significativamente positiva ($\rho = 0,90$) entre la abundancia celular (cél. L_{agua}^{-1}) y la concentración de toxina en el seston ($\mu\text{g}_{\text{tox}} L_{\text{agua}}^{-1}$), indicando que las células de *Ostreopsis* son las productoras de las toxinas estudiadas. A su vez, ambos parámetros también muestran una buena correlación con la cantidad de toxina total en los aerosoles ($\text{ng}_{\text{tox aerosol}}$) ($\rho = 0,52$). Es decir, cuanto mayor es la concentración de células de *O. cf. ovata* en el seston, mayor parece ser la cantidad de toxina aerosolizada. Estos resultados sugieren que, en momentos de proliferación de este dinoflagelado, los análogos de la PLTX podrían encontrarse en el aerosol a mayores concentraciones a medida que va avanzando la proliferación hasta su punto más álgido.

Sin embargo, en el experimento #10 (año 2021, Figura 3-Artículo #5) se observó que la concentración de toxinas aerosolizadas fue 3,5 veces menor que en el experimento #12, aunque la abundancia celular estimada en el incubador y la concentración de toxinas en el seston fueron mucho mayores en el experimento #10. Este comportamiento podría sugerir que la diferente fisiología de las células (fase de crecimiento) podría tener un papel importante en la aerosolización de las toxinas, ya que el experimento #12, tal y como se comentó en el capítulo anterior (sección 3.3.1), se realizó en un momento en el que las muestras fueron recolectadas durante una proliferación masiva puntual. En ese día, las condiciones atmosféricas ocasionaron el fenómeno de "rissaga" (reducción del nivel del mar) que comportó la retirada del agua de mar hacia mar adentro, durante unos minutos, seguido de un "barrido" de una gran masa de células de *Ostreopsis* adheridas hasta el momento a las macroalgas (descrito al final de la sección 3.3.1, Capítulo 3). Este fenómeno podría haber provocado en el medio natural un mayor estrés de las células en aquel día (#12), lo que consecuentemente habría llevado a una mayor producción de toxinas y, por tanto, a una posible mayor aerosolización de las mismas. El mayor nivel de toxinas en el aire podría, así, relacionarse con los síntomas respiratorios observados en las personas expuestas ese día.

Por otro lado, la presencia de una mayor cantidad de células y una matriz mucilaginoso más abundante en el experimento #10 podría resultar en una menor aerosolización de toxinas debido a la mayor presencia de partículas de exopolímeros transparentes (TEP), que potencialmente hubieran impedido la liberación al aire; este hecho fue documentado en los experimentos realizados en el 2019 con una concentración del orden de 10^6 células L^{-1} . En los experimentos de 2021 se observó una relación ligeramente negativa ($\rho = -0,39$) entre la concentración estimada de TEP en el seston y la concentración de toxinas aerosolizadas (Figura 4.2). Así, al aumentar la concentración de exopolímero en el agua, parece que disminuye la cantidad de toxinas que se liberan al aire, esto estaría indicando que una acumulación de

partículas de exopolímeros en la superficie del agua podría estar actuando como barrera y dificultar/impedir la aerosolización de los análogos de la PLTX.

Los hallazgos de esta Tesis en el estudio de aerosoles pueden ser una aportación importante para ayudar a la comprensión de los mecanismos de aerosolización y distribución de las toxinas en el aire. Además, estos estudios de aerosolización también han mostrado que la mayor parte de la aerosolización de las toxinas se estaría produciendo durante las primeras horas de incubación. Por ello, se recomienda realizar experimentos cortos (1 a 3 horas) de recolección de muestras de toxinas en aerosoles, al menos si se utiliza un diseño de incubación similar al empleado en esta Tesis con el objetivo de observar la evolución de la aerosolización de toxinas. El hecho que podría explicar este comportamiento puede estar asociado a un posible estrés de las células durante el primer período de la incubación, por un lado, que comportaría una mayor síntesis y excreción de toxinas. Durante la inoculación del agua de mar contenida en el incubador, las células pasan de encontrarse en su medio natural (agua de mar), a estar en el interior de un incubador (55–60L) con el agua en circulación. Durante el período de acondicionamiento de las células a un nuevo medio “extraño” se podría producir el estrés de las mismas que las llevaría a producir y excretar una mayor cantidad de toxinas, potencialmente aerosolizables durante las primeras horas de incubación. Así, a partir de la tercera o cuarta hora de incubación se observa que la concentración de toxina en el aerosol va disminuyendo, permanece constante o varía en el tiempo, pero siempre presenta una menor concentración aerosolizada que al inicio de la incubación. Además, se ha observado que a lo largo de la incubación las células se adherían a las paredes, incluso al fondo del incubador (sedimentando), haciendo que cada vez hubiese menos células en el flujo de recirculación del agua que se rocía/impacta sobre la superficie del incubador. Este hecho también podría contribuir a que la aerosolización de toxinas fuese mayor al inicio de la incubación y que, posteriormente, fuese disminuyendo. Además, este hallazgo está de acuerdo con la correlación significativamente negativa ($\rho = -0,51$) que se ha observado entre la cantidad de aire muestreado (L_{aire}) y la concentración de toxinas aerosolizadas.

Por otro lado, se observa una correlación significativamente positiva entre la concentración de DMSP (precursor del DMS) y la abundancia celular en el seston ($\rho = 0,95$), y también entre la concentración del DMSP y la concentración de toxinas en el seston ($\rho = 0,85$). Ello reforzaría la idea de que son las células de *Ostreopsis* cf. *ovata* las que sintetizan tanto el DMSP como las toxinas. Por otro lado, el DMSP en el seston también se correlacionó positivamente con la concentración de toxinas en el aerosol ($\rho = 0,93$). Estos resultados sugieren que, tal vez, los mecanismos implicados en la aerosolización del DMS (generado a partir de la descomposición del DMSP) podrían presentar algunas analogías con los de la aerosolización de esta

familia de toxinas. Sin embargo, la naturaleza química del DMS (una molécula pequeña que contiene azufre) y las ovatoxinas (cadena de carbonada de alto peso molecular) es muy diferente. De todos modos, se puede deducir que el sistema experimental (incubador generador de aerosoles por *bubble-bursting* - estallido de burbujas-) puede ser utilizado para estudiar la aerosolización del DMS producido por *Ostreopsis* u otras microalgas, teniendo en consideración, por ejemplo, los resultados de los experimentos relativos al tiempo de incubación.

También, se valoró el papel de las células planctónicas y bentónicas en la aerosolización. En estos estudios se realizaron los experimentos utilizando muestras de agua de mar recolectadas en la zona de estudio que ya contenían células planctónicas (seston). Para aumentar la concentración celular durante la incubación, se añadieron células bentónicas a estas muestras (seston enriquecido). Aunque se observó un potencial diferente de aerosolización (Figura 4-Artículo #5), no ha sido posible encontrar una explicación concreta, ni una posible correlación con algún parámetro que permita explicar esta observación. Por ello, para el estudio del potencial de las células planctónicas o bentónicas en la aerosolización, se recomienda la incubación de ambos tipos celulares por separado. Para ello es necesario filtrar el agua de mar por un filtro de 0,1 μm de tamaño de poro con el objetivo de poder separar las células planctónicas y otros microorganismos, y proceder posteriormente al enriquecimiento de este agua filtrada únicamente con células bentónicas.

Por otro lado, se estudió el papel de las toxinas disueltas en el proceso de aerosolización. Para ello se utilizó en los experimento de aerosolización solo agua de mar filtrada (filtro de 0,1 μm) que contenían las toxinas, y en los aerosoles se llegó a detectar una concentración de 16,6 $\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1}$. No obstante, dado que sólo se dispone de un único resultado positivo, no es posible establecer una conclusión definitiva. Sin embargo, este resultado parece indicar el potencial de aerosolización de la fracción de toxinas disueltas en el agua. Por lo tanto, se recomienda enfocar investigaciones futuras hacia el análisis de los análogos de la PLTX en la fase disuelta del agua de mar. Estos estudios adicionales nos podrían permitir obtener una comprensión más profunda de la presencia y comportamiento de las toxinas en esta fase y su posible contribución a la aerosolización.

En los Artículos #4 y #5 se han detectado y cuantificado, por primera vez, todos los análogos de la PLTX en el aerosol, excepto la OVTX-f y la iso-PLTX, que no se detectaron por estar presentes a concentraciones inferiores al límite de detection de la técnica. Además, se observó que a medida que aumentaba la concentración total de toxinas en el aerosol, se detectaban un mayor número de tipos diferentes de ovatoxinas. Es importante tener en cuenta que este estudio es solo una aproximación inicial para comprender mejor el comportamiento de este dinoflagelado y la aerosolización de las toxinas que produce.

4.3.3. Relación de los niveles de toxina en el aerosol con la sintomatología

Aunque los mecanismos involucrados en la aerosolización aún se desconocen, los hallazgos de esta Tesis proporcionan una sólida evidencia de la presencia de los análogos de la PLTX en el aerosol. Además, estos análogos de la PLTX se han detectado en partículas de aerosoles con un tamaño inferior a $1 \mu\text{m}$ (Artículo #4), las cuales podrían llegar más fácilmente a los pulmones por inhalación y causar un mayor daño. Por ello, es necesario investigar las concentraciones a las que se encuentran estas toxinas y determinar si representan un riesgo para la salud humana. A continuación, se discuten las concentraciones de toxinas determinadas en el aerosol (sección *Experimental y resultados* del presente capítulo) y su posible relación con los efectos que puedan tener en la salud humana.

Para evaluar la exposición por inhalación en personas hay que estimar el tiempo necesario para alcanzar los niveles LD_{50} de toxicidad por inhalación a las concentraciones de toxinas encontradas en los aerosoles ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1}$). Para ello se ha considerado un LD_{50} de $0,031 \mu\text{g kg}^{-1}$ [155], que es el dato experimental de que se dispone para la OVTX-a (mezcla con OVTX-d/e, minoritarias) en ratas (inhalación), y se ha calculado la exposición para una persona de 60 kg peso que respira una media de 7 m^3 de aire al día.

La Tabla 4.2 muestra las estimaciones de los días necesarios de exposición para alcanzar el LD_{50} considerando algunas las concentraciones de toxinas aerosolizadas ($\text{pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1}$) durante los experimentos de aerosolización de 2019–2021, así como la concentración de toxina aerosolizada durante el experimento en el que se incubó solo agua de mar filtrada (filtro #11B) (FSW).

En el experimento realizado solo con agua de mar filtrada (FSW), la concentración de toxina aerosolizada fue de tan solo $16,61 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1}$, siendo necesario un total de 16 días de exposición continuada para superar el LD_{50} en las condiciones consideradas. En cambio, la incubación directa del seston (S) recolectado en la zona de estudio (filtros 2020–#3A y 2021–#11A), lleva a una concentración de toxinas mayor en los aerosoles y por lo tanto una persona alcanzaría el nivel tóxico al inhalar dichos aerosoles durante unos 5 días. Por otro lado, el enriqueciendo del agua de mar con células bentónicas (EaS, EbS) produce las máximas concentraciones en aerosoles ($69,01 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1} - 234,2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{L}_{\text{aire}}^{-1}$) reduciendo el tiempo de exposición necesario para alcanzar los niveles tóxicos a tan sólo 1,1–3,3 días de inhalación del aerosol. Hay que indicar que en los experimentos de aerosolización #10A y #12A (2021) se enriqueció el seston con células bentónicas a una elevada concentración (EbS, Artículo #5) para simular un evento de máxima proliferación (2021–#12; $5,6 \times 10^5 \text{ cél. L}^{-1}$) como el sucedido en el Golfo de Trieste ($6,7 \times 10^6 \text{ cél. L}^{-1}$) [93]. En el experimento #12A, se observó un

nivel de concentración de toxina en el aerosol mucho mayor ($234,2 \text{ pg}_{\text{tox}} \text{ L}_{\text{aire}}^{-1}$), que también podría estar favorecido por el episodio de estrés ya comentado anteriormente (rissaga). En estas condiciones los niveles de toxicidad era posible alcanzarlos en tan solo 1 día.

Tabla 4.2. Resumen de las concentraciones más importantes encontradas en el aerosol, con la respectiva abundancia celular en el interior del incubador y la concentración de toxina en el agua incubada. En la primera columna se indica el año, código de filtro recolectado (en base a los Artículos #4 y #5) y el tipo de incubación. En la última columna a la derecha, se indican los días que debería pasar una persona respirando para que la concentración de toxina encontrada en el aerosol llegase a niveles tóxicos.

Año-#Filtro (*Tipo de incubación)	Ab. celular cél. $\text{L}_{\text{agua}}^{-1}$	Concent. de toxina, seston $\text{pg}_{\text{tox}} \text{ L}_{\text{agua}}^{-1}$	Concent. de toxina, aerosol $\text{pg}_{\text{tox}} \text{ L}_{\text{aire}}^{-1}$ ($\text{ng}_{\text{tox}} \text{ aerosol}$)	Días
2021 – #11B (FSW)	-	-	16,6 (38,2 ng_{tox})	16
2020 – #3A (S)	$0,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6 \pm 9,6 \times 10^2$	53,4 (125,5 ng_{tox})	5,0
2021 – #11A (S)	$1,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^5$	53,1 (122,7 ng_{tox})	5,0
2019 – #1 (EaS)	$0,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^3$	69,0 (119,0 ng_{tox})	3,9
2021 – #10A (EbS)	$1,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7 \pm 4,9 \times 10^6$	79,5 (182,8 ng_{tox})	3,3
2021 – #12A (EbS)	$5,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$	234,2 (531,7 ng_{tox})	1,1

*FSW: Agua de mar filtrada; S: seston; EaS: Seston enriquecido con células bentónicas ($\sim 10^5 \text{ cél. L}_{\text{agua}}^{-1}$); EbS: Seston enriquecido con células bentónicas ($\sim 10^6 \text{ cél. L}_{\text{agua}}^{-1}$).

La relación entre la sintomatología y la aerosolización de los análogos de la PLTX es un tema complejo y aún no se ha establecido una relación directa clara. Si bien se ha demostrado que la exposición a los análogos de la PLTX puede desencadenar síntomas respiratorios y cutáneos en ciertos casos, existen muchos factores que pueden influir en la manifestación de estos síntomas. Las condiciones ambientales y geográficas pueden afectar a la aerosolización, y el nivel de exposición de cada individuo vendrá condicionado por la duración de la exposición, la frecuencia de inhalación, así como la concentración de toxinas en el aerosol durante la exposición. Además, hay que tener en cuenta la sensibilidad y la respuesta

inmunológica de cada individuo también pueden desempeñar un papel importante en la manifestación de los síntomas.

En los estudios de aerosolización realizados en esta Tesis, es importante tener en cuenta que las concentraciones alcanzadas en el aerosol no son directamente comparables a las que se encuentran en la costa, ya que el diseño experimental es cerrado y se utiliza un volumen de agua de mar limitado. Si en la zona de la proliferación las concentraciones aerosolizadas fuesen menores, los niveles tóxicos tardarían más en alcanzarse, alargándose los períodos estimados en la Tabla 4.2. También hay que tener en cuenta que en el ambiente marino las condiciones de aerosolización pueden ser mucho más complejas y variables, ya que factores como la agitación del agua, las corrientes, el viento y la presencia de otros organismos marinos pueden influir en la liberación de toxinas al aire. Los resultados obtenidos en estos estudios experimentales de laboratorio son sólo una primera aproximación para ayudar a entender lo que podría estar pasando en condiciones reales en la costa.

Es importante indicar que el estudio sobre la relación entre la aerosolización de los análogos de la PLTX y la sintomatología está aún en proceso, y existen pocos estudios en los que se hayan determinado esta familia de toxinas en el aerosol. Por ello, se requiere más investigación para entender mejor esta compleja relación. En este contexto, se debe seguir estudiando los mecanismos subyacentes, los factores desencadenantes y las vías de exposición para obtener una imagen más clara de cómo los análogos de la PLTX pueden afectar a la salud humana.

Sin embargo, los estudios realizados en esta Tesis nos permiten comprender mejor los procesos de aerosolización y nos brindan información sobre las posibles concentraciones de toxinas que podríamos encontrar en el aire en la zona de estudio de Sant Andreu de Llavaneres. Además, aunque se haya demostrado la aerosolización de la mayoría de los análogos de la PLTX, aún queda mucho por entender.



CONCLUSIONES

An underwater photograph showing a rocky seabed in the foreground and a colorful coral reef in the background. The water is clear and blue, with sunlight filtering through from above.

CONCLUSIONES

Las proliferaciones de algas nocivas (HABs) son fenómenos naturales que conllevan altas concentraciones de algas representando riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Esta Tesis se ha centrado en el estudio del dinoflagelado *Ostreopsis* cf. *ovata*, y en las toxinas que produce (análogos a la PLTX). Se ha desarrollado una metodología analítica robusta para la cuantificación/identificación de esta familia de toxinas y con el fin de explorar su presencia en muestras medioambientales. Además, se ha estudiado la aplicabilidad de la movilidad iónica como técnica innovadora en la caracterización y análisis de las toxinas producidas por *Ostreopsis* cf. *ovata*. El seguimiento de las proliferaciones de *O. cf. ovata* a lo largo de los años de estudio (2018–2021), así como la producción de toxinas, podría ayudar a las autoridades a emitir avisos o advertencias que permitan evitar la posible exposición de los bañistas y otros usuarios de las aguas costeras a las toxinas que se producen. También se ha explorado el efecto de los nutrientes en las HABs producidas por *O. cf. ovata* estudiando su influencia en su crecimiento y producción de toxinas. La Tesis finaliza con el estudio de la aerosolización de las toxinas utilizando una cámara de incubación.

A continuación, se resumen las conclusiones más relevantes extraídas de los resultados obtenidos en esta Tesis.

En relación a las metodologías analíticas y parámetros de identificación,

En esta Tesis se han evaluado diferentes metodologías analíticas para el análisis de esta familia de toxinas en muestras medioambientales, concluyéndose:

- Para una cuantificación robusta y selectiva de las toxinas producidas por *O. cf. ovata* se recomienda el uso del ESI con asistencia neumática y térmica, ya que hace posible conseguir la máxima eficacia en la etapa de ionización. Además, se propone la selección/seguimiento de múltiples iones correspondientes a todas las especies iónicas que generan estos compuestos. Este método permite garantizar el análisis cuantitativo de las toxinas independientemente del instrumento y/o condiciones del sistema utilizado. El método propuesto se ha utilizado para el análisis de las toxinas producidas durante las proliferaciones de *O. cf. ovata* y en muestras de cultivo y de aerosoles.
- Además, para una extracción eficaz de los análogos de la PLTX a partir de los extractos celulares se propone una única extracción con metanol:agua (80:20, v/v).
- También, se ha evaluado por primera vez el uso de la movilidad iónica para el estudio de los análogos de la PLTX, lo que ha permitido proponer valores de $^{DT}CCS_{He}$, $^{DT}CCS_{N_2}$ y $^{TW}CCS_{N_2}$ para los diferentes iones observados en ESI para la

PLTX_{std}, OVTX-a y OVTX-b. Asimismo, se propone utilizar la PLTX_{std} como calibrante de la celda de movilidad iónica para el análisis de esta familia de compuestos en el sistema TWIMS. El CCS, junto con el tiempo de retención, el perfil de iones obtenidos y la masa exacta, podría ayudar en la identificación de nuevos compuestos relacionados con este grupo de toxinas. Además, los valores de ^{DT}CCS_{N2} propuestos se pueden utilizar en un futuro para determinar valores de CCS de otros compuestos en distintos instrumentos de IMS.

- Por otro lado, los estudios computacionales de simulación de dinámicas moleculares han ayudado a confirmar algunos de los resultados obtenidos con la movilidad iónica. La conformación plegada de estos compuestos, debido a su estabilización por puentes de hidrógenos, propuesta en estos estudios computacionales ha permitido justificar el hecho de que los aductos [M+H+2Na]³⁺ y [M+H+Ca]³⁺ presenten la misma movilidad (volumen y CCS similares). El sodio y el calcio podrían estar coordinados en los sitios vacantes dentro de la estructura plegada de los análogos de la PLTX no afectando al volumen total de la molécula.

- Los estudios de defecto de masa de Kendrick a través de los gráficos de KMD-O han demostrado ser útiles para visualizar más fácilmente la presencia de un gran número de toxinas e identificar patrones o tendencias en los datos. Los gráficos KMD-O proporcionan criterios de identificación adicionales a la información obtenida como los tiempos de retención, masas exactas o valores de CCSs, para lograr la correcta identificación o detección de nuevas familias análogas a la PLTX.

En relación con el crecimiento de *Ostreopsis cf. ovata* y su producción de toxinas a lo largo de las proliferaciones anuales y en función de la disponibilidad de nutrientes,

Se ha evaluado el crecimiento de una cepa de *O. cf. ovata* aislada en el noroeste del Mar Mediterráneo durante la proliferación de 2018 y se han estudiado las proliferaciones naturales durante cuatro años (2018–2021) con especial énfasis en la concentración de toxinas. Además, se ha explorado, en estudios de campo y de cultivos en el laboratorio, la relación del crecimiento y de la producción de toxinas con la disponibilidad de nutrientes.

- En los estudios de campo se confirma que la temperatura es un factor importante en las proliferaciones de *O. cf. ovata*. Concretamente, la proliferación se inicia cuando las temperaturas empiezan a superar los 20°C.

- En los estudios de cultivos en el laboratorio, se ha observado que la cepa estudiada de *O. cf. ovata* del noroeste del Mar Mediterráneo puede utilizar diferentes tipos de fuentes de nitrógeno (orgánicas e inorgánicas). Además, la cantidad absoluta de nutrientes determinaron los niveles de biomasa producida.

- Sin embargo, no se ha observado una correlación entre la disponibilidad de nitrógeno (orgánico e inorgánico) y fósforo (inorgánico), con la cantidad y el tipo (perfil) de toxinas celulares. Estos hallazgos sugieren que estos nutrientes (tanto en valor absoluto como estequiométricamente) no estarían desempeñando un papel importante en la producción de toxinas por parte de *O. cf. ovata* en el área de la proliferación, aunque, en los estudios de campo sí que se observó una relación positiva entre el fósforo orgánico y la concentración de toxina en el agua. Futuros estudios deberán explorar la posible implicación de las formas orgánicas de fósforo (no investigadas en los estudios con cultivos) en la síntesis de toxinas.

- En los diversos experimentos, se ha observado un perfil de toxinas similar en los distintos tratamientos y fases de los cultivos (de exponencial a estacionaria). La OVTX-a suele ser la más abundante, seguida de las OVTX-b/d/e/c, mientras que las OVTX-f/g y la iso-PLTX suelen encontrarse en menor concentración. Este mismo patrón se observó a lo largo de la proliferación natural, donde los análogos en menor proporción solo se detectaron cuando la cantidad de biomasa fue suficientemente elevada.

- La iso-PLTX, sólo se ha detectado a muy bajas concentraciones durante las proliferaciones de *Ostreopsis cf. ovata*. Si bien existen estudios sobre los efectos toxicológicos por distintas vías de exposición para la PLTX_{std}, los futuros estudios deben centrarse en entender la toxicidad de los diferentes análogos de la PLTX. Para ello, es esencial disponer de patrones sintéticos o purificados a partir de extractos de cada uno de los propios compuestos.

En relación con la aerosolización de los análogos de la PLTX,

En los estudios de aerosolización se ha determinado la concentración de toxinas en aerosoles generados experimentalmente a partir de muestras de agua de mar que contenían diferentes concentraciones de células de *O. cf. ovata* obtenidas en días específicos durante la proliferación de esta especie en Sant Andreu de Llavaneres. Se midieron simultáneamente las concentraciones de toxinas en suspensión en el agua y en el aire utilizando un incubador experimental de generación de aerosoles. En estos estudios se obtuvieron algunas pistas sobre los mecanismos involucrados en la transferencia de toxinas del agua a la atmósfera.

- La utilización del incubador generador de aerosoles ha permitido detectar/cuantificar la presencia de todos los análogos de la PLTX en el aerosol, excepto la OVTX-f y la iso-PLTX. Este hallazgo representa un gran avance, ya que en estudios anteriores solo fue posible cuantificar la OVTX-a, mientras que los análogos -b, -d y -e debían encontrarse por debajo de los límites de detección [24].

Este nuevo avance amplía la comprensión de la presencia y distribución de estas toxinas en el aerosol.

Sin embargo, las concentraciones de toxinas detectadas en el aerosol en esta Tesis no parecen apuntar a que exista una relación directa con la sintomatología observada en personas expuestas a estos aerosoles. De todas formas, se ve la necesidad de ampliar estos estudios en el futuro.

- Se ha observado una variabilidad en la producción de toxinas aerosolizadas debido a diversos factores, como la concentración de células en el incubador, la fisiología de las células durante la proliferación y el tiempo de incubación. Por ejemplo, la alta abundancia celular y de mucílago en la espuma flotante podría limitar las emisiones de toxinas.

- Por otro lado, en esta Tesis se señalan ciertos aspectos que se tienen que tener en cuenta, como por ejemplo, el hecho de que al introducir las células en un entorno diferente a su medio natural es posible que éstas experimenten estrés, lo que podría resultar en una mayor producción de toxinas aerosolizadas durante las primeras horas de incubación mientras se adaptan al nuevo medio.

En resumen, el trabajo presentado en esta Tesis representa un avance en el estudio de las biotoxinas marinas, ya que determina simultáneamente la cantidad de análogos de la PLTX producidos por *O. cf. ovata* en suspensión en el agua (seston) y en el aerosol. Sin embargo, se requiere ampliar estos estudios en el futuro para comprender mejor los mecanismos de aerosolización de las toxinas. En global, se enfatiza la necesidad de enfoques interdisciplinarios, entre la química, la biología, la ecología y la medicina para mejorar la comprensión de estas complejas interacciones.



REFERENCIAS



REFERENCIAS

- [1] GEOHAB, Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan, SCOR and IOC, Baltimore and Paris, **2001**.
- [2] K.J. Flynn, A. Mitra, P.M. Glibert, Mixotrophy in Harmful Algal Blooms By Whom, on Whom, When, Why, and What Next, in: P.M. Glibert, E. Berdalet, M.A. Burford, G.C. Pitcher, M. Zhou (Eds.), *Glob. Ecol. Oceanogr. Harmful Algal Bloom.*, Springer, **2018**: pp. 113–132. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70069-4_16.
- [3] R.S. Shahmohamadloo, S.P. Bhavsar, X. Ortiz Almirall, S.A.C. Marklevitz, S.M. Rudman, P.K. Sibley, Cyanotoxins accumulate in Lake St. Clair fish yet their fillets are safe to eat, *Sci. Total Environ.* 874 (**2023**) 162381. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162381>.
- [4] Q. Catherine, W. Susanna, E.S. Isidora, H. Mark, V. Aurélie, H. Jean-François, A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management, *Water Res.* 47 (**2013**) 5464–5479. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.042>.
- [5] Y.-S. Cheng, Y. Zhou, C.M. Irvin, B. Kirkpatrick, L.C. Backer, Characterization of aerosols containing microcystin, *Mar. Drugs.* 5 (**2007**) 136–150. <https://doi.org/10.3390/md20070010>.
- [6] H. Aboualaalaa, M.L.B. El kbiach, B. Rijal Leblad, F. Hervé, A. Hormat-Allah, L. Baudy, I. Ennaskhi, I. Hammi, M. Ibghi, H. Elmortaji, E. Abadie, J.L. Rolland, Z. Amzil, M. Laabir, Development of harmful algal blooms species responsible for lipophilic and amnesic shellfish poisoning intoxications in southwestern Mediterranean coastal waters, *Toxicon.* 219 (**2022**) 106916. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.09.002>.
- [7] M. Ibghi, M.L. El kbiach, B. Rijal Leblad, H. Aboualaalaa, F. Hervé, M. Sibat, A. Chair, E. Masseret, N. Maamour, M. Daoudi, Z. Amzil, M. Laabir, Occurrence of three dominant epibenthic dinoflagellates (*Ostreopsis* spp., *Coolia monotis* and *Prorocentrum lima*) in relation to biotic substrates and environmental factors in a highly dynamic ecosystem, the Strait of Gibraltar (Southwe, *Environ. Monit. Assess.* 194 (**2022**) 810. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10426-9>.
- [8] L.E. Fleming, B. Kirkpatrick, L.C. Backer, J.A. Bean, A. Wanner, A. Reich, J. Zaias, Y.S. Cheng, R. Pierce, J. Naar, W.M. Abraham, D.G. Baden, Aerosolized Red-Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma, *Chest.* 131 (**2007**) 187–194. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1830.Aerosolized>.
- [9] R.M. Kudela, K. Hayashi, C.G. Caceres, Is San Francisco Bay resistant to Pseudo-nitzschia and domoic acid?, *Harmful Algae.* 92 (**2020**) 101617. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.05.010>.

- [10] C. Marampouti, A.G.J. Buma, M.K. de Boer, Mediterranean alien harmful algal blooms: origins and impacts, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28 (2020) 3837–3851. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10383-1>.
- [11] Y. Fukuyo, I. Imai, M. Kodama, Red tides and other harmful algal blooms in Japan, in: F.J.R. Taylor, V.L. Trainer (Eds.), Harmful Algal Bloom. PICES Reg. North Pacific, PICES Sci. Rep. No. 23, Institute of Ocean Sciences, Sidney, Canada, 2002: pp. 7–20.
- [12] R. Margalef, Red tides and ciguatera as successful ways in the evolution and survival of an admirable old phylum, in: B. Reguera, J.M. Blanco, M.L. Fernández (Eds.), Proc. VIII Int. Conf. Harmful Algae, Vigo, Spain, 25-29 June 1997, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1998.
- [13] R. Margalef, Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment, *Oceanol. Acta.* 1 (1978) 493–509. <https://doi.org/10.1007/BF00202661>.
- [14] M. Vila, J. Camp, E. Garcés, M. Masó, M. Delgado, High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean, *J. Plankton Res.* 23 (2001) 497–514. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.5.497>.
- [15] L. Airoidi, F. Bulleri, Anthropogenic disturbance can determine the magnitude of opportunistic species responses on marine urban infrastructures, *PLoS One.* 6 (2011) e22985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022985>.
- [16] J.E. Adolf, D. Krupatkina, T. Bachvaroff, A.R. Place, Karlotoxin mediates grazing by *Oxyrrhis marina* on strains of *Karlodinium veneficum*, *Harmful Algae.* 6 (2007) 400–412. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.12.003>.
- [17] C. Guisande, M. Frangópulos, I. Maneiro, A.R. Vergara, I. Riveiro, Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225 (2002) 169–176. <https://doi.org/10.3354/meps225169>.
- [18] C.D. Senft-Batoh, H.G. Dam, S.E. Shumway, G.H. Wikfors, C.D. Schlichting, Influence of predator–prey evolutionary history, chemical alarm-cues, and feeding selection on induction of toxin production in a marine dinoflagellate, *Limnol. Oceanogr.* 60 (2015) 318–328. <https://doi.org/10.1111/lno.10027>.
- [19] J.T. Turner, P.A. Tester, Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs, *Limnol. Oceanogr.* 42 (1997) 1203–1214. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1203.
- [20] H. Hégaret, K.B. Brokordt, C.F. Gaymer, K.B. Lohrmann, C. García, D. Varela, Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on

- histopathological and escape responses of the Northern scallop *Argopecten purpuratus*, *Harmful Algae*. 18 (2012) 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.006>.
- [21] G. Álvarez, P.A. Díaz, M. Godoy, M. Araya, I. Ganuza, R. Pino, F. Álvarez, J. Rengel, C. Hernández, E. Uribe, J. Blanco, Paralytic shellfish toxins in surf clams *Mesodesma donacium* during a large bloom of *Alexandrium catenella* dinoflagellates associated to an intense shellfish mass mortality, *Toxins (Basel)*. 11 (2019) 188. <https://doi.org/10.3390/toxins11040188>.
- [22] W.W. Carmichael, The Cyanotoxins, *Adv. Bot. Res.* 27 (1997) 211–256. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60282-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60282-7).
- [23] L.E. Fleming, L.C. Backer, D.G. Baden, Overview of aerosolized Florida red tide toxins: Exposures and effects, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 618–620. <https://doi.org/10.1289/ehp.7501>.
- [24] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, G. Benedettini, M. Onorari, F. Serena, C. Battocchi, S. Casabianca, A. Penna, First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 3532–3540. <https://doi.org/10.1021/es405617d>.
- [25] E. Berdalet, L.E. Fleming, R. Gowen, K. Davidson, P. Hess, L.C. Backer, S.K. Moore, P. Hoagland, H. Enevoldsen, Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st century, *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*. 96 (2016) 61–91. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001733>.
- [26] G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, C. Belin, M.Y.D. Bottein, E. Bresnan, M. Chinain, H. Enevoldsen, M. Iwataki, B. Karlson, C.H. McKenzie, I. Sunesen, G.C. Pitcher, P. Provoost, A. Richardson, L. Schweibold, P.A. Tester, V.L. Trainer, A.T. Yñiguez, A. Zingone, Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts, *Commun. Earth Environ.* 2 (2021) 117. <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00178-8>.
- [27] P.A. Tester, R.W. Litaker, E. Berdalet, Climate change and harmful benthic microalgae, *Harmful Algae*. 91 (2020) 101655. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101655>.
- [28] A. Zingone, L. Escalera, K. Aligizaki, M. Fernández-Tejedor, A. Ismael, M. Montresor, P. Mozetič, S. Taş, C. Totti, Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report, *Harmful Algae*. 102 (2021) 101843. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101843>.
- [29] K. Aligizaki, G. Nikolaidis, Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera

- dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea, *J. Biol. Res.* 9 (2008) 75–82.
- [30] W.C. Holland, R.W. Litaker, C.R. Tomas, S.R. Kibler, A.R. Place, E.D. Davenport, P.A. Tester, Differences in the toxicity of six *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species measured using an in vitro human erythrocyte lysis assay, *Toxicon.* 65 (2013) 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.016>.
- [31] K. Aligizaki, M. Iliadou, I. Kappas, M. Arsenakis, Is the eastern Mediterranean a “*Gambierdiscus* biodiversity hotspot”? New data from Greece and Cyprus, in: Abstr. B. 18th Int. Conf. Harmful Algae, IFREMER, Nantes, 2018: p. 493.
- [32] M. Chinain, C.M.I. Gatti, H.T. Darius, J.P. Quod, P.A. Tester, Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends, *Harmful Algae.* 102 (2021) 101873. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101873>.
- [33] M.L. Parsons, K. Aligizaki, M.Y.D. Bottein, S. Fraga, S.L. Morton, A. Penna, L. Rhodes, *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology, *Harmful Algae.* 14 (2012) 107–129. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.017>.
- [34] P.A. Tester, R.W. Litaker, E. Soler-Onís, J. Fernández-Zabala, E. Berdalet, Using artificial substrates to quantify *Gambierdiscus* and other toxic benthic dinoflagellates for monitoring purposes, *Harmful Algae.* 120 (2022) 102351. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102351>.
- [35] L. Roselli, C. Caroppo, S. Bevilacqua, P.C. Ciciriello, N. Ungaro, M.R. Vadrucci, Harmful algae and pressure-impact relationship: Noxious blooms and toxic microalgae occurrence from coastal waters of the Apulia region (Adriatic and Ionian Seas, Mediterranean), *Mar. Environ. Res.* 183 (2023) 105791. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105791>.
- [36] L. Mangialajo, N. Ganzin, S. Accoroni, V. Asnaghi, A. Blanfuné, M. Cabrini, R. Cattaneo-Vietti, F. Chavanon, M. Chiantore, S. Cohu, E. Costa, D. Fornasaro, H. Grossel, F. Marco-Miralles, M. Masó, A. Reñé, A.M. Rossi, M.M. Sala, T. Thibaut, C. Totti, M. Vila, R. Lemée, Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts, *Toxicon.* 57 (2011) 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.019>.
- [37] S. Accoroni, C. Totti, The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: A review, *Adv. Oceanogr. Limnol.* 7 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.4081/aiol.2016.5591>.
- [38] L. Açaf, R. Lemée, M. Abboud-Abi Saab, Monitoring of benthic harmful algal blooms of *Ostreopsis* sp. in Naqoura South of Lebanon (Eastern Mediterranean), *Rapid Commun. Int. Mer Médit.* 41 (2016) 288.

- [39] L. Açaf, M. Abboud-Abi Saab, M. Khoury-Hanna, R. Lemée, Bloom dynamics of the newly described toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis fattorussoi* along the Lebanese coast (Eastern Mediterranean), *Reg. Stud. Mar. Sci.* 38 (2020) 101338. <https://doi.org/10.1016/j.risma.2020.101338>.
- [40] R. Munday, Palytoxin toxicology: Animal studies, *Toxicon.* 57 (2011) 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.003>.
- [41] C.E.J.A. Tibiriçá, I.P. Leite, T.V.V. Batista, L.F. Fernandes, N. Chomérat, F. Hervé, P. Hess, L.L. Mafra, *Ostreopsis* cf. *ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin Profile and Contamination of Mussels and Marine Plastic Litter, *Toxins (Basel)*. 11 (2019) 446. <https://doi.org/10.3390/toxins11080446>.
- [42] M. Pelin, S. Sosa, V. Brovedani, L. Fusco, M. Poli, A. Tubaro, A novel sensitive cell-based immunoenzymatic assay for palytoxin quantitation in mussels, *Toxins (Basel)*. 10 (2018) 329. <https://doi.org/10.3390/toxins10080329>.
- [43] M. Vila, M. Masó, N. Sampedro, H. Illoul, L. Arin, E. Garcés, M.G. Giacobbe, J. Álvarez, J. Camp, The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties?, in: Proc. 12th Int. Conf. Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, International Society for the Study of Harmful Algae, 2008: pp. 334–336.
- [44] H. Illoul, F.R. Hernández, M. Vila, N. Adjias, A.A. Younes, M. Bournissa, A. Koroghli, N. Marouf, S. Rabia, F.L.K. Ameer, The genus *Ostreopsis* along the algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode, *Cryptogam. Algol.* 33 (2012) 209–216. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.209>.
- [45] P. Durando, F. Ansaldi, P. Oreste, P. Moscatelli, L. Marensi, C. Grillo, R. Gasparini, G. Icardi, *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-06, in north-west Italy, *Euro Surveill.* 12 (2007). <https://doi.org/10.2807/esw.12.23.03212-en>.
- [46] M. Gallitelli, N. Ungaro, L.M. Addante, V. Procacci, N.G. Silver, C. Sabbà, Respiratory Illness as a Reaction to Tropical Algal Blooms Occurring in a Temperate Climate, *JAMA.* 294 (2005) 44. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.1977>.
- [47] L. Tichadou, M. Glaizal, A. Armengaud, H. Grossel, R. Lemée, R. Kantin, J.L. Lasalle, G. Drouet, L. Rambaud, P. Malfait, L. De Haro, Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009, *Clin. Toxicol.* 48 (2010) 839–844.

- <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.513687>.
- [48] M. Pfannkuchen, J. Godrijan, D. Marić Pfannkuchen, L. Iveša, P. Kružić, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, M. Godrijan, Toxin-producing *Ostreopsis* cf. *ovata* are likely to bloom undetected along Coastal Areas, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 5574–5582. <https://doi.org/10.1021/es300189h>.
- [49] M. Vila, R. Abós-Herràndiz, J. Isern-Fontanet, J. Àlvarez, E. Berdalet, Establishing the link between *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms and human health impacts using ecology and epidemiology, *Sci. Mar.* 80 S1 (2016) 107–115. <https://doi.org/10.3989/scimar.04395.08A>.
- [50] E. Berdalet, A.S. Pavaux, R. Abós-Herràndiz, M. Travers, G. Appéré, M. Vila, J. Thomas, L. de Haro, M. Estrada, N.I. Medina-Pérez, L. Viure, B. Karlson, R. Lemée, Environmental, human health and socioeconomic impacts of *Ostreopsis* spp. Blooms in the NW Mediterranean, *Harmful Algae.* 119 (2022) 102320. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102320>.
- [51] A.S. Pavaux, E. Berdalet, R. Lemée, Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions, *Front. Mar. Sci.* 7 (2020) 498. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00498>.
- [52] M.P. Gémin, D. Réveillon, F. Hervé, A.S. Pavaux, M. Tharaud, V. Séchet, S. Bertrand, R. Lemée, Z. Amzil, Toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea, *Harmful Algae.* 92 (2020) 101727. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>.
- [53] M. de Virgilio, S. Cifarelli, G. Garofoli, G. Lamberti, V. Massari, B. Degryse, Citizen science in the monitoring of *Ostreopsis ovata* blooms in southern Italy: A five-year study, *Mar. Pollut. Bull.* 173 (2021) 112981. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112981>.
- [54] M.A. Faust, S.L. Morton, J.P. Quod, Further sem study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae), *J. Phycol.* 32 (1996) 1053–1065. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.01053.x>.
- [55] A. Penna, M. Vila, S. Fraga, M.G. Giacobbe, A. Francesco, P. Riobó, C. Vernesi, Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences, *J. Phycol.* 41 (2005) 212–225. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2005.04011.x>.
- [56] F. Guerrini, L. Pezzolesi, A. Feller, M. Riccardi, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, R. Pistocchi, Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas, *Toxicon.* 55 (2010) 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.019>.

- [57] N.S. Kang, H.J. Jeong, S.Y. Lee, A.S. Lim, M.J. Lee, H.S. Kim, W. Yih, Morphology and molecular characterization of the epiphytic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the temperate waters off Jeju Island, Korea, *Harmful Algae*. 27 (2013) 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.05.006>.
- [58] H. David, A. Laza-Martínez, I. Miguel, E. Orive, *Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* from the Atlantic Iberian Peninsula: Morphological and phylogenetic characterization, *Harmful Algae*. 30 (2013) 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.08.006>.
- [59] K. Aligizaki, G. Nikolaidis, The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece, *Harmful Algae*. 5 (2006) 717–730. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.005>.
- [60] M.S. Selina, T.Y. Orlova, First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan, *Bot. Mar.* 53 (2010) 243–249. <https://doi.org/10.1515/BOT.2010.033>.
- [61] L.C. Pin, L.P. Teen, A. Ahmad, G. Usup, Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia, *Mar. Biotechnol.* 3 (2001) 246–255. <https://doi.org/10.1007/s101260000073>.
- [62] M.A. Faust, Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov., *Phycologia*. 38 (1999) 92–99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-38-2-92.1>.
- [63] S. Accoroni, T. Romagnoli, A. Penna, S. Capellacci, P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, M. Abboud-Abi Saab, V. Giussani, V. Asnaghi, M. Chiantore, C. Totti, *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea, *J. Phycol.* 52 (2016) 1064–1084. <https://doi.org/10.1111/jpy.12464>.
- [64] L. Tartaglione, A. Mazzeo, C. Dell'Aversano, M. Forino, V. Giussani, S. Capellacci, A. Penna, V. Asnaghi, M. Faimali, M. Chiantore, T. Yasumoto, P. Ciminiello, Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: Structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 915–932. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9183-3>.
- [65] D.R. Norris, J.W. Bomber, E. Balech, Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from Florida keys. I. *Ostreopsis heptagonia* sp. nov, in: D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden (Eds.), *Toxic Dinoflag.*, Elsevier, New York, 1985: pp. 39–44.
- [66] M.A. Faust, S.L. Morton, Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae), *J. Phycol.* 31 (1995) 456–463. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00456.x>.

- [67] N. Mohammad-Noor, N. Daugbjerg, Ø. Moestrup, A. Anton, Marine epibenthic dinoflagellates from Malaysia - A study of live cultures and preserved samples based on light and scanning electron microscopy, *Nord. J. Bot.* 24 (2008) 629–690. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2004.tb01938.x>.
- [68] Y. Fukuyo, Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs, *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 47 (1981) 967–978. <https://doi.org/10.2331/suisan.47.967>.
- [69] N. Chomérat, G. Bilien, A. Derrien, K. Henry, A. Ung, J. Viallon, H.T. Darius, C. Mahana iti Gatti, M. Roué, F. Hervé, D. Réveillon, Z. Amzil, M. Chinain, *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity, *Harmful Algae.* 84 (2019) 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.004>.
- [70] O. Carnicer, A. Tunin-Ley, K.B. Andree, J. Turquet, J. Diogène, M. Fernández-Tejedor, Contribution to the genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): Molecular, morphologic and toxicity characterization, *Cryptogam. Algol.* 36 (2015) 101–119. <https://doi.org/10.7872/crya.v36.iss1.2015.101>.
- [71] M. Ashton, T. Tosteson, C. Tosteson, The effect of elevated temperature on the toxicity of the laboratory cultured dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae), *Rev. Biol. Trop.* 51 (2003) 1–6.
- [72] J. Quod, *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov. (Dinophyceae), dinoflagelles toxiques associés à la ciguatera dans l’Océan Indien, *Cryptogam. Algol.* 15 (1994) 243–251.
- [73] S. Lenoir, L. Ten-Hage, J. Turquet, J.P. Quod, C. Bernard, M.C. Hennion, First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean, *J. Phycol.* 40 (2004) 1042–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.04016.x>.
- [74] S.M. Nascimento, E. V. Corrêa, M. Menezes, D. Varela, J. Paredes, S. Morris, Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil, *Harmful Algae.* 13 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.008>.
- [75] L. Pezzolesi, F. Guerrini, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, R. Pistocchi, Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays, *Water Res.* 46 (2012) 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.029>.
- [76] A. Verma, M. Hoppenrath, J.J. Dorantes-Aranda, D.T. Harwood, S.A. Murray, Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis*

- (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon, *Harmful Algae*. 60 (2016) 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.004>.
- [77] J. Schmidt, Flora of Koh Chang: contributions to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Part IV. Peridinales J Botanique, 23 (1901) 212–218.
- [78] E. Cagide, M.C. Louzao, B. Espiña, R. Mercedes, D. Jaen, L. Maman, T. Yasumoto, L.M. Botana, Production of functionally active palytoxin-like compounds by Mediterranean *Ostreopsis* cf. *siamensis*, *Cell. Physiol. Biochem*. 23 (2009) 431–440. <https://doi.org/10.1159/000218190>.
- [79] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, T. Yasumoto, C. Battocchi, M.G. Giacobbe, A. Amorim, A. Penna, Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Harmful Algae*. 23 (2013) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.12.002>.
- [80] L. Rhodes, N. Towers, L. Briggs, R. Munday, J. Adamson, Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae), *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 36 (2002) 631–636. <https://doi.org/10.1080/00288330.2002.9517118>.
- [81] S. Sato, T. Nishimura, K. Uehara, H. Sakanari, W. Tawong, N. Hariganeya, K. Smith, L. Rhodes, T. Yasumoto, Y. Taira, S. Suda, H. Yamaguchi, M. Adachi, Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan, *PLoS One*. 6 (2011) e27983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027983>.
- [82] K. V Efimova, T. Yu Orlova, V.A. Brykov, Phylogenetic characterization of cryptic species of the marine dinoflagellate, *Ostreopsis* sp. Shmidt, 1902, from Russian coastal waters, the Sea of Japan, *J. Biodivers. Environ. Sci.* 5 (2014) 317–332. <http://www.innspub.net>.
- [83] W. Tawong, T. Nishimura, H. Sakanari, S. Sato, H. Yamaguchi, M. Adachi, Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand, *Harmful Algae*. 37 (2014) 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.003>.
- [84] G. Honsell, A. Bonifacio, M. De Bortoli, A. Penna, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Fattorusso, S. Sosa, T. Yasumoto, A. Tubaro, New Insights on Cytological and Metabolic Features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A Multidisciplinary Approach, *PLoS One*. (2013) e57291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057291>.
- [85] L. Escalera, G. Benvenuto, E. Scalco, A. Zingone, M. Montresor, Ultrastructural features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*

- (Dinophyceae), *Protist.* 165 (2014) 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.03.001>.
- [86] C. Totti, S. Accoroni, F. Cerino, E. Cucchiari, T. Romagnoli, *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata, *Harmful Algae.* 9 (2010) 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006>.
- [87] V. Giussani, F. Sbrana, V. Asnaghi, M. Vassalli, M. Faimali, S. Casabianca, A. Penna, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, L. Tartaglione, A. Mazzeo, M. Chiantore, Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Harmful Algae.* 44 (2015) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.02.006>.
- [88] I. Bravo, M. Vila, S. Casabianca, F. Rodriguez, P. Rial, P. Riobó, A. Penna, Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae), *Harmful Algae.* 18 (2012) 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.001>.
- [89] A.S. Pavaux, D. Velasquez-Carjaval, K. Drouet, A. Lebrun, A. Hiroux, S. Marro, E. Christians, S. Castagnetti, R. Lemée, Daily variations of *Ostreopsis* cf. *ovata* abundances in NW Mediterranean Sea, *Harmful Algae.* 110 (2021) 102144. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102144>.
- [90] F.H. Chang, Y. Shimizu, B. Hay, R. Stewart, G. Mackay, R. Tasker, Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: Temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997, *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 34 (2000) 29–39. <https://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516913>.
- [91] S. Accoroni, T. Romagnoli, S. Pichierri, F. Colombo, C. Totti, Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases, *Harmful Algae.* 19 (2012) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.05.003>.
- [92] S. Vanucci, L. Pezzolesi, R. Pistocchi, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione, F. Guerrini, Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Harmful Algae.* 15 (2012) 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.12.003>.
- [93] G. Honsell, M. De Bortoli, S. Boscolo, C. Dell’Aversano, C. Battocchi, G. Fontanive, A. Penna, F. Berti, S. Sosa, T. Yasumoto, P. Ciminiello, M. Poli, A. Tubaro, Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 7051–7059. <https://doi.org/10.1021/es201373e>.
- [94] M. Monti, M. Minocci, A. Beran, L. Iveša, First record of *Ostreopsis* cf. *ovata*

- on macroalgae in the Northern Adriatic Sea, *Mar. Pollut. Bull.* 54 (2007) 598–601. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.01.013>.
- [95] N. Chomérat, E. Antajan, I. Auby, G. Bilien, L. Carpentier, M.N. de Casamajor, F. Ganthy, F. Hervé, M. Labadie, C. Méteigner, C. Paradis, M. Perrière-Rumèbe, F. Sanchez, V. Séchet, Z. Amzil, First Characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) and Detection of Ovatoxins during a Multispecific and Toxic *Ostreopsis* Bloom on French Atlantic Coast, *Mar. Drugs*. 20 (2022) 461. <https://doi.org/10.3390/md20070461>.
- [96] O. Carnicer, C. Guallar, K.B. Andree, J. Diogène, M. Fernández-Tejedor, *Ostreopsis* cf. *ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors, *Environ. Res.* 143 (2015) 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.08.023>.
- [97] O. Carnicer, M. García-Altare, K.B. Andree, L. Tartaglione, C. Dell’Aversano, P. Ciminiello, P. de la Iglesia, J. Diogène, M. Fernández-Tejedor, *Ostreopsis* cf. *ovata* from western Mediterranean Sea: Physiological responses under different temperature and salinity conditions, *Harmful Algae*. 57 (2016) 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.06.002>.
- [98] S. Accoroni, T. Romagnoli, S. Pichierri, C. Totti, New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Harmful Algae*. 34 (2014) 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.02.003>.
- [99] C. Battocchi, C. Totti, M. Vila, M. Masó, S. Capellacci, S. Accoroni, A. Reñé, M. Scardi, A. Penna, Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 1074–1084. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.017>.
- [100] N. Ungaro, G. Assennato, M. Blonda, B. Cudillo, M.R. Petruzzelli, M. Mariani, A.M. Pastorelli, M.R. Aliquò, A. D’Angela, C. Aiello, S. Ranieri, Occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* along the apulian coastal areas (Southern Italy) and relationship with anthropogenic pollution, *Fresenius Environ. Bull.* 19 (2010) 1813–1821.
- [101] C.E.L. Ferreira, Sea urchins killed by toxic algae, *JMBA Glob. Mar. Environ.* (2006) 22–23.
- [102] F.J.R. Taylor, A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material, *Toxic Dinoflag. Bloom.* (1979) 71–76.
- [103] M. Vila, E. Garcés, M. Masó, Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean, *Aquat. Microb. Ecol.* 26 (2001) 51–60. <https://doi.org/10.3354/ame026051>.
- [104] L. Rhodes, World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus

- Ostreopsis* Schmidt, *Toxicon*. 57 (2011) 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.010>.
- [105] N.T. Shears, P.M. Ross, Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide, *Harmful Algae*. 8 (2009) 916–925. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.05.003>.
- [106] F. Simoni, A. Gaddi, C. Di Paolo, L. Lepri, Harmful epiphytic dinoflagellates on Tyrrhenian Sea, *Harmful Algae News No. 24*. (2003) 13–14.
- [107] M. Vila, L. Viure, R. Lemée, E. Berdalet, Developing an *Ostreopsis* Early Warning System: the joint engagement of environmental agencies, beach users and scientists, in: Proc. 19th Int. Conf. Harmful Algae, International Society for the Study of Harmful Algae, La Paz, B.C.S., Mexico, 2022: pp. 310–315.
- [108] E. Scalco, C. Brunet, F. Marino, R. Rossi, V. Soprano, A. Zingone, M. Montresor, Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions, *Harmful Algae*. 17 (2012) 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.008>.
- [109] C. Brescianini, C. Grillo, N. Melchiorre, R.M. Bertolotto, A. Ferrari, B. Vivaldi, G. Icardi, L. Gramaccioni, E. Funari, S. Scardala, *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006, *Euro Surveill*. 11 (2006).
- [110] P. Barroso García, J. Guillén Enriquez, Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas, *Gac. Sanit*. 22 (2008) 578–584. [https://doi.org/10.1016/S0213-9111\(08\)75357-3](https://doi.org/10.1016/S0213-9111(08)75357-3).
- [111] E. Funari, M. Manganelli, E. Testai, *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities, *Harmful Algae*. 50 (2015) 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.008>.
- [112] P. Pagliara, C. Caroppo, Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cfr. *monotis* and *Ostreopsis* cfr. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea), *Toxicon*. 60 (2012) 1203–1214. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.005>.
- [113] O. Blasutto, M. Celio, G. Honsell, C. Suraci, M. Venuti, B. Zanolin, A. Acquavita, G. Mattassi, Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: First record of *Ostreopsis ovata* bloom, in: K. Pagou, G.M. Hallegraeff (Eds.), Proc. 14th Int. Conf. Harmful Algae, Hersonisssons-Crete, Greece, 1–5 Novemb. 2010, 2013: pp. 13–15.
- [114] Ž. Ninčević Gladan, J. Arapov, S. Casabianca, A. Penna, G. Honsell, V. Brovedani, M. Pelin, L. Tartaglione, S. Sosa, C. Dell’Aversano, A. Tubaro,

- A. Žuljevi, B. Grbec, M. Cavar, M. Buzančić, A. Bakrač, S. Skejić, Massive Occurrence of the Harmful Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Eastern Adriatic Sea, *Toxins (Basel)*. 11 (2019) 300. <https://doi.org/10.3390/toxins11050300>.
- [115] R.E. Moore, G. Bartolini, Structure of palytoxin, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2491–2494.
- [116] R.E. Moore, P.J. Scheur, Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate, *Science* (80-.). 172 (1971) 495–498. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.495>.
- [117] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, G.S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo, N. Melchiorre, The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6153–6159. <https://doi.org/10.1021/ac060250j>.
- [118] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Grillo, N. Melchiorre, Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001>.
- [119] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, L. Pezzolesi, R. Pistocchi, S. Vanucci, Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 1869–1875. <https://doi.org/10.1021/ja210784u>.
- [120] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, R. Pistocchi, Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2735–2744. <https://doi.org/10.1002/rcm>.
- [121] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, C. Battocchi, R. Crinelli, E. Carloni, M. Magnani, A. Penna, Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MSⁿ characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 1243–1252. <https://doi.org/10.1021/tx300085e>.
- [122] M. García-Altres, L. Tartaglione, C. Dell’Aversano, O. Carnicer, P. De La Iglesia, M. Forino, J. Diogène, P. Ciminiello, The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural insights by LC-high resolution MSⁿ, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1191–1204. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8338-y>.

- [123] C. Brissard, F. Hervé, M. Sibat, V. Séchet, P. Hess, Z. Amzil, C. Herrenknecht, Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification, *J. Chromatogr. A.* 1388 (2015) 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.015>.
- [124] L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna, C. Dell’Aversano, Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 13920–13928. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03827>.
- [125] T. Suzuki, R. Watanabe, H. Uchida, R. Matsushima, H. Nagai, T. Yasumoto, T. Yoshimatsu, S. Sato, M. Adachi, LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan, *Harmful Algae*. 20 (2012) 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.08.002>.
- [126] H. Uchida, Y. Taira, T. Yasumoto, Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 1999–2008. <https://doi.org/10.1002/rcm.6657>.
- [127] M. Usami, M. Satake, S. Ishida, T. Yasumoto, A. Oue, Y. Kan, Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5389–5390. <https://doi.org/10.1021/ja00124a034>.
- [128] T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, H. Naoki, T. Fujita, Y. Kan, T. Yasumoto, Structure Elucidation of Ostreocin D, a Palytoxin Analog Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2585–2588. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2585>.
- [129] T. Ukena, M. Satake, M. Usami, Y. Oshima, T. Fujita, H. Naoki, T. Yasumoto, Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 2387–2393. <https://doi.org/10.1002/rcm.867>.
- [130] T. Terajima, H. Uchida, N. Abe, T. Yasumoto, Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018) 1001–1007. <https://doi.org/10.1002/rcm.8130>.
- [131] T. Terajima, H. Uchida, N. Abe, T. Yasumoto, Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/ Q-TOF MS, *Biosci.*

- Biotechnol. Biochem.* 83 (2019) 381–390.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1550356>.
- [132] R. Rossi, V. Castellano, E. Scalco, L. Serpe, A. Zingone, V. Soprano, New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *Toxicon*. 56 (2010) 1381–1387.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.003>.
- [133] S. Accoroni, T. Romagnoli, F. Colombo, C. Pennesi, C.G. di Camillo, M. Marini, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, L. Tartaglione, A. Penna, C. Totti, *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 2512–2519.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.003>.
- [134] S. Vanucci, F. Guerrini, L. Pezzolesi, C. Dell’Aversano, P. Ciminiello, R. Pistocchi, Cell growth and toxins’ content of *Ostreopsis* cf. *ovata* in presence and absence of associated bacteria, *Cryptogam. Algal.* 33 (2012) 105–112.
<https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.105>.
- [135] C. Brissard, C. Herrenknecht, V. Séchet, F. Hervé, F. Pisapia, J. Harcouet, R. Lemée, N. Chomérat, P. Hess, Z. Amzil, Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification, *Mar. Drugs*. 12 (2014) 2851–2876.
<https://doi.org/10.3390/md12052851>.
- [136] M. García-Portela, P. Riobó, J.M. Franco, R.M. Bañuelos, F. Rodríguez, Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*, *Harmful Algae*. 60 (2016) 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.10.007>.
- [137] H. Gu, Y. Wang, A. Derrien, F. Hervé, N. Wang, M. Pransilpa, P.T. Lim, C.P. Leaw, Two toxigenic *Ostreopsis* species, *O.* cf. *ovata* and *O. siamensis* (Dinophyceae), from the South China Sea, tropical Western Pacific, *Harmful Algae*. 113 (2022) 102206. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102206>.
- [138] L. Tartaglione, M. Pelin, M. Morpurgo, C. Dell’Aversano, J. Montenegro, G. Sacco, S. Sosa, J.D. Reimer, P. Ciminiello, A. Tubaro, An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon, *Toxicon*. 121 (2016) 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.012>.
- [139] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, C. Florio, P. Lorenzon, M. De Bortoli, A. Tubaro, M. Poli, G. Bignami, Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-

- palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 1851–1859. <https://doi.org/10.1021/tx900259v>.
- [140] D. Uemura, Y. Hirata, T. Iwashita, H. Naoki, Studies on palytoxins, *Tetrahedron*. 41 (1985) 1007–1017. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96468-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96468-3).
- [141] E. Ternon, E. Glukhov, E. Trytten, R. Lemée, W.H. Gerwick, On the Hunt for New Toxin Families Produced by a Mediterranean Strain of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Toxins (Basel)*. 14 (2022) 234. <https://doi.org/10.3390/toxins14040234>.
- [142] J. Álvarez, A. Pedrol, I. Parrón, J. Goxencia, M. De Torres, M. Manzanera, C. Planas, G. Coscolluela, A. López, M. Masó, M. Vila, R. Isalt, Brote Epidémico de sintomatología irritativa en Sant Andreu de Llavaneres: ¿el origen está en el mar?, in: Proc. XXIII Reun. La Soc. Española Epidemiol. Las Palmas Gran Canar. Spain. *Gac. Sanit.* 19(1), 2005: pp. 3–139.
- [143] A. Tubaro, P. Durando, G. Del Favero, F. Ansaldi, G. Icardi, J.R. Deeds, S. Sosa, Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure, *Toxicon*. 57 (2011) 478–495. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.005>.
- [144] A.C. Alcala, L.C. Alcala, J.S. Garth, D. Yasumura, T. Yasumoto, Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin, *Toxicon*. 26 (1988) 105–107. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90142-0).
- [145] A.M. Kodama, Y. Hokama, T. Yasumoto, M. Fukui, S. Jo Manea, N. Sutherland, Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapтерus macrosoma* (mackerel), *Toxicon*. 27 (1989) 1051–1053. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90156-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90156-6).
- [146] J. Molgo, E. Benoit, A.M. Legrand, K. A.S., Bioactive agents involved in fish poisoning: an overview., in: Proc. 5th Indo-Pacific Fish Conf., 1999: pp. 721–738.
- [147] Y. Onuma, M. Satake, T. Ukena, J. Roux, S. Chanteau, N. Rasolofonirina, M. Ratsimaloto, H. Naoki, T. Yasumoto, Identification of putative palytoxin as the cause of cluetoicism, *Toxicon*. 37 (1999) 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00133-0).
- [148] S. Casabianca, A. Casabianca, P. Riobó, J.M. Franco, M. Vila, A. Penna, Quantification of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR Assay in marine aerosol, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 3788–3795. <https://doi.org/10.1021/es305018s>.
- [149] E. Habermann, Palytoxin acts through Na⁺, K⁺-ATPase, *Toxicon*. 27 (1989)

- 1171–1187. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90026-3).
- [150] P. Artigas, D.C. Gadsby, Na^+/K^+ -pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 501–505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0135849100>.
- [151] D.W. Hilgemann, From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 386–388. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437775100>.
- [152] C. Frelin, P. Vigne, J.-P. Breittmayer, Palytoxin acidifies chick cardiac cells and activates the Na^+/H^+ antiporter, *FEBS Lett.* 264 (1990) 63–66. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80765-b](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80765-b).
- [153] A. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, *J. Basic Clin. Pharm.* 7 (2016) 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
- [154] J.S. Wiles, J.A. Vick, M.K. Christensen, Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species, *Toxicon.* 12 (1974) 427–433. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90011-7).
- [155] M. Poli, P. Ruiz-Olvera, A. Nalca, S. Ruiz, V. Livingston, O. Frick, D. Dyer, C. Schellhase, J. Raymond, D. Kulis, D. Anderson, S. McGrath, J. Deeds, Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats, *Toxicon.* 150 (2018) 235–250. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.067>.
- [156] R. Lemée, L. Mangialajo, S. Cohu, Z. Amzil, A. Blanfune, N. Chomerat, N. Ganzin, S. Gasparini, H. Grossel, L. Guidi-Guivard, L. Hoareaw, F. Le Duff, S. Marro, N. Simow, E. Nezan, M.L. Pedrotti, V. Sechet, O. Soliveres, T. Thibaut, Interactions between scientists, managers and policy makers in the framework of the French Medios project on *Ostreopsis* (2008-2010), *Cryptogam. Algol.* 33 (2012) 137–142. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.137>.
- [157] R. Munday, Occurrence and toxicology of palytoxin, in: L.M. Botana (Ed.), *Seaf. Freshw. Toxins. Pharmacol. Physiol. Detect.*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2008: pp. 693–713.
- [158] S. Sosa, G. Del Favero, M. De Bortoli, F. Vita, M.R. Soranzo, D. Beltramo, M. Ardizzone, A. Tubaro, Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice, *Toxicol. Lett.* 191 (2009) 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.009>.
- [159] A. Boente-Juncal, C. Vale, M. Camiña, J.M. Cifuentes, M.R. Vieytes, L.M. Botana, Reevaluation of the acute toxicity of palytoxin in mice: Determination of lethal dose 50 (LD_{50}) and No-observed-adverse-effect level (NOAEL), *Toxicon.* 177 (2020) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.01.010>.

- [160] G. Del Favero, D. Beltramo, M. Sciancalepore, P. Lorenzon, T. Coslovich, M. Poli, E. Testai, S. Sosa, A. Tubaro, Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and invitro effects on cardiomyocytes, *Toxicon*. 75 (2013) 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.003>.
- [161] A. Boente-Juncal, S. Raposo-García, C. Vale, M.C. Louzao, P. Otero, L.M. Botana, In vivo evaluation of the chronic oral toxicity of the marine toxin palytoxin, *Toxins (Basel)*. 12 (2020) 5–10. <https://doi.org/10.3390/toxins12080489>.
- [162] F. Misurale, C. Scarone, L. Pezzolesi, R. Pistocchi, A.M. Bassi, A. Novellino, M. Calderoni, A. Pagano, V. Giussani, S. Alloisio, An Integrated *In Vitro* Approach for Human Health and Environmental Risk Assessment of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima*, and *Coolia monotis* Strains, *Appl. Vit. Toxicol.* 8 (2022) 102–112. <https://doi.org/10.1089/aivt.2022.0008>.
- [163] M.P. Gémin, R. Lancelleur, L. Meslier, F. Hervé, D. Réveillon, Z. Amzil, E. Ternon, O.P. Thomas, V. Fessard, Toxicity of palytoxin, purified ovatoxin-a, ovatoxin-d and extracts of *Ostreopsis cf. ovata* on the Caco-2 intestinal barrier model, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 94 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103909>.
- [164] M. Pelin, M. Forino, V. Brovedani, L. Tartaglione, C. Dell’Aversano, R. Pistocchi, M. Poli, S. Sosa, C. Florio, P. Ciminiello, A. Tubaro, Ovatoxin-a, A Palytoxin Analogue Isolated from *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo: Cytotoxic Activity and ELISA Detection, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 1544–1551. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04749>.
- [165] R. Crinelli, E. Carloni, E. Giacomini, A. Penna, S. Dominici, C. Battocchi, P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, M. Magnani, Palytoxin and an *Ostreopsis* toxin extract increase the levels of mRNAs encoding inflammation-related proteins in human macrophages via p38 MAPK and NF-κB, *PLoS One*. 7 (2012) e38139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038139>.
- [166] K. Aligizaki, P. Katikou, G. Nikolaidis, A. Panou, First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece), *Toxicon*. 51 (2008) 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.016>.
- [167] K. Aligizaki, P. Katikou, A. Milandri, J. Diogène, Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art, *Toxicon*. 57 (2011) 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.014>.
- [168] Z. Amzil, M. Sibat, N. Chomérat, H. Gossel, F. Marco-Miralles, R. Lemée, E. Nezan, V. Sechet, Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in

- Relation to *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast, *Mar. Drugs*. 10 (2012) 477–496. <https://doi.org/10.3390/md10020477>.
- [169] R. Biré, S. Trotureau, R. Lemée, C. Delpont, B. Chabot, Y. Aumond, S. Krys, Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009, *Harmful Algae*. 28 (2013) 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.007>.
- [170] R. Biré, S. Trotureau, R. Lemée, D. Oregioni, C. Delpont, S. Krys, T. Guérin, Hunt for palytoxins in a wide variety of marine organisms harvested in 2010 on the French Mediterranean coast, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 5425–5446. <https://doi.org/10.3390/md13085425>.
- [171] EFSA, Scientific Opinion. Marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Parma, Italy, 2009. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1393>.
- [172] R.B. Gonzales, A.C. Alcalá, Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines, *Toxicon*. 15 (1977) 169–170. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(77\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(77)90036-8).
- [173] E. Granéli, C.E.L. Ferreira, T. Yasumoto, E.M. Rodrigues, B. Neves, Sea urchins poisoning by the benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on the Brazilian Coast, in: 10th Int. Conf. Harmful Algae, Steidinger, Pete Beach, Florida, 2002: p. 113.
- [174] R. Simonini, M. Orlandi, M. Abbate, Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*, *Mar. Environ. Res.* 72 (2011) 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.009>.
- [175] M. Faimali, V. Giussani, V. Piazza, F. Garaventa, C. Corrà, V. Asnaghi, D. Privitera, L. Gallus, R. Cattaneo-Vietti, L. Mangialajo, M. Chiantore, Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms, *Mar. Environ. Res.* 76 (2012) 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.010>.
- [176] R.A.F. Neves, T. Fernandes, L.N. Dos Santos, S.M. Nascimento, Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*, *PLoS One*. 12 (2017) e0175168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175168>.
- [177] S. Gorbi, R. Bocchetti, A. Binelli, S. Bacchiocchi, R. Orletti, L. Nanetti, F. Raffaelli, A. Vignini, S. Accoroni, C. Totti, F. Regoli, Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* cf. *ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*, *Chemosphere*. 89 (2012) 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.064>.

- [178] M. Vila, L. Arin, C. Battocchi, I. Bravo, S. Fraga, A. Penna, A. Reñé, P. Riobó, F. Rodríguez, M.M. Sala, J. Camp, M. De Torres, J.M. Franco, Management of *Ostreopsis* blooms in recreational waters along the Catalan coast (NW Mediterranean Sea): Cooperation between a research project and a monitoring program, *Cryptogam. Algol.* 33 (2012) 143–152. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.143>.
- [179] J. Àlvarez, Internal document of the Public Health Surveillance System of the Autonomous Government of Catalonia, 2006.
- [180] M. Masó, E. Garcés, F. Pagès, J. Camp, Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species, *Sci. Mar.* 67 (2003) 107–111. <https://doi.org/10.3989/scimar.2003.67n1107>.
- [181] M. Vila, M. Masó, Phytoplankton functional groups and harmful algal species in anthropogenically impacted waters of the NW Mediterranean Sea, *Sci. Mar.* 69 (2005) 31–45. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n131>.
- [182] M. Miraglia, H.J.P. Marvin, G.A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R.W.A. Hutjes, M.Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G.J. van den Born, A. Vespermann, Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1009–1021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.005>.
- [183] R. Pistocchi, L. Pezzolesi, F. Guerrini, S. Vanucci, C. Dell’Aversano, E. Fattorusso, A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*, *Toxicon.* 57 (2011) 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.013>.
- [184] Z. Wu, H. Zhang, Q. Li, L. Cui, H. Chen, S. Lu, Effects of temperature on the growth and carbohydrate production of three benthic dinoflagellate species from Hainan Island, South China Sea, *Ecotoxicology.* 30 (2021) 1789–1798. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02428-z>.
- [185] E. Granéli, N.K. Vidyarathna, E. Funari, P.R.T. Cumarantunga, R. Scenati, Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*?, *Harmful Algae.* 10 (2011) 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.09.002>.
- [186] M. Manganelli, S. Bogialli, A. Di Corcia, D. Mattei, F. Mattera, S. Scardala, M. Stefanelli, E. Funari, Temperature effect on palytoxin production by cultures of *Ostreopsis ovata*, in: Proc. Int. Symp. Algal Toxins, Trieste, May 27–29, 2007: p. 48.
- [187] M.P. Gémin, S. Bertrand, V. Séchet, Z. Amzil, D. Réveillon, Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxin content of a Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain, *Harmful Algae.* 106 (2021) 102060. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102060>.

- [188] N.K. Vidyarathna, E. Granéli, Influence of temperature on growth, toxicity and carbohydrate production of a Japanese *Ostreopsis ovata* strain, a toxic-bloom-forming dinoflagellate, *Aquat. Microb. Ecol.* 65 (2012) 261–270. <https://doi.org/10.3354/ame01555>.
- [189] K. Drouet, C. Jauzein, S. Gasparini, A.S. Pavaux, E. Berdalet, S. Marro, V. Davenet-Sbirrazuoli, R. Siano, R. Lemée, The benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the NW Mediterranean Sea: Relationship between sea surface temperature and bloom phenology, *Harmful Algae*. 112 (2022) 102184. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102184>.
- [190] E. Granéli, N.K. Vidyarathna, E. Funari, R. Cumaranatunga, Climate change and benthic Dinoflagellates - the *Ostreopsis ovata* case, in: Proc. 13th Int. Conf. Harmful Algae, Hong Kong, 3–7, 2008: p. 42.
- [191] S. Cohu, R. Lemée, Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea, *Cah. Biol. Mar.* 53 (2012) 373–380.
- [192] S. Cohu, L. Mangialajo, T. Thibaut, A. Blanfuné, S. Marro, R. Lemée, Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea, *Harmful Algae*. 24 (2013) 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.01.002>.
- [193] M. Monti, E. Cecchin, Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions, *Cryptogam. Algal.* 33 (2012) 113–119. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.113>.
- [194] V. Sechet, M. Sibat, N. Chomérat, E. Nézan, H. Gossel, J.B. Lehebel-Peron, T. Jauffrais, N. Ganzin, F. Marco-Miralles, R. Lemée, Z. Amzil, *Ostreopsis* cf. *ovata* in the French Mediterranean coast: Molecular characterisation and toxin profile, *Cryptogam. Algal.* 33 (2012) 89–98. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.089>.
- [195] S. Fraga, F. Rodríguez, I. Bravo, M. Zapata, E. Marañón, Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms, *Cryptogam. Algal.* 33 (2012) 171–179. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.171>.
- [196] R. Barone, Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: The spider's strategy, *Harmful Algae News*. 33 (2007).
- [197] G. Delgado, C.H. Lechuga-Devéze, G. Popowski, L. Troccoli, C.A. Salinas, Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba, *Rev. Biol. Trop.* 54 (2006) 299–310. <https://doi.org/10.15517/rbt.v54i2.13870>.

- [198] R.D. Carlson, D.R. Tindall, Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands, in: D.M. Anderson, A.W. White, D.G. Baden (Eds.), *Toxic Dinoflag.*, Elsevier Science Publishing, New York, USA, **1985**: pp. 171–176.
- [199] S. Accoroni, P.M. Glibert, S. Pichierri, T. Romagnoli, M. Marini, C. Totti, A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients, *Harmful Algae*. 45 (**2015**) 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.04.002>.
- [200] S. Cohu, T. Thibaut, L. Mangialajo, J.P. Labat, O. Passafiume, A. Blanfuné, N. Simon, J.M. Cottalorda, R. Lemée, Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean), *Mar. Pollut. Bull.* 62 (**2011**) 2681–2691. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.022>.
- [201] P. Riobó, J.M. Franco, Palytoxins: Biological and chemical determination, *Toxicon*. 57 (**2011**) 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.012>.
- [202] P. Riobó, B. Paz, J.M. Franco, J.A. Vázquez, M.A. Murado, E. Cacho, Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships, *Food Chem. Toxicol.* 46 (**2008**) 2639–2647. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.020>.
- [203] A. Alfonso, A. Fernández-Araujo, C. Alfonso, B. Caramés, A. Tobio, M.C. Louzao, M.R. Vieytes, L.M. Botana, Palytoxin detection and quantification using the fluorescence polarization technique, *Anal. Biochem.* 424 (**2012**) 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.014>.
- [204] J. Nicolas, T.F.H. Bovee, L. Kamelia, I.M.C.M. Rietjens, P.J.M. Hendriksen, Exploration of new functional endpoints in neuro-2a cells for the detection of the marine biotoxins saxitoxin, palytoxin and tetrodotoxin, *Toxicol. Vitro*. 30 (**2015**) 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.001>.
- [205] V. Brovedani, S. Sosa, M. Poli, M. Forino, K. Varello, A. Tubaro, M. Pelin, A revisited hemolytic assay for palytoxin detection: Limitations for its quantitation in mussels, *Toxicon*. 119 (**2016**) 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.013>.
- [206] E. Habermann, G. Ahnerthilger, G.S. Ghhtwal, L. Béress, Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics, *Biochim. Biophys. Acta*. 649 (**1981**) 481–486. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90439-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90439-9).
- [207] G.S. Bignami, A rapid and sensitive hemolysis neutralisation assay for palytoxin, *Toxicon*. 31 (**1993**) 817–820. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90389-z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90389-z).
- [208] P. Riobó, B. Paz, J.M. Franco, J.A. Vázquez, M.A. Murado, Proposal for a

- simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin. Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability, *Harmful Algae*. 7 (2008) 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.09.001>.
- [209] P. Seemann, C. Gernert, S. Schmitt, D. Mebs, U. Hentschel, Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 96 (2009) 405–411. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9353-4>.
- [210] B. Espiña, E. Cagide, M.C. Louzao, M.M. Fernandez, M.R. Vieytes, P. Katikou, A. Villar, D. Jaen, L. Maman, L.M. Botana, Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells, *Biosci. Rep.* 29 (2009) 13–23. <https://doi.org/10.1042/BSR20080080>.
- [211] M. Pelin, S. Boscolo, M. Poli, S. Sosa, A. Tubaro, C. Florio, Characterization of palytoxin binding to HaCaT cells using a monoclonal anti-palytoxin antibody, *Mar. Drugs.* 11 (2013) 584–598. <https://doi.org/10.3390/md11030584>.
- [212] M. Fraga, N. Vilariño, M.C. Louzao, D.A. Fernández, M. Poli, L.M. Botana, Detection of palytoxin-like compounds by a flow cytometry-based immunoassay supported by functional and analytical methods, *Anal. Chim. Acta.* 903 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.040>.
- [213] S. Boscolo, M. Pelin, M. De Bortoli, G. Fontanive, A. Barreras, F. Berti, S. Sosa, O. Chaloin, A. Bianco, T. Yasumoto, M. Prato, M. Poli, A. Tubaro, Sandwich ELISA assay for the quantitation of palytoxin and its analogs in natural samples, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 2034–2042. <https://doi.org/10.1021/es304222t>.
- [214] T. Yasumoto, D. Yasumura, Y. Ohizumi, M. Takahashi, A.C. Alcalá, L.C. Alcalá, Palytoxin in Two Species of Xanthid Crab from the Philippines, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 163–167. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867344>.
- [215] C.O. Lau, H.E. Khoo, R. Yuen, M. Wan, C.H. Tan, Isolation of a novel fluorescent toxin from the coral reef crab, *Lophozozymus pictor*, *Toxicon*. 31 (1993) 1341–5. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(93\)90409-C](https://doi.org/10.1016/0041-0101(93)90409-C).
- [216] L. Soliño, M. García-Altare, L. Godinho, P.R. Costa, Toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* from Portuguese continental coast and Selvagens Islands (Madeira, Portugal), *Toxicon*. 181 (2020) 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.102>.
- [217] V. Ramos, V. Vasconcelos, Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects, *Mar. Drugs.* 8 (2010) 2021–2037. <https://doi.org/10.3390/md8072021>.

- [218] T. Inuzuka, D. Uemura, H. Arimoto, The conformational features of palytoxin in aqueous solution, *Tetrahedron*. 64 (2008) 7718–7723. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.025>.
- [219] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, M. Forino, L. Tartaglione, M. Pelin, S. Sosa, A. Tubaro, O. Chaloin, M. Poli, G. Bignami, Stereoisomers of 42-hydroxy palytoxin from Hawaiian *Palythoa toxica* and *P. tuberculosa*: Stereostructure elucidation, detection, and biological activities, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 351–357. <https://doi.org/10.1021/np4009514>.
- [220] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, R. Rossi, V. Soprano, D. Capozzo, L. Serpe, Palytoxin in seafood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Investigation of extraction efficiency and matrix effect, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5135-8>.
- [221] A. Mazzeo, M. Varra, L. Tartaglione, P. Ciminiello, Z. Zendong, P. Hess, C. Dell’Aversano, Toward isolation of palytoxins: Liquid chromatography coupled to low-or high-resolution mass spectrometry for the study on the impact of drying techniques, solvents and materials, *Toxins (Basel)*. 13 (2021) 650. <https://doi.org/10.3390/toxins13090650>.
- [222] L. Pezzolesi, S. Vanucci, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, L. Tartaglione, R. Pistocchi, Effects of N and P availability on carbon allocation in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*, *Harmful Algae*. 55 (2016) 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.011>.
- [223] E. Ternon, A.S. Pavau, S. Marro, O.P. Thomas, R. Lemée, Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and a co-occurring diatom, *Harmful Algae*. 75 (2018) 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.04.003>.
- [224] L. Tartaglione, C. Dell’Aversano, A. Mazzeo, M. Forino, A. Wieringa, P. Ciminiello, Determination of Palytoxins in Soft Coral and Seawater from a Home Aquarium. Comparison between *Palythoa*- and *Ostreopsis*-Related Inhalatory Poisonings, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 1023–1030. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05469>.
- [225] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, M. Forino, L. Tartaglione, Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for palytoxins in mussels, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1463–1473. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8367-6>.
- [226] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, Stereochemical studies on ovatoxin-a, *Chem. Eur. J.* 18 (2012) 16836–16843. <https://doi.org/10.1002/chem.201201357>.
- [227] C. Dell’Aversano, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, S. Casabianca, A. Penna, P. Ciminiello, *Ostreopsis cf. ovata* from the

- Mediterranean Sea. Variability in toxin profiles and structural elucidation of unknowns through LC-HRMSⁿ, in: MacKenzie AL Mar. Freshw. Harmful Algae. Proc. 16th Int. Conf. Harmful Algae, Wellington, New Zeal., **2014**: pp. 70–73.
- [228] B. Paz, P. Riobó, J.M. Franco, Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (**2011**) 3627–3639. <https://doi.org/10.1002/rcm.5264>.
- [229] P. Ciminiello, C. Dell’Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives, *Toxicon.* 57 (**2011**) 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.002>.
- [230] J. Patocka, R.C. Gupta, Q. hua Wu, K. Kuca, Toxic potential of palytoxin, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci.* 35 (**2015**) 773–780. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1506-3>.
- [231] X. Zheng, R. Wojcik, X. Zhang, Y.M. Ibrahim, K.E. Burnum-Johnson, D.J. Orton, M.E. Monroe, R.J. Moore, R.D. Smith, E.S. Baker, Coupling front-end separations, ion mobility spectrometry, and mass spectrometry for enhanced multidimensional biological and environmental analyses, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 10 (**2017**) 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045212>.
- [232] V. D’Atri, T. Causon, O. Hernandez-Alba, A. Mutabazi, J.L. Veuthey, S. Cianferani, D. Guillaume, Adding a new separation dimension to MS and LC–MS: What is the utility of ion mobility spectrometry?, *J. Sep. Sci.* 41 (**2018**) 20–67. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700919>.
- [233] J.J. Thomson, E. Rutherford, On the passage of electricity through gases exposed to Röntgen rays, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 42 (**1896**) 392–407. <https://doi.org/10.1080/14786449608620932>.
- [234] J.C. May, J.A. McLean, Ion mobility-mass spectrometry: Time-dispersive instrumentation, *Anal. Chem.* 87 (**2015**) 1422–1436. <https://doi.org/10.1021/ac504720m>.
- [235] G.R. Asbury, H.H. Hill, Using different drift gases to change separation factors (α) in ion mobility spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (**2000**) 580–584. <https://doi.org/10.1021/ac9908952>.
- [236] M.D. Howdle, C. Eckers, A.M.F. Laures, C.S. Creaser, The effect of drift gas on the separation of active pharmaceutical ingredients and impurities by ion mobility-mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 298 (**2010**) 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.08.007>.
- [237] E.A. Mason, E.W. McDaniel, Transport Properties of Ions in Gases, Wiley,

- John Wiley & Sons: New York, **1988**.
- [238] K. Thalassinou, M. Grabenauer, S.E. Slade, G.R. Hilton, M.T. Bowers, J.H. Scrivens, Characterization of phosphorylated peptides using traveling wave-based and drift cell ion mobility mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 248–254. <https://doi.org/10.1021/ac801916h>.
- [239] F. Meier, S. Beck, N. Grassl, M. Lubeck, M.A. Park, O. Raether, M. Mann, Parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF): Multiplying sequencing speed and sensitivity by synchronized scans in a trapped ion mobility device, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 5378–5387. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00932>.
- [240] D.G. Beach, J.E. Melanson, R.W. Purves, Analysis of paralytic shellfish toxins using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2473–2484. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8488-6>.
- [241] S. Poyer, C. Loutelier-Bourhis, G. Coadou, F. Mondeguer, J. Enche, A. Bossée, P. Hess, C. Afonso, Identification and separation of saxitoxins using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to traveling wave ion mobility-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 50 (2014) 175–181. <https://doi.org/10.1002/jms.3515>.
- [242] D. Privitera, V. Giussani, G. Isola, M. Faimali, V. Piazza, F. Garaventa, V. Asnagli, E. Cantamessa, R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, Toxic effects of *Ostreopsis ovata* on larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*, *Harmful Algae.* 18 (2012) 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.03.009>.
- [243] R.R.L. Guillard, M.S. Sieracki, Counting cells in cultures with the light microscope, in: R.A. Andersen (Ed.), *Algal Cult. Tech.*, Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, **2005**: pp. 239–252.
- [244] R.W. Hoshaw, J.R. Rosowski, Methods for microscopic algae, in: J.R. Stein (Ed.), *Cult. Methods Growth Meas.*, Cambridge University Press, Cambridge, **1973**: pp. 53–58.
- [245] R.A. Andersen, M. Kawachi, Traditional Microalgae Isolation Techniques Robert, in: R.A. Andersen (Ed.), *Algal Cult. Tech.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, **2005**: pp. 83–100.
- [246] R.R.L. Guillard, Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: W.L. Smith, M.H. Chanley (Eds.), *Cult. Mar. Invertebr. Anim.*, Plenum Pre, **1975**: pp. 29–60.
- [247] T.N.J. Fouquet, R.B. Cody, Y. Ozeki, S. Kitagawa, H. Ohtani, H. Sato, On the Kendrick Mass Defect Plots of Multiply Charged Polymer Ions: Splits, Misalignments, and How to Correct Them, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 1611–1626. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-1972-4>.

- [248] L. Mangialajo, R. Bertolotto, R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, C. Grillo, R. Lemée, N. Melchiorre, P. Moretto, P. Povero, N. Ruggieri, The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy, *Mar. Pollut. Bull.* 56 (2008) 1209–1214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.028>.
- [249] L. Mangialajo, A. Fricke, G. Perez-Gutierrez, D. Catania, C. Jauzein, R. Lemée, Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms, *Harmful Algae.* 64 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.03.002>.
- [250] E. Granéli, N. Johansson, Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions, *Harmful Algae.* 2 (2003) 135–145. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00006-4).
- [251] E. Granéli, K.J. Flynn, Chemical and Physical Factors Influencing Toxin Content, in: E. Granéli, J.T. Turner (Eds.), *Ecol. Harmful Algae*, Ecological, Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 2006: pp. 229–241.
- [252] A.I. Gedaria, B. Luckas, K. Reinhardt, R. V. Azanza, Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions, *Toxicon.* 50 (2007) 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.04.021>.
- [253] S. Accoroni, F. Colombo, S. Pichierri, T. Romagnoli, M. Marini, C. Battocchl, A. Penna, C. Totti, Ecology of *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northwestern adriatic sea, *Cryptogam. Algol.* 33 (2012) 191–198. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss2.2011.191>.
- [254] M. Abboud-Abi Saab, M. Fakhri, M.-T. Kassab, N. Matar, Seasonal and spatial variations of the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis* in the Lebanese coastal waters (Eastern Mediterranean), *Cryptogam. Algol.* 34 (2013) 57–67. <https://doi.org/10.7872/crya.v34.iss1.2013.57>.
- [255] S. Turki, N. Balti, A. Aissaoui, Z. Armi, *Ostreopsis* cf. *siamensis* proliferations in coastal water of Bizerte, Northern Tunisia, *Harmful Algae News.* (2010) 4–5. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.08.006>.
- [256] M.C. de Q. Mendes, J.M.C. Nunes, M. Menezes, S. Fraga, F. Rodríguez, J.A. Vázquez, J. Blanco, J.M. Franco, P. Riobó, Toxin production, growth kinetics and molecular characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* isolated from Todos os Santos Bay, tropical southwestern Atlantic, *Toxicon.* 138 (2017) 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.007>.
- [257] S. Accoroni, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, S. Pichierri, M. Marini, A. Campanelli, C. Dell’Aversano, C. Totti, Influence of environmental factors on the toxin production of *Ostreopsis* cf. *ovata* during bloom events, *Mar. Pollut. Bull.* 123 (2017) 261–268.

- <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.049>.
- [258] A.C. Redfield, On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton, in: James Johnstone Meml. Vol., University of Liverpool Press, Liverpool., **1934**: pp. 176–192.
- [259] T.S. Weber, C. Deutsch, Ocean nutrient ratios governed by plankton biogeography, *Nature*. 467 (2010) 550–554. <https://doi.org/10.1038/nature09403>.
- [260] M.L. Parsons, L.B. Preskitt, A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i, *Harmful Algae*. 6 (2007) 658–669. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.01.001>.
- [261] M. Ben Brahim, M. Feki, A. Bouain, Occurrences of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in relation with environmental factors in Kerkennah Island (Southern coast of Tunisia), *J. Coast. Life Med.* 3 (2015) 596–599. <https://doi.org/10.12980/jclm.3.2015j5-71>.
- [262] N.K. Vidyarthna, E. Granéli, Impact of temperature and nutrients on the growth and toxicity of *Ostreopsis ovata*, in: 14th Int. Conf. Harmful Algae, Hersonissos-Crete, **2010**: p. 82.
- [263] R. Pistocchi, L. Pezolesi, F. Guidi, S. Vanucci, F. Guerrini, A. Pinna, Inorganic nutrients uptake and organic phosphorus utilization by *Ostreopsis* cf. *ovata*, in: Mar. Freshw. Harmful Algae. Proc. 16th Int. Conf. Harmful Algae., A. Lincoln MacKenzie, Cawthron Institute, Nelson, New Zealand and the International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA), **2014**.
- [264] N.T.W. Ellwood, M.M. Pasella, C. Totti, S. Accoroni, Growth and phosphatase activities of *Ostreopsis* cf. *ovata* biofilms supplied with diverse dissolved organic phosphorus (DOP) compounds, *Aquat. Microb. Ecol.* 85 (2020) 155–166. <https://doi.org/10.3354/AME01946>.
- [265] C. Jauzein, D. Couet, T. Blasco, R. Lemée, Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Harmful Algae*. 65 (2017) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.005>.
- [266] A. Hattori, J. Myers, Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations from *Anabaena cylindrica*. 1. Part Reduction of nitrite to ammonia, *Chem. Zentralblatt*. 138 (1967) 149. <https://doi.org/10.1104/pp.41.6.1031>.
- [267] A. Hattori, J. Myers, Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. II. Reduction of nitrate to nitrite, *Plant Cell Physiol*. 8 (1967) 327–337. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a079265>.
- [268] K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling, Methods of seawater analysis, second revised and extended edition, 2nd ed., Florida, **1983**.

- [269] X.A. Álvarez-Salgado, A.E.J. Miller, Simultaneous determination of dissolved organic carbon and total dissolved nitrogen in seawater by high temperature catalytic oxidation: Conditions for precise shipboard measurements, *Mar. Chem.* 62 (1998) 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(98\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(98)00037-1).
- [270] O. Holm-Hansen, B. Riemann, Chlorophyll a Determination: Improvements in Methodology, *Oikos*. 30 (1978) 438–447. <https://doi.org/10.2307/3543338>.
- [271] M. Vila, P. Riobó, I. Bravo, M. Masó, A. Penna, A. Reñé, C. Battocchi, S. Fraga, F. Rodriguez, J.M. Franco, A Three-Year Time Series Of Toxic *Ostreopsis* Blooming in A NW Mediterranean Coastal Site: Preliminary Results, *ICHA 14 Conf. Proceedings*. (2005) 3–5.
- [272] M. Estrada, Primary production in the northwestern Mediterranean, *Sci. Mar.* 60 (1996) 55–64.
- [273] S.Y. Maestrini, C. Béchemin, D. Grzebyk, C. Hummert, Phosphorus limitation might promote more toxin content in the marine invader dinoflagellate *Alexandrium minutum*, *Plankt. Biol. Ecol.* 47 (2000) 7–11.
- [274] E.H. John, K.J. Flynn, Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): The effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels, *Eur. J. Phycol.* 35 (2000) 11–23. <https://doi.org/10.1080/09670260010001735581>.
- [275] M. Han, H. Lee, D.M. Anderson, B. Kim, Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures, *Mar. Pollut. Bull.* 104 (2016) 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.057>.
- [276] A.A. Corcoran, B. Richardson, L.J. Flewelling, Effects of nutrient-limiting supply ratios on toxin content of *Karenia brevis* grown in continuous culture, *Harmful Algae*. 39 (2014) 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.009>.
- [277] D.R. Hardison, W.G. Sunda, D. Shea, R.W. Litaker, Increased Toxicity of *Karenia brevis* during Phosphate Limited Growth: Ecological and Evolutionary Implications, *PLoS One*. 8 (2013) e58545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058545>.
- [278] D.C. Blanchard, L.D. Syzdek, Water-to-Air Transfer and Enrichment of Bacteria in Drops from Bursting Bubbles, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 1001–1005. <https://doi.org/10.1128/aem.43.5.1001-1005.1982>.
- [279] P.S. Liss, R.A. Duce, Preface. In *The Sea Surface and Global Change*, UK: Cambridge, Univ. Pres, Cambridge, 1997.
- [280] K.A. Hunter, Chemistry of the sea-surface microlayer, in: P.S. Liss, R.A.

- Duce (Eds.), *Sea Surf. Glob. Chang.*, UK: Cambridge, Univ. Pres, Cambridge, **1997**: pp. 287–320.
- [281] M. John Sieburth, P.J. Willis, K.M. Johnson, C.M. Burney, D.M. Lavoie, K.R. Hinga, D.A. Caron, F.W. French, P.W. Johnson, P.G. Davis, Dissolved organic matter and heterotrophic microneuston in the surface microlayers of the North Atlantic, *Science* (80-.). 194 (**1976**) 1415–1418. <https://doi.org/10.1126/science.194.4272.1415>.
- [282] J.Y. Aller, M.R. Kuznetsova, C.J. Jahns, P.F. Kemp, The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols, *J. Aerosol Sci.* 36 (**2005**) 801–812. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2004.10.012>.
- [283] D.C.O. Thornton, S.D. Brooks, J. Chen, Protein and carbohydrate exopolymer particles in the sea surface microlayer (SML), *Front. Mar. Sci.* 3 (**2016**) 135. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00135>.
- [284] M. Cunliffe, A. Engel, S. Frka, B.Ž. Gašparović, C. Guitart, J.C. Murrell, M. Salter, C. Stolle, R. Upstill-Goddard, O. Wurl, Sea surface microlayers: A unified physicochemical and biological perspective of the air-ocean interface, *Prog. Oceanogr.* 109 (**2013**) 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2012.08.004>.
- [285] A.R.J. Curson, J.D. Todd, M.J. Sullivan, A.W.B. Johnston, Catabolism of dimethylsulphonioacetate: Microorganisms, enzymes and genes, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (**2011**) 849–859. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2653>.
- [286] K.W. Tang, P.T. Visscher, H.G. Dam, DMSP-consuming bacteria associated with the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana), *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 256 (**2001**) 185–198. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00314-2).
- [287] J.D. Todd, A.R.J. Curson, M.J. Sullivan, M. Kirkwood, W.B. Johnston Andrew, The *Ruegeria pomeroyi* *acuI* gene has a role in DMSP catabolism and resembles *yhdH* of *E. coli* and other bacteria in conferring resistance to acrylate, *PLoS One.* 7 (**2012**) e35947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035947>.
- [288] C. Arsene, I. Barnes, R.I. Olariu, K.H. Becker, Dimethyl sulphide photo-oxidation at various NO₂ concentrations. 1.Product study and mechanistic investigation, *Rev. Roum. Chim.* 50 (**2005**) 359–369.
- [289] I. Barnes, J. Hjorth, N. Mihalopoulos, Dimethyl Sulfide and Dimethyl Sulfoxide and Their Oxidation in the Atmosphere, *Chem. Rev.* 106 (**2006**) 940–975. <https://doi.org/10.1021/cr020529>.
- [290] P.S. Liss, A.D. Hatton, G. Malin, P.D. Nightingale, S.M. Turner, Marine sulphur emissions, *Philos. Trans. R. Soc. B.* 352 (**1997**) 159–168. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0011>.

- [291] M.T. Woodhouse, G.W. Mann, O. Boucher, Sensitivity of cloud condensation nuclei to regional changes in dimethyl-sulphide emissions, *Atmos. Chem. Phys.* 13 (2013) 2723–2733. <https://doi.org/10.5194/acp-13-2723-2013>.
- [292] K.J. Mayer, X. Wang, M. V Santander, B.A. Mitts, J.S. Sauer, C.M. Sultana, C.D. Cappa, K.A. Prather, Secondary Marine Aerosol Plays a Dominant Role over Primary Sea Spray Aerosol in Cloud Formation, *ACS Cent. Sci.* 6 (2020) 2259–2266. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00793>.
- [293] M.C. Facchini, M. Rinaldi, S. Decesari, C. Carbone, E. Finessi, M. Mircea, S. Fuzzi, D. Ceburnis, R. Flanagan, E.D. Nilsson, G. de Leeuw, M. Martino, J. Woeltjen, C.D. O’Dowd, Primary submicron marine aerosol dominated by insoluble organic colloids and aggregates, *Geophys. Res. Lett.* 35 (2008) L17814. <https://doi.org/10.1029/2008GL034210>.
- [294] S. Decesari, E. Finessi, M. Rinaldi, M. Paglione, S. Fuzzi, E.G. Stephanou, T. Tziaras, A. Spyros, D. Ceburnis, C.D. O’Dowd, M. Dall’osto, R.M. Harrison, J. Allan, H. Coe, M.C. Facchini, Primary and secondary marine organic aerosols over the North Atlantic Ocean during the MAP experiment, *J. Geophys. Res. Atmos.* 116 (2011) D22210. <https://doi.org/10.1029/2011JD016204>.
- [295] A.A. Frossard, L.M. Russell, S.M. Burrows, S.M. Elliott, T.S. Bates, P.K. Quinn, Sources and composition of submicron organic mass in marine aerosol particles, *J. Geophys. Res. Atmos.* 119 (2014) 12977–13003. <https://doi.org/10.1002/2014JD021913>. Received.
- [296] Y. Su, W. Wang, W. Wang, L. Zhai, X. Shen, J. Xu, Z. Li, Re-evaluation of BioSampler and its improvement for on-line, time-resolved monitoring of environmental coarse aerosol, *Atmos. Environ.* 225 (2020) 117249. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117249>.
- [297] X. Lin, T. Reponen, K. Willeke, Z. Wang, S.A. Grinshpun, M. Trunov, Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection, *Aerosol Sci. Technol.* 32 (2000) 184–196. <https://doi.org/10.1080/027868200303722>.
- [298] S. Zhou, F. Guo, C. Chao, S. Yoon, S.L. Alvarez, S. Shrestha, J.H. Flynn, S. Usenko, R.J. Sheesley, R.J. Griffin, Marine Submicron Aerosols from the Gulf of Mexico: Polluted and Acidic with Rapid Production of Sulfate and Organosulfates, *Environ. Sci. Technol.* 57 (2023) 5149–5159. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05469>.
- [299] J. Ovadnevaite, C. O’Dowd, M. Dall’Osto, D. Ceburnis, D.R. Worsnop, H. Berresheim, Detecting high contributions of primary organic matter to marine aerosol: A case study, *Geophys. Res. Lett.* 38 (2011) L02807. <https://doi.org/10.1029/2010GL046083>.
- [300] V.Z. Berta, L.M. Russell, D.J. Price, C.L. Chen, A.K.Y. Lee, P.K. Quinn, T.S.

- Bates, T.G. Bell, M.J. Behrenfeld, Non-volatile marine and non-refractory continental sources of particle-phase amine during the North Atlantic Aerosols and Marine Ecosystems Study (NAAMES), *Atmos. Chem. Phys.* 23 (2023) 2765–2787. <https://doi.org/10.5194/acp-23-2765-2023>.
- [301] M. Dall'Osto, J. Ovadnevaite, M. Paglione, D.C.S. Beddows, D. Ceburnis, C. Cree, P. Cortés, M. Zamanillo, S.O. Nunes, G.L. Pérez, E. Ortega-Retuerta, M. Emelianov, D. Vaqué, C. Marrasé, M. Estrada, M.M. Sala, M. Vidal, M.F. Fitzsimons, R. Beale, R. Airs, M. Rinaldi, S. Decesari, M.C. Facchini, R.M. Harrison, C. O'Dowd, R. Simó, Antarctic sea ice region as a source of biogenic organic nitrogen in aerosols, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06188-x>.
- [302] A. Loh, D. Kim, J.G. An, N. Choi, U.H. Yim, Chemical characterization of sub-micron aerosols over the East Sea (Sea of Japan), *Sci. Total Environ.* 856 (2023) 159173. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159173>.
- [303] M.C.G. Chalbot, J. Brown, P. Chitranshi, G. Gamboa Da Costa, E.D. Pollock, I.G. Kavouras, Functional characterization of the water-soluble organic carbon of size-fractionated aerosol in the southern Mississippi Valley, *Atmos. Chem. Phys.* 14 (2014) 6075–6088. <https://doi.org/10.5194/acp-14-6075-2014>.
- [304] K. Sem, M. Jang, R. Pierce, P. Blum, Z. Yu, Characterization of Atmospheric Processes of Brevetoxins in Sea Spray Aerosols from Red Tide Events, *Environ. Sci. Technol.* 56 (2022) 1811–1819. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05740>.
- [305] L.C. Backer, W. Carmichael, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.-S. Cheng, Recreational Exposure to Low Concentrations of Microcystins During an Algal Bloom in a Small Lake, *Mar. Drugs.* 6 (2008) 389–406. <https://doi.org/10.3390/md20080018>.
- [306] L.C. Backer, S. V. McNeel, T. Barber, B. Kirkpatrick, C. Williams, M. Irvin, Y. Zhou, T.B. Johnson, K. Nierenberg, M. Aubel, R. LePrell, A. Chapman, A. Foss, S. Corum, V.R. Hill, S.M. Kieszak, Y.S. Cheng, Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes, *Toxicon.* 55 (2010) 909–921. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.006>.
- [307] S.A. Wood, D.R. Dietrich, Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 1617–1624. <https://doi.org/10.1039/c1em10102a>.
- [308] L.C. Backer, B. Kirkpatrick, L.E. Fleming, Y.S. Cheng, R. Pierce, J.A. Bean, R. Clark, D. Johnson, A. Wanner, R. Tamer, Y. Zhou, D.G. Baden, Occupational Exposure to Aerosolized Brevetoxins during Florida Red Tide Events: Effects on a Healthy Worker Population, *Environ. Health Perspect.*

- 113 (2005) 644–649. <https://doi.org/10.1289/ehp.7502>.
- [309] S. Yu, X. Zhou, P. Hu, H. Chen, F. Shen, C. Yu, Inhalable particle-bound marine biotoxins in a coastal atmosphere: Concentration levels, influencing factors and health risks, *J. Hazard. Mater.* 434 (2022) 128925. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128925>.
- [310] B. Kirkpatrick, R. Pierce, Y.S. Cheng, M.S. Henry, P. Blum, S. Osborn, K. Nierenberg, B.A. Pederson, L.E. Fleming, A. Reich, J. Naar, G. Kirkpatrick, L.C. Backer, D. Baden, Inland transport of aerosolized Florida red tide toxins, *Harmful Algae.* 9 (2010) 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.09.003>.
- [311] S.S. Patel, V.J. Lovko, R.F. Lockey, Red Tide: Overview and Clinical Manifestations, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 8 (2020) 1219–1223. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.10.030>.
- [312] B. Kirkpatrick, L.E. Fleming, J.A. Bean, K. Nierenberg, L.C. Backer, Y.S. Cheng, R. Pierce, A. Reich, J. Naar, A. Wanner, W.M. Abraham, Y. Zhou, J. Hollenbeck, D.G. Baden, Aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma: Continued health effects after 1h beach exposure, *Harmful Algae.* 10 (2011) 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.08.005>.
- [313] G. Sansoni, B. Borghini, G. Camici, M. Casotti, P. Righini, C. Rustighi, Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente, *Biol. Ambient.* 17 (2003) 17–23.
- [314] O. Wurl, E. Wurl, L. Miller, K. Johnson, S. Vagle, Formation and global distribution of sea-surface microlayers, *Biogeosciences.* (2011) 121–135. <https://doi.org/10.5194/bg-8-121-2011>.
- [315] K. Azetsu-scott, U. Passow, Ascending marine particles: Significance of transparent exopolymer particles (TEP) in the upper ocean, *Limnol. Oceanogr.* 49 (2004) 741–748. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.3.0741>.
- [316] U. Passow, A.L. Alldredge, Aggregation of a diatom bloom in a mesocosm: The role of transparent exopolymer particles (TEP), *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 42 (1995) 99–109. [https://doi.org/10.1016/0967-0645\(95\)00006-C](https://doi.org/10.1016/0967-0645(95)00006-C).
- [317] M. Dall’Osto, D. Vaqué, A. Sotomayor-Garcia, M. Cabrera-Brufau, M. Estrada, T. Buchaca, M. Soler, S. Nunes, S. Zeppenfeld, M. van Pinxteren, H. Herrmann, H. Wex, M. Rinaldi, M. Paglione, D.C.S. Beddows, R.M. Harrison, E. Berdalet, Sea Ice Microbiota in the Antarctic Peninsula Modulates Cloud-Relevant Sea Spray Aerosol Production, *Front. Mar. Sci.* 9 (2022) 827061. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.827061>.
- [318] A.L. Alldredge, U. Passow, S.H.D. Haddock, The characteristics and transparent exopolymer particle (TEP) content of marine snow formed from thecate dinoflagellates, *J. Plankton Res.* 20 (1998) 393–406.

- <https://doi.org/10.1093/plankt/20.3.393>.
- [319] T. Berman, Y. Viner-Mozzini, Abundance and characteristics of polysaccharide and proteinaceous particles in Lake Kinneret, *Aquat. Microb. Ecol.* 24 (2001) 255–264. <https://doi.org/10.3354/ame024255>.
- [320] M.A.J. Curran, G.B. Jones, Spatial distribution of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in the Australasian sector of the Southern Ocean, *J. Geophys. Res.* 103 (1998) 16677–16689. <https://doi.org/10.1029/97JD03453>.
- [321] A.G. Howard, D.W. Russell, An alternative approach to the measurements of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and other precursors of dimethylsulfide, in: R.P. Kiene, P.T. Visscher, M.D. Keller, G.O. Kirst (Eds.), *Biol. Environ. Chem. DMSP Relat. Sulfonium Compd.*, Plenum Press, New York, 1996: pp. 65–73.
- [322] L.A. MacKenzie, *In situ* passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.013>.



ANEXOS



Tabla A1a. Base de datos de las proliferaciones 2018. Fecha de muestreo (mes/día/año), abundancia celular bentónica (Ab. Cel. cél. gPF⁻¹) y planctónica (Ab. Cel. cél. L⁻¹) y concentración de toxina celular (pg_{tox} cél.⁻¹). La concentración de toxina celular es aquella determinada a partir de las muestras bentónicas. Las desviaciones estándares (debido a los duplicados) de cada concentración de toxina se pueden observar en la Figura 1 del Artículo #3. Nd: no detectado.

Fecha	Concentración de toxina celular (pg _{tox} cél. ⁻¹)														Toxina total			
	Ab. Cel. (cél. gPF ⁻¹)	Ab. Cel. (cél. L ⁻¹)	OVTX -a	OVTX -b	OVTX -c	OVTX -d	OVTX -e	OVTX -f	OVTX -g	Iso-PLTX	OVTX -g	OVTX -f	OVTX -e	OVTX -d		OVTX -c	OVTX -b	OVTX -a
6/21/18	1,09×10 ²	8,00×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7/5/18	4,84×10 ²	2,00×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7/10/18	6,40×10 ⁴	1,08×10 ³	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7/20/18	1,62×10 ⁵	1,48×10 ⁴	28,06	9,20	1,17	2,64	1,17	1,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	42,24
7/24/18	8,02×10 ⁵	1,95×10 ⁵	20,61	6,07	0,67	1,46	1,32	1,32	0,19	0,15	0,09	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	30,57
7/27/18	2,51×10 ⁶	5,64×10 ⁴	15,83	4,76	0,50	1,16	1,34	1,34	nd	0,10	0,18	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	23,88
8/1/18	8,21×10 ⁵	3,24×10 ³	38,97	12,77	1,15	2,39	2,18	2,18	nd	nd	0,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	57,64
8/8/18	4,66×10 ⁴	7,20×10 ²	9,56	4,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13,87
8/21/18	5,36×10 ⁵	4,42×10 ³	16,22	5,77	0,62	0,90	0,34	0,34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,86
8/28/18	8,65×10 ³	5,25×10 ⁴	20,62	8,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,69
9/13/18	1,72×10 ⁵	4,14×10 ³	22,64	9,01	1,33	1,35	0,44	0,44	0,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	35,20
10/3/18	5,70×10 ⁴	7,60×10 ²	15,12	6,55	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21,67
11/7/18	2,74×10 ³	2,00×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla A1b. Base de datos de las proliferaciones 2018. Fecha de muestreo (mes/día/año), temperatura del agua in situ (T, °C), salinidad (S), concentración de clorofila (Chl, $\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), silicato (SiO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}), nitrógeno total (TN) y fósforo total (TP). Todas las concentraciones de los nutrientes se dan en unidad de μM .

Fecha	T	S	Chl	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	SiO_2^-	PO_4^{3-}	TN	TP
6/21/18	22,9	35,6	0,33	52,06	0,19	1,12	2,42	0,10	63,34	0,23
7/5/18	23,5	37,4	0,68	1,01	0,09	2,78	0,61	0,07	10,83	0,21
7/10/18	25,0	36,5	0,45	22,12	0,10	2,08	1,63	0,04	35,17	0,23
7/20/18	26,7	36,9	0,65	1,34	0,06	1,55	0,49	0,05	12,63	0,20
7/24/18	26,0	37,0	10,92	3,41	0,08	0,67	1,03	0,10	16,43	0,27
7/27/18	24,5	37,1	4,41	0,32	0,07	0,98	0,67	0,08	12,64	0,32
8/1/18	25,7	37,4	0,49	1,79	0,20	1,43	0,57	0,12	13,83	0,25
8/8/18	26,3	37,2	0,92	5,48	0,23	0,42	1,18	0,05	17,10	0,10
8/21/18	25,6	37,7	0,42	0,22	0,05	0,30	0,72	0,03	9,73	0,12
8/28/18	27,4	37,2	3,81	7,66	0,28	0,82	1,04	0,11	19,34	0,26
9/13/18	25,3	37,9	1,67	2,95	0,13	0,51	0,58	0,06	15,23	0,17
10/3/18	22,7	37,8	1,81	1,41	0,13	0,23	0,93	0,05	10,62	0,08
11/7/18	18,0	37,6	1,41	4,61	0,21	0,44	2,80	0,11	13,72	0,16

Tabla A2a. Base de datos de las proliferaciones 2019. Fecha de muestreo (mes/día/año), abundancia celular bentónica (Ab. Cel, cél. gPF⁻¹) y planctónica (Ab. Cel, cél. L⁻¹) y concentración de toxina celular (pg_{tox} cél.⁻¹). La concentración de toxina celular es aquella determinada a partir de las muestras bentónicas. Las desviaciones estándares (debido a los duplicados) de cada concentración de toxina y abundancia celular se pueden observar en la Figura 5 del Artículo #1. Nd: no detectado.

Fecha	Ab. Cel. (cél. gPF ⁻¹)	Ab. Cel. (cél. L ⁻¹)	Concentración de toxina celular (pg _{tox} cél. ⁻¹)														
			OVTX -a	OVTX -b	OVTX -c	OVTX -d	OVTX -e	OVTX -f	OVTX -g	Iso-PLTX	OVTX	OVTX	OVTX	Toxina total			
6/19/19	6,16×10 ⁰	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6/27/19	1,41×10 ¹	2,00×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7/2/19	1,82×10 ²	6,00×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7/9/19	2,08×10 ⁴	2,80×10 ²	0,88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,88
7/16/19	7,52×10 ⁴	5,80×10 ²	2,58	1,30	0,05	0,31	0,26	0,26	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	4,54
7/23/19	6,31×10 ⁵	2,32×10 ³	4,29	2,43	0,25	0,57	0,45	0,45	0,09	0,09	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	8,20
7/30/19	1,08×10 ⁶	6,04×10 ³	9,09	3,62	0,44	1,24	1,35	1,35	0,12	0,12	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	16,00
8/6/19	9,53×10 ⁵	7,56×10 ⁴	9,26	3,74	0,49	1,26	1,07	1,07	0,15	0,15	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,04	16,23
8/20/19	2,21×10 ⁵	1,50×10 ³	6,97	3,19	0,42	0,77	0,62	0,62	0,18	0,18	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	12,36
9/3/19	9,16×10 ⁵	3,82×10 ³	4,65	2,21	0,25	0,56	0,48	0,48	0,06	0,06	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,01	8,37
9/17/19	1,77×10 ⁵	1,12×10 ³	4,89	2,17	0,20	0,54	0,47	0,47	nd	nd	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	nd	8,34
10/8/19	7,07×10 ⁴	3,20×10 ²	12,08	4,65	0,38	1,04	0,98	0,98	0,11	0,11	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	19,29
11/7/19	3,42×10 ³	1,20×10 ²	10,62	2,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,67

Tabla A2b. Base de datos de las proliferaciones 2019. Fecha de muestreo (mes/día/año), temperatura del agua in situ (T, °C), salinidad (S), concentración de clorofila (Chl, $\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), silicato (SiO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}), nitrógeno total (TN) y fósforo total (TP). Todas las concentraciones de los nutrientes se dan en unidad de μM .

Fecha	T	S	Chl	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	SiO_2^-	PO_4^{3-}	TN	TP
6/19/19	19,7	37,6	0,41	0,42	0,05	0,26	0,60	0,01	17,04	0,07
6/27/19	23,3	37,9	0,20	0,68	0,08	0,21	0,63	0,01	18,95	0,03
7/2/19	25,7	37,7	0,64	35,13	0,11	0,44	2,67	0,04	65,30	0,05
7/9/19	20,6	37,7	1,89	3,02	0,07	0,21	0,68	0,04	22,13	0,06
7/16/19	24,8	37,8	1,49	1,32	0,09	0,20	0,60	0,02	19,26	0,07
7/23/19	26,3	37,8	0,14	3,75	0,37	6,80	0,90	0,28	35,15	0,34
7/30/19	27,1	37,8	1,03	8,22	0,68	4,23	1,30	0,24	37,91	0,35
8/6/19	26,9	37,7	3,68	3,91	0,28	1,18	1,01	0,09	24,52	0,13
8/20/19	25,9	38,1	2,02	0,67	0,11	0,43	0,76	0,06	19,64	0,16
9/3/19	26,8	37,9	0,66	19,64	0,17	0,39	1,82	0,05	34,73	0,08
9/17/19	23,6	38,1	1,16	2,42	0,10	0,30	0,95	0,03	20,16	0,09
10/8/19	21,8	37,7	0,66	2,47	0,43	1,48	0,98	0,03	18,66	0,08
11/7/19	17,3	38,2	0,93	3,45	0,15	0,36	1,49	0,11	20,57	0,13

Tabla A3a. Base de datos de las proliferaciones 2020. Fecha de muestreo (mes/día/año), abundancia celular bentónica (Ab. Cel, cél. gPF⁻¹) y planctónica (Ab. Cel, cél. L⁻¹) y concentración de toxina celular (pg_{tox} cél.⁻¹). La concentración de toxina celular es aquella determinada a partir de las muestras bentónicas. Las desviaciones estándares (debido a los duplicados) de la abundancia celular se pueden observar en la Figura 1 del Artículo #5. Nd: no detectado.

Fecha	Ab. Cel. (cél. gPF ⁻¹)	Ab. Cel. (cél. L ⁻¹)	Concentración de toxina celular (pg _{tox} cél. ⁻¹)											Toxina total	
			OVTX -a	OVTX -b	OVTX -c	OVTX -d	OVTX -e	OVTX -f	OVTX -g	Iso-PLTX					
6/15/20	6,15×10 ²	6,00×10 ¹	13,85	8,40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22,25
6/29/20	1,54×10 ⁵	1,64×10 ³	8,00	2,70	0,40	0,91	0,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12,61
7/6/20	8,88×10 ⁵	2,34×10 ³	9,06	3,33	0,24	0,67	0,46	0,07	0,07	0,09	0,06	0,06	0,06	0,06	13,97
7/13/20	2,49×10 ⁶	6,94×10 ³	5,96	5,28	0,42	1,12	0,93	0,13	0,13	0,13	0,07	0,13	0,13	0,07	14,04
7/15/20	2,30×10 ⁶	7,56×10 ³	5,62	4,21	0,27	0,71	0,61	0,10	0,10	0,10	0,15	0,15	0,05	0,05	11,73
7/20/20	2,82×10 ⁶	3,42×10 ⁴	6,86	4,68	0,53	1,33	1,18	1,18	0,10	0,10	0,14	0,14	0,09	0,09	14,92
7/22/20	2,89×10 ⁶	7,86×10 ³	5,49	3,54	0,65	1,44	1,19	1,19	0,13	0,13	0,21	0,21	0,09	0,09	12,73
7/27/20	2,92×10 ⁶	7,02×10 ³	5,39	3,71	0,53	1,19	1,13	1,13	0,14	0,14	0,20	0,20	0,08	0,08	12,37
7/29/20	1,73×10 ⁶	4,68×10 ³	7,93	5,74	0,48	1,15	1,10	1,10	0,20	0,20	0,25	0,25	0,08	0,08	16,94
8/5/20	1,33×10 ⁶	7,60×10 ²	7,09	5,16	0,60	1,40	1,24	1,24	0,14	0,14	0,22	0,22	0,10	0,10	15,96
8/12/20	2,10×10 ⁶	1,35×10 ⁴	8,54	7,07	0,89	1,81	1,64	1,64	0,20	0,20	0,34	0,34	0,12	0,12	20,61
9/14/20	9,67×10 ⁴	1,80×10 ²	8,12	3,15	0,50	0,91	0,72	0,72	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13,41

Tabla A3b. Base de datos de las proliferaciones 2020. Fecha de muestreo (mes/día/año), temperatura del agua in situ (T, °C), salinidad (S), concentración de clorofila (Chl, $\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), silicato (SiO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}), nitrógeno total (TN) y fósforo total (TP). Todas las concentraciones de los nutrientes se dan en unidad de μM .

Fecha	T	S	Chl	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	SiO_2^-	PO_4^{3-}	TN	TP
6/15/20	21,3	37,0	0,36	-	-	-	-	-	-	-
6/29/20	25,8	36,8	2,21	9,84	0,19	1,25	0,83	0,21	22,09	0,32
7/6/20	25,8	37,1	0,61	1,70	0,16	0,72	1,11	0,04	15,81	0,13
7/13/20	26,2	37,2	0,74	4,81	0,25	0,63	1,44	0,04	13,70	0,21
7/15/20	26,0	37,7	0,78	7,72	0,29	0,31	1,78	0,05	14,28	0,27
7/20/20	23,8	37,4	2,70	9,57	0,26	0,70	1,65	0,05	18,91	0,25
7/22/20	24,1	37,5	0,82	5,93	0,13	0,67	0,71	0,05	25,52	0,14
7/27/20	26,3	37,7	0,73	4,60	0,14	1,08	0,64	0,13	13,70	0,20
7/29/20	26,5	37,8	1,28	4,20	0,11	0,56	0,82	0,05	13,26	0,13
8/5/20	26,6	37,9	0,42	3,14	0,14	1,00	0,79	0,04	14,16	0,22
8/12/20	26,4	38,0	3,26	6,84	0,29	0,90	1,13	0,08	14,38	0,25
9/14/20	24,4	36,8	0,55	4,78	0,19	0,48	0,87	0,04	-	0,58

-: No hay datos.

Tabla A4a, Base de datos de las proliferaciones 2021. Fecha de muestreo (mes/día/año), abundancia celular bentónica (Ab. Cel. cél. gPF⁻¹) y planctónica (Ab. Cel., cél. L⁻¹) y concentración de toxina celular (pg_{tox} cél.⁻¹). La concentración de toxina celular es aquella determinada a partir de las muestras bentónicas, Las desviaciones estándares (debido a los duplicados) de cada concentración de toxina se pueden observar en la Figura 1 del Artículo #5. Nd: no detectado.

Fecha	Concentración de toxina celular (pg _{tox} cél. ⁻¹)														Toxina total
	Ab. Cel. (cél. gPF ⁻¹)	Ab. Cel. (cél. L ⁻¹)	OVTX -a	OVTX -b	OVTX -c	OVTX -d	OVTX -e	OVTX -f	OVTX -g	Iso-PLTX					
5/18/21	6,80×10 ¹	1,00×10 ²	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5/31/21	6,50×10 ⁰	1,20×10 ²	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6/7/21	2,43×10 ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6/14/21	8,94×10 ¹	nd	37,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	37,25
6/21/21	1,46×10 ²	4,00×10 ¹	32,93	29,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	62,81
6/28/21	1,08×10 ²	2,00×10 ¹	50,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	50,66
7/5/21	2,06×10 ³	1,40×10 ²	6,89	4,44	3,21	3,30	3,24	3,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21,09
7/14/21	8,07×10 ⁴	5,20×10 ²	10,80	3,42	0,39	0,89	0,59	0,59	0,13	0,19	0,12	0,19	0,19	0,12	16,53
7/19/21	4,24×10 ⁵	3,41×10 ⁴	9,36	3,84	0,10	0,73	0,44	0,44	0,07	0,11	0,05	0,11	0,11	0,05	14,69
7/21/21	4,86×10 ⁵	1,72×10 ⁴	18,02	6,17	0,46	0,73	0,34	0,34	0,10	0,18	0,07	0,18	0,18	0,07	26,07
7/26/21	5,88×10 ⁵	3,27×10 ⁴	16,62	5,46	0,74	1,52	1,23	1,23	0,16	0,29	0,08	0,29	0,29	0,08	26,11
7/28/21	1,40×10 ⁶	1,03×10 ⁵	13,33	5,59	0,56	1,22	1,09	1,09	0,19	0,31	0,13	0,31	0,31	0,13	22,41
8/2/21	1,19×10 ⁶	7,38×10 ⁴	27,94	11,88	0,91	2,10	1,94	1,94	0,34	0,49	0,22	0,49	0,49	0,22	45,82
8/9/21	5,00×10 ⁵	2,16×10 ⁴	37,68	17,41	1,17	2,22	2,41	2,41	0,57	0,73	0,44	0,73	0,73	0,44	62,63
8/30/21	3,23×10 ⁵	2,26×10 ³	16,12	5,52	0,75	1,10	1,08	1,08	0,55	0,60	0,52	0,60	0,60	0,52	26,24
9/20/21	3,44×10 ⁵	3,74×10 ³	20,83	11,13	0,81	1,29	1,26	1,26	0,45	0,54	0,39	0,54	0,54	0,39	36,70

Tabla A4b. Base de datos de las proliferaciones 2021. Fecha de muestreo (mes/día/año), temperatura del agua in situ (T, °C), salinidad (S), concentración de clorofila (Chl, $\mu\text{g L}^{-1}$), concentración de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), silicato (SiO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}), nitrógeno total (TN) y fósforo total (TP). Todas las concentraciones de los nutrientes se dan en unidad de μM . Nota: En 2021, el conductímetro dio valores excesivamente bajos de salinidad, que no correspondían al rango medido en la zona de estudio. Por ello no se recopilaron.

Fecha	T	Chl	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	SiO_2^-	PO_4^{3-}	TN	TP
5/18/21	15,7	0,79	13,94	0,68	1,42	2,13	0,17	16,56	0,27
5/31/21	20,1	0,37	21,43	0,82	2,56	2,28	0,23	27,79	0,34
6/7/21	22,3	1,32	8,03	0,58	0,52	0,73	0,05	24,94	0,24
6/14/21	22,0	0,87	12,12	0,42	0,86	1,63	0,08	17,98	0,41
6/21/21	19,1	1,02	2,93	0,14	0,32	0,70	0,03	14,98	0,40
6/28/21	22,0	0,53	3,24	0,14	0,32	0,72	0,04	13,94	0,24
7/5/21	24,5	0,46	2,99	0,12	0,17	0,99	0,06	34,43	0,27
7/14/21	24,9	0,39	3,13	0,11	0,25	0,97	0,06	13,59	0,26
7/19/21	25,0	1,48	3,38	0,22	0,18	1,05	0,06	29,99	0,22
7/21/21	24,4	1,41	4,84	0,41	1,65	1,10	0,22	12,34	0,25
7/26/21	26,0	2,26	5,06	0,28	0,50	1,19	0,08	15,40	0,25
7/28/21	25,8	5,32	1,45	0,16	0,37	1,01	0,05	18,43	0,22
8/2/21	25,0	5,20	2,50	0,12	0,55	0,69	0,06	16,31	0,27
8/9/21	25,3	2,14	3,71	0,41	6,48	1,37	0,09	25,18	0,25
8/30/21	25,3	0,82	21,23	0,59	0,47	1,01	0,04	31,25	0,31
9/20/21	23,5	0,77	3,91	0,10	0,80	0,91	0,04	12,76	0,27