



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



INFLUENCIA DE BACTERIAS EN LA
GERMINACIÓN, COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y
CRECIMIENTO DEL DINOFLAGELADO TÓXICO
Gymnodinium catenatum (Graham, 1943)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA
DULCE VALERIA RAMÍREZ RODRÍGUEZ

LA PAZ, B.C.S., ENERO DE 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 06 del mes de Diciembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"INFLUENCIA DE BACTERIAS EN LA GERMINACIÓN, COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y CRECIMIENTO DEL DINOFLAGELADO TÓXICO Gymnodinium catenatum (GRAHAM, 1943)"

Presentada por el alumno:

RAMÍREZ

RODRÍGUEZ

DULCE VALERIA

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro: A 1 6 0 9 9 8

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT
Directora de Tesis

DR. JOSÉ JESÚS BUSTILLOS GUZMÁN
2º. Director de Tesis

DRA. CLAUDIA HERNÁNDEZ GUERRERO

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

DR. DAVID JAVIER LÓPEZ CORTÉS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 08 del mes de Diciembre del año 2017

El (la) que suscribe BM. DULCE VALERIA RAMÍREZ RODRÍGUEZ Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A160998 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT Y DR. JOSÉ JESÚS BUSTILLOS GUZMÁN

y cede los derechos del trabajo titulado:

"INFLUENCIA DE BACTERIAS EN LA GERMINACIÓN, COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

Y CRECIMIENTO DE DINAFLAGELADO TÓXICO *Gymnodinium catenatum* /GRAHAM, 1943)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: dulval01@gmail.com - ciband@yahoo.com - jose04@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. DULCE VALERIA RAMÍREZ RODRÍGUEZ

Nombre y firma del alumno

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ

Dirección

Dra. Christine Johana Band Schmidt

IPN-Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas

Dr. José Jesús Bustillos Guzmán

Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C.

Comité tutorial, revisor y sinodal

Dr. David Javier López Cortés

Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C.

Dra. Bárbara González Acosta

IPN-Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas

Dra. Claudia Judith Hernández
Guerrero

IPN-Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas

Jurado suplente

Dr. Mauricio Muñoz Ochoa

IPN-Centro Interdisciplinario de
Ciencias Marinas

ÍNDICE GENERAL

Página

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
III.	JUSTIFICACIÓN	16
IV.	HIPÓTESIS	17
V.	OBJETIVOS	18
	5.1. <i>Objetivo general</i>	18
	5.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	6.1. <i>Cepas</i>	19
	6.2. <i>Medio de cultivo</i>	19
	6.3. <i>Condiciones de cultivo</i>	20
	6.4. <i>Sorting celular acoplado a citometría de flujo</i>	20
	6.5. <i>Identificación molecular de las poblaciones de bacterias</i>	21
	6.5.1. <i>Extracción de ADN</i>	21
	6.5.2. <i>Amplificación de ADN mediante PCR</i>	22
	6.5.3. <i>Secuenciación y análisis filogenético</i>	24
	6.6. <i>Curvas de crecimiento</i>	24
	6.6.1. <i>Bacterias</i>	24
	6.6.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	26
	6.7. <i>Determinaciones bioquímicas</i>	27
	6.7.1. <i>Obtención de extractos</i>	27
	6.7.2. <i>Proteínas</i>	28
	6.7.3. <i>Carbohidratos</i>	30
	6.7.4. <i>Lípidos</i>	31
	6.8. <i>Determinación de pigmentos</i>	33
	6.9. <i>Determinación del perfil de toxinas paralizantes</i>	34
	6.10. <i>Asociación entre Gymnodinium catenatum y bacterias</i>	35
	6.11. <i>Influencia de las bacterias en la germinación de quistes de Gymnodinium catenatum</i>	37
	6.11.1. <i>Inducción al proceso sexual entre las cepas BAPAZ 7 y 62L</i>	37
	6.11.2. <i>Aislamiento y esterilización de quistes</i>	37

6.11.3. Inoculación de bacterias	38
6.11.4. Cambios en el perfil de toxinas paralizantes	39
6.12. <i>Análisis estadísticos</i>	39
VII. RESULTADOS	40
7.1. <i>Sorting celular</i>	40
7.2. <i>Identificación molecular de las poblaciones de bacterias</i>	44
7.3. <i>Curvas de crecimiento</i>	47
7.3.1. Bacterias	47
7.3.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	50
7.4. <i>Formación de cadenas celulares</i>	52
7.5. <i>Determinación de metabolitos</i>	56
7.5.1. Bacterias	56
7.5.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	57
7.6. <i>Perfil de pigmentos</i>	62
7.6.1. Bacterias	62
7.6.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	64
7.7. <i>Perfil de toxinas paralizantes</i>	67
7.8. <i>Toxicidad</i>	70
7.9. <i>Asociación Gymnodinium catenatum y bacterias</i>	73
7.9.1. Biomasa máxima.....	73
7.9.2. Tasa de crecimiento	74
7.9.3. Tiempo de generación	75
7.9.4. Longitud de cadenas	76
7.9.5. Producción de metabolitos.....	78
7.9.6. Pigmentos fotosintéticos	80
7.9.7. Toxinas paralizantes.....	82
7.9.8. Toxicidad	84
7.10. <i>Influencia de las bacterias en la germinación de quistes de Gymnodinium catenatum</i>	85
7.10.1. Inducción al proceso sexual	85
7.10.2. Aislamiento y esterilización de quistes.....	87
7.10.3. Inoculación de bacterias	87
7.10.4. Perfil de toxinas paralizantes	90
7.10.5. Toxicidad	93

VIII. DISCUSIÓN	96
8.1. <i>Identificación de de Alteromonas spp. y Roseovarius spp.</i>	96
8.2. <i>Curvas de crecimiento</i>	100
8.2.1. Bacterias	100
8.2.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	102
8.3. <i>Formación de cadenas celulares</i>	104
8.4. <i>Determinación de metabolitos</i>	105
8.4.1. Bacterias	105
8.4.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	106
8.5. <i>Perfil de pigmentos</i>	108
8.5.1. Bacterias	108
8.5.2. <i>Gymnodinium catenatum</i>	109
8.6. <i>Perfil de toxinas paralizantes</i>	109
8.7. <i>Toxicidad</i>	111
8.8. <i>Asociación entre Gymnodinium catenatum y bacterias</i>	112
8.9. <i>Influencia de bacterias en la germinación de quistes de Gymnodinium</i> <i>catenatum</i>	117
IX. CONCLUSIÓN	119
X. SUGERENCIAS	120
XI. LITERATURA CITADA	121

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Célula individual y cadenas del dinoflagelado planctónico <i>Gymnodinium catenatum</i> . .	4
Figura 2. Distribución global de <i>G. catenatum</i>	5
Figura 3. Diseño experimental de la cepa GCCV-7 en presencia de las bacterias VB1 y VB2 .	28
Figura 4. Esquema de la caja multipozos con los detalles respectivos a los grupos control y tratamientos de la inoculación de las bacterias en los quistes de <i>G. catenatum</i>	38
Figura 5. Citograma de la delimitación de la población de bacterias con autofluorescencia a través de citometría de flujo	41
Figura 6. Citograma de las poblaciones de bacterias teñidas con el fluorocromo Hoechst 33342 a través de citometría de flujo	42
Figura 7. Citograma post-sort de las poblaciones de bacterias aisladas.	43
Figura 8. Citograma post-sort de las poblaciones de bacterias aisladas y teñidas con el fluorocromo Hoechst 33342	44
Figura 9. Izquierda confirmación de extracción de ADN a través de geles de agarosa al 1%. .	45
Figura 10. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de <i>Gymnodinium catenatum</i>	47
Figura 11. Curva de crecimiento de la bacteria <i>a</i> en medio GSe	48
Figura 12. Curva de crecimiento de la bacteria <i>b</i> en medio GSe	49
Figura 13. Micrografía de la morfología de <i>Alteromonas</i> spp. y <i>Roseovarius</i> spp., con microscopía de epifluorescencia	50
Figura 14. Curvas de crecimiento de las tres cepas de <i>Gymnodinium catenatum</i>	51
Figura 15. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe	54
Figura 16. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa GCMV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe	55
Figura 17. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.	56
Figura 18. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.	60
Figura 19. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCMV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.	61
Figura 20. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.....	62
Figura 21. Estriado en agar.....	63
Figura 22. Cromatograma del perfil de pigmentos de <i>Alteromonas</i> spp.	63
Figura 22. Cromatograma del perfil de pigmentos de <i>Roseovarius</i> spp.....	64
Figura 23. Cromatograma base del perfil de pigmentos de <i>G. catenatum</i>	64

Figura 24. Perfil de pigmentos de la cepa GCCV-7 de <i>G. catenatum</i> .	66
Figura 25. Perfil de pigmentos de la cepa GCMV-7 de <i>G. catenatum</i> .	66
Figura 26. Perfil de pigmentos de la cepa 62L de <i>G. catenatum</i> .	67
Figura 27. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> a lo largo de la curva de crecimiento.	68
Figura 28. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCMV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> a lo largo de la curva de crecimiento.	69
Figura 29. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> a lo largo de la curva de crecimiento.	70
Figura 30. Toxicidad (pg STXeq/cél) de la cepa GCCV-7 de <i>G. catenatum</i> .	71
Figura 31. Toxicidad (pg STXeq/cél) de la cepa GCMV-7 de <i>G. catenatum</i> .	72
Figura 32. Toxicidad (pg STXeq/cél) de la cepa 62L de <i>G. catenatum</i> .	72
Figura 33. Biomasa máxima de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> inoculados con las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas en medio GSe	74
Figura 34. Tasa de crecimiento de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> inoculados con las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas en medio GSe	75
Figura 35. Tiempo de generación de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> inoculados con las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas en medio GSe	76
Figura 36. Formación de cadenas celulares de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> inoculados con las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.	77
Figura 37. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de las bacterias en medio GSe.	80
Figura 38. Perfil de pigmentos de la cepa GCCV-7 de <i>G. catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.	81
Figura 39. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.	83
Figura 40. Toxicidad (pg STXeq/cél) de la cepa GCCV-7 de <i>G. catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas. Líneas verticales: desviación estándar. * representa diferencias significativas ($p < 0.001$).	85
Figura 41. Formación de quistes de resistencia entre las cepas 62L y BAPAZ-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> .	86
Figura 42. Micrografías del proceso de germinación de quistes de las cepas 62L y BP7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.	88

Figura 43. Micrografías de comparación entre las células vegetativas de las cepas parentales 62L y BP7 y aquellas germinadas en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.....	89
Figura 44. Perfil de toxinas paralizantes de las cepas parentales y germinadas de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.....	92
Figura 45. Toxicidad (pg STXeq/cél) de las cepas parentales y germinadas de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.....	94
Figura 46. Toxicidad (pg STXeq/cél) de las cepas germinadas de <i>Gymnodinium catenatum</i> en presencia de <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Cepas de <i>G. catenatum</i> aisladas de diversas regiones del Pacífico mexicano.....	19
Tabla II. Comparación de las bacterias asociadas a la cepa G7 de <i>G. catenatum</i> con secuencias reportadas en el NCBI.....	45
Tabla III. Posición taxonómica de las bacterias aisladas de la cepa G7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> .	46
Tabla V. Porcentaje promedio de cadenas celulares y día de cultivo con mayor porcentaje de cadenas de 7 células y mayores en <i>Gymnodinium catenatum</i>	53
Tabla VI. Producción promedio de metabolitos en <i>Alteromonas</i> spp. y <i>Roseovarius</i> spp.....	57
Tabla X. Características para la identificación de los diferentes pigmentos fotosintéticos de <i>G. catenatum</i> ..	65
Tabla XI. Datos promedio del crecimiento de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> inoculados con las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas en medio GSe.....	73
Tabla XII. Cuantificación de metabolitos en la cepa GCCV-7 de <i>G. catenatum</i> en presencia de las bacterias <i>Alteromonas</i> spp., <i>Roseovarius</i> spp. y ambas.....	78

Para Jasmín, mi inspiración, poesía y fortaleza

Para Hilda, el faro que ilumina mis penumbras

Para Miguel y Romeo, por su amor siempre fiel,
comprensión y paciencia

Para quienes creen en mí y en lo que hago

Para quienes le apostaron a este sueño, sembrando juntos, hoy cosechamos el
éxito y culminación de un peldaño más

Porque sin ustedes no hubiese sido posible

¡Gracias!

Agradecimientos académicos

A mis directores de tesis, Dra. Christine Johanna Band Schmidt y Dr. José Jesús Bustillos Guzmán.

Al comité revisor de tesis: Dra. Bárbara González Acosta, Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, Dr. David Julián López Cortés.

Al Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval, por el apoyo en la determinación de los análisis cromatográficos y gravimétricos de toxinas paralizantes, pigmentos y lípidos, respectivamente.

A la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo por su disponibilidad, entusiasmo y apoyo con la microscopía de epifluorescencia.

A la M.C. Sonia Futema Jiménez por su ayuda en las determinaciones bioquímicas.

Al B.M. César Guadarrama Analco, por su guía y aportación en los análisis moleculares.

A los investigadores que me recibieron con la mejor disposición durante la estancia de investigación realizada en el Centro Médico Nacional Siglo XXI: Dra. Lourdes Andrea Arriaga Pizano, Dr. Armando Isibasi Araujo, Dr. Vadim Pérez Koldenkova, Dr. Arturo Cérbulo Vázquez

A los investigadores que llevaron a cabo los aislamientos de las cepas utilizadas en el presente trabajo: Dra. Christine J. Band Schmidt, Dra. Sonia Isabel Quijano Scheggia, Dra. Lourdes Morquecho Escamilla (CODIMAR), Dra. Mónica C. Rodríguez Palacio.

Al Ph.D David W. Johnson por su valioso apoyo en la traducción del resumen del presente trabajo

A las instituciones por el apoyo recibido para manutención y asistencia a congresos: CONACyT (beca 599467, proyecto CONACYT-SEP 248468), BEIFI-IPN,

SIP-IPN (proyectos 2016-0356, 2017-1082), a la Red Temática de Florecimientos Algales Nocivos (RedFAN) por el apoyo recibido para presentar mis resultados en el 4° Congreso de la SOMEFAN y 2ª Reunión ALEAN.

Agradecimientos personales

Porque en esta travesía de conocimientos, pensamientos y personas nuevas, al fin comprendí que las mejores cosas conllevan a un arduo trabajo, el cual se hace pasajero a lado de la compañía perfecta. Es por ello que agradezco infinitamente a todos aquellos que se dieron la oportunidad de aprender y crecer conmigo, porque directa o indirectamente este es el resultado de nuestro esfuerzo. ¡Gracias!

Miguel Angel Aguilar, Hilda Cerón Serrano, Jasmín Rodríguez Cerón, Antonio Ramírez Gómez, Lizeth Paola Ramírez Rodríguez, Aldo Ramírez Rodríguez, Irán Rodríguez Cerón, Osmara Vargas Rodríguez, Víctor Vargas Rodríguez, Brenda Toscano, César Guadarrama, Daniela Corona.

Por su exigencia, regaños y retos, pero sobre todo porque me han forjado como mejor científica: Dra. Christine Band, Dra. Bárbara González, Dra. Claudia Hernández, Dr. José Bustillos, Dr. David López, Dr. Francisco Sandoval, Dr. Mauricio Muñoz, Dra. Lulú Arriaga, Dra. Carmen Jaramillo.

Finalmente, a quienes se convirtieron en mi segunda familia, Equipo FAN-CICIMAR: Lorena, Aldo, Nacho, Ana, Tina, Miriam y Armando.

GLOSARIO

Análogo: es un compuesto que tiene una estructura similar a la de otro, pero difiere de él con respecto a un cierto componente. Puede diferir en uno o más átomos, grupos funcionales o subestructuras, que se sustituyen por otros átomos (FAO, 2016).

Cepa: organismo con alguna variante genética que usualmente se propaga clonalmente para que estos conserven la característica de interés (Garay *et al.*, 2006).

Cromatografía: método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través de la fase estacionaria (Yuan *et al.*, 2002).

Curva de crecimiento: es aquella donde se pueden conocer las diferentes fases (iniciación, exponencial, estacionaria y de muerte) en el desarrollo de un organismo en condiciones de cultivo bajo condiciones controladas (Castrejón *et al.*, 1994).

Hidrólisis: reacción química mediante la cual se generan dos nuevos compuestos a partir de una sustancia compleja mediante la adición de agua y su posterior descomposición (Lehninger, 1981).

Metabolismo: conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (Curtis *et al.*, 2006).

Metabolito primario: moléculas abundantes en la naturaleza e indispensables para el desarrollo fisiológico del organismo; se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil extracción y conducen a la síntesis de los metabolitos secundarios. Entre los principales metabolitos primarios están las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Castillo & Martínez, 2007).

Metabolito secundario: moléculas orgánicas sintetizadas en pequeñas cantidades que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo,

además de no ser partícipes en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, etc. Se caracterizan por estar presentes en una sola especie o grupo de especies, vinculándose directamente en las relaciones ecológicas (Castro *et al.*, 2002).

Saxitoxina: molécula pequeña, con un peso molecular de 299 g/mol. Presenta un sistema tricíclico que contiene dos grupos guanidino, los cuales le confieren una gran polaridad, caracterizándose por exhibir un número sorprendente de análogos naturales en los cuales hay variaciones en la cadena lateral carbamoyl, en el nitrógeno 1 (N1) y en el carbono 11 (C11) (Durán-Riveroll *et al.*, 2013).

Toxicidad: se refiere al efecto de un veneno sobre un organismo completo, en nuestro caso, hará referencia a la sumatoria de la toxicidad específica de cada análogo detectado (Vale & Taleb, 2005).

Toxina: sustancia que puede ser de naturaleza proteica o no proteica y es de origen vegetal, animal o bacteriológico, la cual cuenta con una estructura química que desencadena desordenes fisiológicos (Williams & Clarke, 1998).

Toxinas paralizantes: toxinas que actúan principalmente en el sistema nervioso, bloqueando los canales de sodio ocasionando parálisis muscular. La intoxicación puede ser leve manifestándose en adormecimiento de labios o aguda provocando la muerte por paro respiratorio, síntomas típicos del envenenamiento paralizante por consumo de moluscos (Guo *et al.*, 1987).

Pigmentos fotosintéticos: metabolitos capaces de captar energía lumínica y de transformarla en energía química mediante la fotosíntesis, se diferencian en su biogénesis, composición y estructura, existiendo dos grupos generales, **pigmentos primarios** que son los que tienen como finalidad principal la captación de la energía lumínica mientras que los **pigmentos accesorios** amplían el espectro de absorción de los pigmentos primarios y sirven como sistemas de protección frente a la luz excesiva (Manrique, 2003).

RESUMEN

Los dinoflagelados se caracterizan por tener una estrecha relación con comunidades bacterianas que influyen en su crecimiento, fisiología y dinámica poblacional. En comparación con la relación entre dinoflagelados-factores abióticos, la relación bacteria-dinoflagelado es menos clara. En este trabajo se cuantificaron los cambios en el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos y toxinas paralizantes a lo largo de la curva de crecimiento de tres cepas de *G. catenatum* (GCCV-7, GCMV-7 y 62L), y únicamente para la cepa GCCV-7 se determinó si la presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. inducen la germinación de quistes, además de modificar el contenido de metabolitos primarios, perfil de pigmentos fotosintéticos y toxinas paralizantes. Mediante sorting celular, se aislaron ambas bacterias de la cepa G7 del dinoflagelado, las cuales se inocularon con una concentración inicial de 10^5 cél/mL en la cepa GCCV-7, registrándose un incremento significativo ($p < 0.001$) en la biomasa máxima celular, tasa de crecimiento y tiempo de generación con respecto a los controles, además de incrementarse los lípidos y carbohidratos. En las cepas restantes, se registraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la fase de aclimatación-exponencial y exponencial-declive en proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente. Ambas bacterias promovieron la germinación de quistes de *G. catenatum* en un 96%, observándose células vegetativas individuales con poca pigmentación y de menor tamaño. Estos resultados corroboran la sinergia entre ambos organismos e indican que la interacción entre las bacterias y *G. catenatum* es clave para el éxito del proceso sexual del dinoflagelado, además de favorecer su crecimiento al triplicar la tasa de crecimiento (de 0.176 a 0.353 div/día) y duplicar su biomasa (de 3153 a 6402 cél/mL). En cuanto al perfil toxicológico, si bien no cambió, la presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. incrementó la producción de los análogos sulfocarmaboil y decarbamoil.

ABSTRACT

Dinoflagellates are characterized by having a close relationship with bacterial communities that influence their growth, physiology and population dynamics. Compared to the relationship between dinoflagellates-abiotic factors, the bacteria-dinoflagellate ratio is less clear. In this work, changes in protein content, carbohydrates, lipids, pigments and paralyzing toxins were quantified along the growth curve of three strains of *G. catenatum* (GCCV-7, GCMV-7 and 62L). For GCCV-7 alone the presence of *Alteromonas* spp. and *Roseovarius* spp. was investigated with regard to their role in inducing the germination of cysts, in addition to modifying the content of primary metabolites, profile of photosynthetic pigments and paralyzing toxins. Both bacteria of the G7 strain of the dinoflagellate were isolated by cellular sorting and cell staining; when they were inoculated with an initial concentration of 10^5 cells / mL in strain GCCV7 with a significant increase ($p < 0.001$) in the biomass. In addition, maximum cell, growth rate and generation time were observed, as well as increases in lipids and carbohydrates. In the remaining strains, significant differences were recorded ($p < 0.001$) between the acclimation-exponential and exponential-decline phases in proteins, carbohydrates and lipids, respectively. Both bacteria promoted the germination of *G. catenatum* cysts in 96%, observing individual vegetative cells with reduced pigmentation and smaller size. These results corroborate the synergy between both organisms and indicate that the interaction between bacteria and *G. catenatum* is key to the success of the sexual process of the dinoflagellate, as well as favoring its growth by tripling the growth rate (0.176 - 0.353 div / day) and doubling its biomass (3153 - 6402 cells / mL). Although the toxicological profile it did not change, the presence of *Alteromonas* spp. and *Roseovarius* spp. increased the production of the sulfocarmaboil and decarbamoyl analogs.



I. INTRODUCCIÓN

En el ambiente terrestre, dulceacuícola y marino, las microalgas se caracterizan por asociarse con bacterias, las cuales pueden ser promotoras del crecimiento, simbioses o simplemente coexistir con la microalga, de manera análoga a los saprofitos en ambientes terrestres (Mouget *et al.*, 1995; de-Bashan & Bashan, 2013).

La comunidad bacteriana crece en un área específica que rodea a las células de la microalga y se caracteriza por mantener un intercambio activo de nutrientes, que generalmente, favorecen el crecimiento de ambos microorganismos. Fue hace poco (más de 40 años) que dicha región fue descrita, nombrándose ficosfera en alusión a la rizosfera de las plantas superiores e hizo referencia a la delgada capa que permite la difusión pasiva de los nutrientes, acumulándolos en altas concentraciones comparado con el agua circundante. Dicho excedente de nutrientes favorece la comunicación celular entre bacterias y microalgas, aumentando el área de respuesta entre ambos microorganismos (Bell & Mitchell, 1972; Azam *et al.*, 2007; Amin *et al.*, 2012; 2015).

La estrecha convivencia generada dentro de la ficosfera permite la coexistencia con decenas, incluso cientos de diferentes tipos de bacterias, lo que promueve el desarrollo de diversas interacciones: microalga-microalga, microalga-bacteria y bacteria-bacteria, manteniendo un equilibrio en la dinámica poblacional a través del intercambio de energía dado principalmente en la zona eufótica (Falkowski *et al.*, 2008; Le Chevanton *et al.*, 2013; 2016).

Dependiendo del flujo y gasto energético, las interacciones establecidas entre bacterias y microalgas pueden ser altamente específicas como: **a)** el desarrollo de simbioses intracelulares (Amin *et al.*, 2015), **b)** relaciones mutualistas (Grossart, 1999; Amin *et al.*, 2009), **c)** parasoidistas (Wang *et al.*, 2014; 2015) y **d)** alguicidas (Iwata *et al.*, 2004), o bien, generalistas como **e)** la competencia por nutrientes y/o espacio (Danger *et al.*, 2007). A pesar del nivel de impacto, todas y cada una de las diferentes interacciones repercuten en el comportamiento y fisiología de ambos microorganismos, modificando sus ciclos de vida, procesos sexuales y nutricionales (Yu *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2011; Bolch *et al.*, 2017).



Se ha demostrado que la interacción entre estos microorganismos está mediada en parte por el suministro de nutrientes que aportan las bacterias (Cole, 1982; Croft *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2008), así como por el intercambio energético a través de la liberación de compuestos ricos en carbono al agua circundante por parte de las microalgas (Cole, 1982; Wolter, 1982; Doucette, 1995; Rooney-Varga *et al.*, 2005; Cooper & Smith, 2015).

Es por ello, que basándose en las características de dichos microorganismos se han descrito diversas premisas que estipulan el papel ecológico de cada uno. Las microalgas en general, proveerán carbono orgánico que será remineralizado inmediatamente por las bacterias permitiéndoles continuar con su crecimiento, mientras que las bacterias brindarán diversos compuestos promotores del crecimiento mediante el desarrollo de sideróforos, los cuales facilitarán la captación de micronutrientes, lo que a su vez brindará diversos cofactores para enzimas específicas del metabolismo celular (Zehr & Ward, 2002; Amin *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2009; Vasseur *et al.*, 2012).

Estos antecedentes han llevado a considerar que las bacterias y las microalgas están estrechamente relacionadas en ambientes marinos costeros, incrementando mutuamente su biomasa y constituyendo un factor importante e influyente en el desarrollo de Florecimientos Algales Nocivos (FAN) debido a que la relación ecológica que guardan ha sido considerada altamente específica e individual entre especies de microalgas y bacterias.

El presente trabajo se ha enfocado en conocer cómo influyen dos poblaciones de bacterias aisladas de una cepa de *Gymnodinium catenatum* de Bahía de Santiago, Colima en el contenido total de los tres principales metabolitos primarios: proteínas, carbohidratos y lípidos, así como en el perfil de pigmentos y toxinas paralizantes a lo largo de la curva de crecimiento de tres cepas del dinoflagelado. Se eligió a la cepa GCCV-7 de Bahía de La Paz como modelo experimental para inocular ambas bacterias y cuantificar los cambios en los parámetros antes descritos, además de evaluar el efecto en el crecimiento (biomasa máxima y tasa de crecimiento) y formación de cadenas celulares. Finalmente, a través del proceso sexual entre las cepas BAPAZ-7



y 62L se obtuvieron quistes de resistencia, los cuales fueron esterilizados superficialmente, añadiéndoles ambas bacterias y monitoreando el impacto que su presencia generó en la germinación y en el perfil de toxinas paralizantes en las nuevas cepas clonales.

II. ANTECEDENTES

Durante la primavera de 1939, la tripulación del barco del Instituto Oceanográfico Scripps reportó el hallazgo de una especie de dinoflagelado planctónico formador de cadenas en el Golfo de California que pocos años después Herbert W. Graham describiría como una nueva especie: *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943).

Este organismo es un dinoflagelado gymnodinoide desnudo con cuerpo circular a cuadrado en vista ventral y un sulcus excavado que se extiende desde el epicono hasta el hipocono, separados por el cíngulo totalmente recto que aloja al flagelo transversal. Longitudinalmente, en el sulcus encontramos al segundo flagelo (Graham, 1943).

Las células presentan un citoplasma amarillo-verdoso con algunas vacuolas, un núcleo central, grande y ligeramente lunado. En promedio, el tamaño celular es de 30 (22-33) μm de largo y 36 (30-46) μm de diámetro (Graham, 1943. Fig. 1).



Figura 1. Célula individual y cadenas del dinoflagelado planctónico *Gymnodinium catenatum*.

Esta especie permaneció prácticamente desconocida, reportándose en dos ocasiones entre 1940 y 1967 (Balech, 1964; Hada, 1967). Posteriormente no se reportó su presencia hasta 1976 con el primer reporte de PSP en las zona costera de España y a partir de este año hasta la fecha, su incidencia ha ido en aumento, reportándose en más de 23 países a través de su perfil de toxinas y por secuenciación genética de la subunidad larga no codificante del RNA ribosomal. Entre los países con mayor frecuencia de reportes está: Australia, Japón, Venezuela, Cuba, Uruguay, Argentina, España, Costa Rica, Egipto, Portugal, entre otros (Band-Schmidt *et al.*, 2010; Hallegraeff *et al.*, 2011; Quijano-Scheggia *et al.*, 2012).

En México, su distribución se ha reportado a lo largo de la costa del Pacífico mexicano (Band-Schmidt *et al.*, 2006; 2010) y en el Golfo de México se reporta por primera vez en 2006 en la Laguna de Términos, en las costas de Yucatán (Licea *et al.*, 2004; Zamudio *et al.*, 2013) mientras que para Bahía de Campeche y la zona de los Petenes se reporta a partir del 2008 en la época de lluvias (junio-octubre) con rangos de abundancia de 100 a 26×10^4 células (Poot-Delgado y Guzmán-Noz, 2010; Poot-



Delgado, 2016; Fig. 2). Es una especie que forma cadenas celulares de longitud variada, el citoplasma es continuo en toda la cadena y el ápice de una célula se extiende estrechamente uniéndose con la parte posterior de la célula siguiente (Graham, 1943; Blackburn *et al.*, 1989). Se caracteriza por ser el único dinoflagelado desnudo productor de toxinas paralizantes que repercute directa y ampliamente en las costas del Pacífico nuestro país, tolerando un amplio intervalo de temperatura, salinidad y proporciones de N:P, lo que probablemente le permita tener una amplia distribución geográfica (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2014; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012).



Figura 2. Distribución global de *G. catenatum*. Los círculos evidencian los lugares en donde la especie ha sido detectada (Modificada de Hallegraeff *et al.*, 2011).

El dinoflagelado *G. catenatum* tiene dos procesos de reproducción: uno **sexual** heterotálico múltiple que se da por la fusión de los isogametos haploides y otro **asexual** que implica la división vegetativa de las células. En 1989, Blackburn y colaboradores describieron el ciclo completo de ambos procesos. El proceso sexual comienza con la fusión de ambos gametos, lo que da lugar a la formación de un planocigoto diploide,



biflagelado y de mayor tamaño que el resto de las células vegetativas. Eventualmente el dinoflagelado pierde el flagelo y con ello su capacidad natatoria, adquiriendo una forma más redondeada con un sulcus y cíngulo claramente visibles, que con el paso del tiempo se van desvaneciendo (Figueroa *et al.*, 2006). Es en este punto del ciclo de vida dónde existen dos rutas posibles: **enquistarse** o **dividirse** y dependerá de las condiciones ambientales cuál se lleva a cabo.

Cuando las condiciones ambientales son óptimas, el planocigoto se dividirá mediante el proceso sexual, favoreciendo el intercambio genético. De lo contrario y considerando el efecto de la depredación y/o pastoreo dentro de la población y la interacción con una amplia gama de otros microorganismos, el dinoflagelado se enquistará, transformándose en un hipnocigoto, rodeado por una capa mucilaginosa y con su característico estigma, constituyendo la fase de reposo de su ciclo de vida.

Posterior a dos semanas de inactividad, el hipnocigoto continuará con el proceso de enquistamiento, formándose un planomeiocito biflagelado y diploide que se divide y da lugar a células vegetativas haploides (Figueroa *et al.*, 2006; 2008; Albinsson, 2011).

El proceso de enquistamiento es una estrategia de esta especie ante condiciones desfavorables y es fundamental en la dinámica de sus eventos de proliferación debido a que facilita su dispersión y promueve la recombinación genética. *G. catenatum* puede formar dos tipos de quistes **a)** de resistencia o hipnocigotos, formados únicamente a través del proceso sexual y **b)** temporales o pelicales a partir de células vegetativas móviles rodeadas por una delgada membrana (Bravo, 1986; Anderson y Garrison, 1997).

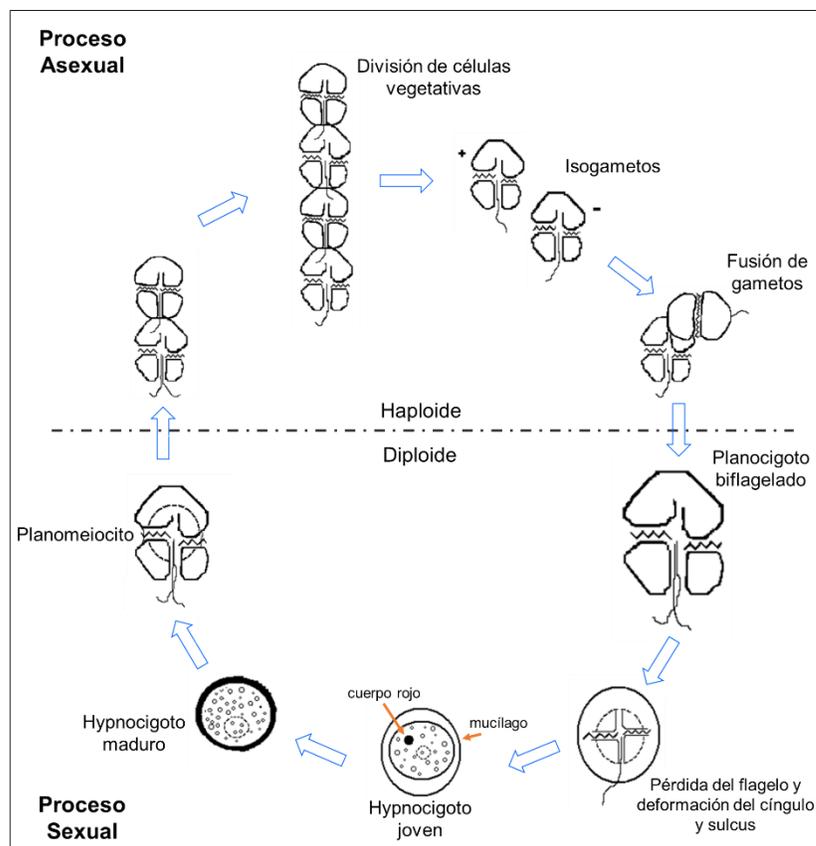


Figura 3. Ciclo de vida de *G. catenatum*, se esquematizan ambos procesos de división celular. **Superior:** proceso asexual haploide. **Inferior:** proceso sexual diploide. (Modificado de Albinsson, 2011).

Existen diversos grupos de fitoplancton que se caracterizan por producir FAN en diversas regiones costeras, destacándose las diatomeas, silicoflagelados, prymnesiofitas, rafidofitas y dinoflagelados con alrededor de 300 especies descritas. Sin embargo, el número de especies decrece si únicamente nos centramos en aquellos organismos que son considerados nocivos o tóxicos como resultado de la producción de biotoxinas, daños físicos en los organismos aledaños, anoxia, reducción de la irradiación solar. Bajo esta perspectiva, encontramos al grupo de los dinoflagelados, quienes sobresalen por ser un grupo particularmente nocivo, representando poco más del 70% (40-60 taxa) de las especies formadoras de FAN (Anderson *et al.*, 1989; Smayda, 1989; Hallegraeff, 1993; Sournia, 1995).

Gymnodinium catenatum es el único dinoflagelado gymnodinioide que produce ficotoxinas (compuestos químicos producidos por algas procariotas y eucariotas). No



obstante existen otras especies de dinoflagelados que también las producen, particularmente especies del género *Alexandrium* y sólo una del género *Pyrodinium* (*P. bahamense*) (Hallegraeff y Fraga, 1998; Cembella, 1998; Landsberg, 2002). Dichas toxinas pueden transferirse entre organismos de diversos niveles tróficos sin daño aparente, acumulándose en moluscos bivalvos, caracoles, crustáceos (Saldate-Castañeda *et al.*, 1991; Pérez-Linares *et al.*, 2009), pulpos (Núñez-Vázquez *et al.*, 2008), peces (Reis-Costa *et al.*, 2010; Wiese *et al.*, 2010) y de manera secundaria en el ser humano, que al ser expuesto a altas concentraciones puede causar una intoxicación (síndrome conocido como PSP por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisoning).

La asociación de *G. catenatum* con episodios de intoxicación por PSP ocurrió por primera vez en 1976 en España (Estrada *et al.*, 1984) y posteriormente en Sinaloa en 1979 (Cortés-Altamirano, 1981). A partir de esta fecha el reporte e incidencia de la especie comenzó a aumentar en diversos lugares del mundo (Hallegraeff *et al.*, 2011), reportándose hasta 2 000 casos de PSP al año con una tasa de mortalidad menor al 15% (Van Dolah, 2000). En enero de 2015 en la franja costera de San Felipe-Puertecitos, en el Alto Golfo de California se presentó uno de los FAN más importantes documentados en México de *G. catenatum* debido a la mortalidad de más de 10 mil aves marinas, cientos de mamíferos marinos y la intoxicación de 8 personas (Medina-Elizalde *et al.*, 2016). Dicho evento generó cuantiosas pérdidas, sin embargo, los impactos económicos, sociales y ambientales no son exclusivos de la zona, en todo el país la presencia de FAN han ocasionado daños, por lo que la implementación de programas de monitoreo constante en diversos puntos de la zona costera ha contribuido a minimizar los riesgos sanitarios, aumentar el conocimiento en la población acerca de estos eventos y comenzar a implementar herramientas de fácil detección (Etheridge, 2010).

Las toxinas producidas por *G. catenatum* son compuestos neurotóxicos basados en el mismo alcaloide básico compuesto de tetrahidropurina, la **saxitoxina**, que bloquea los canales de sodio de las células nerviosas causando efectos neurotóxicos (Negri *et al.*, 2003). Entre los diversos análogos sintetizados por esta especie se



encuentran la SXT, gonyautoxinas 1-4 (**GTX1-4**), toxinas **C 1-4**, **B 1-2**, neosaxitoxina (**NEO**) y los análogos decarbamoil en los que la cadena lateral ha sido reemplazada por un grupo hidroxilo, **dcSXT**, **dcGTX 1-4**, **dcNEO** (Hallegraeff *et al.*, 2011). Sin embargo, de manera reciente Negri y colaboradores (2003) describieron tres nuevas toxinas producidas exclusivamente por esta especie, a las cuales se les nombró toxinas **GC1-3**, caracterizándose por tener sustituida la cadena lateral por un grupo para-hidroxil benzoil.

Se ha descrito en diversos estudios que la presencia, ausencia y proporción entre los análogos varía entre cepas y poblaciones, además que no se tiene un registro de alguna cepa capaz de producir todos los análogos, aunque es bien sabido que todas las cepas tienen la capacidad de sintetizar más de uno. También se han reportado variaciones dentro de una misma población y diferencias en la síntesis de los análogos en función de factores físicos, químicos, nutricionales y manera reciente, agentes bióticos (Cembella, 1998; Band-Schmidt *et al.*, 2004; 2006; 2014; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012; Ramírez-Rodríguez, 2015).

El fitoplancton y las bacterias son organismos ubicuos en la columna de agua, lo que favorece el desarrollo de diversas interacciones entre ambos que influyen mutuamente en varios aspectos de su existencia (Doucette, 1995; Doucette & Powell, 1998). De manera general, las microalgas proveerán distintos sustratos orgánicos de crecimiento, además de servir como sustrato de crecimiento bacteriano (Bell *et al.*, 1972, 1974; Cole, 1982). Mientras que las bacterias a su vez, producen compuestos promotores del crecimiento (Stewart *et al.*, 1997; Croft *et al.*, 2005), citoquininas que promueven las proliferaciones algales (Fukami *et al.*, 1991), vitaminas esenciales como la B₁₂ (Croft *et al.*, 2005). Sin embargo, también tienen la capacidad de sintetizar sustancias inhibitoras del crecimiento que repercuten de manera específica a ciertas especies (Holmström & Kjelleberg, 1999).

Dichas interacciones se crean principalmente en la zona circundante a la fitosfera debido a la abundancia de nutrientes excretados que alberga la zona, facilitando el intercambio de compuestos esenciales que, principalmente, promuevan el crecimiento de ambos microorganismos. No obstante, no todo es benéfico para los organismos ya



que también existe una competencia directa por diversos micronutrientes (Paul y Pohnert, 2011; Amin *et al.*, 2012).

De manera general, la relación entre microalgas y bacterias puede darse desde dos perspectivas diferentes: intra o extracelular. El primer tipo se ha descrito en diversas especies de dinoflagelados como *Gonyaulax tamarensis*, *Noctiluca scintillans* y *Alexandrium tamarense* (Silva, 1990; Seibold *et al.*, 2001; Schweikert, 2003) y hace referencia a aquellas bacterias intracelulares que sintetizan los nutrientes a través de la fotosíntesis, fijación de nitrógeno o aumentando la actividad enzimática para la microalga, mientras que el hospedero proporciona un hábitat óptimo (Seibold *et al.*, 2001). En cuanto a las bacterias extracelulares, la colonización en la superficie de la microalga le proporciona varias ventajas como una mejor adquisición de nutrientes, protección ante la depredación y radiación U.V. (Dang y Lovell, 2000).

Si bien, las interacciones bacteria-microalga han recibido una creciente cantidad de atención en la última década (Hold *et al.*, 2001; Uribe y Espejo, 2003; Croft *et al.*, 2005), los mecanismos que las rigen están lejos de ser determinados debido a la dificultad y limitaciones que conlleva el diseño experimental, afrontándose una serie de retos metodológicos. En primer lugar, las bacterias asociadas a las cepas del dinoflagelado presentan una amplia diversidad filogenética y para su eliminación se requiere el uso de uno o varios antibióticos que pueden alterar la morfología y procesos fisiológicos de la célula. En segundo lugar, la confirmación de la ausencia total de una o más bacterias es difícil debido a la existencia de bacterias intracelulares presentes en la microalga, y en tercer lugar, el dilema inherente que la prueba de esterilidad es compleja, laboriosa y necesita de equipos sofisticados y generalmente costosos (Doucette, 1995; Doucette & Powell, 1998; Uribe y Espejo, 2003; Maas *et al.*, 2007).

Es por ello que una alternativa más viable (en el caso de los dinoflagelados) ha sido el desarrollo de modelos experimentales basados en la obtención de quistes de resistencia, los cuales tras ser esterilizados superficialmente con H₂O₂ al 0.55% v/v o mediante el uso de antibióticos (eritromicina, novobiocina, cefazolina, penicilina, estreptomycin y tobramicina) son inoculados con una o una mezcla de bacterias conocidas, permitiendo de esta forma constatar que las bacterias añadidas son las



“únicas” con las que el dinoflagelado desarrollará una convivencia. Los efectos de dicha interacción se han monitoreado constantemente y por períodos de tiempo prolongado (>30 días), contrastándose con sus respectivos controles (Groben *et al.*, 2000; Alavi *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2004; Bolch *et al.*, 2004). Mediante estos modelos bacterianos se han podido describir tres principales respuestas de crecimiento (Bolch *et al.*, 2001, 2004; Vincent, 2003; Green *et al.*, 2004; Subramanian, 2008):

-  **Respuesta alguicida:** bacterias de la familia Cytophaga/Flavobacterium ocasionan la muerte del dinoflagelado justo después de la germinación de los quistes.
-  **Crecimiento lento:** típicamente causado por comunidades bacterianas del género *Roseobacter* y *Rhodobacter*, quienes alargan la fase de crecimiento estacionaria, o bien, alternan ascensos/descensos en el crecimiento durante la fase exponencial.
-  **Crecimiento potenciado:** en presencia de bacterias pertenecientes a los géneros *Marinobacter* y *Alcanivorax*, el dinoflagelado aumenta más de un 30% su crecimiento en un menor tiempo.

Dichos modelos experimentales, además de permitir evaluar la influencia de las bacterias, permiten esclarecer los diversos mecanismos bacteria-microalga que se activan y repercuten sobre la toxicología, fisiología, dinámica del crecimiento, entre muchas otras temáticas, las cuales son importantes para el entendimiento de lo que sucede en ambientes marinos naturales (Albinsson, 2011).

Particularmente el grupo de los dinoflagelados, se caracteriza por presentar una asociación con comunidades bacterianas conformadas hasta por 1 000 especies distintas, las cuales se ha confirmado a través de experimentos en laboratorio mantienen una sinergia importante que repercute en la dinámica de crecimiento de ambos. A pesar de que dicha interacción también se ha observado en ambientes naturales, son pocos los trabajos que abordan esta temática, dándole mayor relevancia a los efectos originados por factores físicos como el fotoperíodo, temperatura, disponibilidad de nutrientes, corrientes, entre otros; dejando de lado las relaciones



ecológicas como la simbiosis, competencia y/o depredación (Hold *et al.*, 2001; Bolch *et al.*, 2004, 2017; Green *et al.*, 2004; Amin *et al.*, 2009, 2015).

Debido al alto nivel de complejidad que requieren los experimentos para evaluar la interacción establecida entre dos microorganismos, el uso de los modelos experimentales antes descritos permite “limpiar” los cultivos monoalgales de algunos dinoflagelados, eliminando exitosamente la mayor cantidad de bacterias e inoculando únicamente aquellas que sean de interés. Dicha acción resulta ser la única que nos permite comprobar y atribuir que el efecto observado es debido a la presencia de la bacteria, que la interacción bacteria-dinoflagelado es cepa específica y el efecto es diferente para cada especie de dinoflagelado a pesar de tratarse de la misma bacteria (Bolch *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2006; Amin *et al.*, 2015).

A pesar de que las respuestas son específicas por especie de dinoflagelado, las bacterias no disciernen entre una y otra especie, pudiéndose presentar en una amplia variedad de dinoflagelados. Por ejemplo, los géneros *Pfiesteria*, *Alexandrium* y *Scrippsiella*, se caracterizan por asociarse a bacterias de la clase Alphaproteobacterias y los géneros *Marinobacter*, *Alcanivorax* y *Alteromonas*, miembros de la clase Gammaproteobacterias, son comunes en muchos dinoflagelados tecados o desnudos, planctónicos o bentónicos (Alavi *et al.*, 2001; Hold *et al.*, 2001; Seibold *et al.*, 2001; Ferrier *et al.*, 2002; Jasti *et al.*, 2005).

A pesar de que *G. catenatum* es una de las especies más estudiadas en nuestro país, la interacción que guarda con microorganismos, bacterias principalmente, ha sido estudiada de manera reciente, por lo que son pocos los trabajos los que evalúan esta interacción y los posibles efectos que tiene en su crecimiento, composición celular y toxicidad.

Se ha evaluado el impacto directo que tienen bacterias específicas en cepas de *G. catenatum*, evidenciando el requerimiento del dinoflagelado ante la presencia de estos microorganismos. A pesar de que dichas observaciones tienen el sustento en diseños experimentales bajo condiciones de laboratorio no se descarta la idea de poder extrapolar los resultados al ambiente marino, pudiéndose explicar la dinámica y



alternancia de crecimiento de esta especie y las adyacentes en una zona en particular (Bolch *et al.*, 2004, 2011; Green *et al.*, 2004; Albinsson, 2011).

Un trabajo que sentó las bases para poder realizar estudios posteriores en los que se tratara de comprender la influencia que tienen las bacterias sobre el crecimiento, fisiología y toxicidad de *G. catenatum* fue el de Green y colaboradores en 2004 debido a que ellos caracterizaron la comunidad bacteriana asociada a cepas específicas de *G. catenatum* identificando tres phyla dominantes: Proteobacterias (70%), Bacteroidetes (26%) y Actinobacterias (3%). Con esta información se pudo comprobar que a pesar de la distribución geográfica, de los ecotipos de la especie, del medio y condiciones de cultivo la comunidad bacteriana asociada a la especie, tenía por lo menos, un representante de estos phyla.

Dicha caracterización permitió que años más tarde Bolch y colaboradores (2011) lograran desarrollar un modelo experimental específico para *G. catenatum*, el cual se basó en la inducción al proceso sexual de la especie para la obtención de quistes que fueron esterilizados superficialmente e inoculados con la bacteria de interés para así evaluar su efecto directo en la especie.

Los principales trabajos que evalúan la interacción entre *G. catenatum* y las bacterias asociadas mencionan una influencia en el crecimiento, así como en el contenido y perfil de toxinas paralizantes por parte de las bacterias. No obstante, no se menciona ningún efecto en el metabolismo celular, cambios en la producción de los metabolitos primarios y/o secundarios. Bajo este contexto, de manera general, está el trabajo de Fraga y colaboradores en 1992, quienes comenzaron a estudiar las variaciones estequiométricas de N, P, C y O necesarias para que *G. catenatum* pudiera proliferar, aparentemente sin la presencia de bacterias asociadas.

Durante la misma década se reportó que la influencia de las bacterias en el fitoplancton tóxico repercutía en el contenido y producción de las toxinas. Gallacher y colaboradores (1997), Doucette y Powell (1998) y Smith y colaboradores (2001) indicaron que eran las bacterias quienes modulaban la toxicidad y biotransformación de los análogos de las toxinas paralizantes en *G. catenatum*, estableciendo la pauta



que generó un mayor interés por el efecto de las bacterias en diversos aspectos (ecológicos, fisiológicos, toxicológicos, morfológicos) del dinoflagelado.

Un aspecto nuevo a tratar fue el metabolismo de especies de dinoflagelados tóxicos en presencia de comunidades bacterianas. Así, en 2002 Simon y colaboradores evaluaron los cambios en la liberación de metabolitos (carbohidratos y proteínas) a lo largo de la curva de crecimiento de *Alexandrium tamarense* en presencia de algunas cepas bacterias, observando que durante la fase estacionaria los carbohidratos eran el metabolito dominante, mientras que las proteínas tenían su mayor producción en la fase exponencial. Dichos resultados se vincularon directamente con el crecimiento y alimentación de los microorganismos debido a que en la fase estacionaria las bacterias proliferaron debido a una mayor disponibilidad de materia orgánica liberada por el dinoflagelado mientras que la microalga a través de fagotrofía obtuvo los nutrientes necesarios para continuar creciendo.

Un año más tarde, Mansour y colaboradores (2003) analizaron los principales cambios en lípidos, ácidos grasos y esteroides durante la curva de crecimiento de una especie del género *Gymnodinium*, encontrando que algunos esteroides, principalmente el dinosterol está presente durante toda la curva de crecimiento, proponiendo que se pudiera considerar como una herramienta quimiotaxonómica para distinguir a especies de este género

Uno de los primeros reportes que describe un comportamiento alguicida por parte de bacterias hacia dinoflagelados tóxicos lo describió Amaro y colaboradores en 2005 mencionando que la liberación de compuestos alguicidas por las bacterias asociadas a cepas de *Alexandrium catenella*, limitaron su crecimiento cuando la disponibilidad de macronutrientes era baja. Sin embargo, al ir incrementando la concentración de nutrientes, esta relación ecológica vuelve a ser simbiótica, lo que apertura más cuestionamientos desde el punto de vista metabólico, pues no se consideraba que una misma bacteria pudiese ocasionar respuestas opuestas en la misma especie.

La respuesta llegaría en 2008 cuando Subramanian demuestra que la re-adición de bacterias a los cultivos de *G. catenatum* después de un período de crecimiento



determinado, no solo aumenta el crecimiento de un 47 a un 90% sino que los nutrientes liberados por las bacterias no se presentan en las mismas cantidades a lo largo del crecimiento, sino que estos se liberan por pulsos, por lo que al disminuir la cantidad biodisponible de nutrientes, el crecimiento del dinoflagelado se frena, contrario a lo ocurrido cuando los nutrientes son abundantes.

Con la vista puesta en los productos metabólicos exudados al medio de cultivo, Jauzein y colaboradores (2015) caracterizaron los principales exudados orgánicos liberados en los cultivos mixtos de *A. tamarense* y bacterias asociadas, encontrando fitohormonas: auxinas y citoquininas, que favorecieron el crecimiento del dinoflagelado al promover la división celular del mismo.

En este mismo año Ramírez-Rodríguez (2015) proporciona uno de los principales antecedentes del presente trabajo al aislar y caracterizar una comunidad bacteriana asociada a la cepa G7 de *G. catenatum* aislada de Bahía de Santiago, Colima. Dicha comunidad bacteriana fue inoculada en 4 cepas diferentes de *G. catenatum* encontrando dos factores de respuesta: un efecto promotor del crecimiento en dos cepas y en otras dos cepas se observó inhibición en el crecimiento. En ambos casos, el perfil de pigmentos cambió al aumentar la concentración de clorofila *a*, peridina y β -carotenos. En cuanto al perfil de toxinas paralizantes en presencia de la comunidad bacteriana, en tres de las cuatro cepas aumentó la concentración de toxinas N-sulfocarbamoil y carbamoil y disminuyó la concentración de toxinas carbamatadas, por lo que concluye que las bacterias podrían ser consideradas como agentes estresantes con mecanismos de acción desconocidos.

Considerando que las bacterias asociadas a *G. catenatum* representan factores bióticos capaces de modificar su ciclo de vida, Bolch y colaboradores (2017) dan las bases suficientes para considerarlo un hecho, debido a que una germinación exitosa de los quistes de resistencia de esta especie únicamente fue posible en presencia de bacterias pertenecientes a los géneros *Roseobacter*, *Marinobacter* y *Alcanivorax*. Si bien las bacterias fueron aisladas de la misma cepa de *G. catenatum*, cada una tiende a modificar el crecimiento, mortalidad y porcentaje de germinación. En presencia de *Roseobacter*, la fase exponencial de crecimiento se alargó y la fase estacionaria se



acortó e incluso en algunos casos fue inexistente; ante *Marinobacter* se obtuvieron las mayores tasas de crecimiento (0.36 a 0.42 div/día) y finalmente en presencia de *Alcanivorax* la fase de declive se presenta de manera inmediata al alcanzar el día de máxima densidad celular.

Considerando lo anteriormente descrito, algo en común que tienen los experimentos es que demuestran que las comunidades bacterianas asociadas modifican el crecimiento del dinoflagelado, independientemente de otros factores ambientales considerados como reguladores directos del crecimiento. Además, los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones totalmente controladas, considerando un fotoperiodo semejante al natural, una irradiancia saturada, temperatura óptima y con un medio de cultivo enriquecido, por lo que las diferencias observadas sustentan el concepto de que las interacciones bacterianas son un factor importante en la población de los dinoflagelados bajo condiciones óptimas y no limitantes.

III. JUSTIFICACIÓN

Las diversas interacciones establecidas entre bacteria-microalga han ido adquiriendo mayor relevancia en los últimos años debido a que ahora son más los estudios que abordan esta temática, describiéndose que dicha interacción repercute en varias etapas del ciclo de vida de las microalgas, afectando el proceso sexual (Blackburn *et al.*, 2001), la formación de quistes (Adachi *et al.*, 2001), inhibe o promueve el crecimiento (Fukami *et al.*, 1997; Ferrier *et al.*, 2002) o se ve implicado en la producción de toxinas (Albinsson, 2011).

Actualmente el conocimiento sobre la composición bacteriana en células vegetativas en el medio natural de *G. catenatum* es escasa. No obstante, en condiciones de laboratorio se ha demostrado que el crecimiento de esta especie se ve favorecido por comunidades bacterianas complejas que si bien son específicas por cepa, se ha observado que a nivel género, incluso familia, las bacterias son similares, existiendo reportes que describen una amplia gama de dinoflagelados que tienen un



requerimiento obligado de ciertas bacterias, las cuales en general, favorecen su crecimiento (Green *et al.*, 2004; Hallegraeff *et al.*, 2011).

Específicamente, dichas interacciones requieren de una mayor investigación debido a que se postula que las bacterias son agentes reguladores en los procesos de inicio, mantenimiento y declive de los FAN, a través de factores directos como el desarrollo de simbiosis intracelulares o indirectos mediante la liberación de fitohormonas que beneficien y/o repercutan en el crecimiento de los dinoflagelados (Albinsson, 2011; Matsumoto, 2011; Albinsson *et al.*, 2014).

Por lo que el análisis de la composición celular del dinoflagelado *G. catenatum*, especie productora de FAN en nuestro país, en presencia/ausencia de dos bacterias, nos proporcionará una mejor comprensión de la influencia de las bacterias en el crecimiento de las microalgas, así como información sobre su fisiología y los posibles requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo de florecimientos de esta especie.

IV. HIPÓTESIS

Las bacterias asociadas a *G. catenatum* participan en diversos procesos desarrollados por el dinoflagelado como son la germinación, crecimiento, producción de metabolitos, pigmentos y toxinas. Por lo que la presencia de dos aislados bacterianos en los cultivos del dinoflagelado favorecerá su crecimiento con un consecutivo incremento en la producción de proteínas, carbohidratos y lípidos. Además de observar cambios en el perfil de pigmentos y toxinas paralizantes



V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar los cambios en la composición bioquímica del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* en presencia de dos bacterias.

5.2. Objetivos específicos

- Aislar las poblaciones de las bacterias procedentes de la cepa G7 de *Gymnodinium catenatum* mediante sorting celular acoplado a citometría de flujo.
- Identificación de las poblaciones de bacterias mediante la amplificación del gen 16S del ARNr utilizando oligonucleótidos universales para bacterias y oligonucleótidos específicos para cianobacterias.
- Determinar cambios en el contenido total de proteínas, carbohidratos, lípidos, perfil de pigmentos y toxinas paralizantes durante las diferentes fases de crecimiento de tres cepas de *G. catenatum* (GCCV-7, GCMV-7 y 62L).
- Determinar cambios en el contenido total de proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos y toxinas paralizantes en la cepa GCCV-7 en presencia de las dos poblaciones de bacterias, de manera individual y en conjunto.
- Determinar la influencia de las poblaciones de bacterias, de manera individual y en conjunto, en la germinación de los quistes de *G. catenatum*.
- Evaluar los cambios en el perfil de toxinas paralizantes de tres cepas de *G. catenatum*, resultado del proceso sexual, en presencia de las dos poblaciones de bacterias, de manera individual y en conjunto.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas

Se trabajó con tres cepas de *G. catenatum* aisladas de diversas regiones del Pacífico mexicano, las cuales están registradas con las siguientes claves: GCCV-7, GCMV-7 y 62L (Tabla I). La cruza para el proceso sexual se realizó entre la cepa 62L y BAPAZ-7, mientras que las poblaciones de bacterias fueron aisladas de la cepa G7 proveniente de Bahía de Santiago, Colima, México.

Tabla I. Cepas de *G. catenatum* aisladas de diversas regiones del Pacífico mexicano

Cepa	Lugar y año de aislamiento	Aislado por
GCCV-7	Bahía Concepción, B.C.S. 2000	C. Band-Schmidt
GCMV-7	Mazatlán, Sinaloa. 2006	L. Morquecho-Escamilla
G7	Manzanillo, Colima. 2010	S. Quijano-Scheggia
62L	Lázaro Cárdenas, Michoacán. 2005	M. Rodríguez-Palacio
BAPAZ-7	Bahía de La Paz, B.C.S. 2007	C. Band-Schmidt

6.2. Medio de cultivo

Las cepas se mantuvieron en medio GSe modificado con la adición de extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015). Este medio consiste en una solución de nutrientes (nitratos y fosfatos), metales traza, vitaminas y selenio, adicionados en agua de mar previamente filtrada y esterilizada.

En cuanto a las poblaciones aisladas de bacterias, se mantuvieron en medio GSe esterilizado por autoclave mientras que para la inducción al proceso sexual se utilizó medio GSe sin adicionar la fuente de nitrógeno ni el extracto de lombricompostaje.



6.3. Condiciones de cultivo

Durante todas las condiciones experimentales, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con una iluminación de $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ en un ciclo de luz:oscuridad 12:12 y con una salinidad de 34.

6.4. Sorting celular acoplado a citometría de flujo

Antes de realizar el análisis definitivo se corrieron análisis preliminares que nos permitieron establecer las condiciones idóneas para el sorting, además de poder establecer a *Salmonella enteritidis* como el mejor control de compensación, debido a que presenta un tamaño similar al de los organismos de interés ($5 \mu\text{m}$) y carece de autofluorescencia, por lo que permitió delimitar con mayor exactitud las poblaciones de bacterias y evidenciar la autofluorescencia de las muestras.

Se preparó un inóculo, proveniente de la comunidad bacteriana previamente aislada de la cepa G7 de *G. catenatum*, teniendo una concentración inicial de 9 000 cél/mL en 150 mL de medio GSe en un matraz de 250 mL. Se tomaron 30 mL del cultivo, por duplicado, y se centrifugaron a 9 000 rpm a 24°C por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y se siguieron dos métodos diferentes, uno para cada alícuota.

El primero dio lugar a los **controles positivos**, por lo que se agregaron 10 μL del fluorocromo Hoechst 33342 en una concentración de 1 mg/mL y se incubaron en cámaras frías y en oscuridad por 30 min. Terminado el tiempo de incubación se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones que la primera, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 mL de medio GSe estéril por autoclave.

El segundo método, que originó a los **controles negativos**, consistió en resuspender las células que fueron centrifugadas por primera y única vez en 1 mL de medio GSe estéril por autoclave.

El sorting celular se llevó a cabo en el citómetro BD Influx teniendo activo el láser rojo y el detector de dispersión frontal (FSC) que refleja el tamaño de la célula. Para la



separación celular se aplicó una carga de 4 500 volts a cada célula, teniendo en cuenta un stream medio, un nozzle central y un drop delay de tres microsegundos. Conforme se iban separando las células, fueron colocadas por el equipo, en una placa de 96 pocillos, cada uno con 150 μ L de medio GSe estéril por autoclave.

Una vez que las células se reprodujeron y las cepas se escalaron a un mayor volumen, se procedió a realizar la prueba de pureza, la cual se evidenció haciendo crecer las cepas en agar marino y ASN III a través de la técnica de estría cruzada.

6.5. Identificación molecular de las poblaciones de bacterias resultado del sorting celular

6.5.1. Extracción de ADN

Se sembraron las poblaciones de bacterias en agar marino y ASN III. Únicamente para la bacteria VB1 (crecida en agar marino), cuando la biomasa fue suficiente se llevó a cabo la cosecha de las células mediante un ligero frotis con un asa estéril, resuspendiendo las células en 575 μ L de buffer TE (Tris-EDTA pH 8.0) y adicionando 30 μ L de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 3 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL), los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100 μ L de NaCl 5M y 80 μ L de Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) mezclando por inversión e incubando 10 min a 65° C. Posteriormente, se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y nuevamente se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo. Se realizó una segunda extracción con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 14 000 rpm por 5 min. La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando un volumen de isopropanol preenfriado. Los tubos se incubaron a -20° C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm, a 4°C y por 20 min. Los botones resultantes, correspondientes al ADN,



se lavaron con etanol al 70% preenfriado y se centrifugaron nuevamente; este lavado se repitió dos ocasiones para finalmente resuspender el botón en 50 μ L de TE.

El ADN se visualizó con luz ultravioleta en geles de agarosa al 1%, tiñendo con Gel Red y documentando en un fotodocumentador BioRAD Gel Doc™ XR+ (Sambrook y Russel, 2001; Ausubel *et al.*, 2002).

En el caso de la bacteria VB2 (crecida en agar ASN III) se realizó un PCR de colonia para la extracción del ADN. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 μ L de agua Milli-Q y en condiciones de esterilidad se inoculó con la punta de un asa, una colonia de la bacteria previamente visualizada en un estereoscopio Zeiss Stemi SV6 para corroborar la pureza de la cepa. El tubo fue inmediatamente colocado en un termociclador BioRad, programando un ciclo de 5 min a 95°C ocasionando un shock térmico y poder utilizar el producto como templado para la PCR.

6.5.2. Amplificación de ADN mediante PCR

El ADN se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para bacterias **27F** (GAG TTT GAT CCT GGC TCA) y **1385R** (CGG TGT GTR CAA GGC CC) para amplificar la región variable V8-V9 de la sub-unidad pequeña del ARNr 16S (Rheims *et al.*, 1996). También se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cianobacterias **CYA 106F** (CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A) y **781Rb** (GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T), amplificando la región variable V4 de la sub-unidad pequeña del ARNr 16S (Nübel *et al.*, 1997).

Las reacciones de amplificación contuvieron 50 ng de ADN, 1 μ L de cada oligonucleótido, 5 μ L de 10X buffer PCR, 0.2 mM de dNTP's, 0.125 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa (VIVANTIS) y agua Mili-Q para tener un volumen final de 50 μ L.

Ambas reacciones se amplificaron en un termociclador Aeris ESCO Thermal Cycler. En el caso de la bacteria VB1 se siguió el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización a 92° C durante 2 min, 35 ciclos de 95° C durante un min, 50° C por un min y 72° C por 70 seg, seguidos de una fase de extensión final a 72° C por 10 min.



Mientras que para la bacteria VB2 el programa fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 5 min, 30 ciclos de 91° C durante un min, 50° C por un min y 72° C por dos min, seguidos de una fase de extensión final a 72° C por 10 min.

Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1%, de cada reacción se tomaron 2 µL que se mezclaron con 2 µL de buffer de carga (LB_{ADN}) (Sambrook y Russell, 2001). La electroforesis se corrió a 70V durante 30 min, los resultados se documentaron en un fotodocumentador BioRAD Gel DocTM XR+.

Debido a que la concentración de ADN era baja (<100 ng/µL) se tuvo que concentrar el templado, precipitar, cortar banda y purificar. De esta manera las muestras tendrían las características idóneas y requeridas para enviarse a secuenciar. Para tal fin, en un gel de agarosa al 0.7% se cargaron los 50 µL del producto de PCR de cada muestra adicionando 5 µL de GelRed y se corrió la electroforesis a 70V durante 45 min.

Una vez que la electroforesis terminó y las bandas de ADN lograron separarse lo mejor posible, se retiró el gel de la cámara y se visualizó en un transiluminador. Con un bisturí estéril y el cuidado requerido, se cortó el área circundante a la banda de amplificación correspondiente, se trozó en pequeñas partes que se colocaron dentro de un tubo de 600 µL previamente perforado en su base con una aguja de insulina y llenado en un 30% con SGW (Siliconized Glass Wool).

El tubo se colocó dentro de un eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó por 10 min a 6 000 rpm. Se retiró y cuantificó el sobrenadante, colocándose en un tubo nuevo de 1.5 mL y agregando 1/10 parte de acetato de Na 3M, más 500 µL de EtOh absoluto.

Se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Transcurrido el tiempo de precipitado, se centrifugaron las muestras a 4°C por 20 min a 13 000 rpm. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se agregaron 500 µL de EtOh al 70% para enjuagar el botón de ADN, este último paso se realizó dos veces seguido por una centrifugación a 4°C por 10 min y a 13 000 rpm.



Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente el botón de ADN para finalmente resuspenderlo en 30 μ L de agua Milli-Q. Dicho producto se corroboró en un gel de agarosa al 1% como se describió previamente.

6.5.3. Secuenciación y análisis filogenético

Los productos PCR fueron enviados a la empresa MACROGEN donde fueron secuenciados.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas utilizando el programa FinchTv, posteriormente se realizó el análisis de alineamiento *Blast* entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Consecutivamente se realizaron los alineamientos entre todas las secuencias obtenidas mediante la rutina *MUSCLE* incluida en el programa MEGA7.

Los árboles filogenéticos, que nos permitieron evaluar la posición taxonómica de las bacterias, fueron generados a través del método del vecino más cercano (*Bootstrap* 1000 repeticiones) en el programa MEGA7.

6.6. Curvas de crecimiento

6.6.1 Bacterias

Se utilizó el método descrito por Kepner y Pratt (1994) utilizando como fluorocromo SYBR Gold, que tiene afinidad por los ácidos nucleicos. Los conteos se realizaron bajo un microscopio de epifluorescencia marca Olympus, modelo BX60. Las muestras se observaron bajo emisión de luz azul, con una longitud de onda entre 450 y 490 nm a 1 000 x de magnificación, en un cuarto oscuro.

Se colectaron alícuotas de 1 mL del cultivo de las dos poblaciones de bacterias por 4 días en intervalos de 8 h. Todas las alícuotas se diluyeron en una proporción 1:2 con la Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS 1%). Se fijaron inmediatamente



con formol a una concentración final de 4% y fueron refrigeradas a 4°C en oscuridad hasta su análisis.

Las muestras se filtraron a 68 kPa en un sistema de filtración de 15 mL de capacidad a través de una membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0.2 μm de tamaño de poro, previamente humedecida con 1 mL de agua destilada Arrowhead.

Sosteniendo las membranas con pinzas se esperó a que la temperatura del ambiente las secase para posteriormente añadirles 40 μL de SYBR Gold en la parte central y dejarlas reposar por 15 min en total oscuridad. El exceso de colorante se eliminó enjuagando las membranas con 4 mL de TE 1% previamente filtrado a través de membranas de 0.22 μm y se dejaron secar como se mencionó anteriormente.

Es importante que las membranas estén totalmente secas, de lo contrario el montaje no quedará bien. Dicho proceso se realizó como sigue: se colocó una gota de aceite de baja inmersión justo en el centro del portaobjetos, sobre ésta se puso la membrana completamente seca y sobre la misma se volvió a colocar una gota de aceite de baja inmersión que fue cubierta con el cubreobjetos presionando la parte central para cubrir con aceite toda la membrana y eliminar las burbujas de aire. Las preparaciones fueron analizadas inmediatamente o almacenadas en oscuridad y a 4°C hasta su conteo.

Los conteos se realizaron utilizando una retícula de 10 x 10 μm colocada en el ocular del microscopio y se enumeraron un mínimo de 200 células por muestra en campos elegidos aleatoriamente. Se consideraron todas las células con morfología bien definida, así como todos los individuos que quedaron en los bordes de la retícula, siempre y cuando más del 50% de su estructura se encontrara dentro de la misma (Díaz-Hernández, 1997).

Para calcular la abundancia se utilizó la siguiente ecuación (Kepner y Pratt, 1994):



$$\text{cél/mL} = \frac{N \cdot A_t}{D \cdot V_f \cdot G \cdot A_g}$$

Dónde: **N**: número de células contadas; **A_t**: área efectiva de filtración; **D**: factor de dilución; **V_f**: volumen filtrado; **G**: número de retículas contadas; **A_g**: área de la retícula.

6.6.2 *Gymnodinium catenatum*

Para determinar las curvas de crecimiento del dinoflagelado, se prepararon inóculos de cada una de las cepas de *G. catenatum*, iniciando con una concentración de 500 cél/mL en 150 mL de medio GSe en matraces de 250 mL, por triplicado. Se tomaron 2 mL de cultivo cada segundo día hasta la fase de decaimiento y las muestras se fijaron con lugol ácido al 1% (Thronsdén, 1979). Los conteos se realizaron en una cámara de Sedgwick-Rafter de 1 mL bajo un microscopio óptico compuesto (LABOMED CXRII). Se registró el número y largo de las cadenas celulares.

Para la obtención de las curvas de crecimiento, tanto de las bacterias como de *G. catenatum*, se calculó el promedio y la desviación estándar de los conteos. Los promedios de cada conteo fueron graficados para obtener la curva de crecimiento y determinar las fases de crecimiento de las cepas.

La tasa de crecimiento (**K**) se determinó para cada una de las cepas a partir de la fase de crecimiento exponencial, utilizando la siguiente ecuación, de acuerdo a Guillard (1973):

$$K = ((\ln(C_2) - \ln(C_1)) / (t_2 - t_1)).$$

Donde **C₁** es el número de células por mililitro al tiempo uno y **C₂** es el número de células por mililitro en el tiempo dos.

Se calculó el tiempo de generación (**t_g**) a partir de la tasa de crecimiento mediante la ecuación (Guillard, 1973):

$$t_g = 0.301/K$$

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento, tanto de las bacterias como del dinoflagelado, se determinaron los días de la cosecha.



Para *G. catenatum* se eligieron cuatro, uno por fase: **aclimatación, exponencial, estacionaria y declive** y fue cepa-específico a las características de crecimiento de cada una de ellas.

En el caso de las bacterias, la cuantificación de los metabolitos se realizó únicamente en el día de máxima biomasa celular, correspondiente a la fase exponencial tardía.

6.7. Determinaciones bioquímicas

6.7.1. Obtención de extractos

Bacterias

Se preparó el inóculo por triplicado de las bacterias, sembrándolas en agar marino y ASN III (bacteria VB1 y VB2, respectivamente). El día de la máxima biomasa celular (día 2 para la bacteria VB1 y día 3 para la bacteria VB2) se realizó la cosecha mediante un ligero frotis con asa estéril, resuspendiendo las en 200 μ L de buffer Tris (Tris-EDTA 50 mM pH 8.2) y agregando 200 μ L de perlas de vidrio. Los tubos se agitaron en vortex durante un minuto y posteriormente se colocaron en baño de hielo por un minuto, este paso se realizó ocho veces.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm a 4° C por 10 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante, que correspondió al extracto y se colocó en un tubo nuevo, el cual fue congelado hasta su posterior análisis.

Gymnodinium catenatum

Se preparó el inóculo de todas las cepas teniendo una concentración inicial de 500 cél/mL en 150 mL de medio GSe en matraces de 250 mL, realizándose la cosecha en días específicos de acuerdo a la cepa con la que se trabajó. Para las cepas 62L, GCMV-7 y GCCV-7 la cosecha se realizó en cuatro ocasiones debido a que cada una correspondió a una fase de crecimiento distinta, mientras que para la cepa GCCV-7



en presencia de las bacterias VB1, VB2 y VB1/2 se realizó en dos ocasiones: la primera al día 12 de cultivo (t_0) y la segunda posterior a cuatro días de cultivo, es decir, al día 16 (t_f), tanto para los tratamientos como para los grupos control (Fig.3).

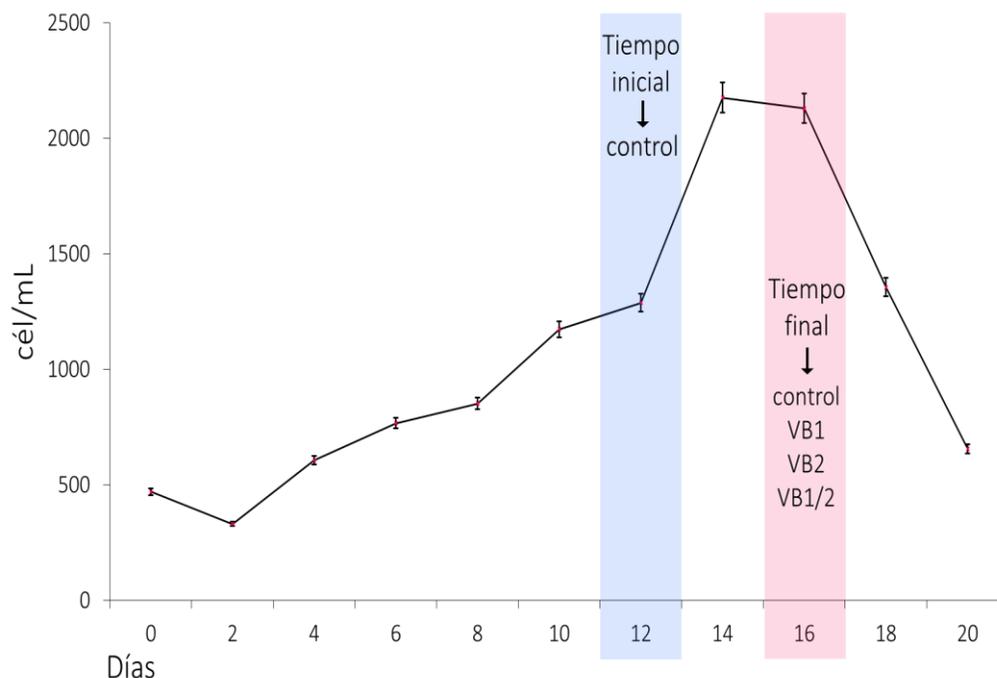


Figura 3. Diseño experimental de la cepa GCCV-7 en presencia de las bacterias VB1, VB2 y VB1/2. Línea continua representa la curva de crecimiento de la cepa GCCV-7. Líneas verticales: desviación estándar. La región sombreada **azul** indica el día de la primera cosecha mientras que el área **rosa** muestra el día de la segunda cosecha. En cada área se evidencia que muestras se cosecharon.

Durante cada cosecha, se centrifugaron 25 mL del cultivo a 3 000 rpm, a 4° C por 15 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular se lavó con 5 mL de formato de amonio al 3% (0.5M) para eliminar las sales presentes en la muestra. Una vez que la pastilla celular quedó libre de sales se guardó a 4°C hasta su análisis.

6.7.2. Proteínas

Para determinar el contenido de proteínas totales se utilizó el método descrito por Lowry y colaboradores (1951). Dicho método consiste en utilizar el Reactivo de Folin, que es reducido por los fenoles a “azul molibdeno”. Las proteínas presentes en la muestra reducen el reactivo de fenol, produciendo un color azul que puede ser medido



por espectrofotometría. La cantidad de color producido es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Para la cuantificación de este metabolito se utilizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA, Baker Analyzed) a una concentración de 1 mg/mL, y a partir de ésta, se realizó un gradiente de concentración desde 0 hasta 500 µg/mL. Todas las diluciones se realizaron por triplicado, una vez que se tuvieron las diferentes concentraciones de BSA se tomaron alícuotas de 200 µL de cada concentración y se colocaron en tubos nuevos, a los cuales se les añadió 1 mL de la solución D en una proporción 40:1:1 de las soluciones A, B y C (**Solución A** (Na₂CO₃ al 3% en NaOH 0.3 N), **Solución B** (Tartrato de Na y K al 4%) y **Solución C** (CuSO₄ al 2%) incubándose por 10 min a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de incubación, se añadieron 100 µL del Reactivo de Folin en una dilución 1:2 y se incubaron las muestras por 30 min en oscuridad para leerse a 750 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201 utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mL de paso óptico, calibrando el equipo a cero con el blanco (agua destilada Arrowhead) tratado de la misma forma que las muestras.

Los resultados de las absorbancias de la curva patrón se graficaron y se ajustaron por mínimos cuadrados a una ecuación lineal, obteniendo la "r²" y el valor de la pendiente (**m**).

En cuanto a las muestras, de los extractos de las bacterias se tomaron 200 µL, colocándolos en un tubo nuevo y agregando 1 mL de la solución D y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, se añadieron 100 µL del Reactivo de Folin, se incubaron los tubos en oscuridad por media hora y posteriormente se realizó su lectura a 750 nm bajo las condiciones descritas para la curva estándar. La cuantificación total de proteínas para estas muestras se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{ng de PRT / mL} = ((\text{ABS} / \text{m}) \cdot 1000)$$

Dónde: **ABS**: absorbancia; **m**: pendiente



En el caso de *G. catenatum*, a cada tubo se le agregó 1 mL de NaOH 0.1N y se centrifugaron a 3 000 rpm a 24° C por 10 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante que fue colocado en un tubo nuevo y del cual se tomaron 200 µL para el análisis, agregando 1 mL de la solución D (solución A, B y C en proporción 40:1:1) e incubando por 10 min a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, se agregaron 100 µL del Reactivo de Folin en una dilución 1:2 y se incubaron los tubos por 30 min en oscuridad para leerse a 750 nm.

La cuantificación total de proteínas para estas muestras consideró el número de células cosechadas, así como el volumen final, obteniéndose de la siguiente manera:

$$\text{ng de PRT / célula} = ((\text{ABS} / \text{m}) \cdot 1000) / ((\text{No. de células} \cdot 25))$$

Dónde: **ABS**: absorbancia; **m**: pendiente

6.7.3. Carbohidratos

Los carbohidratos totales fueron cuantificados de acuerdo al método colorimétrico de Antrona descrito por Yemm y Willis (1954), considerando las modificaciones propuestas por Parsons y colaboradores (1984) debido a que las muestras analizadas fueron de origen marino. Dicho método implica el uso del H₂SO₄ concentrado y un reactivo que desarrolla el color, en este caso la antrona que es un compuesto aromático. El H₂SO₄ hidroliza los enlaces glucosídicos y la antrona reacciona con el monosacárido resultante para producir un compuesto coloreado directamente proporcional a la concentración total de carbohidratos.

La curva estándar se preparó a partir de una solución concentrada de 0.1 mg/mL de glucosa (D-(+) SUPELCO), haciendo un gradiente de concentración de 0 a 100 µg/mL por triplicado. El análisis se llevó a cabo en tubos de vidrio con rosca previamente lavados con H₂SO₄ concentrado.

Para la cuantificación, del extracto de las bacterias se tomaron 200 µL mientras que la pastilla celular de *G. catenatum* se rehidrató con 1 mL de agua destilada y se transfirió directamente a un tubo de vidrio. Teniendo las muestras respectivas a la



curva estándar, así como las de interés, se agregaron 2 mL del Reactivo de Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), el cual se vertió lentamente por las paredes del tubo de manera que se estratificara y formara dos capas: **capa inferior** de color amarillo claro y **capa superior** de un color blanco lechoso.

Los tubos se taparon y se agitaron lentamente en el vortex por 30 seg teniendo los cuidados necesarios, ya que la reacción es exotérmica. Posteriormente se colocaron en baño de hielo por 5 min, subsiguientemente, los tubos se colocaron en baño maría a 80° C por 15 min. Finalmente, se enfriaron en baño de hielo y se leyó la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201 utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mL de paso óptico, calibrando el equipo a cero con el blanco (agua destilada) tratado de la misma forma que las muestras.

Los resultados de las absorbancias de la curva patrón se graficaron y se ajustaron por mínimos cuadrados a una ecuación lineal, obteniendo la “r²” y el valor de la pendiente (**m**).

En el caso de las bacterias, la cuantificación se realizó como sigue:

$$\text{ng de HDC / mL} = ((\text{ABS} / \text{m}) \cdot 1000)$$

Dónde: **ABS**: absorbancia; **m**: pendiente

Para *G. catenatum* los carbohidratos totales se cuantificaron considerando el número de células, así como el volumen cosechado:

$$\text{ng de HDC / célula} = ((\text{ABS} / \text{m}) \cdot 1000) / ((\text{No. de células} \cdot 25))$$

Dónde: **ABS**: absorbancia; **m**: pendiente

6.7.4. Lípidos

La determinación total de lípidos se realizó siguiendo el método gravimétrico propuesto por Folch y colaboradores (1956) y modificado por Bligh y Dyer (1959) el cual se basa en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo:metanol y agua



(CHCl₃: CH₃ OH: H₂O) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas.

Grosso modo, al agregar agua y cloroformo al extracto resultante, se forma una solución bifásica cuya parte superior alberga agua y la inferior cloroformo, que contiene aproximadamente el 96% de los lípidos, mientras que la parte superior se integra por el resto de los lípidos y todas las moléculas no lipídicas, de esta manera, al eliminarla se resta la mayor cantidad de impurezas.

Para lograr una extracción exitosa es recomendable realizar lavados con el disolvente puro. El número de lavados dependerá de la naturaleza de la muestra así como de la precisión del estudio.

Una vez que se tuvieron los extractos tanto de ambas bacterias como de las cepas de *G. catenatum*, se colocaron en un tubo de plástico nuevo, previamente lavado y secado. Del extracto de las bacterias se tomaron 200 µL mientras que el botón celular del dinoflagelado se transfirió directamente.

Posteriormente se agregaron 3 mL de cloroformo:metanol 2:1 (CHCl₃: CH₃ OH) grado HPLC y se sonicaron por 3 min y se dejaron en refrigeración por 24 h.

Después de las 24 h, a cada tubo se le agregaron 2 mL de agua destilada, se colocaron en el vortex, a velocidad media, por 30 seg y posteriormente se centrifugaron a 4 000 rpm por 20 min a 5° C para lograr una mayor estratificación entre las capas de cloroformo:agua.

Se recuperó la fase clorofórmica (capa inferior) con una pipeta pasteur y se colocó en un tubo nuevo. Se realizaron tres lavados, agregando para cada uno, 3 mL de cloroformo:metanol 2:1 (CHCl₃: CH₃ OH) grado HPLC y se realizó el método descrito anteriormente, colocando la fase clorofórmica en el mismo tubo que la primera.

Todos los tubos, destapados y dentro de una campana de extracción, se colocaron en baño maría a 45 ± 5° C por 12 h o hasta que la fase clorofórmica se redujo a 500 µL, aproximadamente.



A la par, se lavaron pequeños viales de vidrio con tapa de rosca con 1 mL de mezcla crómica (H_2CrO_4) y se obtuvo su peso constante, dejándolos destapados dentro de una estufa Blue M a $110^\circ C$ por 24 h para posteriormente pesarse en una balanza analítica Met Toledo modelo ME204TE. Dicho proceso se repitió por 3 días consecutivos.

Obtenido el peso constante de los viales, se transfirió la fase clorofórmica a cada vial y se realizaron dos lavados más, cada uno de 300 μL de cloroformo concentrado. Se evaporó al 100% el cloroformo en un thermoblock VWR Analog Heatblock II Dry Block a $50 \pm 5^\circ C$ y posteriormente se colocaron los viales dentro de la estufa ($110^\circ C$) por una hora para finalmente pesarse en la misma balanza analítica donde se obtuvo el peso constante de los viales.

La cuantificación total de lípidos, tanto para bacterias como para *G. catenatum* se realizó a través de la diferencia de pesos, específicamente para las bacterias se utilizó la fórmula siguiente:

$$\text{ng de LIP} = ((\text{peso del vial con muestra} - \text{peso cte. promedio del vial}) \cdot 1000)$$

En cuanto a las muestras del dinoflagelado, sin discernir en presencia o ausencia de las bacterias, la cuantificación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{ng de LIP / célula} = (((\text{peso del vial con muestra} - \text{peso cte. promedio del vial}) \cdot 1000) / (\text{No. células} \cdot 25))$$

6.8. Determinación de pigmentos

Para la obtención del perfil de pigmentos de las bacterias y de *G. catenatum* en presencia/ausencia de la bacteria a, b y ab, los cultivos se agitaron suavemente antes de tomar la alícuota del cultivo, que dependiendo de la cepa se realizó a lo largo de la curva de crecimiento (GCCV-7, GCMV-7 y 62L) o en un tiempo inicial y final a mitad de la fase exponencial (GCCV-7 en presencia/ausencia de las bacterias).

Se filtraron 25 mL del cultivo a través de una membrana de fibra de vidrio de 25 mm GF/F, los filtros se mantuvieron en tubos eppendorf cubiertos de aluminio y se



congelaron inmediatamente a 4°C hasta su análisis en el Laboratorio de Microalgas Nocivas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Para los cultivos del dinoflagelado se tomó una alícuota de 2 mL que se preservó con una solución de lugol ácido al 1% (Thronsen, 1979) para conteos celulares, los cuales se realizaron como se describe en la sección 6.6.2.

El material retenido en cada filtro se utilizó para identificar y cuantificar los pigmentos fotosintéticos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en un equipo Agilent HP 1100; extrayendo con pinzas cada filtro y colocándolos dentro de tubos de plástico de 25 mL, donde fueron macerados con una varilla de vidrio para posteriormente agregarles 2 mL de acetona grado HPLC y refrigerarse por 24 h.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm, con una temperatura de 4°C durante 25 min. Al finalizar, el sobrenadante se recuperó y se colocó en un vial ámbar, específicos para HPLC, donde se inyectaron 40 µL al sistema, utilizando 440 nm como longitud de onda debido a que la mayoría de los pigmentos registra una buena emisión a esta longitud, que si bien no es la máxima si representa un segundo máximo (Vidussi *et al.*, 1996).

La cuantificación de los principales pigmentos se basó en el valor del factor de respuesta de cada pigmento (concentración de pigmento/absorbancia) de acuerdo a Vidussi y colaboradores (1996) y Montoura y Repeta (1997), considerándose el tiempo de retención y las características espectrales con estándares comerciales certificados (Agencia Internacional para determinaciones de ¹⁴C, Dinamarca).

6.9. Determinación del perfil de toxinas paralizantes

La extracción de toxinas se realizó en diferentes etapas de la curva de crecimiento de las cepas de *G. catenatum*. Para las cepas GCMV-7, 62L y GCCV-7 la determinación se realizó abarcando la curva de crecimiento con cuatro cosechas distintas mientras que para la cepa GCCV-7 en presencia/ausencia de las bacterias *a*, *b* y *ab* se realizó en dos ocasiones (Ver sección 6.7.1).



Se tomó una alícuota de 25 mL, posterior a una suave agitación de los matraces. Se filtró el cultivo a través de filtros de 25 mm GF/F, se añadieron 2 mL de ácido acético (0.03N) y se maceró el filtro con una varilla de vidrio. El sobrenadante se transfirió a un tubo de plástico nuevo de 25 mL previamente lavado y secado; se sonicó (35 kHz) tres veces por cinco minutos en intervalos de 60 seg.

Los tubos se centrifugaron a 4 000 rpm por 15 min a 15° C y el sobrenadante se filtró con acrodiscos de 13 mm y 0.45 µm de tamaño de poro, colocándose en un vial transparente especial para HPLC.

Se tomó una alícuota de 150 µL del extracto clarificado, que se utilizó para la hidrólisis con HCl (1M) para transformar las toxinas decarbamatadas (tipo B y C) a sus análogos. Finalmente, 10 µL de ambos extractos (con y sin hidrólisis) se inyectaron en el sistema HPLC (HP 1260 Infinity II) (Hummert *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998).

La cromatografía se llevó a cabo como lo sugerido por Hummert y colaboradores en 1997 y Yu y colaboradores en 1998, utilizando un gradiente amortiguado de pares de iones (ion-pair-buffer), compuesto de una solución de ácido octanosulfónico y fosfato de amonio a un pH de 6.9 y acetonitrilo, para separar las toxinas paralizantes.

Después de una oxidación postcolumna con ácido periódico alcalino, los productos resultantes se detectaron con un detector de fluorescencia (HP 1116) a una longitud de onda de 330 nm (excitación) y de 395 nm (emisión).

La identificación de toxinas se llevó a cabo comparando cromatogramas de las muestras con los de sus respectivos estándares (National Research Council, Canadá) y la cuantificación se realizó comparando las áreas de los picos de extractos de estándares con el correspondiente factor de respuesta.

6.10. Asociación entre *Gymnodinium catenatum* y bacterias

Se escaló la cepa GCCV-7 de *G. catenatum*, inoculando un total de 15 matraces de 250 mL con una densidad inicial de 500 cél/mL en un volumen final de 150 mL de medio GSe. Los matraces, de manera general, se dividieron en tres grandes grupos: tiempo inicial (**t₀**), tiempo final (**t_f**) y tratamientos, que a su vez representaron la



inoculación de las dos poblaciones de bacterias a la cepa GGCV-7, así, el tratamiento **a** correspondió a la **bacteria VB1**, el tratamiento **b** al inóculo de la bacteria **VB2** y el tratamiento **c** hizo alusión al inóculo de ambas bacterias **VB1/2**.

Una vez que el inóculo del dinoflagelado se colocó en todos los matraces, se esperó al día 12 (mitad de la fase de crecimiento exponencial, obtenido de la curva de crecimiento de la cepa) para realizar la primer cosecha del cultivo, correspondiente al t_0 y que a la par indicó el día del inóculo de las bacterias en el tratamiento respectivo, con una densidad inicial de 10^5 cél/mL.

Una vez que se inocularon las bacterias, se continuó con el crecimiento por cuatro días, siendo en el día 16 dónde se realizó la segunda cosecha, en esta ocasión tanto de los tratamientos como del t_r .

Cabe resaltar que tanto los controles (t_0 y t_r) como los tratamientos se realizaron por triplicado, tomando una alícuota de 2 mL de cada matraz para los conteos celulares de *G. catenatum*, fijando las células con una solución de lugol ácido al 1% (Thronsen, 1979), utilizando una cámara de Sedgwick-Rafter de 1 mL en un microscopio óptico Zeiss Vert. A1 y registrando la longitud de las cadenas celulares. Las bacterias únicamente se contabilizaron antes de ser inoculadas al dinoflagelado para corroborar la densidad del inóculo, obteniendo una alícuota de 500 μ L diluidos en una proporción 1:2 con la solución salina amortiguada por fosfatos (PBS 1%). Se fijaron con formol a una concentración final de 4% y se mantuvieron a 4° C en oscuridad hasta su montaje y análisis por microscopía de epifluorescencia.

La cosecha, en general, se realizó mediante centrifugación de 25 mL del cultivo a 3 000 rpm, 4° C por 15 min, obteniendo cinco alícuotas para la cuantificación de proteínas, carbohidratos, lípidos, toxinas paralizantes y pigmentos.



6.11. Influencia de las bacterias en la germinación de quistes de *Gymnodinium catenatum*

6.11.1. Inducción al proceso sexual entre las cepas BAPAZ 7 y 62L

Los inóculos de cada cepa se mantuvieron en matraces de 150 mL con un volumen final de 75 mL de medio GSe, una vez que la biomasa celular alcanzó su máximo se procedió a realizar la cruza. Para ello, en cajas Petri estériles se colocaron 10 mL de medio GSe deficiente en Nitrógeno inoculándose 4 mL de cada cepa. Las cajas fueron selladas del borde con parafilm y se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo ya descritas.

Cada tercer día se revisaron las cajas con un estereoscopio Zeiss Stemi SV6 y se hicieron anotaciones respecto a los estadios del ciclo de vida que se observaban, así como peculiaridades que se consideraron importantes. Una vez que se formaron los quistes se procedió a extraerlos.

6.11.2. Aislamiento y esterilización de quistes

Cuando se observó la presencia de quistes en las cajas Petri se procedió a extraerlos mediante la técnica de micropipeta y se colocaron grupos de 25 quistes en tubos eppendorf de 600 μ L con 500 μ L de medio GSe estéril por autoclave, posteriormente se agregaron 100 μ L de H₂O₂ 0.55% (v/v) y se incubaron en oscuridad por 30 min.

Concluido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 4 000 rpm por 30 seg, eliminando cuidadosamente el sobrenadante con micropipeta. Este paso se realizó tres veces, añadiendo 500 μ L de medio GSe estéril por autoclave entre cada centrifugación.

Finalmente, los lotes de quistes se colocaron en placas de 6 pozos, cada uno con 2 mL de medio GSe estéril por autoclave.



6.11.3. Inoculación de bacterias

El inóculo de las bacterias se mantuvo en medio líquido GSe, resemebrándose periódicamente para evitar el declive celular.

A través de la curva de crecimiento de cada bacteria se pudo determinar con exactitud el día de máxima biomasa celular, misma que sirvió para ajustar la densidad celular inicial a 10^5 cél/mL, concentración que fue inoculada en la placa de pozos que albergaban ya a los quistes.

De esta manera, el experimento se delimitó como se muestra en la figura 4, considerando que tanto los controles como los tratamientos se realizaron por duplicado y bajo las condiciones de cultivo ya descritas.

Las placas se revisaron cada tercer día, anotando los detalles morfológicos observados, como la presencia del estigma, germinación, esbozos del cíngulo y sulcus, aparición del flagelo, inicio de la pigmentación, entre otras. Se contabilizó el total de quistes germinados en cada tratamiento, así como el tiempo de germinación.

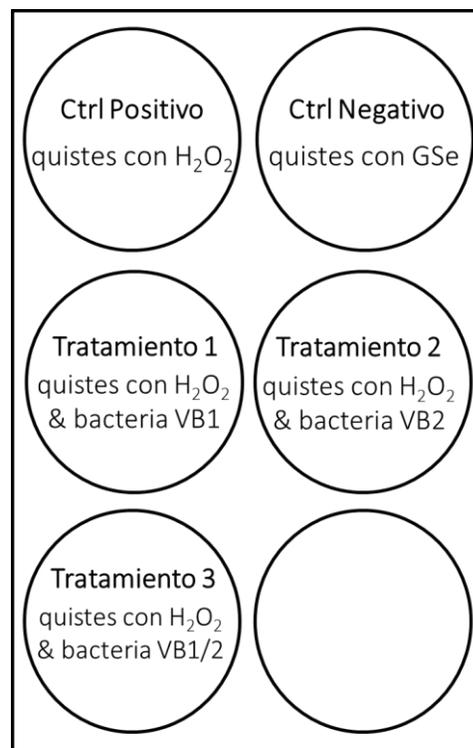


Figura 4. Esquema de la caja multipozos con los detalles respectivos a los **grupos control** y **tratamientos** de la inoculación de las bacterias en los quistes de *G. catenatum*.



6.11.4. Cambios en el perfil de toxinas paralizantes

Los inóculos para este experimento correspondieron a las cepas obtenidas a través de la germinación de los quistes aislados e inoculados con la bacteria VB1, VB2 y VB1/2; por lo que una vez germinados, se mantuvieron en medio GSe estéril por autoclave y se escalaron progresivamente en 500 mL hasta lograr una densidad inicial de 500 cél/mL en 70 mL de medio GSe estéril por autoclave en matraces de 250 mL.

Se colocaron 15 matraces con las características antes mencionadas, los cuales correspondieron, por triplicado, a: **grupos control:** cepas parentales que se indujeron al proceso sexual (BPAZ 7 y 62L) y **tratamientos:** aquellos a los que se les inoculó la bacteria a, b y ab en una concentración inicial de 10^5 cél/mL.

El inóculo bacteriano se realizó al décimo día de crecimiento de *G. catenatum*, mismo día en el que se cosechó la primer ronda de matraces correspondientes al tiempo inicial (t_0). Alternadamente, el crecimiento se siguió por cuatro días más, realizando la cosecha final el día 14 (tiempo final (t_f)) tanto del cultivo control como de los distintos tratamientos.

En ambas cosechas se tomó una alícuota de 25 mL, los cuales se filtraron a través de filtros de 25 mm GF/F, se añadieron 2 mL de ácido acético (0.03N) y se maceró el filtro con una varilla de vidrio. Posteriormente, el método a seguir fue el ya descrito en la sección 6.9 de este apartado.

6.12. Análisis estadísticos

Para obtener las diferencias en la producción total de los diversos metabolitos de las cepas de *G. catenatum* se aplicó un análisis de varianza unifactorial, probando la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homoscedasticidad con la prueba de Levene. Mientras que para la cepa GCVV-7 en presencia de las bacterias a, b y ab se realizó una prueba *t* de student (Zar, 1999).

Las diferencias en la biomasa máxima, tasa de crecimiento y tiempo de generación de la cepa GCVV-7 en presencia de las bacterias VB1, VB2 y VB1/2 se obtuvieron con un análisis de varianza unifactorial, probando la normalidad de los



datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homoscedasticidad con la prueba de Levene (Zar, 1999).

Las diferencias en la longitud de cadenas celulares, así como en el perfil de toxinas se evaluaron con la prueba estadística χ^2 , mientras que las diferencias en el perfil de pigmentos se evaluaron con la prueba *t* de student (Zar, 1999).

Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizaron pruebas *a posteriori* de comparación de medias de Tukey (Day y Quinn, 1989) para grupos homogéneos.

Los análisis se realizaron utilizando el software Statistica v12.0 (StatSoft, Inc.) con un nivel de significancia de 0.05.

VII. RESULTADOS

7.1. Sorting celular

La población a separar se caracterizó a través de dos detectores, uno de dispersión frontal que refleja el tamaño de la célula (Forward Scatter FSC) y otro de dispersión lateral que refleja, ya sea la autofluorescencia de las células, o bien de un fluorocromo particular como en este caso el de la fluorescencia de la ficoeritrina (Red fluorescence). De esta manera, se identificó una población dispersa y alargada dónde la mayoría de las células presentaron un tamaño considerable, así como una buena señal de autofluorescencia al ubicarse en el cuadrante superior izquierdo del citograma (Fig. 5).

No obstante, con esta información únicamente conocimos el tamaño relativo más no podíamos obtener un valor real, lo mismo ocurrió con la autofluorescencia celular, así que se decidió utilizar un control de compensación biológico y teñido que lograra contrastar ambos parámetros. Para tal fin, se eligió a *Salmonella enteritidis* y la tinción celular se realizó con el fluorocromo Hoechst 33342.

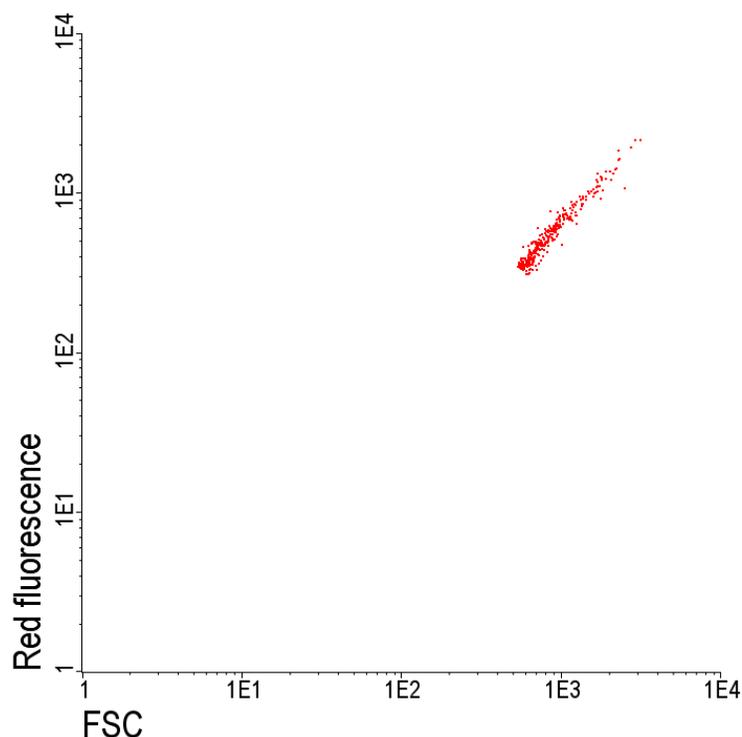


Figura 5. Citograma de la delimitación de la población de bacterias con autofluorescencia a través de citometría de flujo. **Eje horizontal:** tamaño de la partícula (FSC). **Eje vertical:** fluorescencia de la ficoeritrina.

Una vez teñidas las células, el citómetro reconoció a las dos poblaciones de bacterias, una población con mayor autofluorescencia y tamaño en color azul que correspondió a *S. enteritidis* debido a que el patrón de distribución que presenta dentro del citograma ya está estandarizado por la Unidad de Inmunología del CMN Siglo XXI y la segunda población, en rojo, correspondió a la población de bacterias de interés, la cual al ser teñida y contrastada con *S. enteritidis* logró centrarse en el citograma, evidenciando un mayor número de células con un tamaño aproximado de 4-5 μm y una fluorescencia media, suficiente para realizar la separación celular (Fig. 6).

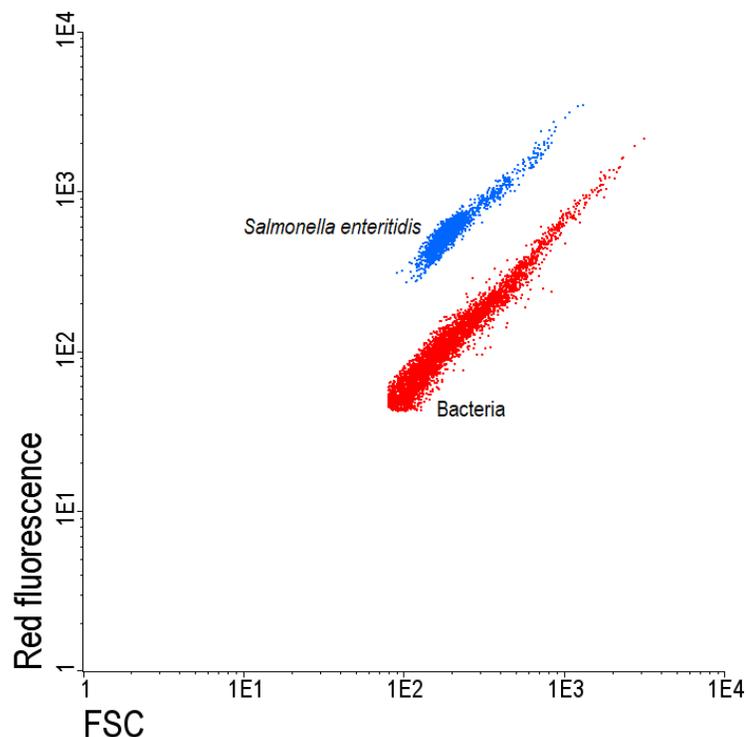


Figura 6. Citograma de las poblaciones de bacterias teñidas con el fluorocromo Hoechst 33342 a través de citometría de flujo. **Eje horizontal:** tamaño de la partícula (FSC). **Eje vertical:** fluorescencia de la ficoeritrina. **Rojo:** población de *Salmonella enteritidis*. **Azul:** población de bacterias de interés.

Debido a que la caracterización de la población de bacterias que nos interesaba separar se evidenció con y sin tinción, se optó por realizar el sorting bajo ambos escenarios. En ausencia de un fluorocromo, se aislaron un total de 1 639 células en 380 seg con una eficiencia/pureza del 100%. Al realizar una adquisición post sort en el citómetro nos percatamos que la población aislada presentaba dos morfologías celulares diferentes, una más pequeña y con poca autofluorescencia que se localizaba en el cuadrante inferior izquierdo del citograma y la segunda, en efecto, constituía a la población que se había caracterizado anteriormente situándose en la parte central del citograma (Fig. 7).

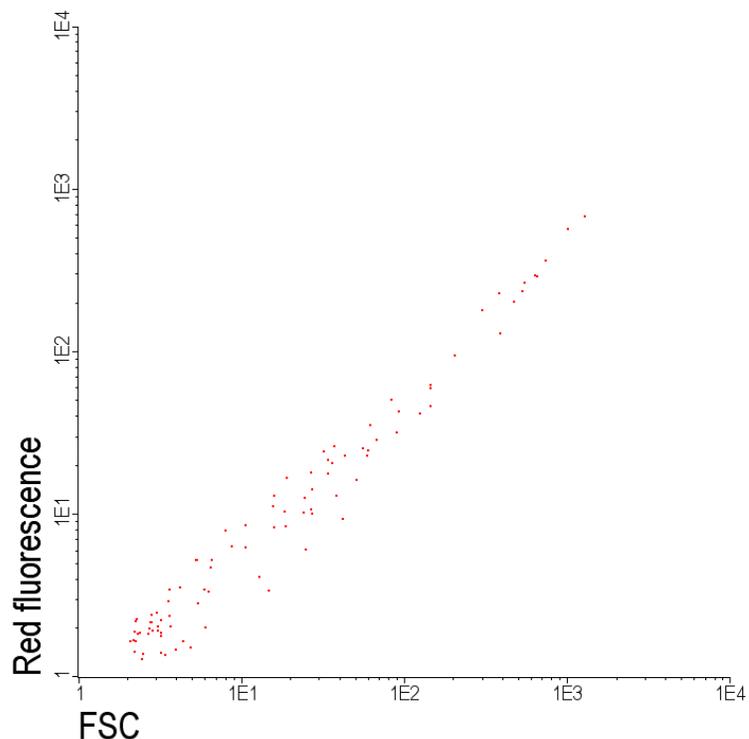


Figura 7. Citograma post-sort de las poblaciones de bacterias aisladas. **Eje horizontal:** tamaño de la partícula (FSC). **Eje vertical:** fluorescencia de la ficoeritrina.

Una vez realizado el sorting en la muestra teñida, de igual manera se tomó una alícuota para analizarse en el citómetro. En esta ocasión, debido a que el número de células aisladas fue mayor (18 062 células en 648 seg con 97.7% de eficiencia/pureza), se hizo más evidente la presencia de las dos poblaciones de bacterias, tal como ocurrió en las muestras sin tinción. La primera población se ubicó en el cuadrante inferior izquierdo del citograma, lo que nos indica que presenta un tamaño pequeño y muy baja fluorescencia, contrario a la segunda población, que se caracterizó por tener un mayor tamaño y autofluorescencia comparado con la primera población, esto basado en la posición central que ocupó dentro del citograma (Fig. 8).

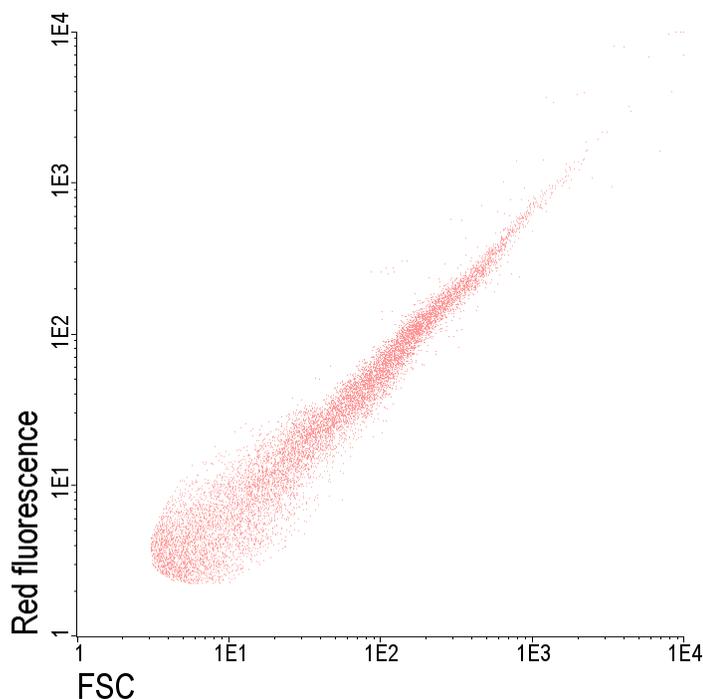


Figura 8. Citograma post-sort de las poblaciones de bacterias aisladas y teñidas con el fluorocromo Hoechst 33342. **Eje horizontal:** tamaño de la partícula (FSC). **Eje vertical:** fluorescencia de la ficoeritrina.

7.2. Identificación molecular de las poblaciones de bacterias

Las bacterias aisladas de la cepa G7 de *G. catenatum* mediante sorting celular fueron identificadas utilizando el análisis del gen 16S del ARNr, extrayendo el ADN con dos métodos, para la bacteria VB1 con el protocolo del CTAB mientras que para la bacteria VB2 mediante PCR de colonia. La amplificación de ambas bacterias fue exitosa utilizando oligos universales para bacterias y cianobacterias, respectivamente.

El ADN de las bacterias fue extraído y confirmado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cuanto a los productos de amplificación que se mandaron secuenciar, también fueron visualizados en geles de agarosa al 1%. En la figura 9 se puede observar, del lado izquierdo las bandas correspondientes a la extracción de ADN mientras que del lado derecho se visualizan ambos productos de amplificación, para la bacteria VB1 se obtuvo un producto de 1300 pb mientras que para la bacteria VB2 fue de 700 pb.

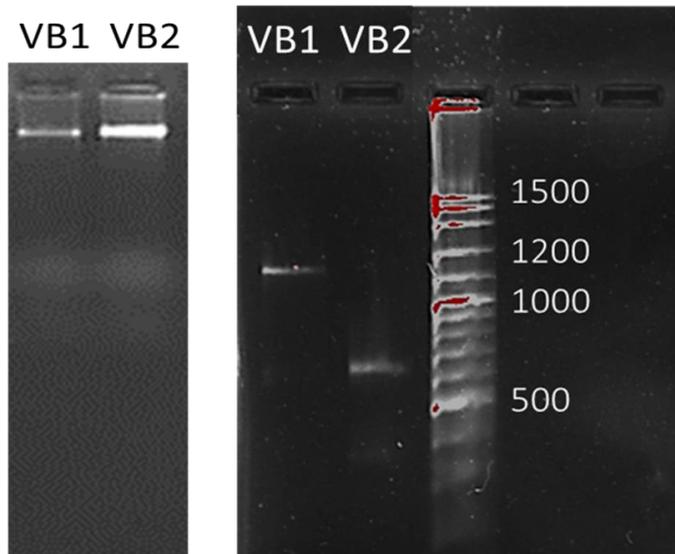


Figura 9. Izquierda confirmación de extracción de ADN a través de geles de agarosa al 1%. Derecha productos PCR de las bacterias aisladas por sorting celular. **VB1** (*Alteromonas* spp.). **VB2** (*Roseovarius* spp.). En la tercer pozo se encuentra el marcador molecular con la longitud de pb de los productos amplificados.

Las secuencias fueron analizadas mediante un alineamiento BLAST con aquellas reportadas en el NCBI (National Center of Biotechnology Information) y que ya han sido descritas asociadas a *G. catenatum* por Green y colaboradores (2004 y 2010), lo cual permitió establecer la clasificación taxonómica de las dos cepas aisladas (Tabla II).

Tabla II. Comparación de las bacterias asociadas a la cepa G7 de *G. catenatum* con secuencias reportadas en el NCBI

Afiliación filogenética	No. acceso	% identidad	Origen de la cepa	Referencia
<i>Alteromonas macleodii</i>	Y18228	92	<i>G. catenatum</i> CAWD101	Green <i>et al.</i> , 2004
<i>Alteromonas DG1136</i>	AY258116	92	<i>G. catenatum</i> GC21V	Green <i>et al.</i> , 2004
<i>Alteromonas DG893</i>	AY258110	96	<i>G. catenatum</i> GC21V	Green <i>et al.</i> , 2010
<i>Alteromonas DG944</i>	AY258090	92	<i>G. catenatum</i> GCJP01	Green <i>et al.</i> , 2004
<i>Roseovarius tolerans</i>	Y11551	96	<i>G. catenatum</i> GCJP01	Green <i>et al.</i> , 2010
<i>Roseovarius GCDE08</i>	AF098495	96	<i>G. catenatum</i> GCDE08	Green <i>et al.</i> , 2010
<i>Roseovarius GCJP01</i>	AF041442	96	<i>G. catenatum</i> GCDE08	Green <i>et al.</i> , 2010



La bacteria VB1 se alineó en un 100% con la bacteria *Alteromonas* DG893 que a su vez se aisló de la cepa GC21V de *G. catenatum* originaria de Ria de Vigo, España mientras que la bacteria VB2, se alineó en un 99% con las bacterias pertenecientes al género *Roseovarius*, las cuales han sido aisladas de dos cepas de *G. catenatum*: GCJP01 y GCDE08 originarias del Mar Interior de Seto, Japón y del Río Derwent, Tasmania, respectivamente.

Se elaboró un árbol filogenético (Fig. 10) con base a las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos empleados a través del método del vecino más cercano dónde se evidencian las relaciones taxonómicas de las dos bacterias aisladas con aquellas reportadas en el NCBI asociadas a *G. catenatum*. A un costado de las ramas se observan los porcentajes de replicación a los cuales se asocian los grupos de taxa en las pruebas *bootstrap* con 1 000 réplicas.

El árbol filogenético se separó en dos clados evidentes, dentro del primero se integró a la bacteria VB1 con las bacterias pertenecientes al género *Alteromonas*, mientras que en el segundo clado, correspondiente a las bacterias del género *Roseovarius* quedó inmersa la bacteria VB2 (Fig. 10).

En resumen, la bacteria VB1 pertenece al género *Alteromonas* spp. y la bacteria VB2 al género *Roseovarius* spp. por lo que a partir de esta sección serán referidas de esta manera. La tabla III muestra la posición taxonómica de las bacterias VB1/2 aisladas de *G. catenatum*.

Tabla III. Posición taxonómica de las bacterias aisladas de la cepa G7 de *Gymnodinium catenatum*.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	<i>Alteromonas</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Roseovarius</i>

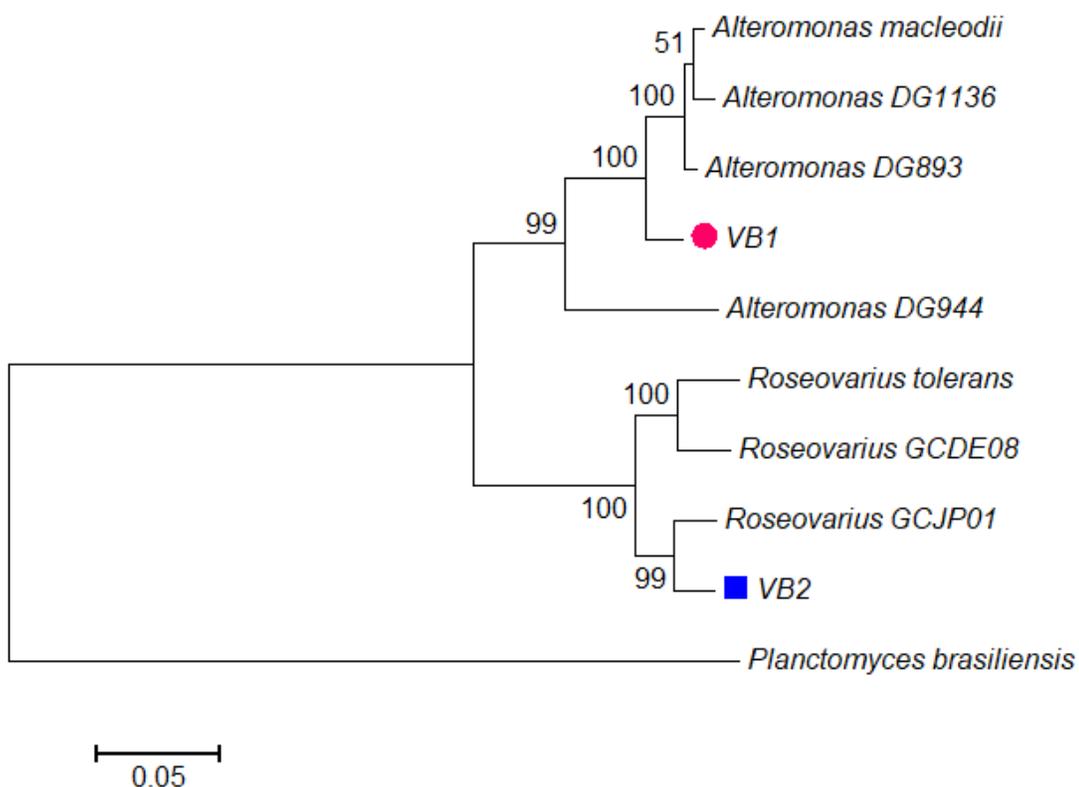


Figura 10. Árbol filogenético de las bacterias aisladas de *Gymnodinium catenatum* obtenido con oligonucleótidos universales para bacterias y cianobacterias por el método de Neighbor Joining. **Círculo rosa:** VB1 (*Alteromonas* spp.). **Cuadro azul:** VB2 (*Roseovarius* spp.). Los números indican el soporte de bootstrap. Aquellas cepas bacterianas que carecen de clave indican la especie a la que se llegó por Biología Molecular mientras que las que sí presentan indican de qué cepa de *G. catenatum* fueron aisladas.

7.3. Curvas de crecimiento

7.3.1. Bacterias

Las curvas de crecimiento de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. se obtuvieron a través del conteo celular por microscopía de epifluorescencia, observándose una mejor delimitación de la forma celular así como de las diferentes fases de crecimiento características del crecimiento bacteriano.



En el caso de *Alteromonas* spp. se obtuvo una fase de aclimatación corta (8 h), seguida de un crecimiento exponencial gradual que concluyó a las 48 h con el día de máxima biomasa celular ($214\,815 \pm 12\,830$ cél/mL). Posterior a los dos días, la biomasa celular disminuyó drásticamente, más de la mitad (de $214\,815 \pm 12\,830$ a $105\,413 \pm 4\,935$ cél/mL) para continuar su descenso hasta las 96 h (Fig. 11). La tasa de crecimiento fue de $0.014 (\pm 0.002)$ div/día y el tiempo de generación de $20.074 (\pm 0.82)$ horas.

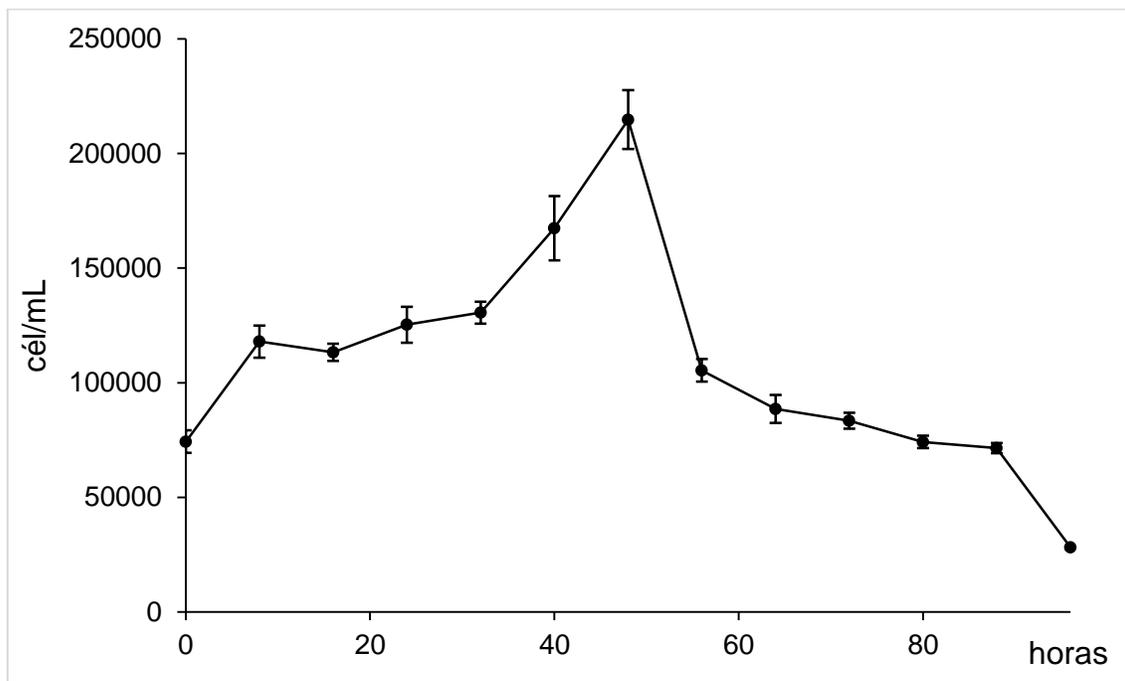


Figura 11. Curva de crecimiento de *Altromonas* spp. en medio GSe estéril por autoclave a $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. Líneas verticales: desviación estándar.

Roseovarius spp. presentó una mejor delimitación de las fases de crecimiento, teniendo una fase de aclimatación de 16 h, seguida por una fase de crecimiento exponencial que terminó a las 80 h registrando la biomasa máxima celular ($83\,430 \pm 3\,479$ cél/mL). Posterior a este punto comenzó el declive celular gradual (Fig. 12). La tasa de crecimiento fue de $0.028 (\pm 0.001)$ div/día con un tiempo de generación de $10.572 (\pm 0.451)$ horas.

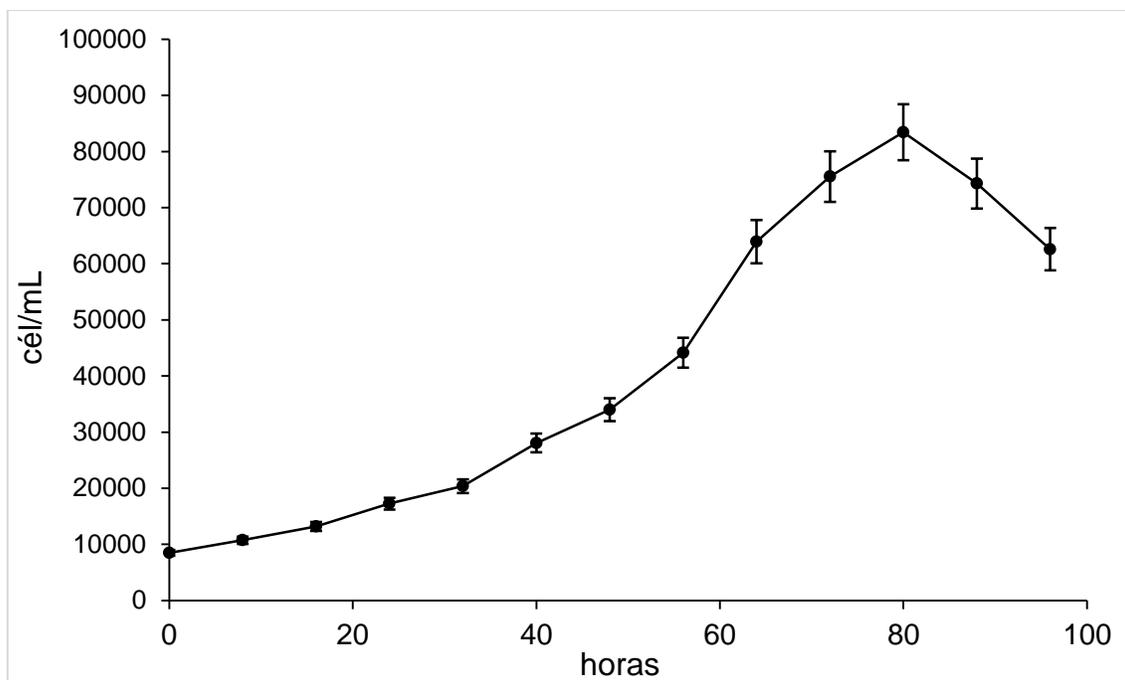


Figura 12. Curva de crecimiento de *Roseovarius* spp. en medio GSe estéril por autoclave a 24 °C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. Líneas verticales: desviación estándar.

La microscopía de epifluorescencia además de permitirnos obtener las curvas de crecimiento a través de los conteos celulares, también nos dejó evidenciar la morfología y tamaño de ambas bacterias. *Alteromonas* spp. presentó una morfología tipo bacilo, como el vocablo latín *bacillus* lo menciona, hace referencia a una barra, forma alargada, delgada y corta, Mientras que *Roseovarius* spp. presentó una morfología tipo coco, del griego *kokkos*, que significa baya, forma esférica (Fig. 13).

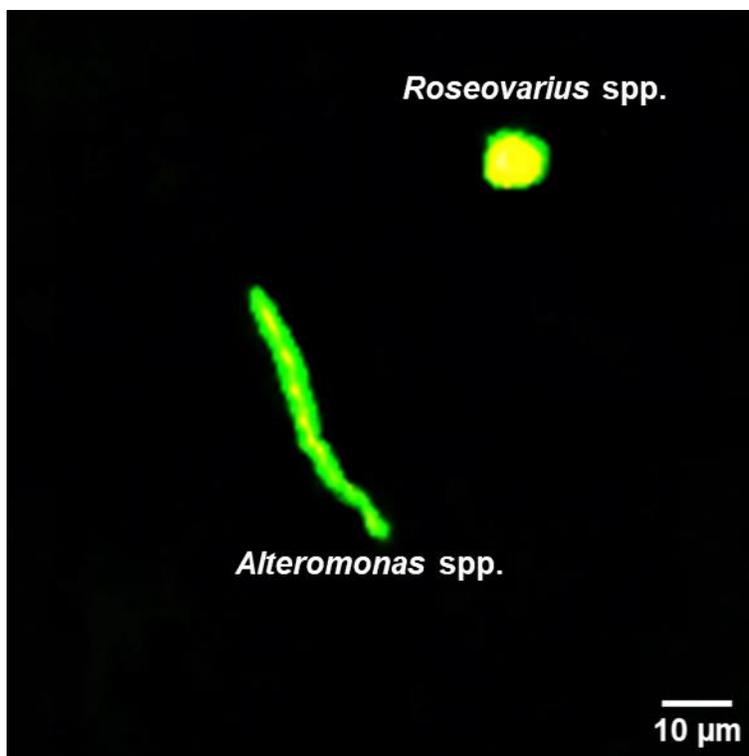


Figura 13. Micrografía de la morfología de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp., con microscopía de epifluorescencia, 1000 x.

7.3.2. *Gymnodinium catenatum*

Las tres cepas: GCCV-7, GCMV-7 y 62L presentaron la típica curva de crecimiento de *G. catenatum*, la cual se caracteriza por tener una fase de aclimatación corta, seguida de una fase exponencial que concluye con el día de máxima biomasa celular (fase exponencial tardía), posterior a esta y salvo contadas excepciones, se presenta la fase estacionaria que tiende a ser corta e incluso nula para concluir con un declive celular inmediato (Fig. 14).

La cepa GCCV-7 presentó una fase de aclimatación de dos días, seguida de un crecimiento exponencial gradual que concluyó a los 14 días con una biomasa celular de 2 175 (\pm 15) cél/mL. A partir del día 16, las células comenzaron su descenso para finalmente concluir con los conteos el día 20 (Fig. 14).

Para la cepa GCMV-7, que presentó un patrón de crecimiento bastante similar al anterior, se registró una fase de aclimatación de dos días, posteriormente comenzó la



fase exponencial que tuvo una duración de $18.7 (\pm 1.24)$ días, concluyendo en el día de máxima biomasa celular ($2\ 155 \pm 15$ cél/mL). Esta cepa no presentó una fase estacionaria por lo que una vez alcanzada la fase exponencial tardía comenzó el declive celular (Fig. 14).

Finalmente, la cepa 62L fue la que presentó la curva de crecimiento más corta (16 días). Sin embargo, también fue la que registró una fase de aclimatación de cuatro días, seguida de un ligero descenso celular. La fase de crecimiento exponencial comenzó el día 6 y concluyó el día 12, registrando una biomasa máxima celular de $4\ 137 (\pm 333)$ cél/mL. La fase estacionaria no se presentó en esta cepa mientras que el declive celular, al igual que en las cepas anteriores fue inmediato y posterior a la fase exponencial tardía (Fig. 14).

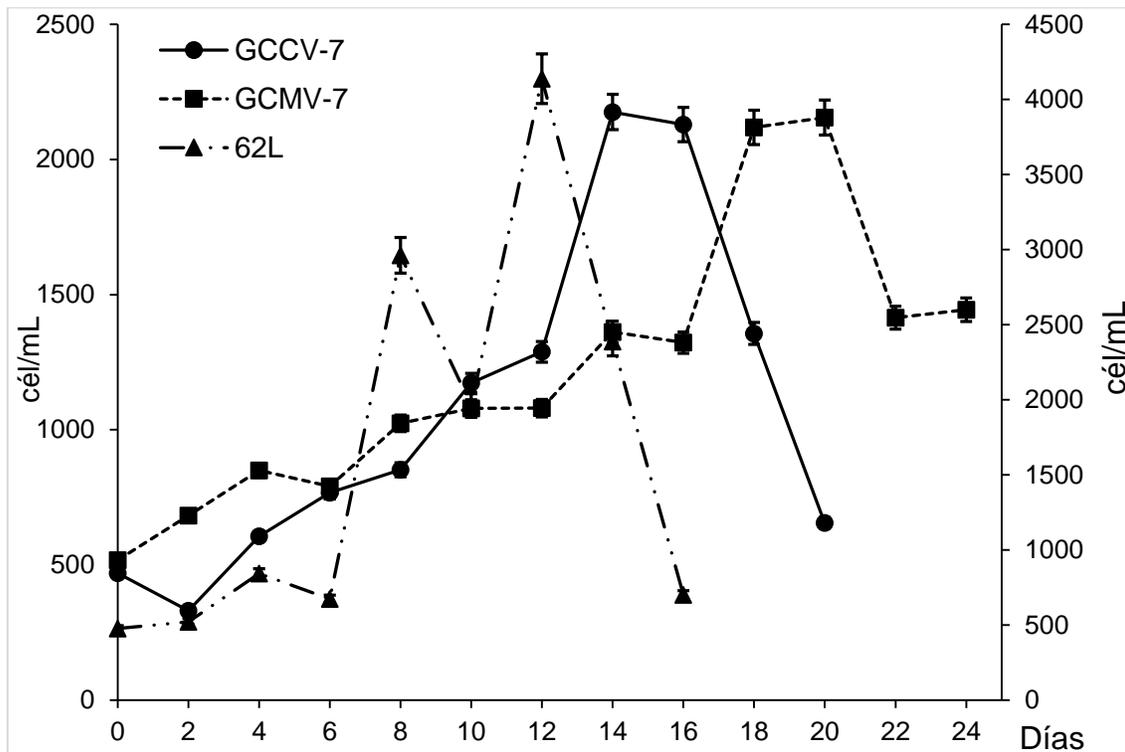


Figura 14. Curvas de crecimiento de las tres cepas de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe a 24 °C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. **Círculos:** GCCV-7. **Cuadros:** GCMV-7. **Triángulos:** 62L. Líneas verticales: desviación estándar. Eje vertical derecho: GCCV-7 y GCMV-7. Eje vertical izquierdo: 62L.

Las tasas de crecimiento oscilaron entre 0.06 y 0.2 div/día, siendo la cepa GCMV-7 la que presentó la menor con $0.063 (\pm 0.03)$ div/día, seguida por la cepa



GCCV-7 cuya tasa de crecimiento fue de $0.156 (\pm 0.001)$ div/día y la cepa michoacana registró la mayor tasa con $0.206 (\pm 0.01)$ div/día (Tabla IV).

El tiempo de generación menor lo presentó la cepa 62L (1.4 ± 0.001 días), seguido de la cepa GCCV-7 (1.9 ± 0.12 días) y finalmente la cepa GCMV-7 que presentó el mayor tiempo de generación (4.7 ± 0.13 días) (Tabla IV).

Tabla IV. Datos promedio del crecimiento de las tres cepas de *G. catenatum* en medio GSe.

Cepa	Inicio de la fase exponencial	Fin de fase exponencial (días)	Tasa de crecimiento (div/día)	Abundancia máxima (cél/mL)	Tiempo en alcanzar la biomasa máxima (días)	Tiempo de generación (días)
GCCV-7	2	12.7 ± 2.35	0.156 ± 0.01	2175 ± 15	14.0 ± 1.93	1.9 ± 0.12
GCMV-7	2	18.7 ± 1.24	0.063 ± 0.03	2155 ± 38	20.1 ± 1.75	4.7 ± 0.13
62L	4	10.3 ± 3.72	0.206 ± 0.01	4137 ± 333	12.8 ± 1.04	1.4 ± 0.01

7.4. Formación de cadenas celulares

A lo largo de la curva de crecimiento de cada cepa se mantuvo un registro del patrón de formación de cadenas celulares (Tabla V), observándose un dominio de las células individuales en dos de las tres cepas (GCCV-7 y GCMV-7), seguido por la formación de cadenas de 2-3 células, de 4-6 células y finalmente, en menor porcentaje las cadenas de 7 células y de mayor longitud.

El comportamiento en la formación de cadenas celulares varía para cada cepa, sin embargo, en esta ocasión, las cepas GCMV-7 y 62L mostraron el mayor porcentaje de cadenas largas (7 células y mayores) durante la fase exponencial mientras que la cepa GCCV-7 tuvo tal comportamiento durante la aclimatación.



Tabla V. Porcentaje promedio de cadenas celulares y día de cultivo con mayor porcentaje de cadenas de 7 células y mayores en *Gymnodinium catenatum*. Los números resaltados en negritas, representan los mayores valores en cada categoría.

Cepa	Células individuales	%			Día con la mayor proporción de cadenas ≥ 7 (% / día / fase)
		Cadenas 2-3	Cadenas 4-6	Cadenas ≥ 7	
GCMV-7	33 \pm 10	37 \pm 15	19 \pm 10	12 \pm 9	26% / 12 / exponencial
GCCV-7	47 \pm 14	30 \pm 13	18 \pm 7	5 \pm 3	13% / 2 / aclimatación
62L	37 \pm 25	21 \pm 6	31 \pm 16	10 \pm 6	19% / 6 / exponencial

La cepa GCCV-7 mostró una heterogeneidad en el patrón de formación de cadenas celulares, iniciando con un dominio de células individuales (47 \pm 14%) que a partir del día dos comienza a disminuir para dar lugar a cadenas más largas, principalmente de 2-3 células, dicho patrón se observó a lo largo de la fase exponencial, alternándose con la formación de cadenas de 4-6 células. Una vez obtenida la biomasa máxima total, la formación de cadenas largas disminuye para dar lugar, nuevamente, a un mayor porcentaje de células individuales (Fig. 15).

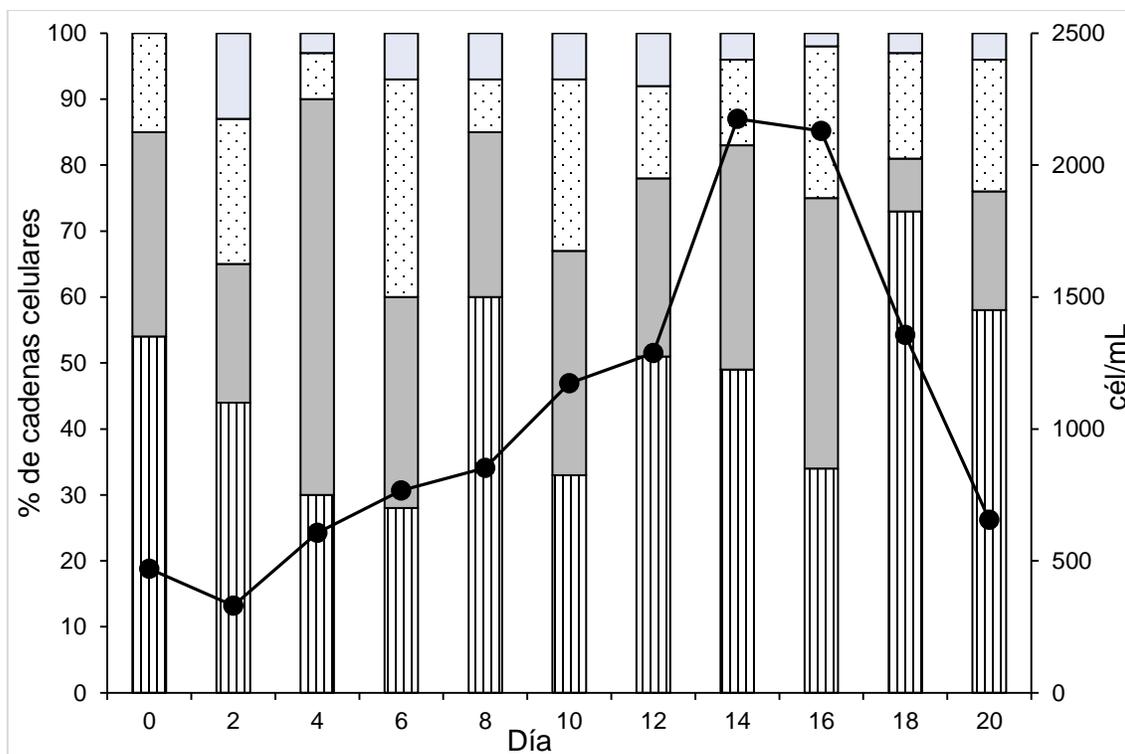


Figura 15. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa GCVV-7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Rayas:** células individuales. **Gris:** cadenas de 2-3 células. **Puntos:** cadenas de 4-6 células. **Azul:** cadenas de 7 células y mayores. La línea continua representa la curva de crecimiento.

En el caso de la cepa GCMV-7, fueron las cadenas de 2-3 células ($37 \pm 15\%$) las que registraron los mayores porcentajes a lo largo de la curva de crecimiento, seguidas por las células individuales ($33 \pm 10\%$). A diferencia de la cepa anterior, GCMV-7 presentó una formación de cadenas celulares largas (4-6 y de 7 células y mayores) que si bien no fue dominante sí se evidenció durante los días 10, 14 y 22, con un promedio de 22 ± 14 , 27 ± 17 y $29 \pm 4\%$ respectivamente (Fig. 16).

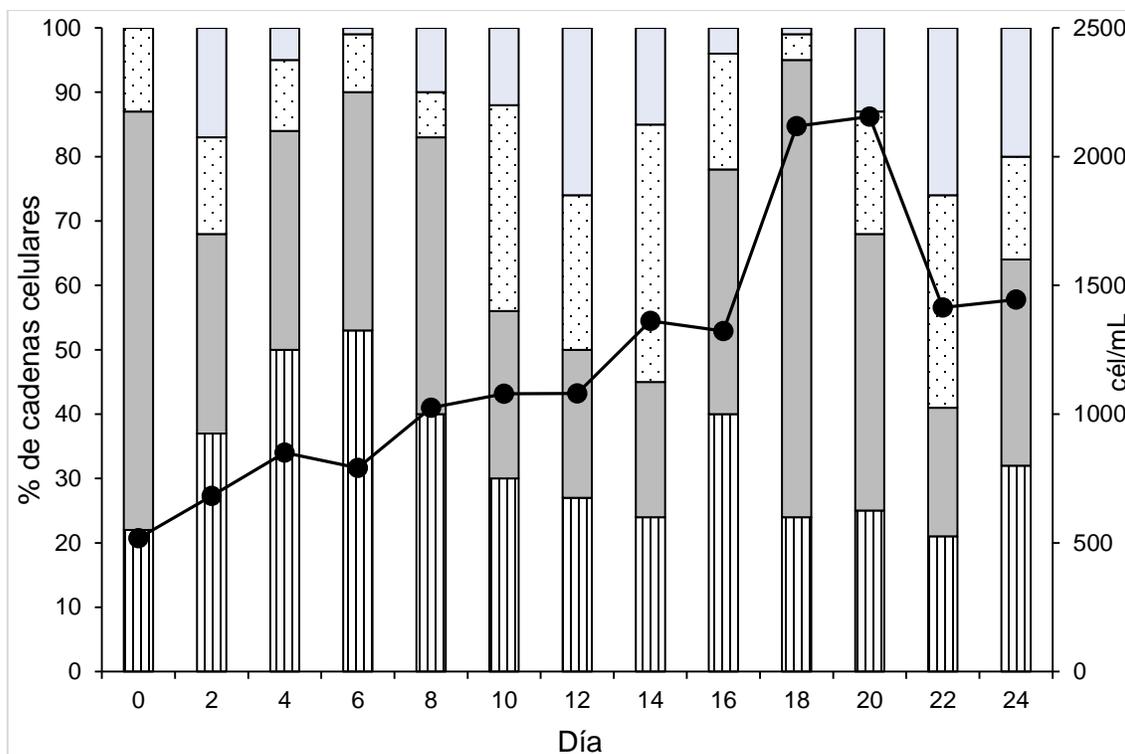


Figura 16. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa GCMV-7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Rayas:** células individuales. **Gris:** cadenas de 2-3 células. **Puntos:** cadenas de 4-6 células. **Azul:** cadenas de 7 células y mayores. La línea continua representa la curva de crecimiento.

La cepa 62L mostró un patrón de comportamiento bastante peculiar. Durante la fase de aclimatación e inicio de la fase exponencial (del día 0 al 8) tuvo un dominio de cadenas de 4-6 células ($44 \pm 4\%$) seguido por cadenas de 2-3 células; en estos días la presencia de células individuales llegó a ser menor que las cadenas de 7 células y mayores.

Fue a partir del día 10 que las células individuales comenzaron a incrementar (de 26 a 46%). No obstante, las cadenas celulares largas siguieron presentándose aunque en menores proporciones (Fig. 17).

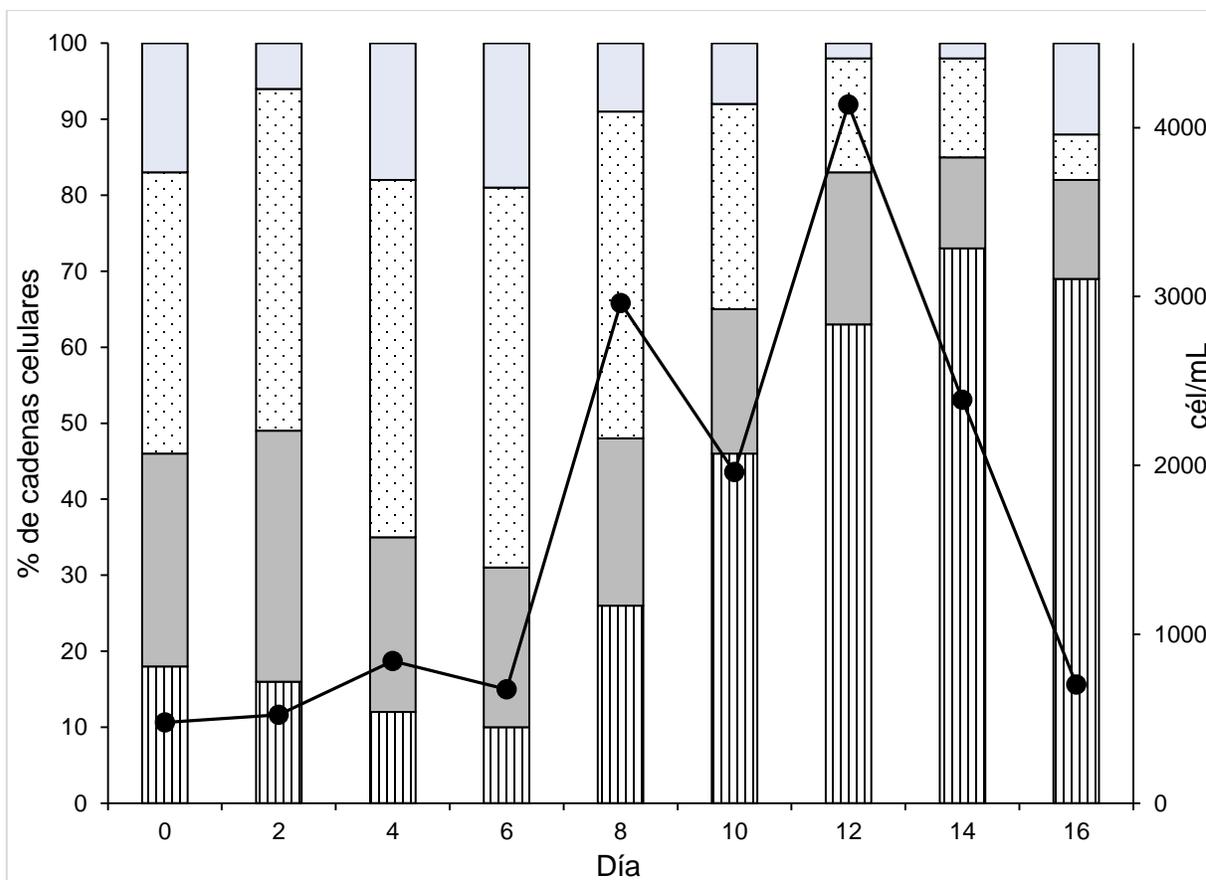


Figura 17. Formación de cadenas celulares durante la curva de crecimiento de la cepa 62L de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Rayas:** células individuales. **Gris:** cadenas de 2-3 células. **Puntos:** cadenas de 4-6 células. **Azul:** cadenas de 7 células y mayores. La línea continua representa la curva de crecimiento.

7.5. Determinación de metabolitos

7.5.1. Bacterias

Alteromonas spp. se caracterizó por presentar un mayor contenido de proteínas ($613\ 333 \pm 20\ 816$ ng/mL), seguido por los lípidos ($592\ 222 \pm 138\ 617$ ng/mL) y finalmente, el metabolito menos abundante fueron los carbohidratos ($1\ 681 \pm 52$ ng/mL). Mientras que *Roseovarius* spp. registró un mayor contenido de lípidos ($616\ 666 \pm 629\ 320$ ng/mL), seguido por proteínas ($63\ 333 \pm 12\ 583$ ng/mL) y finalmente, al



igual que la bacteria anterior, los carbohidratos fueron el metabolito con la menor concentración ($4\ 067 \pm 322$ ng/mL).

Haciendo una comparación entre la concentración de ambas bacterias, el contenido de proteínas presenta diferencias significativas ($t_{6gl} = 55.38597$; $p < 0.001$) al igual que los carbohidratos ($t_{6gl} = 17.8957$; $p < 0.001$). Mientras que los lípidos no presentaron diferencias significativas en su contenido ($p > 0.05$) (Tabla VI).

Tabla VI. Producción promedio de metabolitos en *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. Los números resaltados en negritas, representan diferencias significativas.

	Proteínas ng / mL		Carbohidratos ng / mL		Lípidos ng / mL	
	\bar{X}	S	\bar{X}	S	\bar{X}	S
<i>Alteromonas</i> spp.	613,3	20,8	1,7	52	592,2	138617
<i>Roseovarius</i> spp.	63,3	12,5	4,1	322	616,7	629320

7.5.2. *Gymnodinium catenatum*

Para las cepas de *G. catenatum*, la cuantificación del contenido de los diversos metabolitos se realizó en cuatro días diferentes, cada uno característico a una fase de crecimiento. De manera general, los lípidos fueron los metabolitos más abundantes, seguidos por las proteínas y finalmente los carbohidratos.

La cuantificación de proteínas para todas las cepas registró diferencias significativas durante la fase de aclimatación y fue en esta etapa dónde se obtuvieron los valores máximos seguidos por un descenso, en su mayoría gradual. Dos de las tres cepas: GCCV-7 y GCMV-7 presentaron un incremento/descenso, respectivamente que marcó diferencias significativas en el contenido total de este metabolito (Tabla VII).



Tabla VII. Cuantificación de proteínas totales de las tres cepas de *G. catenatum* durante las diferentes fases de crecimiento. Promedio y desviación estándar, se marcan en negritas los valores que presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$).

	GCCV-7 (ng/cél)		GCMV-7 (ng/cél)		62L (ng/cél)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Aclimatación	2.9	0.06	3.4	0.21	2.4	0.05
Exponencial	2.0	0.10	2.7	0.07	1.9	0.08
Estacionaria	2.4	0.05	1.8	0.20	1.9	0.13
Declive	2.1	0.09	2.6	0.09	1.9	0.01

Los carbohidratos fueron el metabolito menos abundante en las tres cepas, registrando una disminución significativa en su cuantificación durante la fase de aclimatación para las cepas GCCV-7 y 62L. Sin embargo, debemos de mencionar que GCCV-7 presentó el mayor contenido de carbohidratos durante esta fase.

Para GCMV-7 fue la fase exponencial la que marcó un aumento significativo en la cuantificación de carbohidratos, siendo en la fase estacionaria donde se obtendría su máximo al igual que en la cepa 62L (Tabla VIII).

Tabla VIII. Cuantificación de carbohidratos totales de las tres cepas de *G. catenatum* durante las diferentes fases de crecimiento. Promedio y desviación estándar, se marcan en negritas los valores que presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$).

	GCCV-7 (ng/cél)		GCMV-7 (ng/cél)		62L (ng/cél)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Aclimatación	0.99	0.001	0.85	0.004	0.31	0.09
Exponencial	0.92	0.0004	0.81	0.035	0.37	0.01
Estacionaria	1.12	0.0002	1.00	0.0003	0.42	0.04
Declive	1.13	0.004	0.86	0.0009	0.39	0.02



Como se mencionó anteriormente, los lípidos constituyeron el metabolito más abundante, teniendo su valor máximo en la fase de aclimatación para las cepas GCCV-7 y 62L seguido por un descenso significativo únicamente para la segunda cepa.

En el caso de la cepa GCMV-7, fue la fase de declive celular la que obtuvo el valor máximo de carbohidratos, precedida por un descenso gradual a partir de la fase de aclimatación (Tabla IX).

Tabla IX. Cuantificación de lípidos totales de las tres cepas de *G. catenatum* durante las diferentes fases de crecimiento. Promedio y desviación estándar, se marcan en negritas los valores que presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$).

	GCCV-7 (ng/cél)		GCMV-7 (ng/cél)		62L (ng/cél)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Aclimatación	26.4	13.4	31.1	10.2	39.9	17.4
Exponencial	14.1	7.1	22.7	2.6	6.9	1.7
Estacionaria	14.4	4.7	17.9	12.4	4.6	2.2
Declive	16.1	3.3	35.5	9.4	7.7	2.2

De forma particular, para la cepa GCCV-7 los lípidos fueron los más abundantes (26 ± 13 ng/cél) durante la fase de aclimatación, disminuyendo en la fase exponencial y estacionaria para finalmente aumentar en la fase de declive (de 14.28 ± 1.75 a 16.13 ± 3.31) sin registrarse diferencias significativas entre fases ($p > 0.05$).

Las proteínas al igual que los lípidos, fueron más abundantes durante la fase de aclimatación (2.95 ± 0.06 ng/cél). En las fases restantes se observó una alternancia, es decir, para la fase exponencial su contenido disminuyó (2.05 ± 0.109 ng/cél), en la fase estacionaria aumentó (2.4 ± 0.051 ng/cél) para finalmente volver a disminuir durante el declive (2.17 ± 0.096 ng/cél). Dichos cambios fueron significativos ($F_{3,12} = 136.95$; $p < 0.001$).

En cuanto a los carbohidratos, a pesar de ser el metabolito menos abundante, fue el único que registró un incremento gradual a partir de la fase exponencial (de 0.92



± 0.0004 a 1.13 ± 0.0047 ng/cél), siendo el cambio estadísticamente significativo ($F_{3,12} = 112.46$; $p < 0.001$) (Fig. 18).

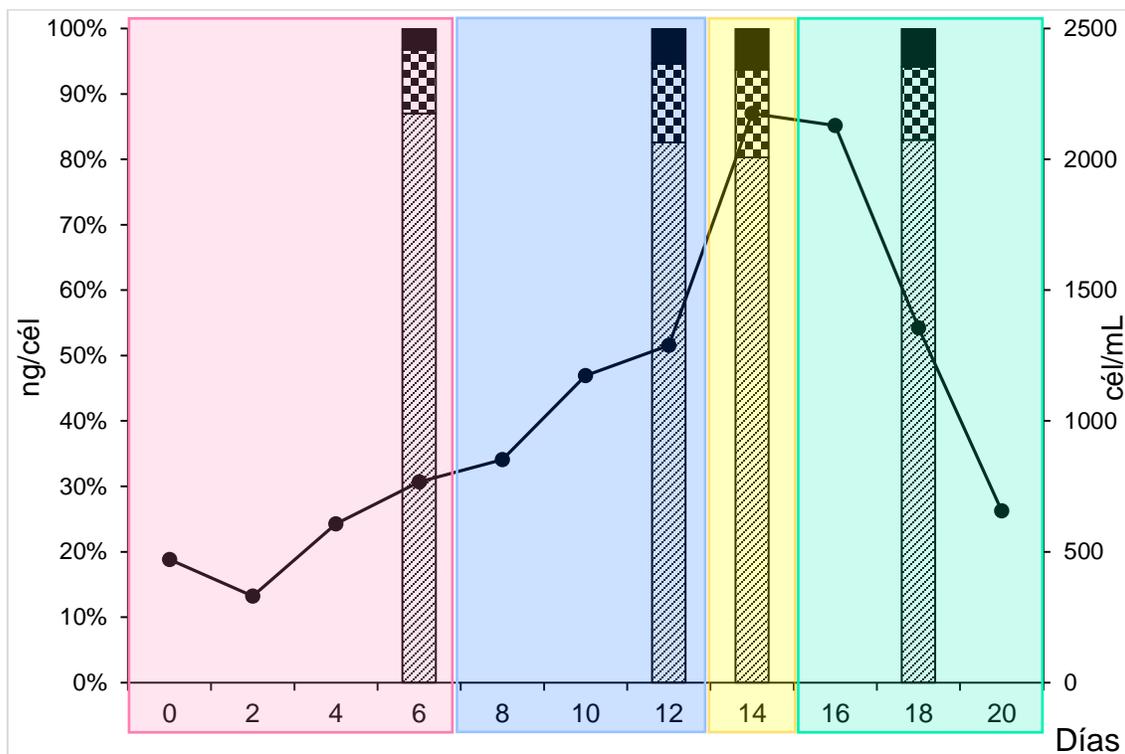


Figura 18. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Diagonales:** lípidos. **Cuadros:** proteínas. **Negro:** carbohidratos. **Rosa:** fase de aclimatación. **Azul:** fase exponencial. **Amarillo:** fase estacionaria. **Verde:** declive celular. La línea continua representa la curva de crecimiento.

La cepa GCMV-7 también presentó a los lípidos como el metabolito dominante, se observó un descenso de la fase de aclimatación a la estacionaria (de 31.13 ± 10.29 a 17.95 ± 12.41 ng/cél) seguido por un aumento significativo ($F_{3,12} = 4.2864$; $p < 0.001$). Este mismo patrón se observó en las proteínas, quienes disminuyeron significativamente ($F_{3,12} = 101.05$; $p < 0.001$) de la fase de aclimatación a la estacionaria (de 3.48 ± 0.21 a 1.86 ± 0.20 ng/cél) para finalmente incrementar en la fase de declive celular.

Los carbohidratos registraron su máximo en la fase estacionaria $1.0015 (\pm 0.0003)$ ng/cél, caracterizándose por ser el metabolito menos abundante (Fig. 19).

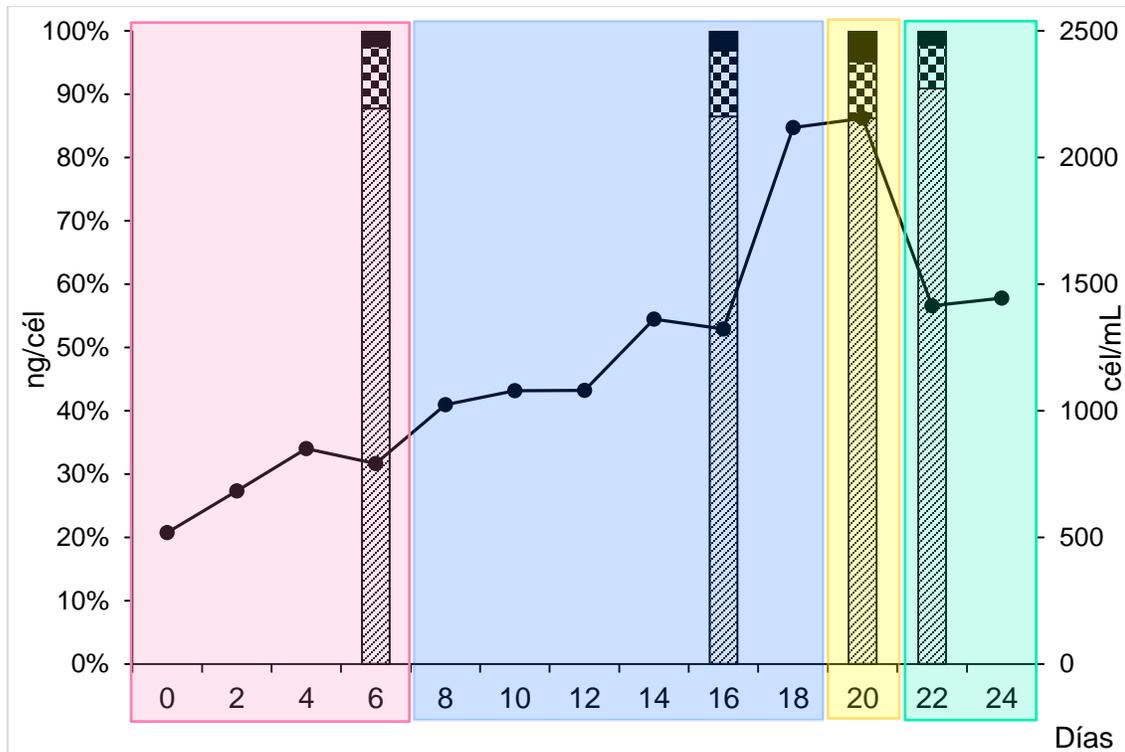


Figura 19. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCMV-7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Diagonales:** lípidos. **Cuadros:** proteínas. **Negro:** carbohidratos. **Rosa:** fase de aclimatación. **Azul:** fase exponencial. **Amarillo:** fase estacionaria. **Verde:** declive celular. La línea continua representa la curva de crecimiento.

Finalmente la cepa michoacana, 62L, registró a los lípidos como los metabolitos dominantes, siendo la fase de aclimatación la que obtuvo el máximo valor con $39.92 (\pm 17.43)$ ng/cél para posteriormente disminuir significativamente ($F_{3,12} = 20.986$; $p < 0.001$). El mismo patrón de comportamiento se observó para las proteínas, quienes disminuyeron significativamente ($F_{3,12} = 52.804$; $p < 0.001$) a partir de la fase exponencial (de 2.42 ± 0.05 a 1.92 ± 0.01 ng/cél).

En esta ocasión, los carbohidratos vuelven a ser el metabolito menos abundante, registrando su máximo en la fase estacionaria con $0.42 (\pm 0.04)$ ng/cél. El contenido de este metabolito incrementó significativamente de la fase de aclimatación a la exponencial, registrando una ligera disminución durante la fase de declive (Fig. 20).

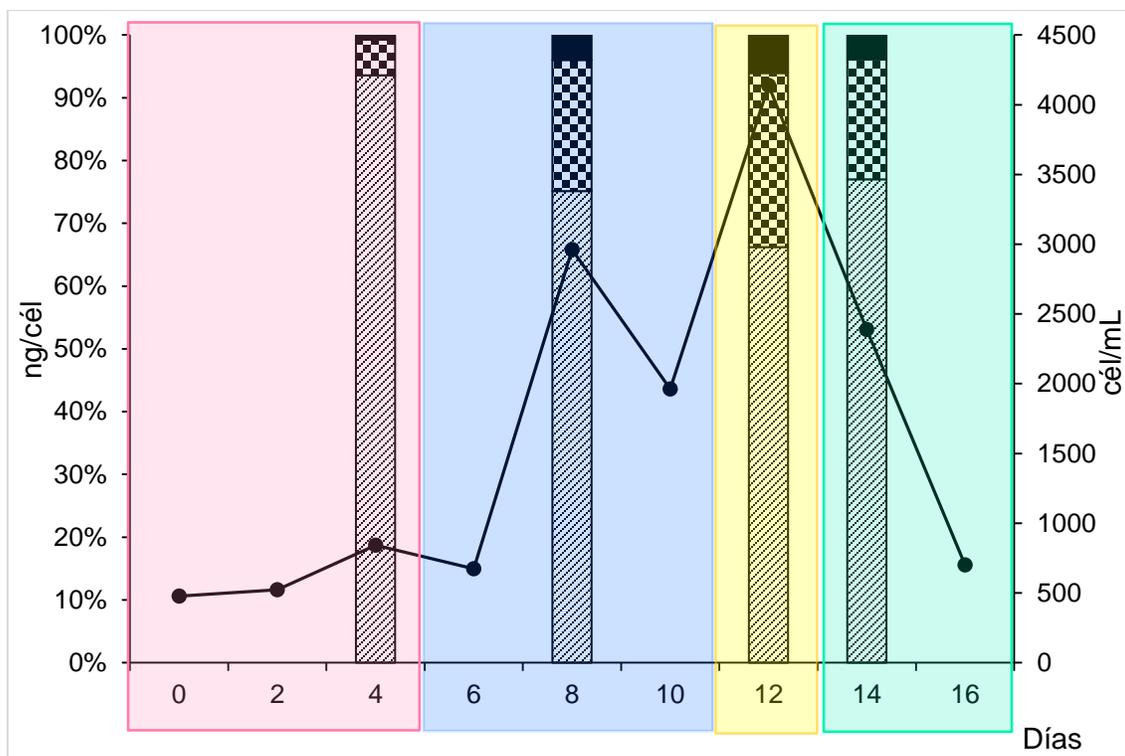


Figura 20. Cuantificación de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa 62L de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. **Diagonales:** lípidos. **Cuadros:** proteínas. **Negro:** carbohidratos. **Rosa:** fase de aclimatación. **Azul:** fase exponencial. **Amarillo:** fase estacionaria. **Verde:** declive celular. La línea continua representa la curva de crecimiento.

7.6. Perfil de pigmentos

7.6.1. Bacterias

De las dos bacterias con las que se trabajó, únicamente *Alteromonas* spp. mostró la producción de pigmentos, lo cual se hacía evidente cuando se sembraba en agar debido a que las colonias presentaban una tonalidad naranja brillante, mientras que *Roseovarius* spp. se distinguió por formar colonias opacas y blancas (Fig. 21).

Una vez analizadas ambas bacterias a través de HPLC utilizando 440 nm como longitud de onda se confirmó la composición del perfil de pigmentos de *Alteromonas* spp., el cual se integró por dos pigmentos, los cuales se presentaron en un tiempo de retención de 5.36 y 6.79 min con un área de 8.08 y 6.17, respectivamente. Sin



embargo, no se pudieron identificar debido a la falta de estándares y que el método al utilizar una sola longitud de onda no proporciona el espectro completo del pigmento en cuestión (Fig. 22).

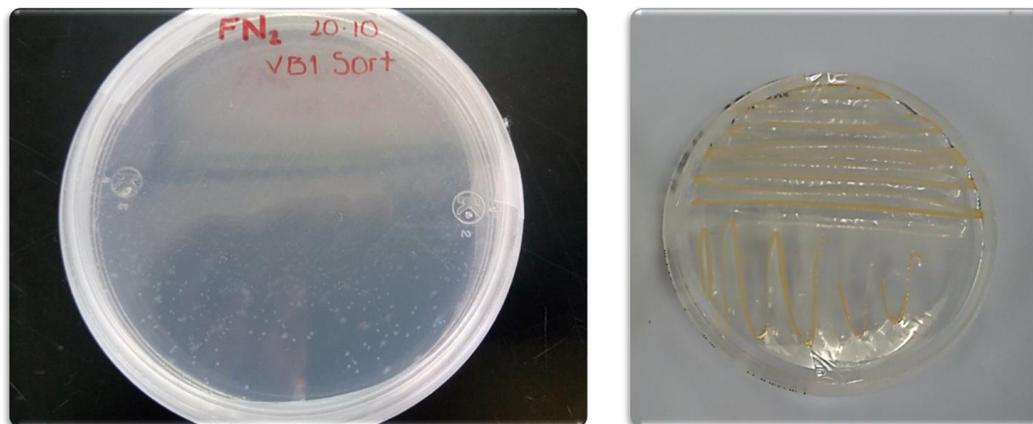


Figura 21. Estriado en agar. **Izquierda:** colonias pequeñas opacas y blancas de *Roseovarius* spp. en medio ASN III. **Derecha:** colonias brillosas, grandes y color anaranjado de *Alteromonas* spp. en agar marino.

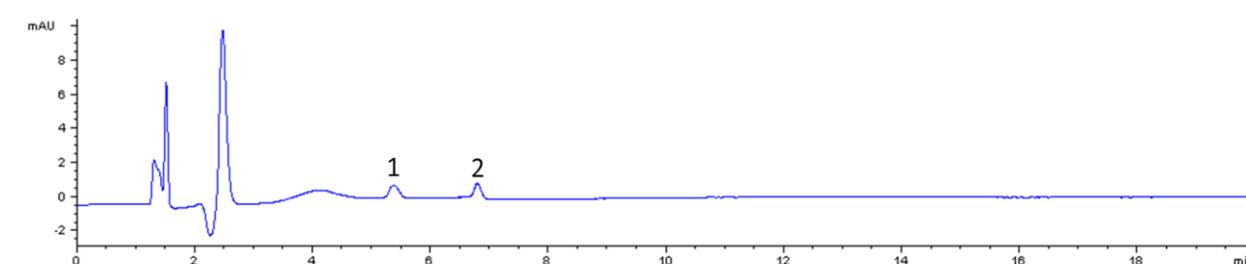


Figura 22. Cromatograma del perfil de pigmentos de *Alteromonas* spp. **1)** Primer pigmento con un tiempo de retención de 5.36 min y un área de 8.08. **2)** Segundo pigmento con un tiempo de retención de 6.79 min y un área de 6.17. **mAU:** miliunidades de absorbancia.

En el caso de *Roseovarius* spp. el análisis a través de HPLC evidencia que esta bacteria carece de pigmentos al no presentar ningún pico de retención en los cromatogramas. Las irregularidades que presenta la línea base se consideran “pulsos normales” para la técnica (Fig. 23).

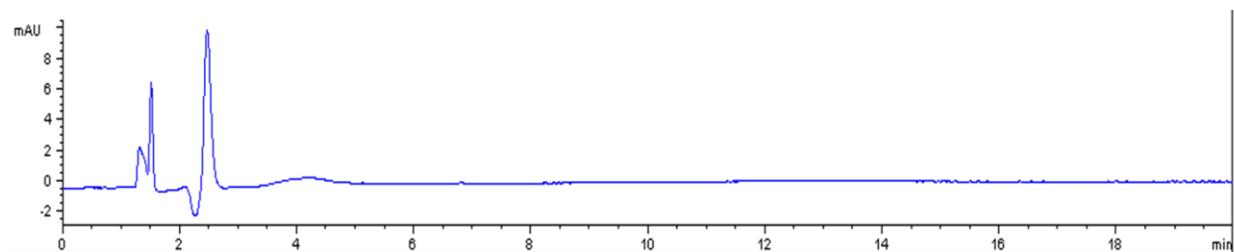


Figura 22. Cromatograma del perfil de pigmentos de *Roseovarius* spp. Se observa una línea base continua indicando que esta bacteria no presenta pigmentos. **mAU**: miliunidades de absorbancia.

7.6.2. *Gymnodinium catenatum*

El perfil de pigmentos de *G. catenatum* se integró por ocho pigmentos fotosintéticos siendo la clorofila a y c, pigmentos primarios, los más abundantes mientras que los pigmentos accesorios, carotenoides (peridinina, β -caroteno) y xantofilas (diadinoxantina) variaron su concentración en cada cepa. En la figura 23 se observa un cromatograma típico de *G. catenatum*, el cual presenta 8 picos bien definidos y delimitados, los cuales se asocian con un pigmento específico debido al tiempo de retención en el que aparecen, así como el área bajo la curva que albergan.

No obstante, del total de pigmentos que se contabilizaron, únicamente fue posible identificar certeramente a 5, las características que se consideraron para su identificación se detallan en la tabla X.

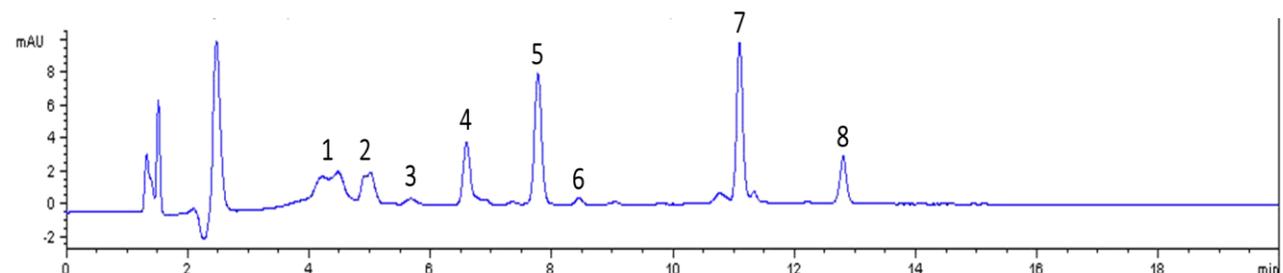


Figura 23. Cromatograma base del perfil de pigmentos de *G. catenatum*. La numeración consecutiva del 1 al 8 hace referencia al número de pigmentos fotosintéticos identificados. **mAU**: miliunidades de absorbancia.



Tabla X. Tiempos de retención de los diferentes pigmentos fotosintéticos de *G. catenatum*. El área bajo la curva de cada pigmento depende directamente de la cepa, por lo que no se consideró como característica de identificación.

Número de pigmento	Tiempo de retención (min)	Pigmento asociado
1	4.461	Chl-c
2	4.99	Peridinina
3	5.86	
4	6.561	Diadinoxantina
5	7.783	
6	8.707	
7	11.808	Chl-a
8	13.858	B-caroteno

Analizando de manera individual a cada cepa, se observa que GCCV-7 tuvo como pigmento dominante a la chl-a, seguido de la peridinina, chl-c, diadinoxantina y el β -caroteno. Sin embargo, la concentración de los mismos entre las diferentes fases de crecimiento varió conforme el tiempo del cultivo avanzaba, siendo significativos dichos cambios ($F_{(9,60)} = 59.619$; $p < 0.001$). La clorofila a presentó descensos significativos ($p < 0.001$) en su concentración en las fases de aclimatación y estacionaria; la clorofila c se caracterizó por una disminución significativa ($p < 0.001$) en su producción únicamente en la fase estacionaria mientras que la diadinoxantina y β -caroteno incrementaron significativamente ($p < 0.001$) su concentración en la fase de declive (Fig. 24).

De manera similar que la cepa anterior, GCMV-7 se caracterizó por presentar como pigmento dominante a la clorofila a, seguido de la diadinoxantina, peridinina, clorofila c y finalmente el β -caroteno. Ambas clorofilas (a y c) y la diadinoxantina disminuyeron su concentración conforme el tiempo de cultivo avanzaba, caso contrario al β -caroteno que incrementó su concentración de la fase de aclimatación a la de declive. Finalmente, la peridinina disminuyó su concentración al pasar de la aclimatación a la fase exponencial para posteriormente incrementar en la fase estacionaria y declive, no obstante, ninguno de los cambios antes mencionado fue significativo ($F_{(9,60)} = 26.455$; $p > 0.05$) (Fig. 25).

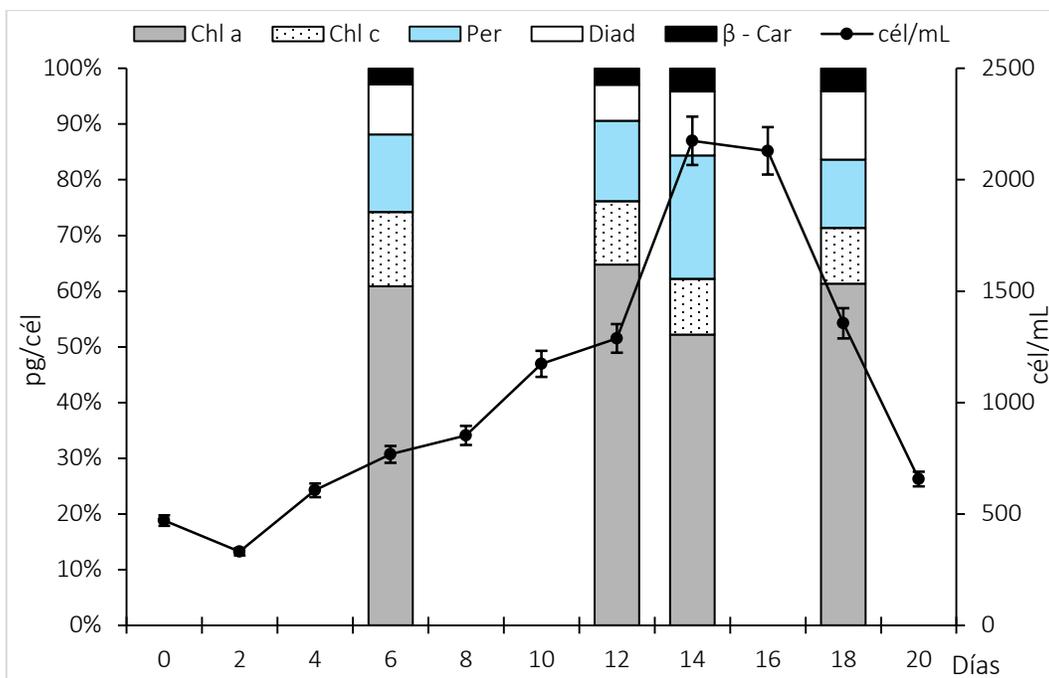


Figura 24. Perfil de pigmentos de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum*. **Gris:** clorofila a. **Puntos:** clorofila c. **Azul:** peridinina. **Blanco:** diadinoxantina. **Negro:** β-caroteno. **Línea continua:** GCCV-7. **Líneas verticales:** desviación estándar.

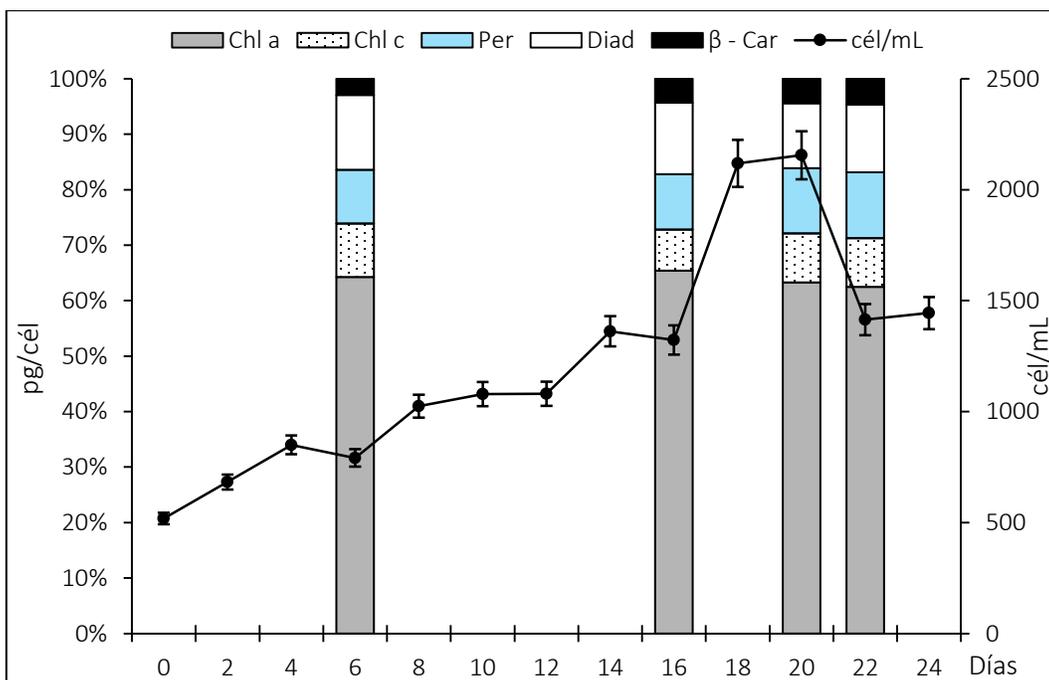


Figura 25. Perfil de pigmentos de la cepa GCMV-7 de *G. catenatum*. **Gris:** clorofila a. **Puntos:** clorofila c. **Azul:** peridinina. **Blanco:** diadinoxantina. **Negro:** β-caroteno. **Línea continua:** GCMV-7. **Líneas verticales:** desviación estándar.



La cepa 62L se caracterizó porque todos los pigmentos aumentaron significativamente su concentración ($F_{(9,60)} = 180.20$; $p < 0.001$) de la fase de aclimatación a la exponencial y posterior a esta comenzaron a disminuir conforme el tiempo del cultivo avanzaba. Aunado a ello, al igual que las cepas anteriores la clorofila a y c fueron los pigmentos dominantes, seguido por la peridina, diadinoxantina y finalmente el β -caroteno. Un aspecto a destacar es que la peridina fue el único pigmento que registró cambios (incremento, descenso, incremento) significativos en su concentración a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 26).

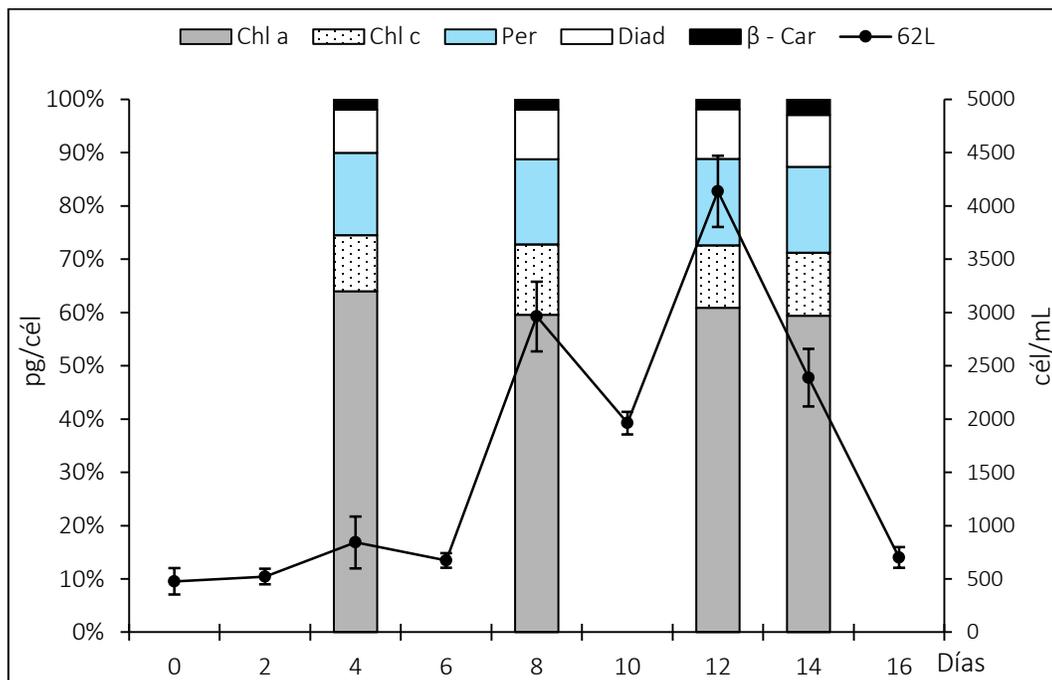


Figura 26. Perfil de pigmentos de la cepa 62L de *G. catenatum*. **Gris:** clorofila a. **Puntos:** clorofila c. **Azul:** peridina. **Blanco:** diadinoxantina. **Negro:** β -caroteno. **Línea continua:** 62L. **Líneas verticales:** desviación estándar.

7.7. Perfil de toxinas paralizantes

Los análogos producidos por *G. catenatum* han sido descritos en función del grupo sustituyente en la cadena lateral, además que los pares enantioméricos se expresan como sumatorias ya que se epimerizan con facilidad bajo las condiciones de



extracción y análisis. A pesar de que pueden ser determinados de manera individual, las cantidades no reflejan necesariamente la composición original en las células.

De manera general, el perfil de toxinas paralizantes de las tres cepas de *G. catenatum* se integró por 7 análogos, que de mayor a menor proporción fueron: C1/2, B2, dcNEO, dcGTX 2/3, GTX 2/3, dcSTX y B1.

GGCV-7 se caracterizó por presentar un decremento en la proporción de la mayoría de los análogos de la fase de aclimatación a la exponencial, seguida por un incremento de los mismos en la fase estacionaria y de declive. Específicamente los análogos GTX2/3, dcSTX y dcGTX2/3 fueron los únicos con cambios significativos ($p < 0.001$) en su proporción (Fig. 27).

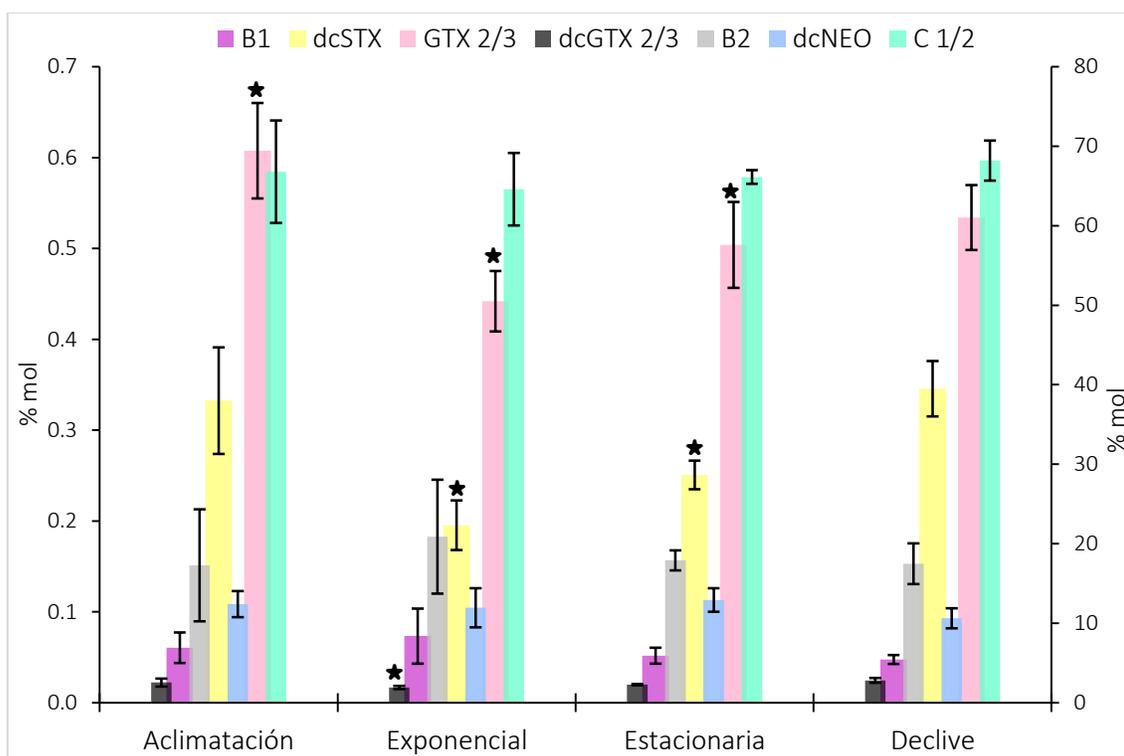


Figura 27. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* a lo largo de la curva de crecimiento. **Morado:** B1. **Amarillo:** dcSTX. **Rosa:** GTX 2/3. **Negro:** dcGTX 2/3. **Gris:** B2. **Azul:** dcNEO. **Verde:** C1/2. **Líneas verticales:** desviación estándar. ***** diferencias significativas ($p < 0.001$).



A diferencia de la cepa anterior, GCMV-7 se caracterizó por presentar un incremento en la proporción de todos los análogos a lo largo de la curva de crecimiento, no obstante, los únicos que registraron diferencias significativas ($p < 0.001$) fueron dcGTX 2/3 y dcSTX (Fig. 28).

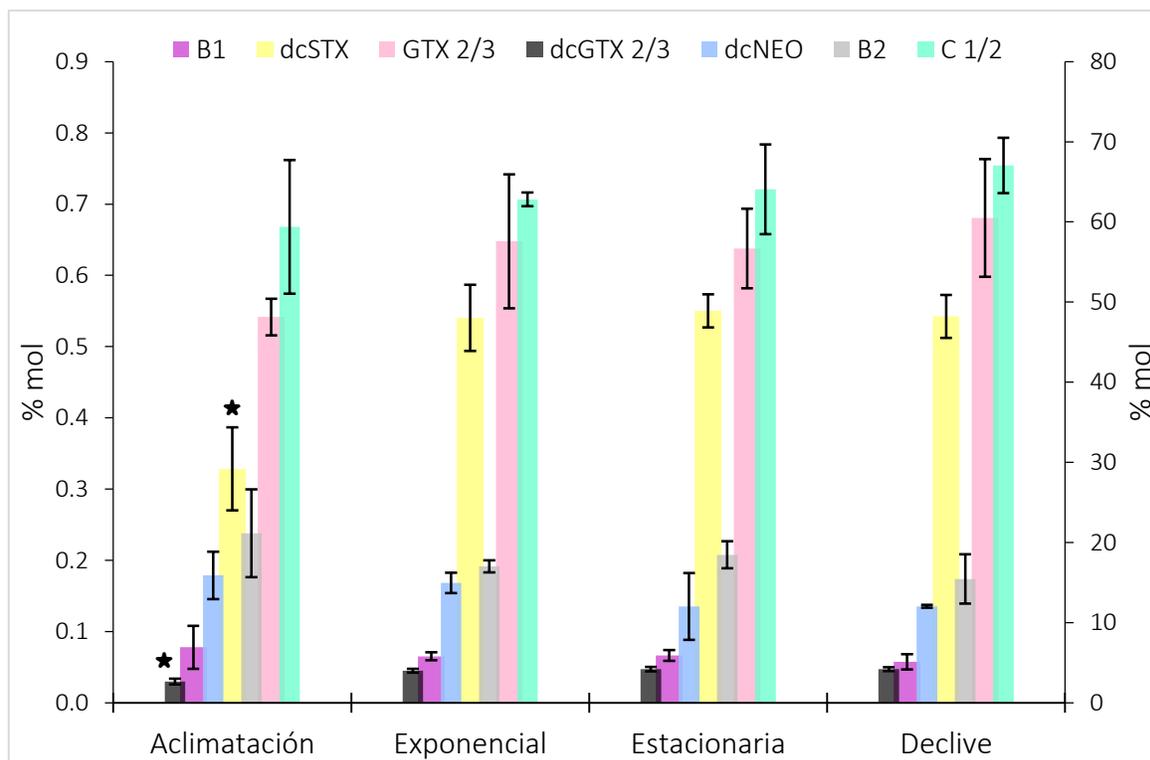


Figura 28. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCMV-7 de *Gymnodinium catenatum* a lo largo de la curva de crecimiento. **Morado:** B1. **Amarillo:** dcSTX. **Rosa:** GTX 2/3. **Negro:** dcGTX 2/3. **Gris:** B2. **Azul:** dcNEO. **Verde:** C1/2. **Líneas verticales:** desviación estándar. * diferencias significativas ($p < 0.001$).

De las tres cepas, la 62L fue la que mostró el perfil de toxinas paralizantes más versátil al alternar incrementos y descensos en la producción de los análogos a lo largo de la curva de crecimiento, que si bien, en su mayoría no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) si se aprecian en la figura 29. Los análogos C1/2 incrementaron su proporción en cada fase, llegando a la máxima concentración en la fase de declive, dicho incremento fue significativo ($p < 0.001$) con respecto a las fases anteriores, al igual que la disminución de la dcSTX, la dcNEO y la dcGTX 2/3 durante la fase estacionaria y de declive.

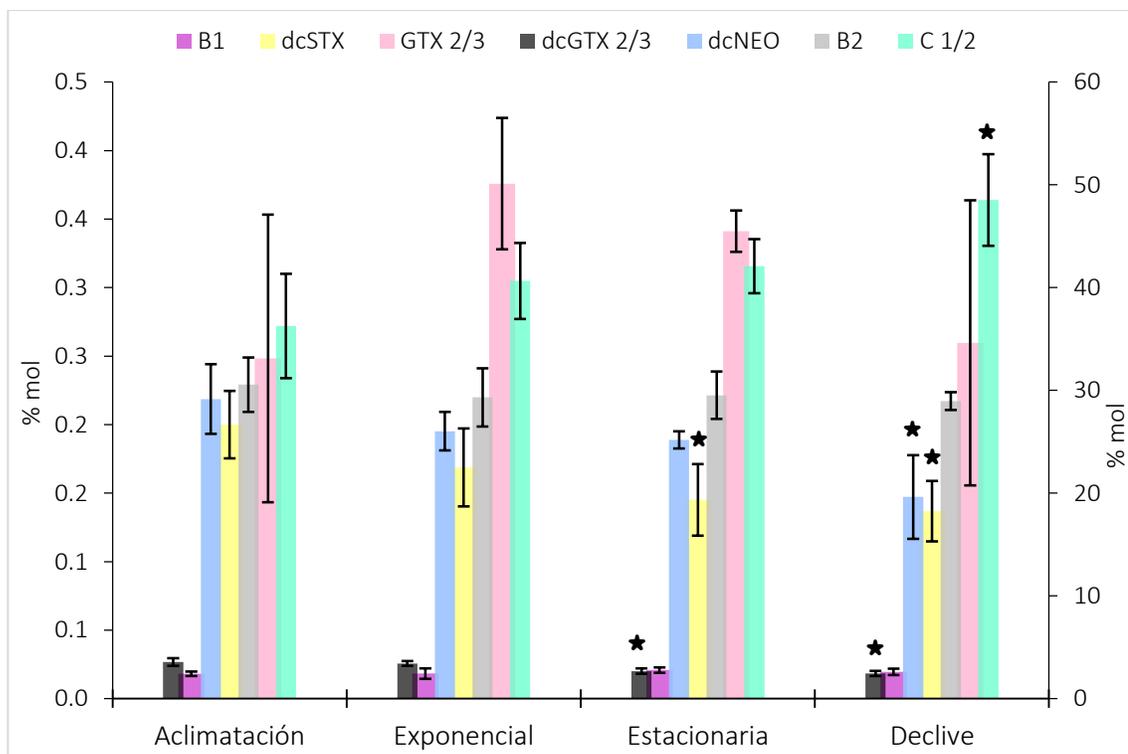


Figura 29. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa 62L de *Gymnodinium catenatum* a lo largo de la curva de crecimiento. **Morado:** B1. **Amarillo:** dcSTX. **Rosa:** GTX 2/3. **Negro:** dcGTX 2/3. **Gris:** B2. **Azul:** dcNEO. **Verde:** C1/2. **Líneas verticales:** desviación estándar. ***** diferencias significativas ($p < 0.001$).

7.8. Toxicidad

La toxicidad total (definida como equivalentes de STX/cél) varió conforme el cultivo avanzaba. Para la cepa GCCV-7 la mayor toxicidad se obtuvo durante la fase exponencial, posteriormente disminuyó en la fase estacionaria y al final, durante el declive volvió a incrementar, dichos cambios no fueron significativos ($p > 0.05$) salvo el incremento observado de la fase de aclimatación a la exponencial ($p < 0.001$) (Fig. 30).

Cabe destacar que los análogos que aportaron una mayor proporción a la toxicidad celular fueron los sulfocarbamoil (C1/2 y B1/2), seguido por los decarbamoil (dcNEO, dcGTX 2/3 y dcSTX) y por último, el menor aporte se dió por las toxinas carbamatadas (GTX 2/3).

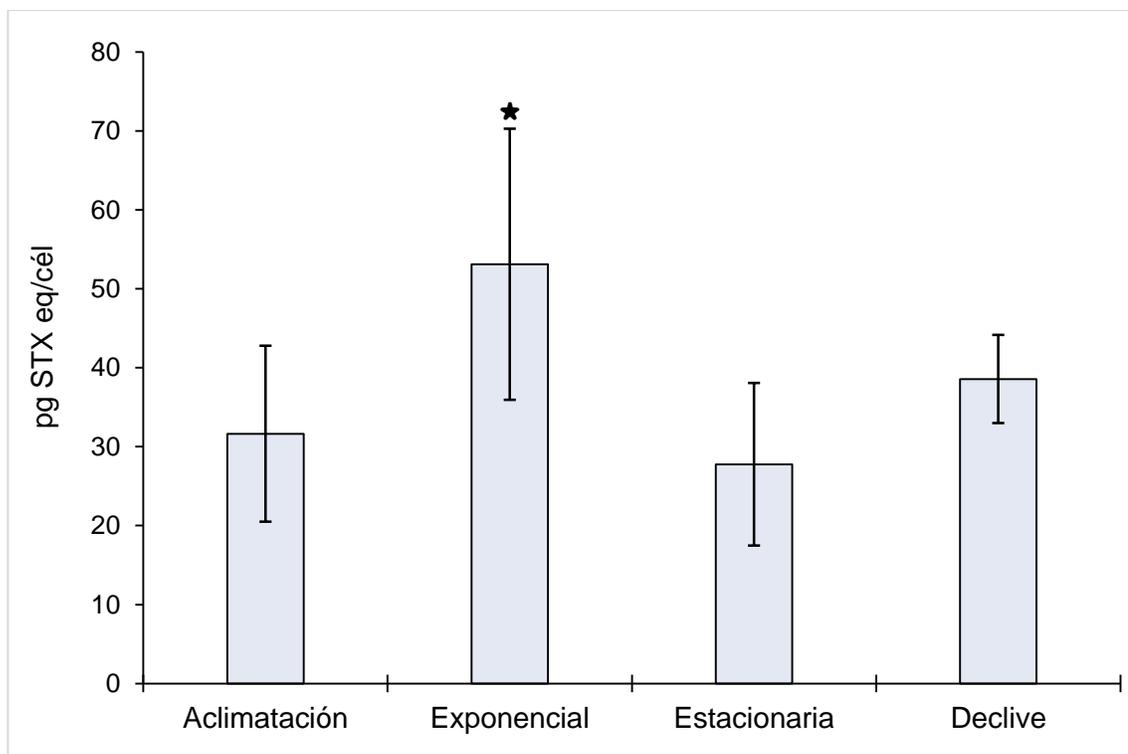


Figura 30. Toxicidad promedio (pg STXeq/cél) de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum*. Líneas verticales: desviación estándar. * diferencias significativas ($p < 0.001$).

La cepa GCMV-7 presentó la mayor toxicidad en los primeros días de cultivo para después disminuir significativamente ($p < 0.001$) en la fase exponencial y continuar su descenso en la fase estacionaria, fase en la que se registró la menor toxicidad por célula de toda la curva de crecimiento. Al igual que para la cepa GCCV-7, los análogos que aportaron una mayor proporción molar fueron los sulfocarbamoil, decarbamoil y finalmente, los carbamoil (Fig. 31).

De todas las cepas de *G. catenatum*, la 62L fue la que presentó los valores máximos de toxicidad celular, si bien, durante la fase de aclimatación la toxicidad celular era alta, logró mantener sus valores máximos a lo largo de la curva de crecimiento al no registrar cambios significativos entre las diferentes fases de cultivo (Fig. 32).

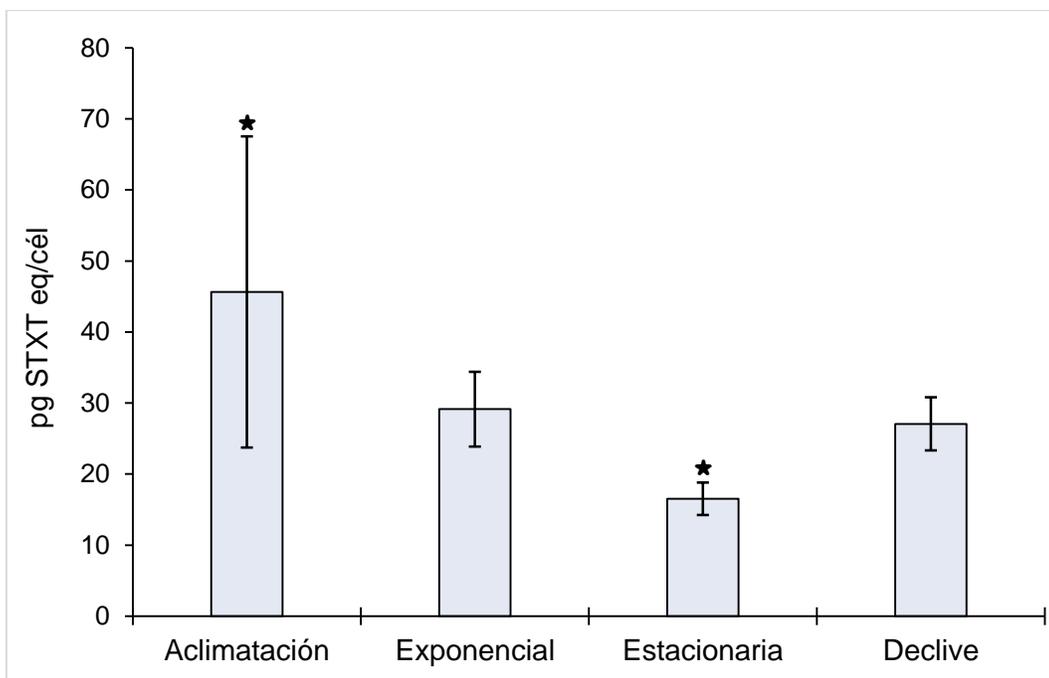


Figura 31. Toxicidad promedio (pg STXe/cél) de la cepa GCMV-7 de *G. catenatum*. Líneas verticales: desviación estándar. * diferencias significativas ($p < 0.001$).

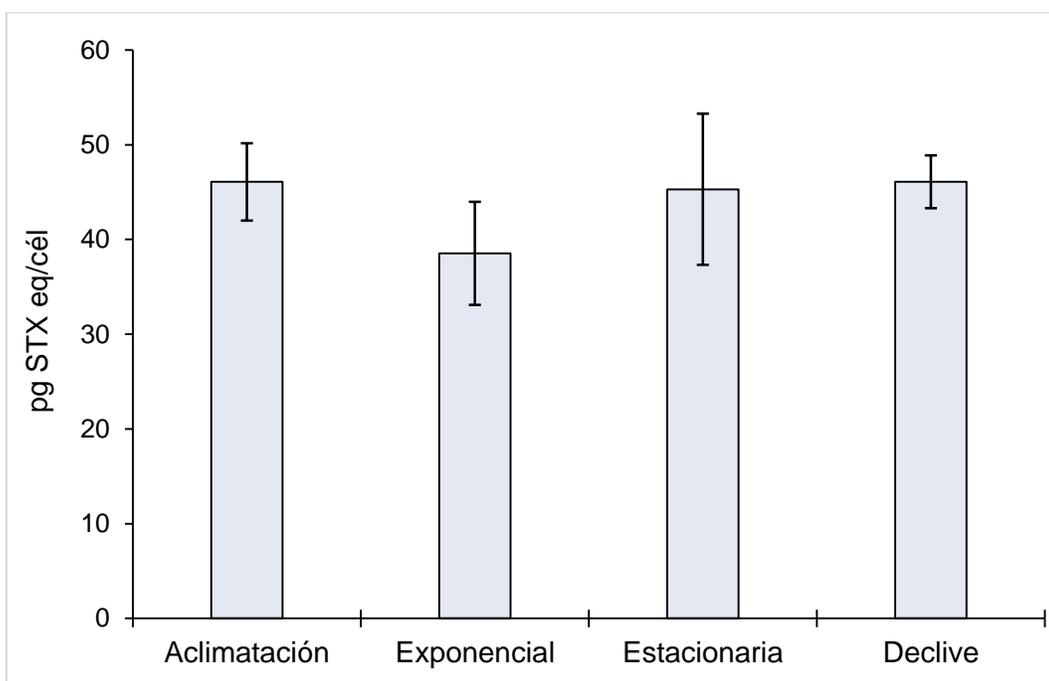


Figura 32. Toxicidad promedio (pg STXe/cél) de la cepa 62L de *G. catenatum*. Líneas verticales: desviación estándar.



7.9. Asociación *Gymnodinium catenatum* y bacterias

7.9.1. Biomasa máxima

En presencia de las bacterias, la biomasa máxima celular de la cepa GCCV-7 incrementó significativamente respecto al control. Si bien hubo un crecimiento tanto en el control como en los diversos tratamientos en presencia de las bacterias entre el día 12 y 16, en el tiempo final (día 16) contrasta la diferencia existente entre los controles³ (153 ± 130 cél/mL) y los diferentes tratamientos con las bacterias donde los cultivos alcanzan una biomasa de $5\,517 \pm 58$ cél/mL (con *Alteromonas* spp.) a $6\,402 \pm 34$ cél/mL (en presencia de ambas bacterias) representando una diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al control (Tabla XI).

Tabla XI. Datos promedio y desviación estándar de la biomasa del cultivo control y los tratamientos de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* inoculados con las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas en medio GSe.

		Día de cosecha	Abundancia máxima (cél/mL)	Tasa de crecimiento (div/día)	Tiempo de generación (días)
Tiempo inicial	Control	12	1557 ± 16	0.176 ± 0.028	1.706 ± 0.395
	Control	14	3153 ± 130		
Tiempo final	<i>Alteromonas</i> spp.	14	5517 ± 58	0.316 ± 0.026	0.951 ± 0.038
	<i>Roseovarius</i> spp.	14	5409 ± 161	0.311 ± 0.023	0.967 ± 0.032
	MIX	14	6402 ± 34	0.353 ± 0.020	0.851 ± 0.047



La biomasa celular en presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. registró un incremento no significativo ($p > 0.05$) comparado con el grupo control. Sin embargo, entre tratamientos (*Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas) se registraron diferencias estadísticamente significativas ($t_{6gl} = 31.897$; $p < 0.05$ y $t_{6gl} = 14.749$; $p < 0.05$, respectivamente) debido a que en presencia de ambas bacterias el aumento en la biomasa máxima fue superior a 939 cél/mL en promedio (Fig. 33).

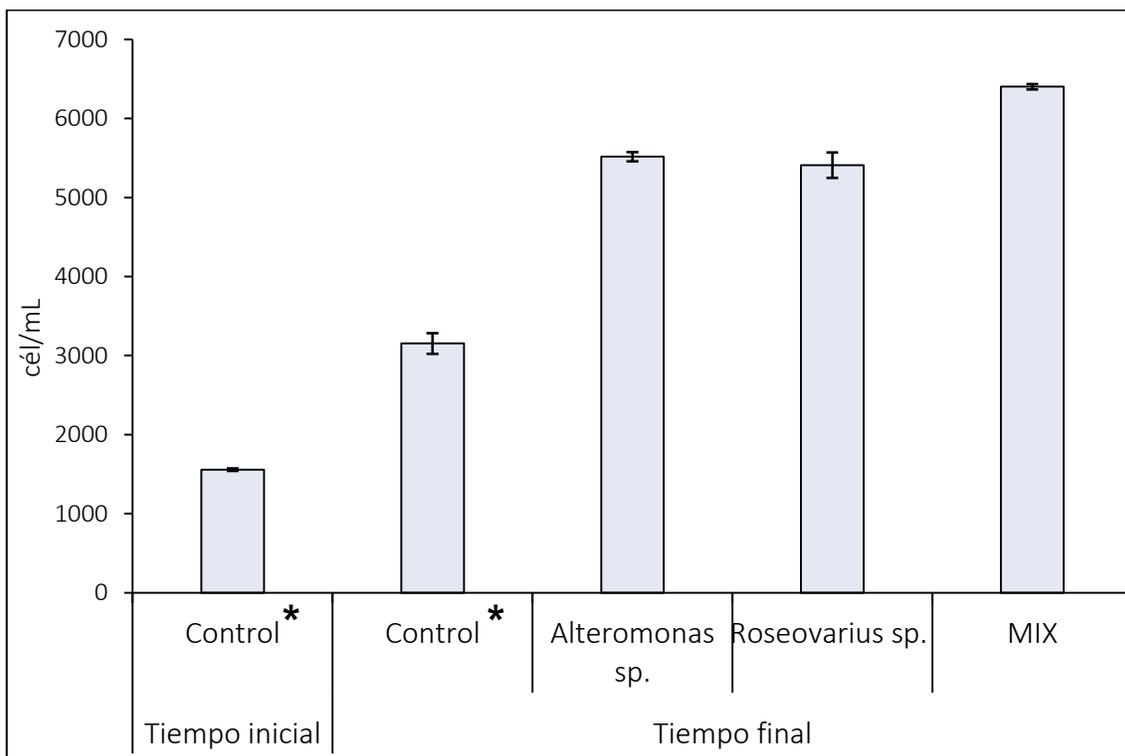


Figura 33. Valores promedio de la biomasa máxima de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* inoculados con las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas en medio GSe, a 24 °C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. * diferencias significativas ($p < 0.001$). Líneas verticales: desviación estándar.

7.9.2. Tasa de crecimiento

Se registraron tasas de crecimiento superiores a las 0.1 div/día, tanto para el control como para los tratamientos, siendo mayores las tasas de crecimiento en presencia de las bacterias respecto al control, con diferencias significativas ($p < 0.001$).



Entre tratamientos, en presencia de la *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp., las tasas de crecimiento oscilaron entre 0.311 (\pm 0.023) y 0.316 (\pm 0.026) div/día, sin diferencia significativa entre ellas ($p > 0.05$). Mientras que en presencia de ambas bacterias, se obtuvo la mayor tasa de crecimiento de 0.353 (\pm 0.020) div/día (Fig. 34).

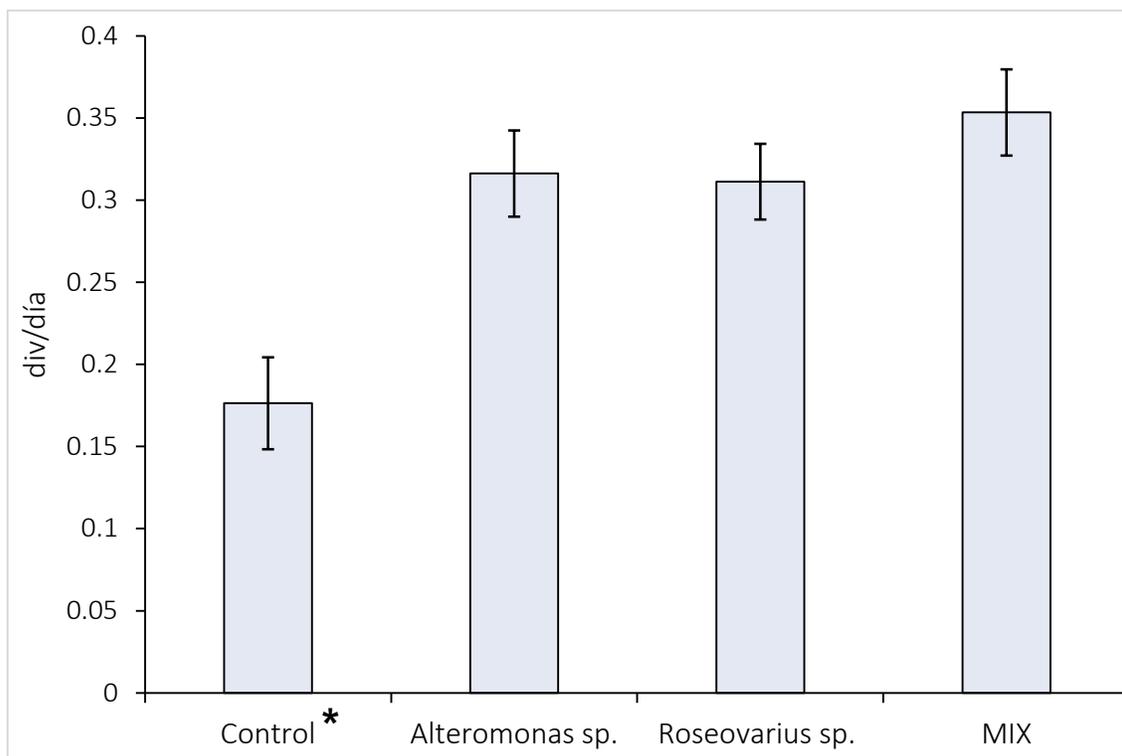


Figura 34. Tasa de crecimiento promedio del cultivo control y de tratamientos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* inoculados con las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas en medio GSe, a 24 °C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. * diferencias significativas ($p < 0.001$). Líneas verticales: desviación estándar.

7.9.3. Tiempo de generación

El mayor tiempo de generación lo presentó el cultivo control (1.706 ± 0.39 días), seguido por los cultivos de *G. catenatum* inoculados con *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp., los cuales fueron de: $0.951 (\pm 0.38)$ y $0.967 (\pm 0.32)$ días, respectivamente. El cultivo inoculado con ambas bacterias registró el menor tiempo de generación (0.851 ± 0.047 días).



Las diferencias significativas se dieron entre el control y los tres tratamientos ($p < 0.001$) (Fig. 35).

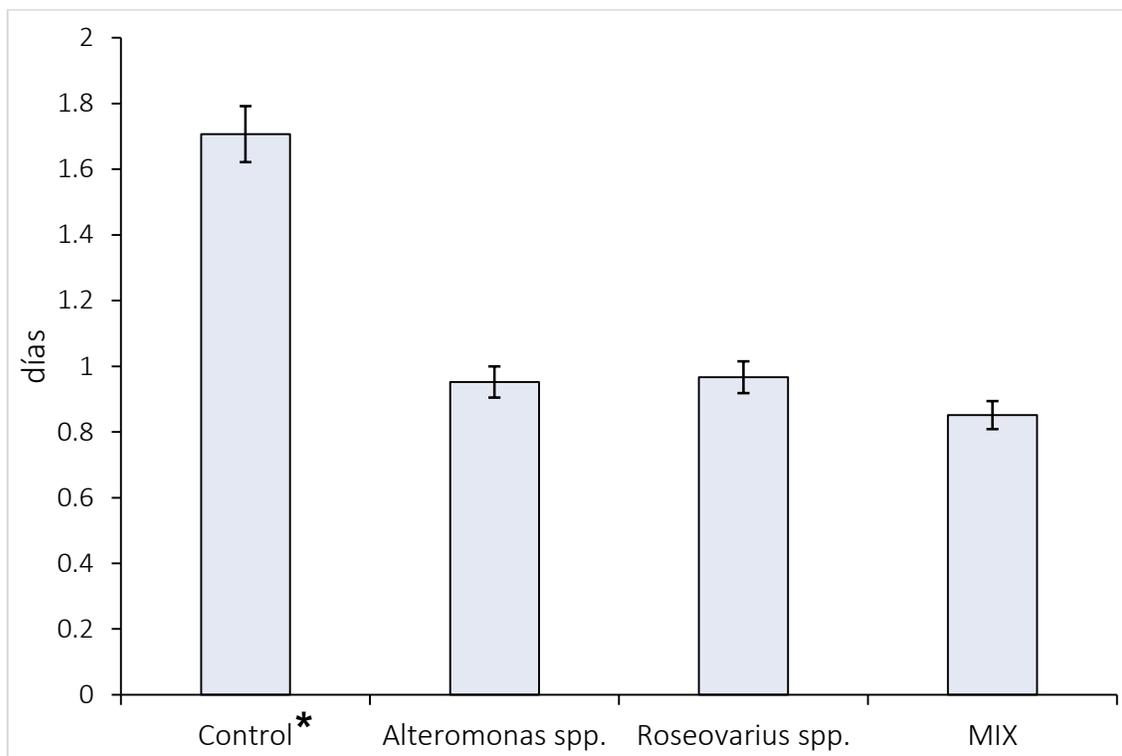


Figura 35. Promedio del tiempo de generación de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* inoculados con las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas en medio GSe, a 24 °C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. * diferencias significativas ($p < 0.001$). Líneas verticales: desviación estándar.

7.9.4. Longitud de cadenas

A lo largo del experimento se llevó un registro de la formación de cadenas celulares tanto de los controles como de los tratamientos, observándose un dominio en la formación de cadenas celulares largas.

La presencia de células individuales se mantuvo constante en los controles y diversos tratamientos con un 23 (± 2.9) %, con la única excepción de que al inocular a *G. catenatum* con *Alteromonas* spp. la presencia de dichas células disminuyó significativamente ($\chi^2_{(0.05,3)} = 3.06$; $p < 0.05$) en cuatro días un 4 (± 2.6) %.

Comparando la formación de cadenas de 2-3 células, se observó un incremento significativo ($\chi^2_{(0.05,3)} = 2.69$; $p < 0.05$) del día 12 al 16, caso contrario a los tratamientos



inoculados con bacterias, donde tales cadenas disminuyeron significativamente ($\chi^2_{(0.05,3)} = 11.70$; $p < 0.05$) de $45 (\pm 6)$ a $14 (\pm 2)\%$. Cabe destacar que para los tratamientos, el promedio de formación de estas cadenas se mantuvo en un 14% durante los cuatro días del experimento comparado con el 24% registrado para el cultivo control. Las cadenas de 4-6 células fueron las dominantes en los siguientes tres casos: tiempo inicial ($31 \pm 21 \%$), tratamiento de inoculación con *Roseovarius* spp. ($47 \pm 8 \%$) y en presencia de ambas bacterias ($36 \pm 7 \%$) mientras que para el tratamiento en presencia de *Alteromonas* spp., fueron las cadenas de 7 células y mayores las que predominaron con $38 (\pm 11) \%$. En base a estos resultados y como se aprecia en la figura 36, en presencia de las bacterias se promueve significativamente ($p < 0.05$) la formación de cadenas celulares más largas.

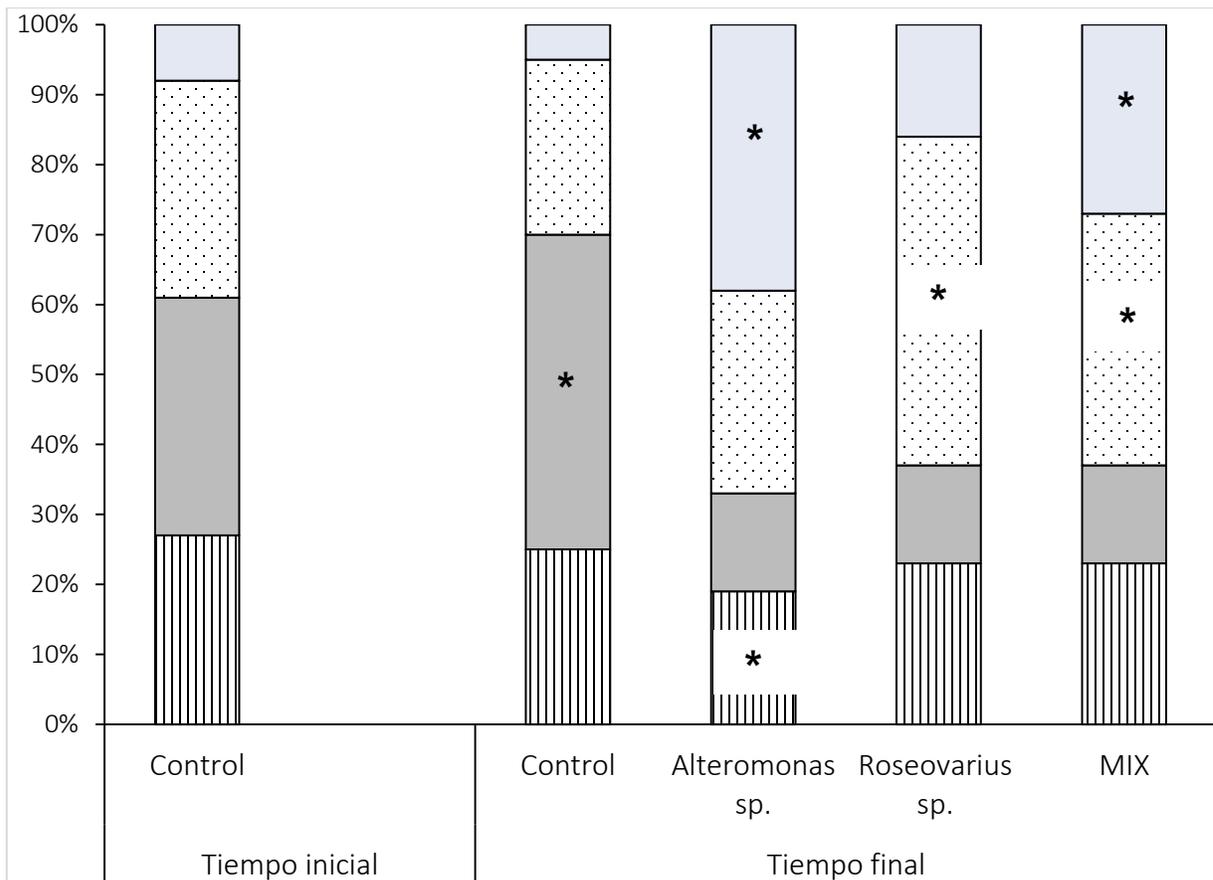


Figura 36. Porcentaje promedio de formación de cadenas celulares de los grupos control y tratamientos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* inoculados con las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Rayas:** células individuales. **Gris:** cadenas de 2-3 células. **Puntos:** cadenas de 4-6 células. **Azul:** cadenas de 7 células y mayores. * diferencias significativas ($p < 0.001$).



7.9.5. Producción de metabolitos

En este experimento, recordemos que se realizaron dos cosechas, la primera en el día 12, correspondiente al tiempo inicial que a su vez constituyó al grupo control. La segunda cosecha se realizó el día 16, teniendo cuatro grupos distintos: grupo control e inoculación de la cepa GCCV-7 con la bacteria *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas.

De manera general, tanto para los controles como para los tratamientos, las proteínas y los carbohidratos tuvieron su mayor contenido durante el tiempo inicial, es decir, justo a mitad de la fase exponencial de crecimiento y en ausencia de las bacterias. Mientras que los lípidos, si bien registraron valores altos bajo las mismas condiciones, tuvieron el contenido máximo en el tiempo final y en presencia de ambas bacterias.

Los cambios observados entre el tiempo inicial y final contrastando los controles y los diferentes tratamientos registraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en el contenido de lípidos y carbohidratos. En cuanto a las proteínas, el único par que no difirió significativamente ($p > 0.05$) fueron los tratamientos en presencia de las bacterias *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. (Tabla XII).

Tabla XII. Cuantificación de metabolitos en la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* en presencia de las bacterias *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. Promedio y desviación estándar, se marcan en negritas los valores que presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$)

		Lípidos		Proteínas		Carbohidratos	
		\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
Tiempo inicial	<i>Control</i>	26.7	0.3	8.2	0.55	0.9	0.009
Tiempo final	<i>Control</i>	23.5	0.7	5.4	0.94	0.7	0.032
	<i>Alteromonas</i> spp.	25.6	0.4	2.6	0.07	0.35	0.009
	<i>Roseovarius</i> spp.	24.4	0.3	2.7	0.03	0.32	0.003
	<i>MIX</i>	28.7	0.5	3.2	0.08	0.39	0.002



En ausencia de las bacterias en el día inicial (12) hubo un mayor contenido de lípidos, que disminuyó en el día 14 (de 26.71 ± 0.33 a 23.54 ± 0.78 ng/cél). En los tratamientos inoculados con *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp., pese a que se observó un descenso comparado con el tiempo inicial, los contenidos registrados fueron significativamente ($t_{6gl} = 5.7589$; $p < 0.05$ y $t_{6gl} = 2.58677$; $p < 0.05$, respectivamente) mayores que el cultivo control. La excepción se presentó en el tratamiento inoculado con ambas bacterias debido a que fue este tratamiento el que registró el mayor contenido de lípidos (28.72 ± 0.58 ng/cél).

Para las proteínas y carbohidratos, fue más evidente que la presencia de las bacterias disminuyó el contenido de ambos metabolitos, debido a que en el tiempo inicial se registró la concentración mayor de ambos metabolitos (8.26 ± 0.55 y 0.93 ± 0.009 ng/cél, respectivamente), además de que en el tiempo final, volvió a ser el control el que registró un contenido mayor de proteínas y carbohidratos comparado con los tratamientos de inoculación. Sin embargo, en presencia de ambas bacterias se registró un incremento significativo ($p < 0.01$) en el contenido de dichos metabolitos pasando de 2.72 ± 0.02 a 3.20 ± 0.08 ng/cél para proteínas y de 0.33 ± 0.004 a 0.39 ± 0.003 ng/cél para carbohidratos (Fig. 37).

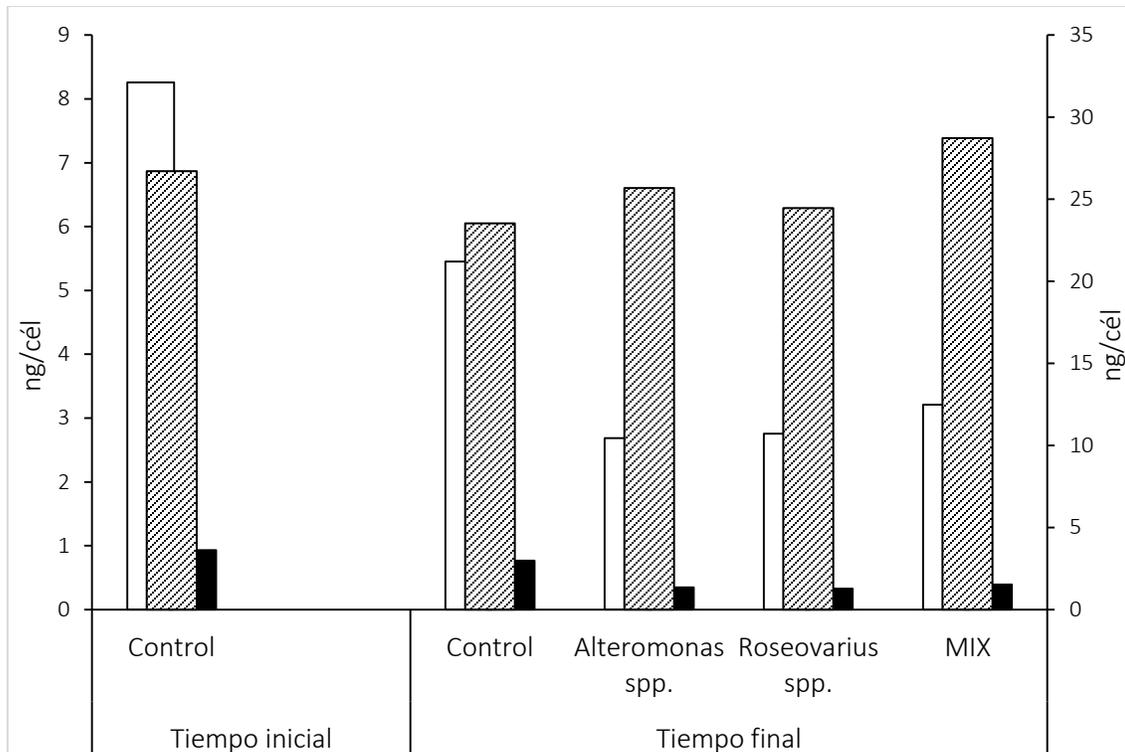


Figura 37. Concentración promedio de proteínas, carbohidratos y lípidos de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* en presencia de las bacterias en medio GSe en el tiempo inicial (día 12) y tiempo final (día 16). **Diagonales:** lípidos. **Blanco:** proteínas. **Negro:** carbohidratos. **Eje izquierdo:** proteínas y carbohidratos. **Eje derecho:** lípidos.

7.9.6. Pigmentos fotosintéticos

La concentración de pigmentos de *G. catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. disminuyó significativamente ($p < 0.001$) con respecto a grupos control. Si bien tal disminución se observó en los tres tratamientos, fue más evidente en presencia de *Alteromonas* spp. que fue el único tratamiento que mostró diferencias significativas para todos los pigmentos y por ende el tratamiento con los valores de concentración más bajos ($F_{(24,75)} = 50.373$; $p < 0.001$).

En presencia de *Roseovarius* spp. como se mencionó anteriormente, la concentración de los pigmentos fotosintéticos de *G. catenatum* también disminuyeron aunque tal cambio fue significativo ($p < 0.001$) únicamente entre el tratamiento (en presencia de *Roseovarius* spp.) y el control correspondiente al tiempo inicial, es decir



a los 12 días de cultivo. Debido a que los valores de concentración de los pigmentos entre este tratamiento y el control correspondiente al tiempo final se mantuvieron similares, no se registró diferencia significativa entre ambos ($p>0.05$) como ocurrió en presencia de *Alteromonas* spp.

En presencia de ambas bacterias se obtuvo la misma respuesta que ha sido descrita anteriormente, con la excepción de que no se registraron diferencias significativas ($p>0.05$) para ningún pigmento. Cabe destacar que los valores en presencia de ambas bacterias se mantuvieron muy cercanos a los obtenidos en presencia de *Roseovarius* spp. por lo que tampoco hubo diferencias con respecto a este tratamiento pero sí con el tratamiento en presencia de *Alteromonas* spp. debido a que la concentración de la chl-c, peridina y chl-a disminuyeron significativamente ($p<0.001$).

Finalmente comparando la presencia individual de las bacterias, observamos una disminución en la concentración de los pigmentos en presencia de *Alteromonas* spp., sin embargo, no es estadísticamente significativa ($p>0.05$) (Fig. 38).

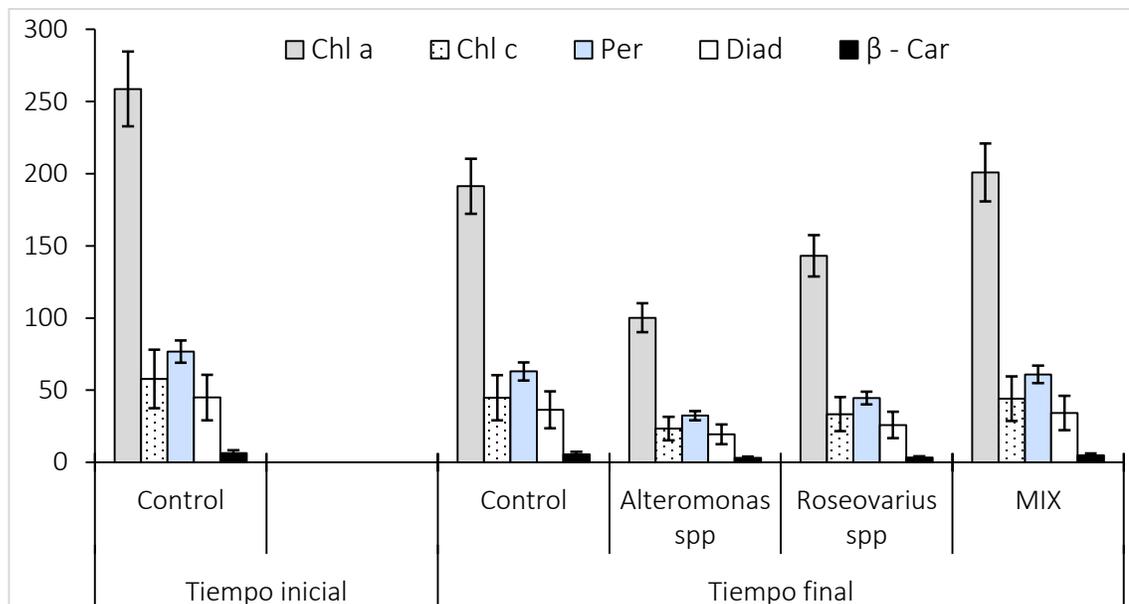


Figura 38. Perfil de pigmentos de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Gris:** clorofila a. **Puntos:** clorofila c. **Azul:** peridina. **Blanco:** diadinoxantina. **Negro:** β-caroteno. **Líneas verticales:** desviación estándar.



7.9.7. Toxinas paralizantes

En presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. el perfil de toxinas de *G. catenatum* no se modificó ya que presentó los mismos análogos en presencia/ausencia de las mismas. Sin embargo, la presencia de estos microorganismos favoreció una mayor concentración de ciertos análogos comparado con los grupos control.

De esta manera, observamos que al inocular las bacterias en *G. catenatum* los análogos GTX 2/3, dcSTX y dcGTX 2/3 disminuyeron. Si bien dicha disminución no fue significativa ($p > 0.05$) para el primer análogo, los dos restantes presentaron cambios significativos ($p < 0.001$) entre el grupo control en el tiempo final (16 días de cultivo) y los tratamientos individuales de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. y entre el grupo control tiempo inicial (12 días de cultivo) y el tratamiento en presencia de *Roseovarius* spp., respectivamente.

Los análogos restantes: B1, B2, dcNEO y C1/2 en presencia de ambas bacterias, ya sea de manera individual o en conjunto aumentaron su concentración aunque para la mayoría dicho incremento no fue significativo, la concentración del análogo B2 fue el único que registró diferencias significativas ($p > 0.001$) entre los tratamientos 1 (en presencia de *Alteromonas* spp) y 3 (en presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp).

Con base en lo anterior se concluye que la presencia de las bacterias en la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* incrementó la concentración de los análogos sulfocarbamoil, es decir, los menos potentes, caso contrario a los análogos decarbamoil y carbamoil, más tóxicos, que disminuyeron en presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. (Fig. 39).

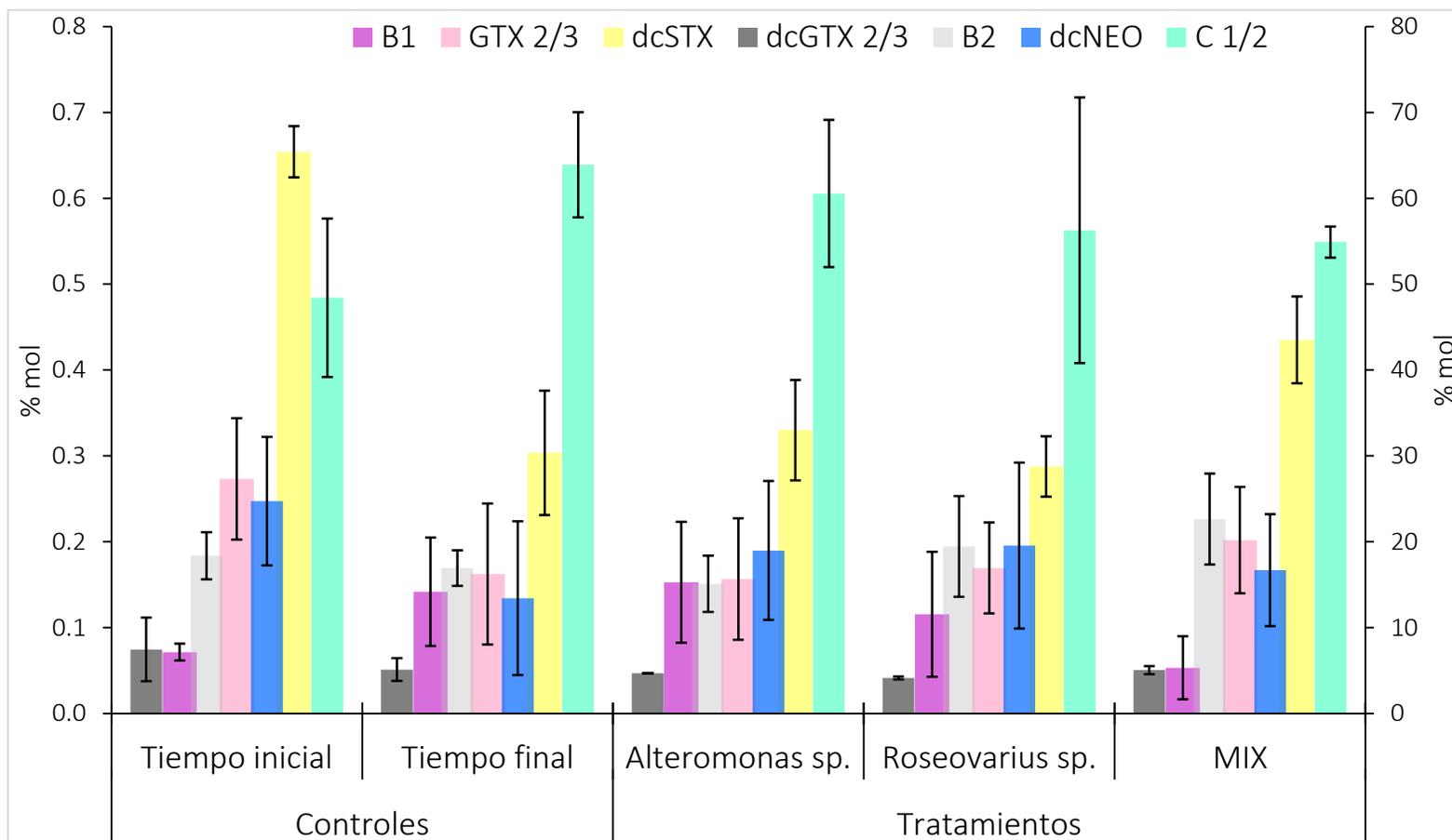


Figura 39. Perfil de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Morado:** B1. **Amarillo:** dcSTX. **Rosa:** GTX 2/3. **Negro:** dcGTX 2/3. **Gris:** B2. **Azul:** dcNEO. **Verde:** C1/2. **Líneas verticales:** desviación estándar. **Derecha:** GTX 2/3, dcSTX, B1. **Izquierda:** dcNEO, dcGTX 2/3, B2, C 1/2.



7.9.8. Toxicidad

La toxicidad por célula en presencia de ambas bacterias disminuyó comparado con los grupos control, observándose diferencias significativas únicamente entre el control correspondiente al tiempo inicial, es decir, a los 12 días de cultivo las células de *G. catenatum* presentaban una mayor toxicidad por célula en ausencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. esto sustentado en el hecho de que los tratamientos, ya sea en presencia de cada bacterias y en conjunto, disminuyeron la toxicidad por célula del dinoflagelado a más de la mitad en 4 días, tiempo de duración del experimento.

En ausencia de las bacterias, el grupo control del tiempo final (14 días de cultivo) tuvo una menor toxicidad celular de *G. catenatum* con respecto al tiempo inicial, siendo tal disminución estadísticamente significativa ($F_{(4,15)} = 13.061$; $p < 0.001$). No obstante, entre el control del tiempo final y los tratamientos con bacterias no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cuanto a los tratamientos, estos mantuvieron valores de toxicidad promedio bastante similares aunque es apreciable que de menor a mayor al agregar *Alteromonas* spp. al cultivo de *G. catenatum* se presentó una menor toxicidad, seguido por el tratamiento con la adición de las dos bacterias y finalmente el cultivo de *G. catenatum* con la adición de *Roseovarius* sp. (Fig. 40).

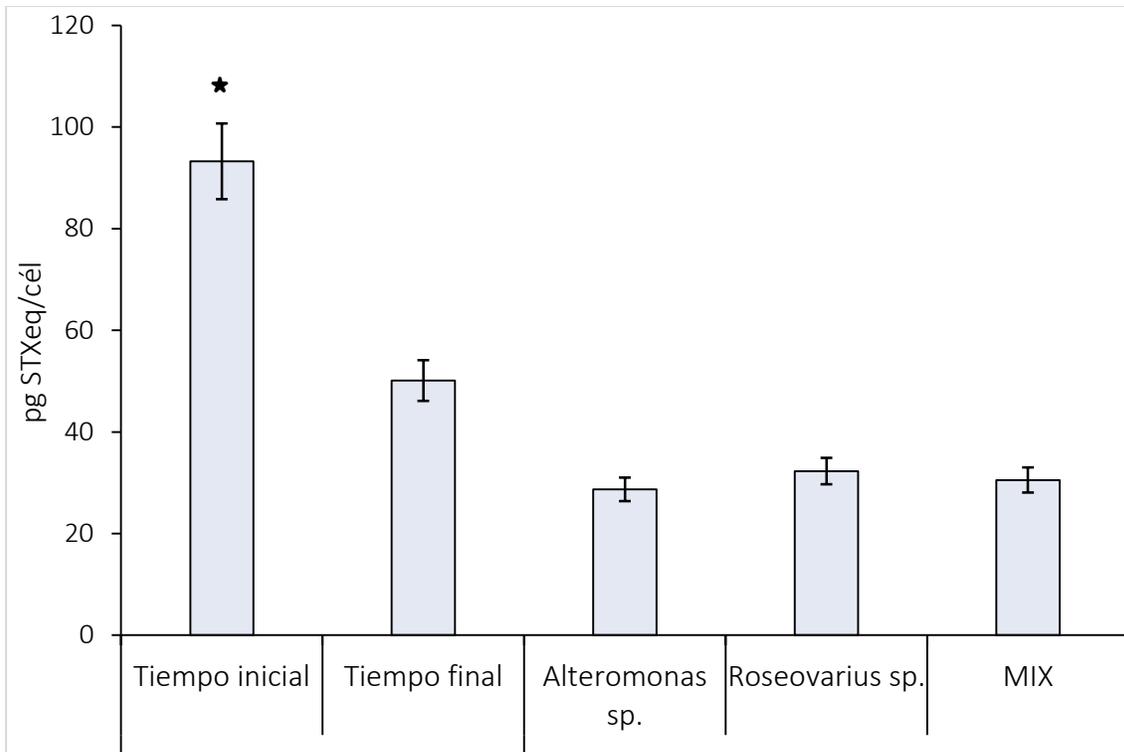


Figura 40. Toxicidad promedio (pg STXeq/cél) de la cepa GCCV-7 de *G. catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Líneas verticales:** desviación estándar. ***** diferencias significativas ($p < 0.001$).

7.10. Influencia de las bacterias en la germinación de quistes de *Gymnodinium catenatum*

7.10.1. Inducción al proceso sexual

Gymnodinium catenatum se caracteriza por presentar un proceso sexual heterotálico múltiple, resultado de la fusión de isogametos haploides en medios de cultivo sin la adición de nitrógeno o fósforo (Blackburn *et al.*, 1989). Al fusionarse los isogametos se obtienen cepas no clonales diploides.

En el presente estudio, la cruce se realizó entre las cepas 62L y BAPAZ-7, las cuales se fusionaron formando un patrón de zig-zag con sus respectivos cíngulos, originándose **planocigotos**, células de mayor tamaño que el resto de las células



vegetativas caracterizadas por ser biflageladas y aplanadas dorsoventralmente. Su formación comenzó después de 15 días de inducido el proceso sexual.

Posterior a 20 días inició el proceso de enquistamiento, obteniendo la máxima cantidad de quistes a los 25-28 días, con un promedio de 302 (\pm 183) quistes por caja de Petri (cada caja Petri contenía 18 mL de cultivo: 10 mL de medio GSe^{-N} y 4 mL de cultivo de cada cepa). En general, los quistes presentaron una pared gruesa y reticulada, una forma esférica, coloración marrón y cuerpos rojos muy evidentes en el centro (Fig. 41).

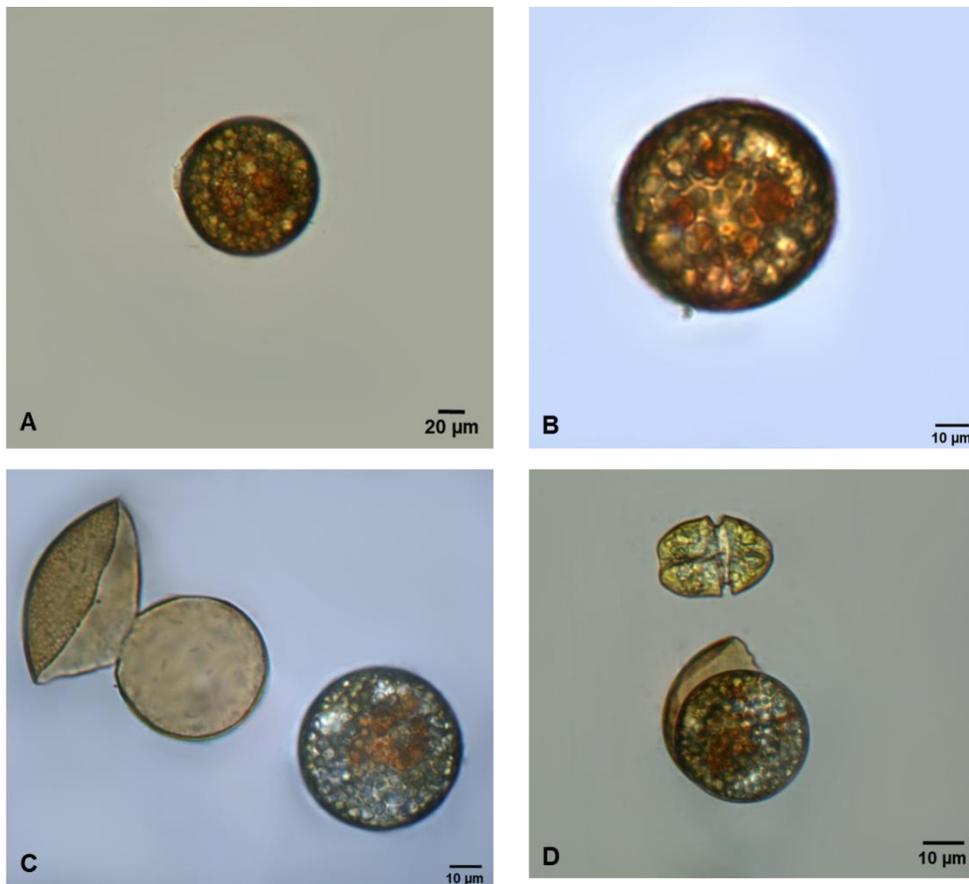


Figura 41. Formación de quistes de resistencia entre las cepas 62L y BAPAZ-7 de *Gymnodinium catenatum*. **A)** Hipnocigoto 10 X. **B)** Hipnocigoto, 60 X, se observan varios cuerpos rojos, así como la pared reticulada. **C)** Autofragma con arqueopilo precingular y célula vegetativa recién liberada. **D)** Célula vegetativa con autofragma adyacente; célula vegetativa “típica” de *Gymnodinium catenatum*.



7.10.2. Aislamiento y esterilización de quistes

De un total de 5 142 (\pm 183) quistes, se aislaron 407 (\pm 8), los cuales fueron lavados con una solución de H₂O₂ al 0.55% para eliminar la mayor cantidad de bacterias extracelulares; inmediatamente se colocaron en cajas de 96 pocillos con medio GSe estéril por autoclave y la placa se cubrió con malla mosquitera para evitar la fotoinhibición.

Posterior a dos semanas, 60 (\pm 4) quistes germinaron, sin embargo, la germinación no se consideró exitosa debido a que las células vegetativas no lograron desarrollarse, es decir, no se formaron los planomeiocios.

7.10.3. Inoculación de bacterias

La esterilización de la superficie de los quistes con H₂O₂ al 0.55% cumplió con su objetivo, el cual fue eliminar la mayor cantidad de bacterias extracelulares. Sin embargo, disminuyó el éxito en la germinación, por lo que se optó por inocular la bacteria *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y una mezcla de ambas a lotes de 25 quistes y evaluar el porcentaje de germinación en cada tratamiento.

En presencia de *Alteromonas* spp. germinaron 37 quistes equivalentes al 74% en cuatro días. Al inocular *Roseovarius* spp. se obtuvo una germinación exitosa en 42 quistes, correspondientes al 84% a partir del sexto día y finalmente, en presencia de ambas bacterias, la germinación comenzó al segundo día de inocularse las bacterias, teniendo una germinación exitosa en 48 quistes, es decir, el 96% de los quistes germinaron (Fig. 42).

Haciendo una comparación entre las células parentales y las recién germinadas, observamos que las segundas presentaban un menor tamaño y lucían “traslúcidas” es decir, no presentaban la pigmentación característica de las células de *G. catenatum* por lo que se procedió a medirlas y fotografiarlas para evidenciar lo antes mencionado (Fig. 43).

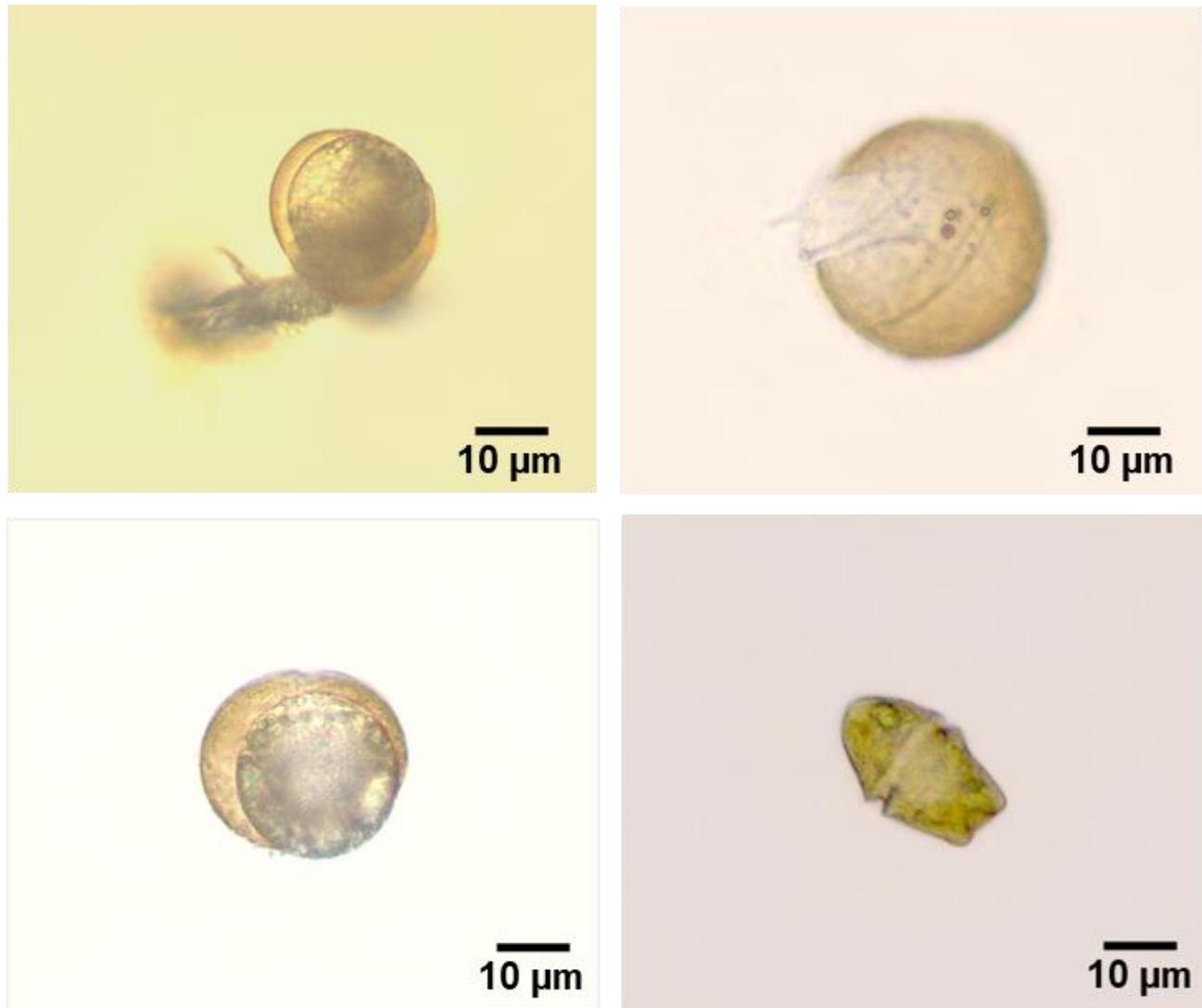


Figura 42. Micrografías del proceso de germinación de quistes de las cepas 62L y BAPAZ-7 de *Gymnodinium catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas

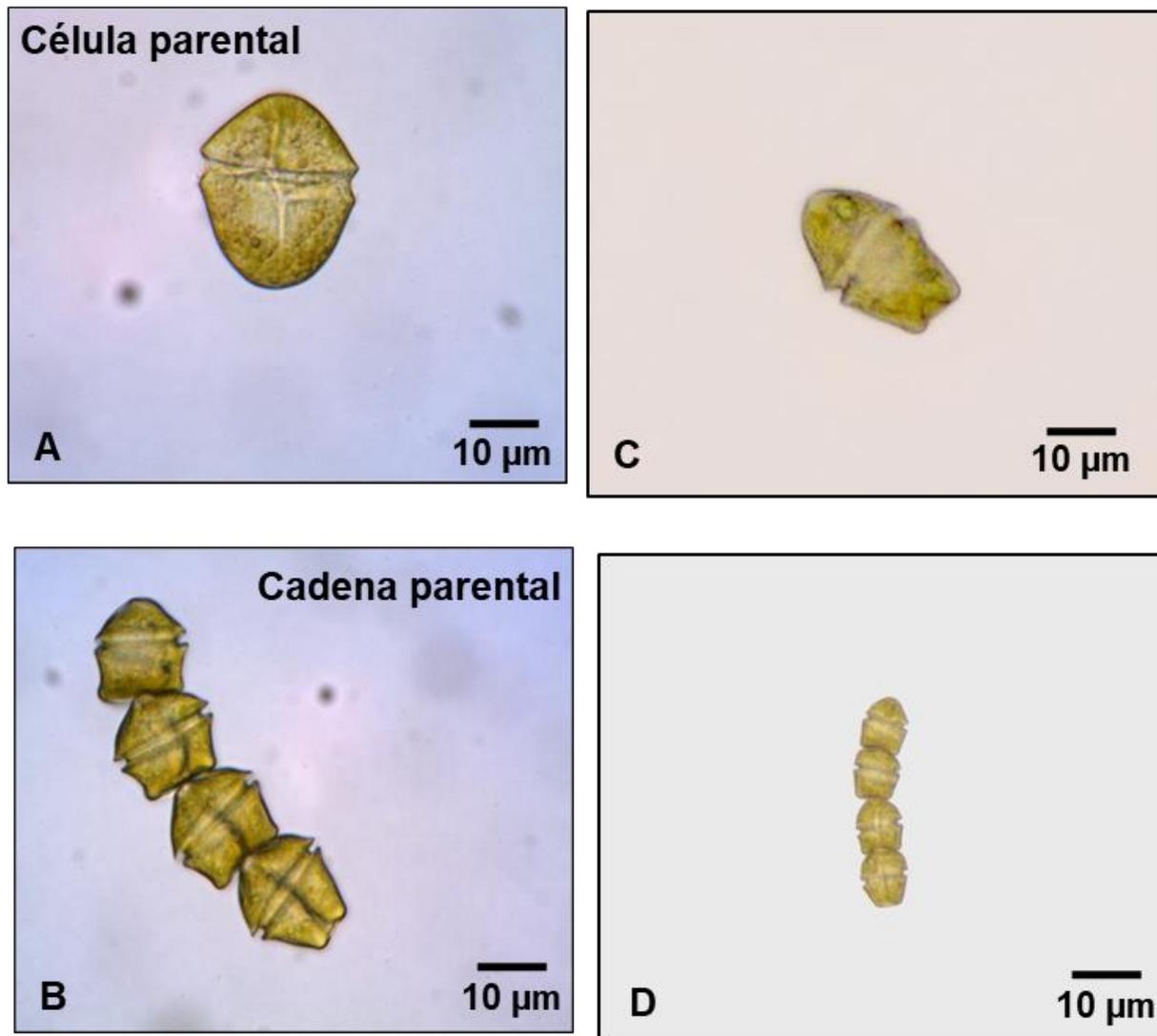


Figura 43. Micrografías de células vegetativas de las cepas parentales 62L y BAPAZ-7 y células obtenidas de la germinación de quistes en presencia de *Roseovarius* spp.



7.10.4. Perfil de toxinas paralizantes

En esta sección se analiza el perfil de toxinas desde dos perspectivas diferentes, la primera hace alusión al perfil obtenido de las células vegetativas germinadas de los quistes inoculados con *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. mientras que el segundo perfil a analizar corresponde al efecto de re-inocular las bacterias a las células de *G. catenatum* a los 10 días de cultivo obtenidas a partir de la germinación de los quistes inoculados con las bacterias, de esta manera los grupos control están representados por las cepas parentales que fueron inducidas al proceso sexual, teniendo dos momentos de cosecha: tiempo inicial y tiempo final.

Tal como ocurrió en el experimento dónde se inocularon las bacterias a la cepa GCCV-7, en esta ocasión la presencia de ambas bacterias, ya sea individualmente o en conjunto no cambió el perfil de toxinas paralizantes pero sí generó cambios importantes en la proporción de los análogos.

De manera general, los análogos GTX 2/3, dcSTX, dcNEO y B2 disminuyeron su concentración mientras que los análogos B1, C1/2 y dcGTX 2/3 aumentaron. En el caso de los grupos control se presentó el mismo patrón de cambios antes mencionado, para el cultivo 62L los cambios observados en ambas cosechas fueron similares, razón por la cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$), aunado al hecho que los valores de todos los análogos detectados permanecieron en el rango promedio. El segundo grupo control, BPAZ-7 presentó cambios similares en su perfil de toxinas, con la excepción de que los análogos dcSTX, B2 y C1/2 sí presentaron diferencias significativas ($p < 0.001$) debido a que los dos primeros disminuyeron drásticamente su concentración mientras que los análogos C1/2 aumentaron significativamente.

Haciendo referencia a los tratamientos de inoculación con bacterias, en presencia de *Alteromonas* spp. se obtuvieron los valores más altos del análogo dcNEO que disminuyó significativamente ($p < 0.001$) entre ambos días de cosecha. Caso contrario con el análogo C1/2 que aumentó significativamente entre los días 10 y 14, correspondientes al tiempo inicial y final, respectivamente. El resto de los análogos



también varió pero no de manera significativa debido a que la mayoría de ellos logró mantener su concentración dentro de un rango promedio.

El tratamiento en presencia de *Roseovarius* spp. presentó diversas peculiaridades, siendo la más importante que el análogo GTX 2/3 fue el más abundante, seguido por los análogos decarbamoil y finalmente los sulfocarbamoil. Sin embargo, así como el análogo GTX 2/3 predominó durante el tiempo inicial fue el disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en el tiempo final, así como los análogos dcSTX y dcGTX 2/3 contrario a dcNEO que únicamente para este tratamiento en lugar de disminuir aumentó su concentración. En cuanto a los análogos B1 y B2 mantuvieron su producción constante y en el caso del análogo B2 se caracterizó por presentar valores altos en comparación con el resto de los cultivos.

Finalmente en presencia de ambas bacterias, se observó una clara disminución en los análogos GTX 2/3, dcNEO y B2 ($p < 0.001$), mientras que los análogos dcGTX 2/3, B1 y C1/2 aumentaron. El único análogo que se mantuvo constante fue la dcSTX (Fig. 44).

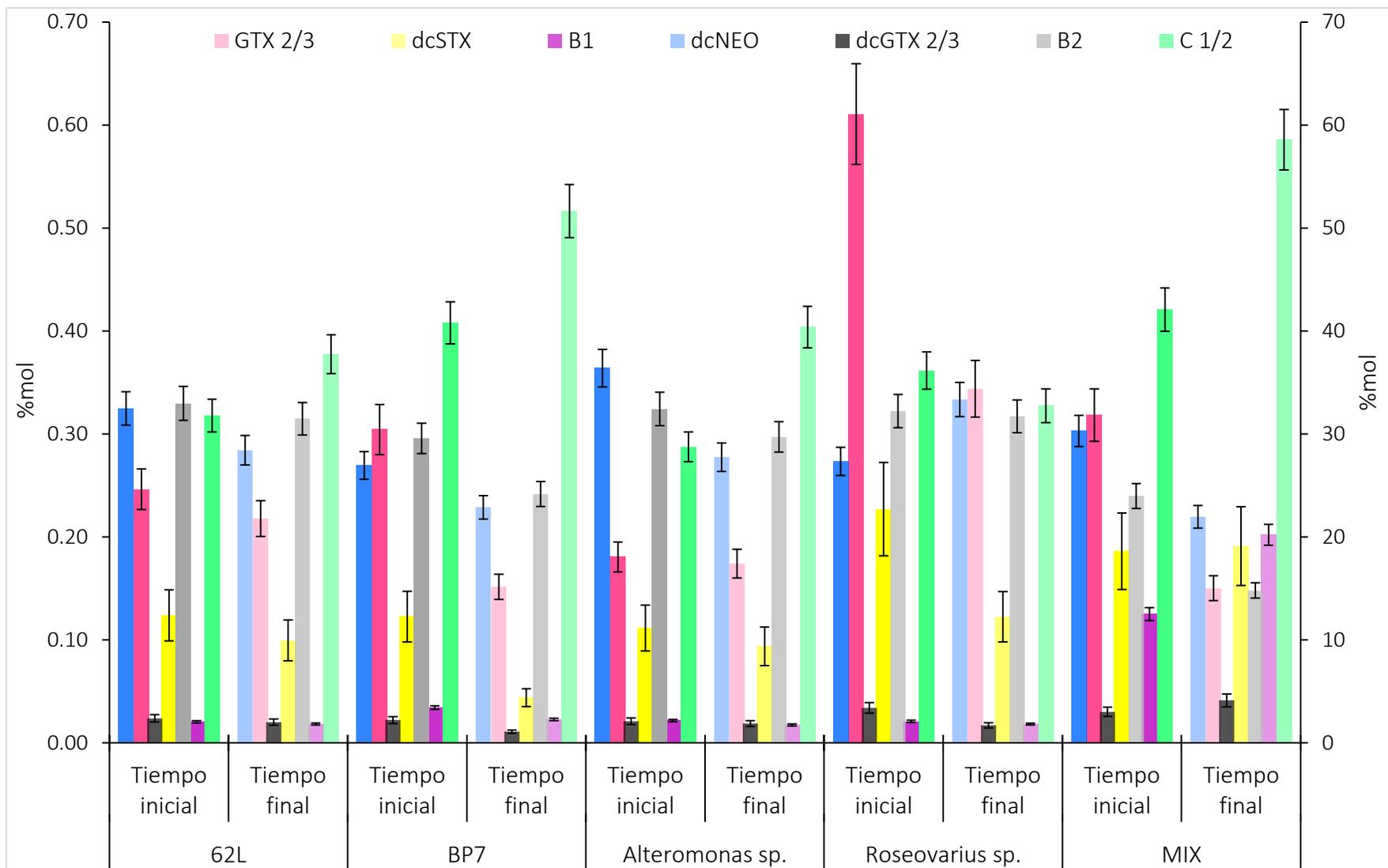


Figura 44. Perfil de toxinas paralizantes de las cepas parentales y germinadas de *Gymnodinium catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Morado:** B1. **Amarillo:** dcSTX. **Rosa:** GTX 2/3. **Negro:** dcGTX 2/3. **Gris:** B2. **Azul:** dcNEO. **Verde:** C1/2. **Líneas verticales:** desviación estándar. **Derecha:** GTX 2/3, dcSTX, B1. **Izquierda:** dcNEO, dcGTX 2/3, B2, C 1/2.



7.10.5. Toxicidad

En lo referente a la toxicidad por célula de los grupos control y los diversos tratamientos observamos que la cepa parental 62L fue la que presentó los valores más altos de toxicidad por célula durante el tiempo inicial, registrando un valor promedio de 79 (\pm 2.70) pg STXeq/cél, seguido por el tratamiento en presencia de *Alteromonas* spp., la mezcla de ambas bacterias, *Roseovarius* spp. y finalmente, la cepa BAPAZ-7.

Al momento de realizar la segunda cosecha, los grupos control registraron una disminución en la toxicidad, específicamente la cepa 62L disminuyó más de la mitad su toxicidad registrando diferencias significativas ($p < 0.001$). De igual manera la cepa BAPAZ-7 registró un descenso en la toxicidad promedio celular, sin embargo tal cambio no fue significativo ($p > 0.05$).

En los tratamientos, de manera opuesta a los grupos control, aumentó la toxicidad promedio de las células. En presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. tal incremento fue significativo ($p < 0.001$) mientras que en presencia de ambas bacterias, si bien se registró un incremento, éste no fue significativo ($p > 0.05$) (Fig. 45).

Hagamos hincapié que a pesar de que los grupos control registraron una mayor toxicidad esta obtuvo un mayor aporte de los análogos menos potentes, es decir, existió una mayor proporción de las toxinas B1, B2 y C1/2 mientras que para los tratamientos aunque también predominaron los análogos sulfocarbamoil, la proporción de los análogos más potentes (decarbamoil y carbamoil) incrementaron (Fig. 46).

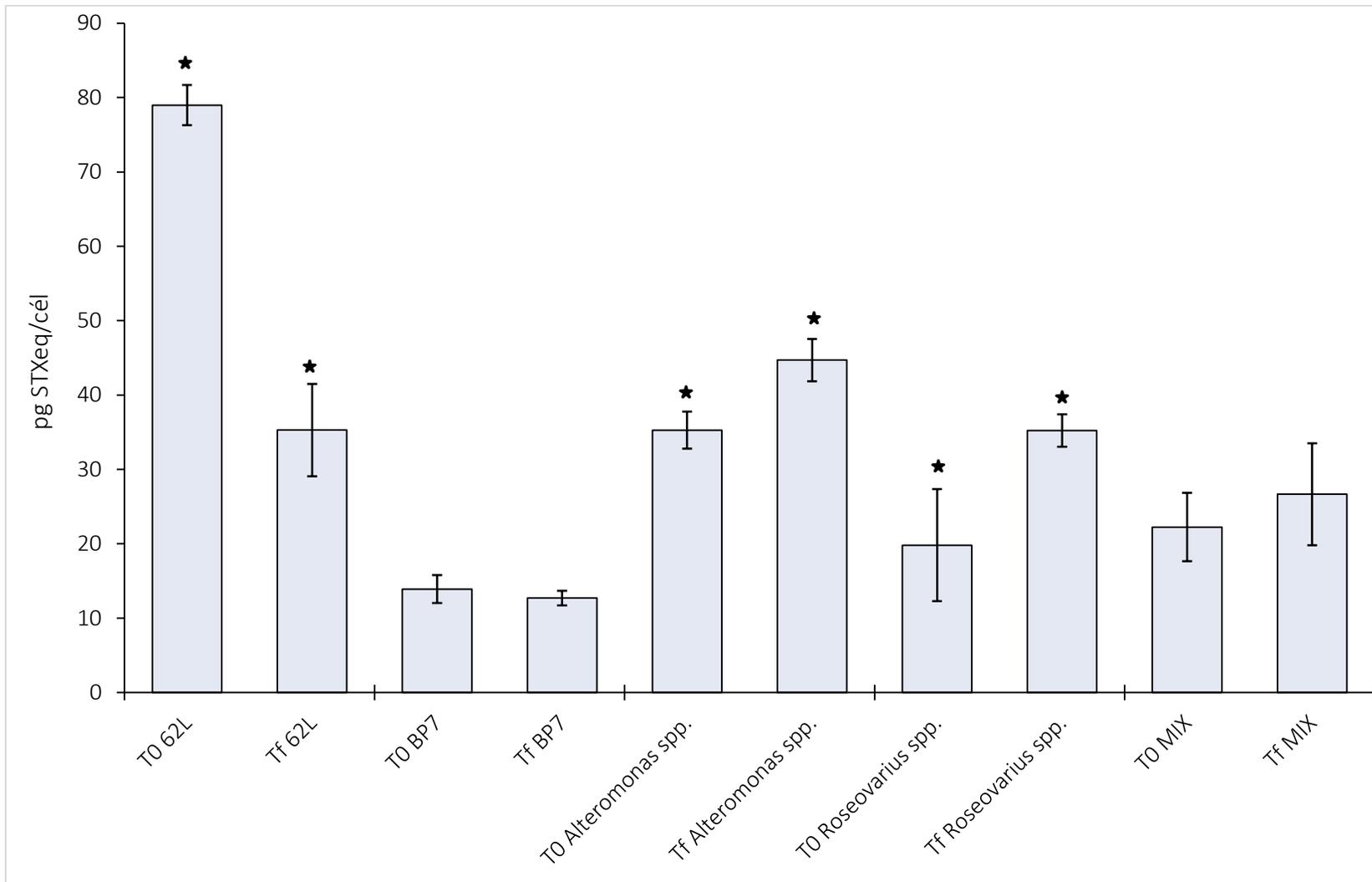


Figura 45. Toxicidad (pg STXeq/cél) de las cepas parentales y germinadas de *Gymnodinium catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. **Líneas verticales:** desviación estándar. ***** diferencias significativas ($p < 0.001$).

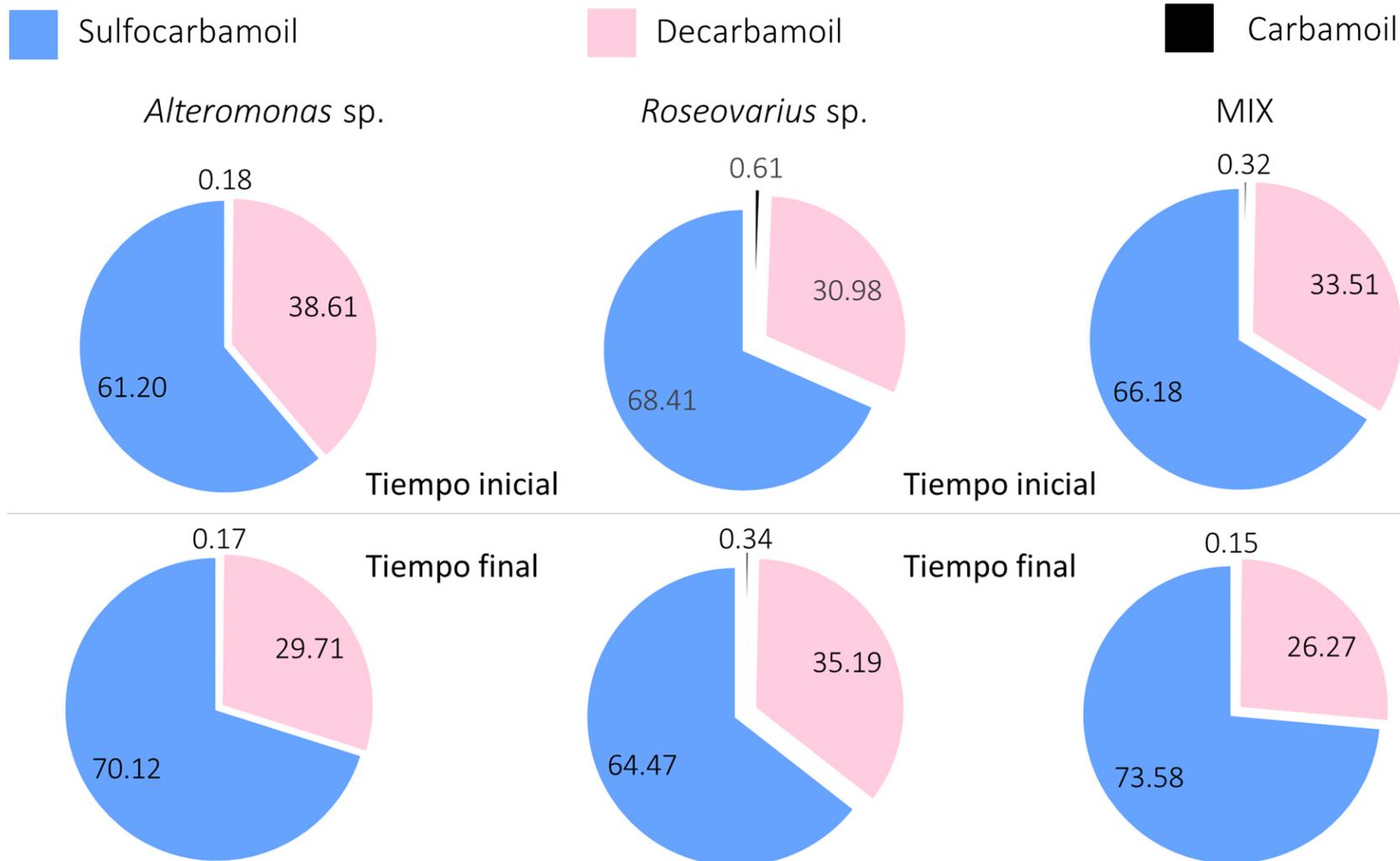


Figura 46. Toxicidad (pg STXe/cél) de las cepas germinadas de *Gymnodinium catenatum* en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y ambas. Agrupación de acuerdo al grupo sustituyente de la cadena lateral.



VIII. DISCUSIÓN

8.1. Identificación de de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp.

En los ambientes naturales coexisten infinidad de micrororganismos con funciones diferentes que compaginan y permiten el correcto funcionamiento de un sistema, razón que ha llevado a interrogarnos qué es lo que sucede con las células integrantes de dicho sistema, cómo son las interacciones dentro del mismo y, sobre todo, cuáles son las propiedades individuales de cada una. Estas preguntas han llevado a la necesidad de aislar y/o purificar subpoblaciones en base a sus propiedades fisicoquímicas, inmunológicas y funcionales (Tortora *et al.*, 1995; Vullo *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2003; Ramírez-Gama *et al.*, 2006). Los métodos de clasificación que se basan en propiedades funcionales utilizan características tales como afinidad, adherencia o crecimiento. La clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos mientras que las características fisicoquímicas son las más utilizadas para la separación o “sorteo celular” ya que se incluyen características como tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de la luz, potencial de membrana, pH, carga eléctrica y contenido celular de diferentes compuestos como ácidos nucleicos, enzimas y otras proteínas (Orfao *et al.* 1996).

Para facilitar el proceso de aislamiento y obtener mejores resultados, frecuentemente se emplean combinaciones de técnicas canónicas y de vanguardia que al estar bien estandarizadas y proporcionar cierto margen de modificación en el procesamiento de la muestra garantiza en un alto porcentaje ($\leq 50\%$) la separación celular (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Shapiro, 2003; Mattanovich & Borth, 2006). Tal es el caso de la citometría de flujo que es una herramienta de análisis en tiempo real que permite hacer la medición simultánea de múltiples características físicas de una sola célula dando la ventaja analítica de hacer mediciones cuantitativas y multiparamétricas en un número estadísticamente adecuado de células para definir las propiedades de una población celular o de las subpoblaciones que la componen. El análisis multiparamétrico hace posible evaluar poblaciones celulares particulares



dentro de una mezcla compleja, ya que aprovecha propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz, y características controladas como la fluorescencia. Al mismo tiempo, es posible separar las poblaciones definidas por éste análisis (Stock & Salgado-Lynn, 2002; Morán *et al.*, 2005; Laguado, 2007).

El uso de citometría de flujo como herramienta de separación celular nos permitió localizar y caracterizar la población de bacterias de interés a través del uso de distintos detectores que realzaron las características de la célula. Sin embargo, la correcta identificación de un grupo de células depende en gran medida del equipo que se utilice, por lo que una ventaja extra que presentó el análisis fue el uso del citómetro BD Influx que presenta un total de 20 detectores que interrogan a la célula y con ello logran describirla mejor, además que el equipo tiene acoplado el sorteador celular.

Se consideró que el sorting celular fue exitoso debido a que la caracterización celular realizada previamente en el citómetro únicamente distinguió una población de bacterias, esto a través de las características que se consideraron tal como lo describe Morán y colaboradores (2005) quienes indican que el tamaño celular acompañado de la autofluorescencia integran el dúo inequívoco de separación proporcionando características directas, específicas y no alterables de las células. Sin embargo, a pesar de que se evaluó la autofluorescencia como parámetro de caracterización ésta no arrojó los resultados esperados debido que se incrementó el ruido electrónico del equipo, se perdió la población conforme el tiempo de muestreo avanzaba y finalmente se sesgó la separación celular. Es por ello que se decidió utilizar a *Salmonella enterinditis* teñida con el fluorocromo Hoechst 3344 como control de compensación; dicha acción nos permitió principalmente dos cosas: **1)** proveerle al citómetro dos poblaciones con intensidades de fluorescencia lo suficientemente alejadas pero con la misma autofluorescencia, esto con el fin de evitar el solapamiento en los espectros de emisión del fluorocromo y evitar resultados erróneos (Roederer, 2002; Vásquez-Flórez, 2009) y **2)** la tinción nos permitió caracterizar de manera mas optima la población a separar, lo que a su vez se tradujo en una mejor separación (Marsán-Suárez *et al.*, 2015) esto sustentado en el hecho de que el uso de fluróforos permite analizar un elevado número de partículas en suspensión en un corto periodo (5 000



células / s), ofrece información del resto de los parámetros y proporciona una mayor señal de reconocimiento (Vogt *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2007; Hedley & Keeney, 2013). No olvidemos que el fluorocromo Hoechst 33342, al ser un benzimidazol presenta un grupo etilo adicional brindándole un comportamiento más lipofílico, por lo que puede atravesar más fácilmente la membrana celular, teñir el ADN y ser eliminado en las primeras tres generaciones celulares (Hawley y Hawley, 2004) lo que nos garantizó la viabilidad de las bacterias pre y post sorting.

A pesar de todas las bondades ya descritas que presenta la citometría de flujo como técnica vanguardista, se debe mencionar que no logró separar al 100% una sola población bacteriana, lo cual podría atribuirse a variaciones fotoeléctricas que hacen “indetectables” algunos componentes bacterianos lo que nos explicaría porque al momento de analizar la autofluorescencia sólo se detectó una población (Fig. 5) mientras que al teñir con Hoechst dicha población incrementó el número de células detectadas observándose una mayor área de cobertura en el citograma (Fig. 6) debido a que ambas poblaciones fueron teñidas indiscriminadamente (Shapiro, 2003; Castillo-Navarrete, 2005). Dicho resultado fue lo que nos llevó a continuar con el aislamiento celular pero en esta ocasión a través de técnicas de separación convencionales como el estriado en placa y el uso de diferentes medios de cultivo, lo que finalmente nos permitió separar ambas poblaciones de bacterias y poder aclimatarlas a las mismas condiciones de cultivo que las cepas de *G. catenatum* (Allen, 1968; Olivas, 2004).

La identificación molecular nos mostró la asertividad del aislamiento al corroborar que las bacterias *Roseovarius* spp. y *Alteromonas* spp. ya habían sido descritas como elementos integrativos de la comunidad bacteriana asociada a distintas cepas de *G. catenatum* (Fig. 10) y debido a que pertenecen a las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria que son de las clases dominantes asociados a este dinoflagelado (Green *et al.*, 2004; 2010).

Una peculiaridad de *G. catenatum* es que presenta una comunidad bacteriana asociada bastante similar a otros dinoflagelados pertenecientes a los géneros: *Pfiesteria*, *Procentrum*, *Scrippsiella*, *Alexandrium* y *Gambierdiscus*. Dicha similitud ha llegado a ser superior al 95% a pesar de encontrarse en regiones geográficas



separadas lo que ha conllevado a suponer que las sustancias liberadas al medio por parte de *G. catenatum* actúan como selectores químicos al favorecer el crecimiento únicamente de ciertas especies bacterianas (Alavi *et al.*, 2001; Hold *et al.*, 2001; Jasti *et al.*, 2005; Pérez-Guzmán *et al.*, 2008). Otra explicación de la alta similitud entre comunidades bacterianas asociadas a dinoflagelados tóxicos es que las bacterias son altamente partícipes en la fisiología del dinoflagelado, desempeñando funciones específicas que en conjunto estimulan el crecimiento de los mismos a través de su activa participación en la remineralización de la materia orgánica, suministrando vitaminas y/o produciendo sideróforos y citoquininas (Gonzalez *et al.*, 1999; Alavi *et al.*, 2001; Hold *et al.*, 2001; Seibold *et al.*, 2001; Schäfer *et al.*, 2002; Yoch, 2002).

Sakami, Alavi y Ferrier con sus respectivos colaboradores (1999; 2001; 2002) tras aislar de la superficie celular de *Gambierdiscus toxicus*, *Pfiesteria* sp. y *Alexandrium fundyense* identificaron a *Alteromonas* spp., como una bacteria promotora del crecimiento debido a que en presencia de la misma, las tres especies de dinoflagelados incrementaron su biomasa celular. Teniendo el mismo efecto pero en esta ocasión observado en *G. catenatum*, la bacteria *Roseovarius* spp. aislada de cepas australianas de la misma especie estimuló el crecimiento del dinoflagelado demostrándose que independientemente del género de bacteria, el efecto generado es el mismo (Green *et al.*, 2004; 2010).

Si bien es cierto que los efectos de las bacterias han sido analizados únicamente en laboratorio bajo condiciones controladas, también existen trabajos que mediante el uso de sondas moleculares lograron observar en el ambiente la asociación entre la abundancia de ciertos géneros de bacterias y dinoflagelados productores de toxinas. Específicamente para especies del género *Alexandrium* y para *Lingulodinium polyedrum* demostrando que existe una correlación en la abundancia de los organismos, es decir, cuando el número de células del dinoflagelado aumentaba también lo hacían las bacterias. Cabe mencionar que a diferencia de los dinoflagelados que se encuentran en vida libre, a las bacterias se les puede encontrar en dos fases diferentes: vida libre o adherida a la célula del dinoflagelado formando sideróforos, lo que favorece la asimilación de diversos micronutrientes. Dicha información respalda la



idea de que las asociaciones entre dinoflagelados y bacterias no son relaciones inducidas sino que constituyen un factor relevante en las poblaciones naturales (González *et al.*, 2000; Frandino *et al.*, 2001; Töbe *et al.*, 2001).

8.2. Curvas de crecimiento

8.2.1. Bacterias

En los últimos 25 años el estudio del femto, pico y microplancton ha ido en incremento desarrollándose diversos métodos que evalúan su abundancia y actividad. Una herramienta altamente confiable la constituye la microscopía de epifluorescencia al ser una técnica de visualización puntual, rápida y sencilla (Legendre *et al.*, 2001; La Ferla *et al.*, 2003; Bouvier *et al.*, 2007; Mecalco-Hernández, 2010) que nos permitió contabilizar ambas poblaciones bacterianas.

Al hacer mención de las bacterias aisladas de la superficie de dinoflagelados tóxicos se debe considerar que su cultivo y mantenimiento generalmente se realiza en caldo marino ZoBell el cual se caracteriza por contener proteosa-peptona, extracto de levadura, FePO_4 y glucosa, todo diluido en agua de mar a un pH 7.6, con una temperatura de 20°C y con agitación constante (León *et al.*, 2005) o bien en placas de agar marino sin un fotoperiodo controlado y a temperatura ambiente. Esto es importante porque al comparar las biomásas celulares, así como las tasas de crecimiento, tiempo de generación y duración de las diferentes fases de crecimiento se ha encontrado una alta variabilidad explicada por la respuesta cepa-específica que describieron Oh y colaboradores (2010) al mostrar diferencias significativas en aislados de la misma especie.

Para ambas bacterias se obtuvo una curva de crecimiento caracterizada por una fase de aclimatación corta, seguida de un crecimiento exponencial gradual con duración variable (de 48 a 80 h) que concluyó el día de máxima biomasa celular para continuar con un declive inmediato. En el caso de *Alteromonas* spp. la curva de crecimiento obtenida coincide con la reportada por León y colaboradores y Carrasco-



Palma (2005) a pesar de que ellos la obtuvieron a través de mediciones de turbidez y no por conteos directos, además cabe resaltar que dicha curva tuvo una duración más corta (16 h) que la obtenida en el presente, lo cual repercute directamente en la biomasa celular debido a que la obtenida en el presente fue significativamente menor ($214,815 \pm 12,830$ cél/mL) que la reportada en literatura ($2,200,000,000$ cél/mL). Las tasas de crecimiento (0.014 ± 0.002 div/día) también fueron más bajas, mientras que el tiempo de generación (20.074 ± 0.82 h) fue mayor.

La segunda bacteria constituye un caso particular debido a que *Roseovarius* spp. ha sido estudiada bajo el enfoque de la capacidad de *Quorum Sensing* (QS) que presenta a través de la producción y liberación al medio de moléculas señal de bajo peso molecular, denominadas *autoinductores*, específicamente N-acil-L-homoserín lactonas (AHL) por lo que los cultivos de la misma buscan, principalmente la producción de biopelículas y su asociación con demás bacterias productoras de QS. De esta manera, el medio de cultivo en el que la cultivan es el medio 733 o medio *Sulfitobacter pontiacus* (acetato de sodio, HEPES, K_2HPO_4 , NH_4Cl , extracto de levadura, peptona, NaCl, $MgSO_4$, $CaCl_2$ y biotina) a $28^\circ C$ y en oscuridad (Jiménez-Taracido, 2009). Dichas condiciones de cultivo se han estipulado para bacterias del género *Roseovarius* de origen marino mientras que *Roseovarius tolerans*, bacteria asociada a la cepa GCJP01 de *G. catenatum* ha sido cultivada en agar marino ZoBell a $18^\circ C$ presentando colonias circulares de 2 a 3 mm de diámetro, translúcidas, superficie lisa, opacas, borde entero y no pigmentadas lo cual coincide con la morfología reportada en el presente trabajo (Fig. 21).

Sin embargo, no encontramos una curva de crecimiento específica para esta bacteria por lo que únicamente podemos mencionar que a diferencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. presentó una curva de crecimiento con una mejor delimitación de las fases de crecimiento (Fig. 11) lo cual posiblemente se atribuya a que presentó un crecimiento más lento (80 h) reflejado en una menor biomasa (Fig. 12).

En cuanto a las diferencias entre los diversos medios utilizados para el crecimiento de *Alteromonas* spp y *Roseovarius* spp. se puede mencionar que el medio GSe, medio utilizado en el presente trabajo, proporciona los nutrientes necesarios para



el crecimiento de *G. catenatum* debido a que la fracción húmica que proporciona el extracto de lombricompostaje le proporciona un plus de nutrientes (Prakash *et al.*, 1973; Granéli *et al.*, 1989), que bien pudieron perder viabilidad al ser esterilizado en autoclave. Aunque también es válido considerar que este medio no es el idóneo para el crecimiento de ambas bacterias al no proporcionar los nutrientes específicos para el crecimiento de cada una, reflejándose en un crecimiento lento con biomasa celular bajas.

8.2.2. *Gymnodinium catenatum*

La curva de crecimiento fue la típica para la especie, la cual se caracteriza por presentar una fase de aclimatación corta (de 2 a 4 días) seguida por la fase exponencial que generalmente describe un incremento gradual del crecimiento que concluye con la obtención de la máxima densidad celular durante la fase estacionaria. Después de la fase estacionaria de forma inmediata la biomasa celular comienza su declive (Martínez-Tecuapacho, 2009; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012; Durán-Riveroll, 2014; Costa *et al.*, 2015).

En general, se obtuvo una tasa de crecimiento entre $0.206 (\pm 0.001)$ y $0.063 (\pm 0.03)$ div/día, siendo únicamente la cepa 62L la que no superó las 0.1 div/día, teniendo el menor tiempo de generación (1.4 ± 0.01 días). Específicamente, para *G. catenatum* se ha reportado una tasa de crecimiento mínima de 0.07 div/día (Durán-Riveroll, 2014) y máxima de 0.34 div/día (Hallegraeff *et al.*, 2011) bajo las mismas condiciones de cultivo del presente trabajo. Cabe mencionar que también existen reportes que describen tasas de crecimiento intermedias (0.14 div/día) utilizando como medio de cultivo el medio f/2, diferentes temperaturas (de 15 a 29°C), a una menor salinidad (30 ups) y con una mayor irradiancia ($230 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Band-Schmidt *et al.*, 2004).

Debemos de recordar que *G. catenatum* es una especie que se caracteriza por presentar diversos ecotipos y que el ecotipo mexicano ha presentado tasas máximas de crecimiento menores comparadas con aquellas aisladas de otros países como España, Tailandia, Filipinas, Singapur, Japón y Tasmania (Hallegraeff *et al.*, 2011).



Con la excepción de las cepas aisladas de Bahía Concepción, Bahía de La Paz y Bahía de Mazatlán (Band-Schmidt *et al.*, 2006) que registraron tasas de crecimiento de 0.7 a 0.82 div/día. En los experimentos aquí descritos, las tres cepas obtuvieron tasas de crecimiento dentro del intervalo establecido para cepas mexicanas de *G. catenatum* (0.063 ± 0.03 , 0.156 ± 0.01 y 0.206 ± 0.01 div/día).

Evaluando el crecimiento de *G. catenatum* ante diversos factores abióticos no se ha encontrado diferencia significativa en el mismo ante cambios en la temperatura, salinidad y medios de cultivo (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2006; Bustillos-Guzmán, *et al.*, 2012; Durán-Riveroll, 2014). No obstante, ante cambios en las proporciones de N:P (4:1, 16:1, 32:1 y 64:1) en cultivos semi-continuos, Hernández-Sandoval (2010) reportó diferencias significativas. A pesar de que son pocos los trabajos que evalúan la respuesta de esta especie ante factores bióticos, Ramírez-Rodríguez (2015), Fernández-Herrera y colaboradores (2016), y Zumaya-Higuera (2017) describen que ante la presencia de bacterias, rafidofitas y otros dinoflagelados nocivos, *G. catenatum* ve disminuido su crecimiento en altas proporciones y en un corto período de tiempo.

El efecto negativo que presentan ciertos organismos ante células vegetativas de *G. catenatum* debe de considerarse como un factor regulador de la población del mismo ya que estos resultados indican que los factores bióticos regulan en mayor proporción el crecimiento de este dinoflagelado que los factores abióticos. Esto posiblemente se deba a que *G. catenatum* se caracteriza por tolerar un amplio intervalo de temperatura (11.5 a 30°C), con un crecimiento óptimo entre los 21 y 29°C y dentro de un rango de salinidad entre 28 y 38 ups (Band-Schmidt *et al.*, 2004), lo que nos garantiza que las condiciones de cultivo aquí descritas quedaron dentro del rango óptimo de crecimiento. No obstante y a pesar de lo anterior, Blackburn y colaboradores (1989) mencionan que un buen crecimiento de *G. catenatum*, así como de cualquier microalga se verifica en las divisiones celulares, siendo las óptimas cada 3 a 4 días, por lo que únicamente la cepa GCMV-7 (4.7 ± 0.13 días) presentó un buen crecimiento, debido a que las dos cepas restantes tuvieron un menor tiempo de generación (1.4 ± 0.01 y 1.9 ± 0.12 días).



8.3. Formación de cadenas celulares

En 1989 Blackburn y colaboradores a través de observaciones directas de cultivos de *G. catenatum* describieron que la proporción de cadenas celulares mayores a 4 células predominan en la fase de crecimiento exponencial y conforme el tiempo de cultivo incrementa, dichas cadenas se separan e incrementa la proporción de células individuales, por lo que concluyen que la longitud de las cadenas celulares está en función de las condiciones fisiológicas de la célula.

Dichas observaciones coinciden con nuestros resultados, ya que a pesar de que la cepa GCMV-7 fue la que presentó la menor abundancia celular y tasa de crecimiento no fue la que obtuvo una mayor proporción de células individuales a lo largo del cultivo ($2\ 155 \pm 38$ cél/mL; 0.063 ± 0.03 div/día; 33 ± 10 %) sino la cepa 62L que obtuvo la mayor densidad celular y tasa de crecimiento ($4\ 137 \pm 333$ cél/mL; 0.206 ± 0.01 div/día; 37 ± 25 %). Cabe destacar que tal como lo mencionó Blackburn y colaboradores (1989), las cadenas celulares largas (> a 7 células) comenzaron a ser dominantes a partir de la fase exponencial para las tres cepas y conforme el cultivo avanzaba, las cadenas se separaron para aumentar la proporción de células individuales.

Sin embargo, el largo de las cadenas celulares está influenciado también por las condiciones y la composición química del medio de cultivo, encontrando que en medio GSe se promueve la formación de cadenas celulares más largas que en medio f/2 (Durán-Riveroll. 2014), esto se puede deber a que el medio GSe está enriquecido con extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015) lo que estimula el crecimiento al aportar diversos micronutrientes extra al cultivo (González-González, 2010; Ortiz-Moreno *et al.*, 2012). A pesar de que no se evaluó este factor en el trabajo podemos mencionar que el medio GSe favoreció la formación de cadenas celulares en las tres cepas, siendo más evidente en la cepa GCMV-7 (Tabla V).



8.4. Determinación de metabolitos

8.4.1. Bacterias

La composición química de las bacterias en general, al igual que para otros seres vivos tiene tres representantes principales: proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales de acuerdo a su abundancia celular mantienen dicho orden. Sin embargo, de acuerdo a las condiciones bajo las cuales se cultivan y mantienen, las bacterias tienden a incrementar/disminuir dichas proporciones para lograr un equilibrio estequiométrico celular (Parés & Giménez, 2002).

De esta manera, las proteínas constituyen alrededor del 50% del peso seco de las células, siendo las más abundantes las lipoproteínas con un 15 a 20%. Seguido de los carbohidratos que forman parte de los ácidos nucleicos además de integrar a los polisacáridos extracelulares que forman la pared celular y de manera específica tienen la capacidad de formar gránulos de reserva en forma de almidón. Finalmente están los lípidos, representados por el 10 al 15% del peso seco celular e integran la pared celular y la membrana plasmática, pueden acumularse en forma de poli- β -hidroxibutirato una sustancia de reserva energética inmediata que constituyen parte fundamental de los fosfolípidos y ácidos grasos como el palmítico, palmitoleico y cisvaccénico (Abel *et al.*, 1963; Parés & Giménez, 2002; Pucci & Pucci, 2003).

Las bacterias con las que se trabajó se caracterizaron por presentar valores sumamente altos de lípidos, seguido por las proteínas y finalmente, el metabolito menos dominante fueron los carbohidratos (Tabla VI). Dicha composición bioquímica da la pauta a considerar que *Roseovarius* spp. no se encontraba en condiciones óptimas de crecimiento al observar que los lípidos constituyeron el metabolito celular dominante mientras que para *Alteromonas* spp. lo fueron las proteínas. Tal aseveración se debe a que en 2005 Pucci & Pucci describieron que bajo condiciones estresantes, las bacterias tienden a incrementar la concentración de lípidos y disminuir la concentración de carbohidratos, ya que estos últimos son utilizados como fuente de energía inmediata para continuar creciendo.



Un ambiente estresante para las bacterias al igual que para otro organismo en cultivo lo establecen dos aspectos principales, el primero es no contar con las condiciones óptimas de crecimiento reflejado en un medio de cultivo pobre, temperatura inadecuada e incluso un pH inferior o superior al de la zona de confort y el segundo aspecto lo constituyen los organismos al estar desfasados en su crecimiento y por ende, no presentan una sincronía en su composición celular interna (Pucci & Pucci, 2005). Para contrarrestar dichos puntos, los principales mecanismos de acción son: **1)** aumentar la producción de lípidos, **2)** cambiar la composición de los ácidos grasos, e **3)** incrementar la longitud de los ácidos grasos ya existentes (Russell, 1984; Suutari y Laakso, 1994; Annous *et al.*, 1997).

Debido a que *Roseovarius* spp. y en menor medida *Alteromonas* spp. mantuvieron altas proporciones de lípidos concluimos que ambas bacterias crecieron estresadas, posiblemente debido a que el medio de cultivo, así como las condiciones a las que se mantuvieron no fueron las idóneas. También cabe mencionar que comparado con otras bacterias, incluso pertenecientes al mismo género, las dos poblaciones bacterianas aquí descritas obtuvieron biomasa máxima celular considerablemente menores.

8.4.2. *Gymnodinium catenatum*

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total y que, sumadas a los carbohidratos y lípidos constituyen hasta el 90%, mientras que los ácidos nucleicos, pigmentos y los demás componentes menores suman el restante 10% (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Sin embargo, estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación por nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento, con un incremento de lípidos y carbohidratos en relación con las proteínas cuando el crecimiento cambia de la fase exponencial a estacionaria (Geider & La Roche, 2002; Granum *et al.*, 2002), tal fue el caso de las tres cepas de *G. catenatum* aquí descritas debido a que los carbohidratos y lípidos tendieron a incrementar conforme el cultivo pasó de la fase de crecimiento



exponencial a la estacionaria (Tabla VIII y IX) mientras que las proteínas registraron un decremento constante conforme el tiempo de cultivo avanzaba (Tabla VII).

Es plausible que se haya encontrado un bajo contenido de proteínas y consecuentemente de carbohidratos debido a que el metabolismo del C y N están relacionados y comparten los suministros de C orgánico y energía suministrados por la respiración del C asimilado (Pérez-García *et al.*, 2011) además que se ha comprobado que diferentes microalgas exhiben comportamientos de acumulación de compuestos en cantidades variables dependiendo el **grupo** al que pertenezcan (p.ej. Brown y colaboradores (1989) y Becker (1994) mencionan que las diatomeas tienden a disminuir su porcentaje de proteínas hasta en un 30 a 40% dependiendo de su forma de vida: planctónica o bentónica), la **forma de vida** que presentan (planctónica o bentónica), estrategia de **nutrición**, su **distribución** en la columna de agua así como la **tolerancia** a los cambios drásticos en las condiciones de cultivo (Lebeau & Robert, 2006; Barsanti & Gualtieri, 2006; Arredondo-Vega *et al.*, 2007; Choix-Ley, 2014).

En cuanto al incremento de los carbohidratos a lo largo del cultivo acompañado de la alternancia en los valores de proteínas (valores máximos durante la aclimatación seguido de un decremento en las siguientes fases; Tabla VII) podrían ser atribuidos al almacenamiento de dichos metabolitos ya que la microalga los puede almacenar como sustancias de reserva de C y N, los cuales son posteriormente utilizados para su crecimiento (Zeeman *et al.*, 2010; Geigenberg, 2011). Dichos componentes estructurales son rápidamente consumidos cuando la microalga obtiene su máxima densidad celular y considerando que *G. catenatum* mayoritariamente crece bajo condiciones autótrofas utiliza casi por completo las proteínas y carbohidratos durante la división celular, incrementando su población pero disminuyendo hasta en un 4% dichos metabolitos (Brányiková *et al.*, 2011)



8.5. Perfil de pigmentos

8.5.1. Bacterias

A pesar de que las bacterias pertenecientes al género *Alteromonas* spp. son de las más abundantes de origen marino, pocos son los trabajos que evalúan las características fisiológicas de las mismas debido a un mayor enfoque hacia las sustancias de aporte biotecnológico. Además, existe poca información acerca de su composición bioquímica y ni que decir de los pigmentos producidos por las diversas especies del género, salvo contadas excepciones. Se sabe que los principales pigmentos registrados para el género *Alteromonas* son la prodigiosina, violaceína y melanina (Harwood & Russel, 1984; Margalith, 1992) aunque también se ha citado la presencia de pigmentos no carotenoides sin identificar en *A. citrea* y *A. aurantia* (Gauthier y Breittmayer, 1979).

En este estudio se mostró el perfil cromatográfico (Fig. 22) de los dos pigmentos encontrados para *Alteromonas* spp., si bien no coinciden con ninguno de los descritos en la bibliografía y no pudieron ser identificados podemos mencionar que la coloración anaranjada de la cepa en agar marino (Fig. 21) coincide con lo reportado por González-del Valle y colaboradores (2000) para la cepa CECT 4800 del género *Alteromonas* aislada de la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae) crecida en agar marino 2216 (DIFCO).

Sin embargo, tal como ocurrió con el resto de los pigmentos anteriormente descritos, tampoco se encontró similitud en el tiempo de retención, forma y área del pico que reportan González-del Valle y colaboradores (2000), probablemente debido al uso de diferentes longitudes de onda en las lecturas por HPLC y al uso de diferentes solventes de extracción (González-del Valle *et al.*, 2000: benceno, acetona, etanol, metanol, hexano, dietil-eter y triclorometano como eluyentes y tres longitudes de onda: 476, 491 y 488 nm mientras que en el presente se utilizó metanol: acetato de amonio 70:30 como eluyentes y la lectura se realizó a 440 nm).



Podemos mencionar que los pigmentos de *Alteromonas* spp. son no fotosintéticos y su posible función parece ser la defensa contra oxidantes y radicales libres (Harwood & Russel, 1984; Margalith, 1992) debido a que bacterias asociadas con microalgas se enfrentan ante condiciones óxicas excesivas debidas al aporte de oxígeno fotosintético y los pigmentos rojo/naranja que producen podrían ser resultado de un mecanismo encaminado a prevenir un posible daño causado por la sobresaturación de oxígeno, bien como agente principal o como un metabolito secundario.

8.5.2. *Gymnodinium catenatum*

El perfil de pigmentos característico de *G. catenatum* está conformado por 10 pigmentos: carotenoides polares, clorofila *c*, peridinina, *cis*-peridinina, dinoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, carotenoides, clorofila *a* y β -carotenos, coincidiendo con el descrito para otros dinoflagelados como *Gyrodinium resplendens* y *Gymnodinium sanguineum* (Hallegraeff *et al.*, 1991).

Estudios anteriores mencionan que el contenido de pigmentos fotosintéticos puede cambiar como respuesta a factores causantes de estrés, a la capacidad fotosintética o al estado de desarrollo en el que se encuentre la microalga, por lo que las diferencias en los diversos pigmentos entre las fases de crecimiento (Figs. 24-26) se asocian a las diferencias en la densidad celular de *G. catenatum* así como a los cambios observados en las proteínas debido a que si éstas van en decremento, los pigmentos principales (chl-*a* y *c*) se ven fuertemente afectados por la baja disponibilidad de N lo que favorece una mayor producción de los pigmentos accesorios, haciendo más eficiente la captura de la luz además de actuar como fotoprotectores (Rosales-Loaiza *et al.*, 2008).

8.6. Perfil de toxinas paralizantes

El ecotipo mexicano de *G. catenatum* se caracteriza por producir los análogos STX, neoSTX, GTX 2/3, dcGTX 2/3, B 1/2 y C 1/2. Específicamente los análogos



decarbamoil (dc GTX 2/3) y N-sulfocarbamoil (B 1/2 y C 1/2), son generalmente las toxinas con mayor contribución molar aunque se ha determinado que la presencia, ausencia y proporción de los mismos varía constantemente entre poblaciones e incluso cepas, y a la fecha no se conoce una cepa de *G. catenatum* que produzca todos los análogos pero sí es sabido que todas sintetizan por lo menos más de uno (Band-Schmidt *et al.*, 2010; Cembella, 1998).

Existen reportes que indican variaciones dentro de las mismas poblaciones y diferencias en las proporciones de los análogos en función de factores físicos (salinidad y temperatura) y nutricionales (medio de cultivo: GSe vs f/2) (Camino-Ordás *et al.*, 2004; Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2006, 2014; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012, 2015; Albinsson *et al.*, 2014; Bolch *et al.*, 2017). Sin embargo, dado que en el presente trabajo las condiciones de cultivo fueron las mismas para las tres cepas, los cambios observados se pueden atribuir a las diferencias en las densidades celulares, a la respuesta cepa-específica que ha descrito Oh y colaboradores (2010) en la que mencionan que independientemente de que se trate de la misma especie y bajo las mismas condiciones de cultivo cada cepa tendrá un comportamiento diferente expresándolo en su perfil bioquímico y toxicológico, deficiencias nutricionales, a un desacoplamiento en la síntesis de toxina durante la división celular o asincronía en la división celular en los cultivos (Anderson *et al.*, 1990; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1997, 2000; Zhuang *et al.*, 2012).

En cuanto al número de análogos reportados en el presente y los descritos en bibliografía, debe de considerarse que esto depende directamente del método de detección y análisis. Por ejemplo, en el 2007 Negri y colaboradores reportaron la producción de 21 análogos de STX en *G. catenatum* mientras que para cepas mexicanas, Bustillos-Guzmán y colaboradores en el 2015 reportan, 10 análogos hidrofílicos (toxinas carbamoil: GTX2/3; decarbamoil: dcSTX, dcNEO y dcGTX2/3 y N-sulfocarbamoil: C1/2 y B1/2), 5 análogo hidroxibenzoil (GC1/2, GC3 y GC4/5) y dos sulfobenzoil (GC1b/2b). En cuanto a los análogos tipo benzoil Durán-Riveroll y colaboradores (2017) confirman la presencia de 15 análogos (GC1-6, GC1a-5a y GC1B, 2b, 4b y 5b) para cepas mexicanas. Considerando que los dos últimos trabajos



evaluaron el perfil de toxinas de cepas mexicanas (incluidas las del presente), del total de análogos descritos, únicamente los tipo benzoil no fueron detectados, además de que no se registraron diferencias en el número de análogos detectados como las descritas en los análisis de toxinas de muestras de fitoplancton silvestre de Bahía Concepción, Bahía de La Paz y Bahía de Mazatlán, donde se reportaron diferencias entre dichas poblaciones y las adyacentes dentro del Golfo de California (Garate-Lizarraga *et al.*, 2004; Band-Schmidt *et al.*, 2006)

Con excepción de la cepa michocana (62L) (Fig. 29), las toxinas C 1/2 fueron las dominantes al presentar abundancias superiores al 65 % pmol, esta alta proporción es considerada una característica de *G. catenatum*. Sin embargo, la cepa antes mencionada presentó una mayor proporción de toxinas decarbamoil y carbamoil lo cual explica la mayor toxicidad de esta cepa, ya que el factor de toxicidad relativa es superior al de las toxinas C 1/2. Dicho patrón coincide con el reportado para cepas de Bahía de La Paz en 2005 y 2006 por Gárate-Lizárraga y colaboradores y Band-Schmidt y colaboradores, respectivamente, debido a que el análogo dominante para dichas cepas fue la dcNEO. El resto de las toxinas, principalmente los análogos carbamoil (GTX 2/3) se encontraron en muy bajas concentraciones debido a que no superaron el 1% del total, lo cual también se considera característico de la especie (Hallegraeff *et al.*, 2011).

8.7. Toxicidad

Los resultados en este trabajo mostraron que durante las primeras etapas de crecimiento se tienen los valores más altos en la toxicidad celular de *G. catenatum* y conforme el tiempo de cultivo avanza, la toxicidad celular tiende a disminuir. Además que el aporte mayoritario lo proporcionan los análogos N-sulfocarbamoil, seguidos por los decarbamoil y finalmente los carbamoil, esto para todas las cepas, que si bien la cepa 62L registró una mayor contribución a la toxicidad celular por parte de los análogos decarbamoil y carbamoil, las toxinas C 1/2 y B 1/2 dominaron.



De esta manera, la cepa 62L se consideró la cepa más toxica debido a: **1)** que tuvo la capacidad de mantener constante la toxicidad celular a lo largo del cultivo al no registrar aumentos o decrementos significativos y **2)** mantuvo en equilibrio la síntesis y pérdida de las toxinas, esto sustentado en lo descrito por Anderson y colaboradores (1990), quienes mencionan que el contenido de toxina es un reflejo de la cantidad inicial de toxina en una célula y el equilibrio entre la síntesis y la pérdida de la misma, ya sea por liberación al medio, catabolismo o división celular.

En cuanto a la comparativa entre los valores de toxicidad celular aquí reportados y aquellos encontrados en la literatura, observamos que entran dentro del intervalo descrito para *G. catenatum* (53.12 ± 17.17 y 16.52 ± 2.29 pgSTX eq/ cél) debido a que Bustillos-Guzmán y colaboradores (2012) reportaron valores de entre 21.75 ± 2.93 y 10 pg STX eq/cél en cepas de Bahía Concepción; Band-Schmidt y colaboradores (2006) reportan una toxicidad promedio de 13 a 101 pg STX eq/cél para 7 cepas de Bahía de Mazatlán, Bahía de La Paz y Bahía Concepción y Durán-Riveroll (2014) encuentra valores máximos de 28 ± 5.1 y mínimos de 1.2 ± 0.3 pg STX eq/cél para 5 cepas de Bahía Concepción, Bahía de La Paz, Michoacán y Colima.

8.8. Asociación entre *Gymnodinium catenatum* y bacterias

Los cultivos, como se ha venido mencionando, se llevaron a cabo bajo condiciones idénticas, considerando un fotoperíodo semejante al natural, una irradiancia saturada, temperatura óptima y se utilizó un medio de cultivo con alta concentración de nutrientes, por lo que las diferencias observadas sustentan el hecho de que las interacciones bacterianas son un factor importante en la población de las microalgas bajo condiciones óptimas y no limitantes como en un principio se mencionaba. Así, los experimentos aquí descritos demuestran que las comunidades bacterianas asociadas modifican el crecimiento de *G. catenatum* independientemente de otros factores ambientales considerados como reguladores directos del crecimiento del fitoplancton.



No es sorprendente que en presencia de bacterias se estimule el crecimiento de las microalgas ya que tal efecto ha sido descrito ampliamente para diversas especies. Por ejemplo, en cultivos de *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* en presencia de *Flavobacterium*, la densidad celular máxima, la tasa de crecimiento y la duración de la fase estacionaria de la diatomea y haptophyta aumentó (Sumunto & Hirayama, 1997). De manera similar *Botryococcus braunii* incrementó hasta en un 50% su crecimiento en presencia de Alphaproteobacterias (Tanabe *et al.*, 2015) mientras que en presencia de cuatro bacterias diferentes *Chlorella vulgaris* aumentó hasta tres veces su crecimiento (Cho *et al.*, 2005), indicando que la presencia de más de una bacteria en un cultivo favorece las interacciones antagónicas donde bacterias específicas pueden: **1)** promover conjuntamente el crecimiento, **2)** inhibirlo, **3)** proteger a la microalga de los compuestos alguicidas que otra bacteria produce como en el caso de las bacterias asociadas a *Karenia brevis* que la protegen de la lisis ante los compuestos alguicidas de *Bacteroidetes* (Mayali & Doucette, 2002).

Sin embargo, no debemos descartar que cada bacteria desempeña una función específica dependiendo de su hospedero así como de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo, pues de esto depende los requerimientos nutricionales disponibles para su crecimiento y por ende, el efecto generado en la microalga (Albinsson *et al.*, 2014).

Haciendo hincapié en la formación de cadenas celulares, en presencia de ambas bacterias se favoreció la formación de cadenas celulares largas (>7 células) lo que conlleva a relacionar tal evento con el aumento en el análogo dcNEO debido a que en 2006 Band-Schmidt y colaboradores reportaron que dicho análogo está directamente relacionado con el largo de las cadenas al observar que cadenas largas contenían de un 24-52% más de dicho análogo comparándolo con las cadenas cortas. Tal comportamiento podría vincularse con los resultados aquí descritos para los tres tratamientos en presencia de *Alteromonas* spp., *Roseovarius* spp. y la mezcla de ambas bacterias donde se observó un incremento en la formación de cadenas celulares largas.



Sin embargo, trabajos que evalúan el efecto alelopático de diversas microalgas sobre *G. catenatum* han reportado principalmente dos patrones de comportamiento. El primero fue descrito por Fernández-Herrera y colaboradores (2016) quienes tras inocular a *Chattonella marina* var. *marina* en diferentes proporciones a la cepa BAPAZ-5 de *G. catenatum* observaron que conforme aumentaba la proporción de interacción (2:1 y 1:2) únicamente se observaban cadenas celulares de 2 y 4 células (50 y 50 %) a las 24 h de iniciado el experimento y conforme el tiempo avanzaba las células individuales formaban cadenas celulares, por lo que a las 48 h la abundancia total del 90 % de las células sobrevivientes de *G. catenatum* formaban cadenas de 2 y 4 células de largo. El segundo comportamiento, totalmente opuesto lo reporta Zumaya-Higuera (2017) tras inocular a *Cochlodinium polykrikoides* y *Gymnodinium impudicum* a la cepa G7 de *G. catenatum* debido a que ella menciona que las primeras células afectadas fueron aquellas que formaban cadenas celulares ya que al tener una mayor superficie de contacto eran más susceptibles al efecto por contacto directo que a los filtrados celulares tendiendo a separarse e incrementar la proporción de células individuales. Dicha información indica que cada agente biótico externo tiende a generar una respuesta diferente en *G. catenatum*.

Considerando la composición bioquímica de *G. catenatum* encontramos que es una especie que se caracteriza por ser un productor activo de ácidos grasos, esteroides, lípidos y aceites (Hallegraeff *et al.*, 1991) lo que favorece el crecimiento de ciertos géneros de bacterias debido a que no todas son capaces de utilizar estos productos como fuentes de C para su crecimiento, además que el perfil lipídico de cada microalga, la composición bioquímica que presenta, así como las proporciones en las que se encuentra tiende a ser específico para cada especie, por lo que se ha llegado a considerar como una herramienta quimiotaxónomica (Mansour *et al.*, 2003).

Es por ello que los lípidos constituyen uno de los metabolitos que pueden ser afectados por un alto número de variables, ya sea ambientales o de cultivo, como: la fase de crecimiento en la que se cuantifican (Dunstan *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1997; Hatate *et al.*, 1998), intensidad de la luz y fotoperiodo (Tzovenis *et al.*, 1997), temperatura (McLachlan *et al.*, 1999), salinidad (Xu & Beardall, 1996),



concentración de dióxido de carbono, nitrógeno y fósforo (Skerratt *et al.*, 1998). Aunado a ello, Murphy (2001) mencionó que el contenido total de lípidos tiende a incrementar como resultado de condiciones de estrés producto de cambios abruptos en la proporción N:P, dichos resultados se han observado en algunas diatomeas y haptófitas (Reitan *et al.*, 1994).

A pesar de que nuestro estudio no evaluó cambios en las proporciones de nutrientes sino la presencia/ausencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. podemos mencionar que ante estas bacterias, *G. catenatum* tiende a incrementar el contenido total de lípidos como posible respuesta a un almacenamiento de energía que posteriormente requiera para continuar su crecimiento; aunque dicho cambio también podría atribuirse a un incremento en la tasa fotosintética como el descrito para la microalga *Chlorella* spp. en presencia de la bacteria *Azospirillum brasilense* debido a que la microalga incrementó la acumulación de lípidos y ciertos pigmentos como chl *a*, *b*, luteína y xantofilas de manera análoga a lo ocurrido en plantas superiores (de-Bashan *et al.*, 2002).

Li y colaboradores (2011) reportaron que cuando las células de las microalgas están creciendo bajo condiciones óptimas, estas normalmente muestran una alta eficiencia fotosintética para mantener el crecimiento y la reproducción. Bajo estas condiciones, las microalgas pueden almacenar un poder reductor en la forma de almidón preferentemente sobre los lípidos. Esto último debido a que la síntesis de almidón a partir de 3-fosfoglicerato requiere 6 moléculas de NADPH y 9 de ATP por cada 18 moléculas de carbono, lo cual es energéticamente más económico comparado con la síntesis de lípidos. Sin embargo, un aumento en la densidad celular, como el obtenido en presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp., podría explicar la disminución de carbohidratos ya que para mantener poblaciones más densas, las células deben sintetizar otros compuestos, tales como proteínas, pigmentos y lípidos utilizando como precursores los carbohidratos acumulados previamente (Wang *et al.*, 2010; Doucha *et al.*, 2012).

Estudios previos han demostrado que la presencia/ausencia de ciertas bacterias, así como cambios en la comunidad bacteriana asociada a una cepa específica de



microalga, repercute en su perfil de toxinas. El contenido de toxinas por célula en *G. catenatum* varía considerablemente y está influenciado por una gama de factores ambientales, de cultivo, por el método de aislamiento, tipo de nutrientes, entre otros (Carrasquero-Verde, 1999; Uribe & Espejo, 2003; Pérez-Guzmán *et al.*, 2008; Jasti *et al.*, 2005; Kodama, 2010). Sin embargo, debido a que nuestros experimentos controlaron todos estos factores dejando como única variable la presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. los resultados obtenidos muestran que ambas bacterias ocasionan un incremento en la proporción de los análogos N-sulfocarbamoil y disminuyen la proporción de los análogos carbamoil y decarbamoil, con la excepción de la dcNEO que incrementó.

Dicho cambio ocasionó que en presencia de las bacterias la toxicidad media celular disminuyera, lo cual coincide con lo reportado por Albinsson y colaboradores (2014) quienes tras inocular a las bacterias *Marinobacter* sp. y *Alcanivorax* sp. a una cepa de *G. catenatum* observaron el mismo efecto que a su vez ha sido reportado en los cultivos de *Alexandrium catenella* y *A. tamarense* lo que indica que esta respuesta no se limita a *G. catenatum* (Hold *et al.*, 2001; Uribe & Espejo, 2003).

De igual manera existen diversos estudios que demuestran una reducción de hasta 40 pgSTX eq/cél en la toxicidad celular de los cultivos de *G. catenatum* establecidos a partir de quistes de reposo (Negri *et al.*, 2007). No se observó la misma escala de cambio en nuestros experimentos pero sí detectamos una disminución en comparación con las cepas parentales lo que podría atribuirse a: **1)** que las células que están por enquistarse detienen la producción de toxinas y comienzan a invertir más energía a la formación de gametos y al proceso sexual (Oshima *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 1998); **2)** la centrifugación y el lavado de los quistes elimina las bacterias asociadas y con ello los metabolitos bacterianos necesarios para la inducción a la síntesis de toxinas después de la germinación (Green *et al.*, 2004; Negri *et al.*, 2007); **3)** silenciamiento genético reversible como el descrito para algunos hongos que producen micotoxinas (Bok *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007).

Dado que hasta la fecha no se comprobado que bacterias heterótrofas produzcan toxinas paralizantes (Green *et al.*, 2004), se puede confirmar que la síntesis de los



diversos análogos aquí reportados son exclusivos del dinoflagelado (Stüken *et al.*, 2011; Hackett *et al.*, 2012; Orr *et al.*, 2013), aunque el incremento en proporción de los análogos N-sulfocarbamoil (B 1/2 y C 1/2) y dcNEO podrían estar mediados por la transformación enzimática bacteriana (Kotaki *et al.*, 1985; Vale, 2008), ya sea mediada por enzimas superficiales que se transporten activamente a la célula del dinoflagelado o mediante la liberación de ciertos metabolitos con influencia directa sobre las vías de síntesis de las toxinas o sobre la fisiología de las células de *G. catenatum* (Albinsson, 2011; Albinsson *et al.*, 2014).

8.9. Influencia de bacterias en la germinación de quistes de *Gymnodinium catenatum*

La interacción que *G. catenatum* guarda con su comunidad bacteriana es esencial para su supervivencia, incluso en cultivos de laboratorio, debido a que en presencia de bacterias su dinámica de crecimiento y rendimiento tiende a incrementar (Bolch *et al.*, 2004; Subramanian, 2008). A pesar de ello, la obtención de una cepa axénica de esta especie sigue siendo la ambición de muchos, por lo que el uso de diversos antibióticos ha permitido “eliminar” a ciertas bacterias asociadas con el inconveniente de favorecer el crecimiento de algunas otras o generar cambios fisiológicos en la cepa original, pudiendo alterar el ciclo de vida de y/o la producción de toxinas (Smith *et al.*, 2001; Donovan *et al.*, 2009).

Existen datos no publicados (Matsumoto y Bolch) que describen que después de la germinación, *G. catenatum* puede sobrevivir sin la presencia de bacterias pero sí con los filtrados celulares de las mismas, es decir, germinados los quistes se les adiciona los exudados celulares bacterianos logrando mantener un cultivo hasta su fase estacionaria, de lo contrario el cultivo decae rápidamente, planteando así la hipótesis de que los productos extracelulares bacterianos funcionan como factores de crecimiento específico (Bolch *et al.*, 2017).

A pesar de las medidas de esterilidad que se mantuvieron, es probable que la presencia de bacterias externas a las inoculadas estén presentes en los cultivos, sin



embargo, se puede atribuir que el éxito en la germinación de quistes de *G. catenatum* fue por la presencia de *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. debido a las réplicas de los experimentos, además que se tuvo un monitoreo constante de contaminación desde la germinación y finalmente se evidenció con la secuenciación del gen 16S.

En cuanto a los cambios morfológicos observados en las cepas producto de la germinación, Laurencó y colaboradores (1997) describen que tras una reducción progresiva de los nutrientes disponibles (en nuestro caso posiblemente haya sido el medio GSe deficiente en N) para las células, éstas tienden a disminuir su tamaño debido a que la captación de nutrientes por célula que pueden asimilar es menor y por ende la biosíntesis de masa celular también lo es. Sin embargo, tras el paso del tiempo, las células de menor tamaño logran obtener un crecimiento similar al observado en células de mayor tamaño siendo con ello más eficientes para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento e incrementado su talla (Borges-Campos *et al.*, 2010). Dichas observaciones coinciden con nuestros experimentos debido a que después de 3-4 generaciones, el tamaño promedio de las células recién germinadas coincidía con el tamaño promedio de *G. catenatum*.



IX. CONCLUSIÓN

El actual incremento en la frecuencia y expansión global de los Florecimientos Algales Nocivos (FAN) junto con los crecientes impactos económicos, constituyen uno de los principales motivos de interés en el deseo de comprender los factores que influyen el desarrollo de dichos eventos, que si bien se ha ido incrementado la investigación que aborda a los principales factores abióticos y bióticos, lo concerniente a la relación bacteria-microalga sigue siendo limitada. Los resultados aquí descritos constituyen un pequeño aporte al conocimiento actual sobre dichas interacciones, demostrando que la presencia de bacterias estimula el crecimiento de *G. catenatum* además de modificar su producción de toxinas paralizantes, jugando así un papel potencialmente significativo en el control de la dinámica de crecimiento de esta especie.

A pesar de que los resultados ilustran que *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. son promotoras del crecimiento de *G. catenatum* actúan de manera diferente, debido a que *Alteromonas* spp. estimula un mayor crecimiento reflejado en una mayor tasa de crecimiento y la presencia de cadenas celulares cortas (2-3 células) mientras que en presencia de *Roseovarius* spp. se alcanzan biomásas celulares menores pero se induce la formación de cadenas celulares largas (>7 células). Esto evidencia que *G. catenatum*, expresa respuestas de crecimiento distintivas según la especie bacteriana asociada, no obstante, los compuestos o vías que median las interacciones no se identificaron, pero podrían, como también lo sugirió Albinsson (2011), incluir remineralización de nutrientes inorgánicos y/o producción de cofactores orgánicos.

En cuanto al perfil bioquímico de *G. catenatum* en presencia de ambas bacterias se incrementaron los lípidos y carbohidratos como metabolitos de reserva y energía inmediata, respectivamente. Mientras que las proteínas, metabolito estructural, tendió a disminuir en conjunto con la clorofila posiblemente debido a la baja disponibilidad de nitrógeno. Además se demostró que *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. desempeñan un rol de cambio en la producción de las toxinas paralizantes de *G. catenatum* influyendo significativamente en las proporciones de los análogos a través de su efecto sobre la fisiología del dinoflagelado.



Se pudo corroborar la sinergia entre *G. catenatum*, *Alteromonas* spp. y *Roseovarius* spp. al obtener una germinación exitosa de los quistes de resistencia únicamente bajo la presencia de ambas bacterias. Sin embargo, en términos de interacción bacteria-microalga aún se requiere más investigación con el fin de establecer mecanismos de interacción y su significado en poblaciones de *G. catenatum* y otros dinoflagelados debido a que hay mucho por descubrir, entender y enseñar.

X. SUGERENCIAS

Para poder entender un poco más acerca de esta conexión hay que buscar la respuesta a muchas interrogantes, como:

- ✿ ¿Qué compuestos, y/o vías metabólicas influyen en la interacción *G. catenatum* y *Alteromonas* spp. o *Roseovarius*?
- ✿ ¿Cómo se traducen los compuestos y las señales tanto en el dinoflagelado como en las bacterias?
- ✿ ¿Qué efectos fisiológicos específicos tienen las interacciones bacteria-dinoflagelado?
- ✿ ¿Qué se requiere en la columna de agua para fomentar las interacciones bacteria-dinoflagelado?

Encontrar la respuesta a estas y probablemente otras preguntas le permitiría a la ciencia abordar una de las preguntas más importantes en términos de interacciones bacteria-microalga, es decir, ¿en verdad las bacterias son la fuerza impulsora detrás del desarrollo, mantenimiento y declive de los FAN?.



XI. LITERATURA CITADA

- Abel, K., H. de Schmertzing. & J.I. Peterson. 1963. Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition. *Journal of Bacteriology*. 85:1039-1044.
- Adachi, M., Matsubara, T., Okamoto, R., Nishijima, T., Itakura, S. & M. Yamaguchi. 2001. Inhibition of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by bacteria from Hiroshima Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology* 26: 223-233.
- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R. & R. Belas. 2001. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environmental Microbiology* 3: 380-396.
- Albinsson, M.E. 2011. Algal-bacterial interactions: a study of *Gymnodinium catenatum* and its associated bacteria. Tesis de Doctorado. Universidad de Tasmania. Australia 198 p.
- Albinsson, M.E., Negri, A.P., Blackburn, S.I. & C.J.S. Bolch. 2014. Bacterial community affects toxin production by *Gymnodinium catenatum*. *Plos one* 9(8): e104623.
- Allen, M.M. 1968. Simple conditions of growth of unicelular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*. 4: 1-4.
- Alvarez-Barrientos, A.M., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C. & M. SánchezPérez. 2000. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Review*. 13:167-195.
- Amaro, A.M., Fuentes, M.S., Ogalde, S.R., Venegas, J.A. & B.J. Suárez-Isla. 2005. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 52:191-200.
- Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Frithjof, C. K., Sunda, W.G. & C.J. Carrano. 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106: 17071-17076.
- Amin, S.A., Hmelo, L.R., Van Tol, H.M., Durham, B.P., Carlson, L.T., Heal, K.R., Morales, R.L., Berthiaume, C.T., Parker, M.S., Djunaedi, B., Ingalls, A.E., Parsek, M.R., Moran, M.A. & E.V. Armbrust. 2015. Interaction and signaling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*. 522: 98-101.
- Amin, S.A., Parker, M.S. & E.V. Armbrust. 2012. Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Rev.* 76: 667-684.
- Anderson, D.M. & O.J. Garrison. 1997. The ecology and oceanography of Harmful Algal Blooms. *Limnology Oceanography*. 42:1009-1035.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S. & C. Lee, 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Marine Biology*. 104: 511-524.
- Anderson, D.M., Kulis, J.J., Sullivan, S., Hall, C. & S. Lee, 1989. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Marine Biology*. 104: 511-524.



- Annous, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P. & B.J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied Environmental Microbiology*. 63:3887-3894.
- Armstrong, P. B. 2010. Nitrogen Uptake by Phytoplankton in the Huon Estuary: With Special Reference to the Physiology of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Tesis de Doctorado. UTAS. Hobart, Tasmania. 211 p.
- Arredondo-Vega, B.O. & D. Voltolina. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR. La Paz, B.C.S. 95 p.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & K. Struhl. 2002. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th Ed. Jhon Wiley and Sons, Inc. 5300 p.
- Azam, F. & F. Malfatti. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Rev. Microbiology*. 5: 782-791.
- Balech, E. 1964. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961-1962. Boletín del Instituto de Biología Marina, Universidad Nacional de Buenos Aires, Mar del Plata. 4: 1-49.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Hernández-Sandoval, F.E., Núñez-Vázquez, E.J. & D.J. López-Cortés, 2014. Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) of the Pacific coast of Mexico. *Toxicon*. 90:199–212.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E.J. & F. Hernández-Sandoval. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Marine Drugs* 8: 1935-1961.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Morquecho, L., Gárate-Lizárraga, I., Alonso-Rodríguez, R., Reyes-Salinas, A., Erler, K. & B. Luckas, 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology*. 42: 757–768.
- Band-Schmidt, C.J., Morquecho, L., Lechuga-Devéze, C.H. & M. Anderson. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Journal of Plankton Research*. 26: 1459–1470.
- Barsanti, L. & P. Gualtieri. 2006. Algae-Anatomy, biochemistry, and biotechnology. CRC Press. Boca Ratón, FL. 301 p.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 293 p.
- Bell, W. & R. Mitchell. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin*. 143: 265-277.
- Bell, W.H., Lang, J.M. & R. Mitchell. 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnology and Oceanography* 19: 833-839.
- Blackburn, S.I., Hallegraeff, G.M. & C.J. Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *Journal of Phycology*. 25: 577-590.



- Bligh, G.E. & J.W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Physiology*. 3: 911-917.
- Bok, J.W., Noordermeer, D., Kale, S.P. & N.P. Keller. 2006. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 6:1636-1645.
- Bolch, C.J.S., Bejoy, T.A. & D.H. Green. 2017. Bacterial associates modify growth dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Frontiers in Microbiology*. 8:670.
- Bolch, C.J.S., Vincent, B., Blackburn, S.I. & D.H. Green. 2004. Host-symbiont range of growth stimulating bacteria associated with *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae Blooms*. 6: 465-485.
- Bolch, J.C., Negri, A.P., Blackburn, S.I. & D.H. Green. 2001. Life cycle variation in PST content and cell toxicity in PST-producing dinoflagellates. In: LIFEHAB: Life history of microalgal species causing harmful blooms. Eds. Garcés, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B. & B. Dale. Report of the LIFEHAB European workshop, Majorca, Spain: European Commission, Directorate General, Science, Research and Development pp 24-27.
- Bolch, J.S., Subramanian, T.A. & H.G. Green. 2011. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) requires marine bacteria for growth. *Phycology*. 47: 1009-1022.
- Borges-Campos, V., Barbarino, E. & S.O. Lourenço. 2010. Crecimiento y composición química de diez especies de microalgas marinas en cultivos de estanques. *Ciencia Rural*. 40:339-347.
- Bouvier, T., Del Giorgio, P.A. & J.M. Gasol. 2007. A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*. 9(8): 2050 – 2066.
- Brányiková, I., Marsálkova, B., Doucha, J., Brányik, T., Bisová, K., Zachleder, V. & M. Vítová. 2011. Microalgae – novel highly efficient starch producers. *Biotechnology Bioengineering*. 108(4): 766-776.
- Bravo, I. 1986. Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Scientia Marina*. 50(3): 313–321.
- Bravo, I., Franco, J.M. & M.I. Reyero. 1998. PSP toxin composition of three life cycle stages of *Gymnodinium catenatum* In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. & T. Wyatt., editors. Harmful Algae. Junta de Galicia and IOC of UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela, 356-358.
- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. & K.A. Miller. 1996. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology*. 34, 64-73.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. & C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. A literature review. CSIRO Marine Reports. No. 205. 44 p.
- Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., Durán-Riveroll, L.M., Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E.J., Cembella, A. & B. Krock. 2015. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Mexican Pacific as revealed by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 32: 1-15.



- Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E.J. & F.E. Hernández-Sandoval. 2012. Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gymnodinium catenatum* Graham del Golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. *Ciencias Marinas*. 38: 101-117.
- Camino-Ordás, M., Fraga, S., Franco, J.M., Ordás, A. & A. Figueras, 2004. Toxin and molecular analysis of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from Galicia (NW Spain) and Andalucía (S Spain). *Journal of Plankton Research* (26)3: 341–349.
- Carey, J.L., McCoy, J.P. & D.F. Keren. 2007. Flow cytometry in clinical diagnosis. 4th ed. Chicago: ASCP Press.
- Carrasco-Palma, D.A. 2005. Caracterización y especificidad del efecto alguicida de la bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre microalgas marinas. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Santiago de Chile. 78 p.
- Carrasquero-Verde, J.R. 1999. Role of associated bacteria in *Heterosigma carterae* toxicity to salmonids. *Aquatic Toxicology*. 45: 19-34.
- Castillo G. & S. Martínez. 2007. Manual de Fitoterapia. Ed. Elsevier Masson. Barcelona España. 25 – 34 p.
- Castillo-Navarrete, J.L. 2005. Citometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular de *Helicobacter pylori*. Tesis de Maestría. Universidad de Concepción. Chile. 144 p.
- Castrejón, O.L., Porras, D.D. & C. Band-Schmidt. 1994. Cultivo de alimento vivo para la acuicultura. Universidad del Mar, Instituto Indigenista. Puerto Ángel, Oaxaca, México. 5 p.
- Castro, A., Choquesillo, F., Félix, L., Milla, H., Bell, C., Castro, E., Palomino, R., Armas, S. & N. Ramos. 2002. Investigación de metabolitos secundarios en plantas medicinales con efecto hipoglicemiante y determinación del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. *Ciencia e Investigación*. 5: 23-29.
- Cembella, A.D., 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 381–403.
- Cho, D.H., Ramanan, R., Jina Heo, J., Lee, J., Kim, B.H. & H.M. Oh. 2015. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal bacterial community. *Bioresour Technology*. 175: 578-585.
- Choix-Ley, F.J. 2014. Evaluación de la acumulación de carbohidratos en la microalga *Chlorella* spp. asociada con la bacteria *Azospirillum brasilense*. Tesis de Doctorado. CIBNOR. La Paz, B.C.S. 121 p.
- Cole, J. J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 13:291–314.
- Cooper, M.B. & A.G. Smith. 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*. 147-153 p.
- Cortés-Altamirano, R.1981. Redescrición y distribución de *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae), causante de "mareas rojas" tóxicas. VI Simposio sobre el medio ambiente del Golfo de California, del 8-12 abril 1981. Hermosillo, Son. México. (Inédito).



- Costa, P.R., Robertson, A. & M.A. Quilliam. 2015. Toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Portuguese coast, as determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Marine Drugs*. 13: 2046-2062.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & A.G. Smith. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 438: 90- 93.
- Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A. & G. Flores. 2006. Invitación a la Biología. Médica Panamericana. Buenos Aires. 768 p.
- Dang, H. & C.R. Lovell. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 66(2): 467-475.
- Danger, M., Oumarou, C., Benest, D. & G. Lacroix. 2007. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology*. 21: 202–210.
- Day, R. & G. Quinn. 1989. Statistical comparisons of the treatments after analysis of variance. *Ecological Monographs*. 59: 430-460.
- De-Bashan, L.E. & Y. Bashan. 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2: 85-90.
- De-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K. & J.J. Bustillos-Guzmán. 2002. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*. 6:514-521.
- Díaz-Hernández, C. 1997. Abundancia de cianobacterias en la corriente de California y Cuenca Delfín y absorción de luz estimada por *Synechococcus* DC-ZWH7803 como modelo. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 68 p.
- Donovan, C.J., Garduño, R.A., Kalmokoff, M., Ku, J.C., Quilliam, M.A. & T.A. Gill. (2009) *Pseudoalteromonas* bacteria are capable of degrading paralytic shellfish toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 75:6919-6923.
- Doucette, G.J. & C.L. Powell. 1998. Algal-Bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates. *Harmful Algae Blooms*. 3: 406-409.
- Doucette, G.J. 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Natural Toxins*. 3: 65-73.
- Doucha, J. & K. Lívansky. 2012. Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *Journal Applied of Phycology*. 24:35-43.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M. & C.D. Garland, 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal Applied Phycology*. 5:71-83.
- Durán-Riveroll, L.M. 2014. Toxinas paralizantes tipo benzoil en el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* Graham y modelo teórico de interacción con el canal de sodio. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – Instituto Politécnico Nacional. México. 213 p.



- Durán-Riveroll, L.M., Krock, B., Cembella, A., Peralta-Cruz, J., Bustillos-Guzmán, J.J. & C.J. Band-Schmidt. 2017. Characterization of benzoyl saxitoxin analogs from the toxigenic marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by hydrophilic interaction liquid ion-chromatography-tandem mass spectrometry. *Natural Products Chemistry Research*. 5:275.
- Durán-Riveroll, L.M., Peralta-Cruz, J., Bustillos-Guzmán, J.J. & C.J. Band-Schmidt. 2013. Presence of benzoate type toxins in a strain of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Manzanillo, Colima, Mexico. *Hidrobiológica*. 23: 169-175.
- Estrada, M., Sánchez, F.J. & S. Fraga, 1984. *Gymnodinium catenatum* (Graham) en las rías gallegas (NO de Espana). *Scientia Marina: Investigación Pesquera*. 48: 31–40.
- Etheridge, S.M. 2010. Paralytic shellfish poisoning sSeafood safety and human health perspectives. *Toxicon*. 56: 108–122.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T. & E.F. Delong. 2008. The microbial engines that drive Earth's biochemical cycles. *Science*. 320: 1034-1039.
- Fandino, L.B., Riemann, L., Steward, G.F., Long, R.A. & F. Azam. 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*. 23: 119-130.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. Toxicity equivalency factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs. World Health Organization. Rome. 108 p.
- Fernández-Herrera, L. J., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Hernández-Guerrero, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J. & E. Núñez-Vázquez. 2016. Allelopathic effect of *Chattonella marinae* var. *marina* (Raphidophyceae) on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Harmful Algae*. 51: 1-9.
- Ferrier, M., Martin, J.L. & J.N. Rooney-Varga. 2002. Stimulation of *Alexandrium fundyense* growth by bacterial assemblages from the Bay of Fundy. *Journal of Applied Microbiology* 92: 16-706.
- Figueroa, R.I., Bravo, I., Ramilo, I., Pazos, A. & A. Moroño. 2008. New life-cycle stages of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): laboratory and field observations. *Aquatic Microbial Ecology*. 52: 13-23.
- Figueroa, R.I., Garcés, E. & I. Ramilo. 2006. Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *Journal of Phycology*. 42: 67-77.
- Folch, J., Less, M. & G.H. Stanley. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biology and Chemistry*. 226: 497-509.
- Fraga, F., Pérez, F.F., Figueiras, F.G. & A.F. Rios. 1992. Stoichiometric variations of N, P, C and O₂ during a *Gymnodinium catenatum* red tide and their interpretation. *Marine Ecology. Progress. Series*. 87, 123–134.
- Fukami, K., Nishijima, T. & Y. Ishida. 1997. Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358: 185-191.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S. & Y. Hata. 1991. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57(12): 2321-2326.



- Gallacher, S., Flynn, K.J., Franco, J.M., Brueggemann, E.E. & H.B. Hines. 1997. Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture. *Applied Environmental Microbiology* 63: 239-245.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Erler, K., Muñetón-Gómez, M. S., Luckas, B. & A. Tripp-Quezada. 2004. Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam, *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae), in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Revista de Biología Tropical*. 52:133-40.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., Morquecho, L., Band-Schmidt, C.J., Alonso-Rodríguez, R., Erler, K., Luckas, A., Reyes-Salinas, B & D.T. Góngora-González, 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 208–236.
- Garay, E., Aznar, R., Lalucat, J. & F. Ribas. 2006. Informe técnico sobre cepas de trabajo en el Laboratorio de Análisis Microbiológicos. Sociedad Española de Microbiología, España. 4 p.
- Gauthier, M.J. & V.A. Breittmayer. 1979. The genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. In: Starr, M.P., Stolp H., Truper, H.G., Balows, A. & H.G. Shlegel (eds.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. Berlin. 3046–3070.
- Geider, R.J. & J. La-Roche. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and biochemical basis. *European Journal of Phycology*. 37:1-17.
- Geigenberger, P. 2011. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology*. 4: 1566-1577.
- González, J.M., Kiene, R.P. & M.A. Moran. 1999. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria. *Applied. Environmental. Microbiology*. 65: 3810-3819.
- González, J.M., Simo, R., Massana, R., Covert, J.S., Casamayor, E.O., Pedros-Alio, C.O. & M.A. Moran. 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 4237-4246.
- González-del Valle, M.A., Montero, O., Moreno-Garrido, I. & L.M. Lubián. 2000. Pigments variations induced by the oxygen level of the meedium in a marine bacterium *Alteromonas* sp. (Strain CECT 4800). *Ciencias Marinas*. 26:77-96.
- González-González, L.M. 2010. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 65 p.
- Graham, H.W., 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transactions of the American Microscopical Society*. 62: 259–261.
- Granéli, E., P. Carlsson, P. Olsson, B. Sundström, W. Granéli & O. Lindahl. 1989. From anoxia to fish poisoning: the last ten years of phytoplankton blooms in Swedish marine waters. In: *Novel phytoplankton blooms*, pp. 407–427. Springer, Berlin Heidelberg.
- Granum, E., Kirkvold, S. & S.M. Mykkestad. 2002. Cellular and extracelular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology and Progress Series*. 242: 83-94.



- Green, D.H., Bowman, J.P., Smith, E.A., Gutierrez, T. & C.J.S. Bolch. 2006. *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:523-527.
- Green, D.H., Hart, M.C., Blackburn, S.I. & C.J.S. Bolch. 2010. Bacterial diversity of *Gymnodinium catenatum* and its relationship to dinoflagellate toxicity. *Aquatic Microbial Ecology* 61: 73–87.
- Green, D.H., Llewellyn, L.E., Negri, A.P., Blackburn, S.I. & C.J. Bolch. 2004. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiology Ecology*. 47: 345-357.
- Groben, R., Doucette, G.J., Kopp, M., Kodama, M., Amann, R. & L.K. Medlin. 2000. 16S Rrna targeted probes for the identification of bacterial strains isolated from cultures of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Microbial Ecology* 39(3): 186-196.
- Grossart, H. 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquatic Microbial Ecology*. 19: 1-11.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. Handbook of phycological methods. Cambridge University Press. E.U.A. 289-312.
- Guo, X.T., Uelrara, A., Ravindram, A., Bryant, S.H., Hall, S. & E. Moceydowski. 1987. Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry*. 26: 7546-7556.
- Hackett, J.D., Wisecaver, J.H., Brosnahan, M.L., Kulis, D.M. & D.M. Anderson. 2012. Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates. *Molecular Biology Evolution*. 30: 70-78.
- Hada, Y. 1967. Protozoan plankton of the Inland Sea Setonaikai. I. The Mastigophora. *Bulletin of Suzugamine Women's College of Natural Science* 13: 1--26.
- Hallegraeff, G. M. & S. Fraga, 1998. Bloom Dynamics of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with Emphasis on Tasmanian and Spanish Coastal Waters. In: Anderson, D. M., A. D. Cembella, G. M. Hallegraeff, eds. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer – Verlag. Heidelberg. pp 59–80.
- Hallegraeff, G., Nichols, P., Volkman, J.K., Blackburn, S.I. & D.A. Everitt. 1991. Pigments, fatty acids and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology*. 27: 591-599.
- Hallegraeff, G.M. 1993. Review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Journal of Phycology*. 32: 79-99.
- Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Doblin, M.A. & C.J.S. Bolch. 2011. Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chain forming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae Blooms*. 14: 130-143.
- Harwood, J.L. & N.J. Russell. 1984. Lipids in Plants and Microbes. *George Allen & Unwin*. Londres. 162 p.



- Hatate, H., Ohgai, M., Murase, N., Miyake, N. & N. Suzuki. 1998. Accumulation of fatty acids in *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae) during stationary growth phase. *Fisheries Science*. 64: 578-581.
- Hawley, T.S. & R.G. Hawley. 2004. Flow Cytometry Protocols: methods in molecular biology. *Human Press*. 2nd ed. N.Y; E.U.A. 419p.
- Hedley, B. & M. Keeney. 2013. Technical issues: flow cytometry and rare event analysis. *International Journal of Society for Laboratory Hematology*. 35:344-50.
- Hold, G. L., Smith, E. A., Birkbeck, T. H. & S. Gallacher. 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin (PST) production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 36:223-234.
- Holmström, C. & S. Kjelleberg. 1999. Marine pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*. 30:285-293.
- Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K. & B. Luckas. 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*. 45: 312-316.
- Iwata, Y., Sugahara, I., Kimura, T., Kowa, H., Matsumoto, A. & K. Noritake. 2004. Properties of an algicidal bacterium (*Flavobacterium* sp.) against *Karenia mikimotoi* isolated from Ise Bay, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 70: 537–541.
- Jasti, S., Sieracki, M. E., Poulton, N. J., Giewat, M. W. & J.N. Rooney-Varga. 2005. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* sp. and other phytoplankton. *Applied Environmental Microbiology*. 71:, 3483–3494.
- Jauzein, C., Evans, A.N. & D.L. Erdner. 2015. The impact of associated bacteria on morphology and physiology of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 50:65-75.
- Jiménez-Taracido, L. 2009. Caracterización biológica del biofouling marino mediante métodos moleculares. Aislamiento y determinación de actividad Quorum Sensing de las especies implicadas en el proceso. Tesis de Doctorado. Universidad de Cádiz. Cádiz, España. 192 p.
- Kepner, R.L. & J.R. Pratt. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Aquatic Microbial Ecology*. 54(4): 603-615.
- Kodama, M. 2010. Paralytic shellfish poisoning toxins: Biochemistry and origin. *Aqua-BioScience Monographs*. 3: 1-38.
- Kotaki, Y., Oshima Y. & T. Yasumoto. 1985. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and a marine snail. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 51: 1009-1013.
- La Ferla, R., Giudice, A.L. & G. Maimone. 2003. Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea. *Scientia Marina*. 68: 23 - 32.
- Laguado, J. 2007. Applications of flow cytometry in microbiology veterinary science and agricultura. *Rev. MVZ*.12: 1077-1095.



- Landsberg, J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* (10)2: 113–390.
- Le Chebantou, M., Matthieu, G., Lukomska, E., Schreiber, N., Cadoret, J.P., Saint-Jean, B. & G. Bougaran. 2016. Effects of Nitrogen Limitation on *Dunaliella* sp.-*Alteromonas* sp. Interactions: From Mutualistic to Competitive Relationships. *Frontiers in Marine Science*. 3:123.
- Le Chevantou, M., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Bérard, J.B., Fouilland, E., Bernard, O. & J.P. Cadoret. 2013. Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*. 2: 212-222.
- Lebeau, T. & J.M. Robert. 2006. Biotechnology of immobilized micro algae: a culture technique for the future? *Science Publishers. Enfield, N.H.* 801-837.
- Legendre, L., Courties, C. & M. Troussellier. 2001. Flow Cytometry in Oceanography 1989-1999. *Cytometry*. 44(3): 164 -172.
- Lehninger, A.L. 1981. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, Cap. 14. 371-
- León, J., Tapia, G. & R. Avalos. 2005. Partial purification and characterization of an antimicrobial substance produced by a marine *Alteromonas* sp. *Revista Peruana de Biología*. 3: 359-368.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M. & Q. Hu. 2011. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalgae *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited condition. *Bioresour Technology*. 102:12-29.
- Lourenço, S.O., Lanfer-Marquez, U.M., Mancini-Filho, J., Barbarino, E. & E. Aida. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*: comparison of two culture media. *Aquaculture*. 148:153-168.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. & R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Maas, E.W., Latter, R.M., Thiele, J., Waite, A.M., Heather, J. & L. Brooks. 2007. Effect of multiple antibiotic treatments on a paralytic shellfish toxin-producing culture of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Aquatic Microbial Ecology*. 48: 255-260.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M. & J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Manrique, E. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de la luz para la fotosíntesis. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 12 p.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K. & S.I. Blackburn. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry*. 63:145-153.
- Margalith, P.Z. 1992. Pigment Microbiology. *Chapman and Hall*. Londres. 156 p.
- Marsán-Suárez, V., del Valle-Pérez, L.O., Díaz-Dominguez, G. & C. Macías. 2015. Methodology and applications of flow cytometry for immunophenotyping of acute leukemias. *Revista Cubana de Hematología e, Inmunología y Hemoterapia*. 31(3): 242-253.
- Martínez-Tecuapacho, G. A. 2009. Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y toxicidad del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* Graham, aislado de la Bahía de Mazatlán,



- Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura. Tecnológico de Estudios Superiores Huixquilucan. México. 63 p.
- Matsumoto, M. 2011. Aspects of the interaction between the marine bacterium *Alcanivorax* DG881 and the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Tesis de Doctorado. Universidad de Tasmania. Australia. 96 p.
- Mattanovich, D. & N. Borth. Applications of Cell Sorting in Biotechnology. *Microbial Cell Factories* 2006; 5:12-22.
- Mayali, X. & G.J. Doucette. 2002. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 1: 277-293.
- McLachlan, J.L., Curtis, J.M., Boutilier, K., Keusgen, M. & M.R. Seguel. 1999. *Tetrestreptia pomquetensis* (Euglenophyta), a psychrophilic species: growth and fatty acid composition. *Journal of Phycology*. 35: 280-286.
- Mecalco-Hernández, A. 2010. Dinámica del bacterioplancton y su relación con la biomasa fitoplanctónica en dos lagunas costeras del estado de Veracruz. Tesis de Maestría. UAM. México. 157 p.
- Montura, R.F.C. & D. Repeta. 1997. Calibration methods for HPLC. In: *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO. París. 407-428 p.
- Morán, M.X., Stepanauskas, R., González, J. & R. Hodson. 2005. Flow-cytometric cell sorting and subsequent molecular analyses for culture-independent identification of bacterioplankton involved in dimethylsulfoniopropionate transformations. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 1405-1416.
- Mou, X., Moran, M., Stepanauskas, R., González, J. & R. Hodson. 2005. Flowcytometric cell sorting and subsequent molecular analyses for culture-independent identification of bacterioplankton involved in dimethylsulfoniopropionate transformations. *Applied Environmental Microbiology*. 71: 1405-1416.
- Mouget, J.L., Dakhama, A., Lavoie, M.C & J. De la Noüe. 1995. Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?. *FEMS Microbiology Ecology* 18: 35-44.
- Murphy, D.J. 2001. The biogenesis and function of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress Lipid Research*. 40: 325-438.
- Negri, A., D. Stirling, M. Quilliam, S. Blackburn, C. Bolch, I. Burton, G. Eaglesham, K. Thomas, J. Walter & R. Willis. 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology*. 16: 1029 – 1033.
- Negri, A.P., Bolch, C.J.S., Geier, S., Green, D.H., Park, T.G. & S.I. Blackburn 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 6: 774–780.
- Núñez-Vázquez, E.J., Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., Cordero-Tapia, A., López-Cortés, D., Hernández-Sandoval, F., Heredia-Tapia, A. & J. Bustillos-Guzmán. 2008. Impacto de las proliferaciones microalgales nocivas en animales silvestres y de cultivo en el Golfo de California. Instituto Nacional de Ecología. México. 7 p.



- Oh, S.J., Matsuyama, Y., Yoon, Y.H., Miyamura, K., Choi, C.G., Yang, H.S. & I.J. Kan, 2010. Comparative analysis of paralytic shellfish toxin content and profile produced by dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Inokushi Bay, Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu Univ.* 55(1): 47–54.
- Olivas, E.E. 2004. Manual de Prácticas, Microbiología I, II y Parasitología: Programa de Medicina. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México. 105 p.
- Orfao, A. & A. Ruiz-Argüelles. 1996. General Concepts about Cell Sorting Techniques. *Clinical Biochemistry*, 29(1): 5-9.
- Orr, R.J.S., Stüken, A., Murray, S.A. & K.S. Jakobsen. 2013. Evolution and distribution of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates. *Marine Drugs*. 11: 2814-2828.
- Ortíz-Moreno, M.L., Cortés-Castillo, C.E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J. y A.M. Otero-Paternina. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*. 16: 2-12.
- Oshima, Y., Bolch, C.J. & G.M. Hallegraeff. 1992. Toxin composition of resting cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Toxicon*. 12:1539-1544.
- Parés, R. & A. Giménez. 2002. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté. España. 341 p.
- Park, Y., Je, K.W., Lee, K., Jung, S.E. & T.J. Choi. 2008. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia*. 598: 219-228.
- Parra, M., Durango, J & S. Máttar. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 7: 187-200.
- Parsons, T.R., Maita, Y. & C.M. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. *Pergamon Press*. 173 p.
- Paul, C. & G. Pohnert. 2011. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS ONE* 6:e21032. doi: 10.1371/journal.pone.0021032.
- Pérez-García, O., Escalante, F.M.E., de Bashan, L.E. & Y. Bashan. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 45: 11-36.
- Pérez-Guzmán, L., Pérez-Matos, A.E., Rosado, W., Tosteson, T.R. & N.S. Govind. 2008. Bacteria associated with toxic clonal cultures of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Marine Biotechnology*. 5: 492-496.
- Poot-Delgado, C.A. 2016. Florecimientos algales nocivos en las costas de Campeche, Golfo de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 68: 91-96.
- Prakash, A., Rashid, M.A., Jensen, A. & D.V. Subba Rao. 1973. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: diatoms. *Limnology and Oceanography*, 18(4): 516–524.



- Pucci, G.N & O.H. Pucci. 2005. Changes in membrane fatty acids of *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 with changes of temperatura and osmolarity. *Microbiología Aplicada*. 13 p.
- Quijano-Scheggia, S.A., Olivos-Ortíz, J.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Gaviño-Rodríguez, J.H., Galicia-Pérez, M.A., Patiño-Barragán, M., Band-Schmidt, C.J. Hernández-Sandoval, F.E. & D.J. López-Cortés, 2012. Bloom of *Gymnodinium catenatum* in Bahía Santiago and Bahía Manzanillo, Colima, México. *Biología Tropical*. 60: 173–186.
- Ramírez-Gama, R. M., Luna Millán, B., Velásquez-Madrado, O., Vierna, L., García, A., Mejía Chávez, G., Tsuzuki-Reyes, L., Hernández-Gómez, I., Muggenburg, A., Camacho-Cruz, Q. & M. del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Ramírez-Rodríguez, D. V. 2015. Efecto de la comunidad bacteriana en el dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943): crecimiento, perfil de pigmentos y toxinas paralizantes. Tesis de Licenciatura. UABCS. La Paz,. B.C.S. 115 p.
- Reis-Costa, P., João, M. & K.A. Lefebvre. 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hidrobiología*. 655: 89-97.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R. & Y. Olsen. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*. 30: 972-979.
- Roederer, M. (2002). Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* Chapter 1, Unit 14.
- Rooney-Varga, J.N., Giewant, M.W., Savin, M.C. Sood, S., LeGresley, M. & J.L. Martin. 2005. Links between phytoplankton and bacterial communities dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*. 49: 163-175.
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C. y E. Morales. 2008. Growth and metabolite production of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. (Chroococcales) in function to irradiance. *Biología Tropical*. 56(2): 421-429.
- Ruseell, N.J. 1984. Mechanisms of Thermal Adaptation in Bacteria: Blueprints for Survival. *Trends in Biochemical Sciences*. 9: 108-112.
- Sakami, T., H. Nakahara., M. Chinain & Y. Ishida. 1999. Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Journal Experimental Marine Biology Ecology*. 233: 231-246.
- Saldade-Castañeda, O., Vázquez-Castellanos, J.L., Galván, J., Sánchez-Anguiano, A. & A. Nazar. 1991. Intoxicaciones por toxina paralizante de moluscos en Oaxaca. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Oaxaca. 8 p.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. NY. 2100 p.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. & G. Muyzer. 2002. Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology*. 42: 25-35.
- Schweikert, M. 2003. Cell wall ultrastructure and intracytoplasmic bacteria in hypnocyts of toxic *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Protistology* 3(2): 138-144.



- Seibold, A., Wichels, A. & C. Schütt. 2001. Diversity of endocytic bacteria in the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *Aquatic Microbial Ecology* 25: 229-235.
- Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. New York. John Wiley & Sons Inc. 2003. 4th Edition.
- Silva, E. S. 1990. Intracellular bacteria: the origin of dinoflagellate toxicity. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 10(3): 124-128.
- Simon, N., Biegala, I.C., Smith, E.A. & D. Vaultot. 2002. Kinetics of attachment of potentially toxic bacteria to *Alexandrium tamarensense*. *Aquatic Microbial Ecology*. 28: 249-256.
- Skerratt, J.H., Davidson, A.D., Nichols, P.D. & T.A. McMeekin. 1998. Effect of UV-B on lipid content of three Antarctic marine phytoplankton. *Phytochemistry* 49: 999-1007.
- Smayda, T.J., 1989. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage? p. 449-483. In: Coper, E.M., V.M. Bricelj, E.J. Carpenter (Eds). *Novel Phytoplankton Blooms*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Smith, C.A., Woloshuk, C.P., Robertson, D. & G.A. Payne. 2007. Silencing of the aflatoxin gene cluster in a diploid strain of *Aspergillus flavus* is suppressed by ectopic aflR expression. *Genetics* 176: 2077-2086.
- Smith, E.A., Grant, F., Ferguson, C.M. & S. Gallacher. 2001. Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 2345-2353.
- Sournia, A. 1995. Red-tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: An inquiry into biodiversity, p. 103-112. In: Harmful marine algal blooms. Proc. 6th Int. Conf. on *Toxic Marine Phytoplankton*. Lavoisier.
- Stewart, J. E., Marks, L. J., Wood, C. R., Risser, S. M. & S. Gray. 1997. Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation. *Aquatic Microbial Ecology* 12: 211-221.
- Stock, R & M. Salgado-Lynn. 2002. Curso de Métodos en Biotecnología: Fluorescence-Activated Cell Sortig (FACS). UNAM. 18 p.
- Stüken, A., Orr, R.J.S., Kellmann, R., Murray, S.A. & B.A. Neilan. 2011. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates. *PLoS ONE* 6(5): e20096.
- Subramanian, T. A. 2008. Experimental models of algal-bacterial interactions. Tesis de Doctorado. Universidad de Tasmania. Australia. 143 p.
- Suminto, S. & K. Hirayama. 1997. Application of a growth promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia* 358: 223-230.
- Suutari, M. & S. Laakso. 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Review Microbiology*. 4: 285-328
- Tai, V., Paulsen, I.T., Phillippy, K., Johnson, D.A. & B. Palenik. 2009. Whole-genome microarray analyses of *Synechococcus-Vibrio* interactions. *Environmental Microbiology*. 11: 2698-2709.
- Tanabe, Y., Okazaki, Y., Yoshida, M., Matsuura, H., Kai, A. & T. Shiratori. 2015. A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*. *Scientific Reports*. 5:10467.



- Taroncher-Oldenburg G. & D.M. Anderson. 2000. Identification and characterization of three differentially expressed genes, encoding S-Adenosylhomocysteine Hydrolase, Methionine Aminopeptidase, and a histone-like protein, in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Applied Environmental Microbiology*. 66(5): 2105--2112.
- Taroncher-Oldenburg, G., Kulis, D.M. & D.M. Anderson. 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnology and Oceanography* 42 (5, part 2): 1178-1188.
- Thronsdon, J. 1979. Special methods-micromanipulators. In: Stein, R.J., Ed. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. London. 139-144 p.
- Töbe, K., Ferguson, C., Kelly, M., Gallacher, S. & L.K. Medlin. 2001. Seasonal occurrence at a Scottish PSP monitoring site of purportedly y toxic bacteria originally isolated from the toxic dinoflagellate genus *Alexandrium*. *European Journal of Phycology*. 36: 243-256.
- Tortora, J., Funke, R. y L. Case. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Tzovenis, I., de Pauw, N. & P. Sorgeloos. 1997. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-ISO). *Aquaculture International*. 5:489-507.
- Uribe, P. & R.T. Espejo. 2003. Effects of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 659-662.
- Vale, P. & H. Taleb. 2005. Assessment of the quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins by pre-column derivatization and elimination of interfering compounds by solid-phase extraction. *Food Additives and Contaminants*. 22: 838-846.
- Vale, P. 2008. Fate of benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*. 1190: 191-197.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental. Environmental Health Perspectives..*, 108: 133--141.
- Vásquez-Flórez, A.C. 2009. Estandarización de un protocolo de citometría de flujo para determinar simultáneamente los recuentos absolutos de LTCD4+ LTCD8+, LT reguladres, LB y células NK en sangre periférica con el fin de evaluar los recuentos en pacientes con Síndrome de Down. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 30 p.
- Vasseur, C., Bougaran, G., Garnier, M., Hamelin, J., Leboulanger, C., Le Chevanton, M., Mostajir, B., Sialve, B., Steyer, J.P. & E. Fouilland. 2012. Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: first step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 119: 79-87.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J.J., Cailleau, C. & J.C. Marty. 1996. Rapid HPLC method for determination of phytoplankton chemotaxonomic pigments: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*. 18: 2377-2382.



- Vincent, B. 2003. Growth stimulation of *Gymnodinium catenatum*: specificity of bacterial association. Honours thesis, School of Aquaculture, University of Tasmania, 127 pp.
- Vogt, R.F., Whitfield, W.E., Henderson, L.O. & W.H. Hannon Fluorescence intensity calibration for immunophenotyping by flow cytometry. *Methods*. 2000 Jul; 21(3): 289-96.
- Vullo, D., Wachsmann, M. & L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina
- Wang, C., Kong, H., He, S., Zheng, X. & C. Li. 2010. The inverse correlation between growth rate and cell carbohydrate content of *Microcystis aeruginosa*. *Journal Applied of Phycology*. 22:105-107.
- Wang, H., Tomasch, J., Jarek, M. & I. Wagner-Döbler. 2014. A dual species co-cultivation system to study the interactions between Roseobacters and dinoflagellates. *Frontiers in Microbiology*. 5: 311.
- Wang, H., Tomasch, J., Michael, V., Bhujju, S., Jarek, M., Petersen, J. & I. Wagner-Döbler. 2015. Identification of genetic modules mediating the Jekyll and Hyde Interaction of *Dinoroseobacter shibae* with the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1262.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C. & B.A. Neilan. 2010. Neurotoxic aAlkaloids: Saxitoxin and its Analogs. *Marine Drugs*. 8: 2185—2211.
- Williams, P.H. & S.C. Clarke. 1998. Why do microbes have toxins?. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 84: 1-6.
- Wolter, K. 1982. Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton populations. *Marine Ecology Progress Series*. 7: 287-295.
- Xu, X.Q. & J. Beardall. 1996. Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry* 45:655-658.
- Yemm, E.W. & A.J. Willis. 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *Biochemistry*. 57: 508-514.
- Yoch, D.C. 2002. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Applied. Environmental. Microbiology*. 68, 5804-5815.
- Yu, H., Jia, S. & Y. Dai. 2009. Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flageliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation. *Applied Phycology*. 21(1): 127:133.
- Yu, R. C., Hummert, C., Luckas, B., Qian, P. Y. & M.J. Zhou. 1998. Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia*. 48: 671-676.
- Yuan, J.P., F. Chen, X. Liu. & X.Z. Li. 2002. Carotenoid composition in the green
- Zamudio, M.E., Licea, S. & R. Luna. 2013. Relative abundance and distribution of unarmoured dinoflagellate species in the South Gulf of Mexico (2005-2010). In: Biological and Geological Perspectives of Dinoflagellates, Ed.: 1er, Chapter 22, Publisher: *The Micropalaeontological Society, Special Publications. Geological Society*. 233-238 p.
- Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. 4th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 1046 p.



- Zeeman, S.C., Kossmann, J. & A.M. Smith. 2010 Starch: its metabolism, evolution, and biotechnology modification in plants. *Annual Review Plant Biology*. 61:209-234.
- Zehr, J.P. & B.B. Ward. 2002. Nitrogen cycling in the ocean: new perspectives on processes and paradigms. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 1015-1024.
- Zhu, C.J., Lee, Y.K. & T.M. Chao. 1997. Effect of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal Applied Phycology*. 9:, 451-457.
- Zhuang, Y., Zhang, H., Hannick, L. & S. Lin. 2012. Cell cycle, saxitoxin, and proton pump rhodopsin: insight from gene expression profiling for an *Alexandrium fundyense* culture and a natural bloom. *Journal of. Phycology*. 48(1): S27.
- Zumaya-Higuera, M.G. 2017. Interacciones bióticas entre los dinoflagelados *Cochlodinium polykrikoides*, *Cochlodinium* cf. *fulvescens* y *Gymnodinium impudicum* sobre *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. IPN-CICIMAR. La Paz, B.C.S. 149 p.