

## Efecto de un consorcio bacteriano en el crecimiento, morfología, pigmentos y toxicidad del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*

Dulce V Ramírez-Rodríguez<sup>1</sup>, Christine J Band-Schmidt<sup>1\*</sup>, Bárbara González-Acosta<sup>1</sup>, Francisco E Hernández-Sandoval<sup>2</sup>, Aldo Aquino-Cruz<sup>3</sup>, Sonia I Quijano-Scheggia<sup>4</sup>, José J Bustillos-Guzmán<sup>2</sup>

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historial del artículo:

Recibido 27 de abril de 2023

Aceptado 03 de septiembre de 2023

Publicado 21 de febrero de 2024

#### READ IN ENGLISH:

<https://doi.org/10.7773/cm.y2024.3415>

#### AUTOR DE CORRESPONDENCIA

\* E-mail: [cbands@ipn.mx](mailto:cbands@ipn.mx)

<sup>1</sup> Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, 23096 La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 23096 La Paz, B.C.S., México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, 04960 Ciudad de México, México.

<sup>4</sup> Centro Universitario de Investigaciones Oceanológicas. Universidad de Colima, 28860 Manzanillo, Colima, México.

**RESUMEN.** *Gymnodinium catenatum*, un dinoflagelado productor de toxinas paralizantes, es una de las especies de dinoflagelados más estudiadas, sin embargo, poco se conoce sobre sus interacciones con bacterias. En este estudio se determinó el efecto de un consorcio bacteriano en cepas de *G. catenatum*. Se emplearon 4 cepas de *G. catenatum* aisladas de Bahía de Santiago, Colima; Lázaro Cárdenas, Michoacán; Bahía Concepción y Bahía de La Paz, Baja California Sur. De la cepa originaria de la costa de Colima se aisló un consorcio bacteriano compuesto de 3 bacterias empleando placas de agar con medio GSe. Se incubaron a una salinidad de 34, a 24 °C y en un ciclo de 12:12 h L:O. *Gymnodinium catenatum* se cultivó en medio GSe líquido en las mismas condiciones que las bacterias. La interacción entre los microorganismos se evaluó inoculando el consorcio bacteriano en las cepas de *G. catenatum*. Se determinó la abundancia máxima, las tasas de crecimiento, la longitud de cadenas y el perfil de pigmentos y toxinas paralizantes en *G. catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano. En presencia de las bacterias no se observó la misma respuesta en el crecimiento de las cepas de *G. catenatum*, ni en el perfil y contenido de toxinas, pero sí se observó un incremento significativo en el número de células en cadena. También se notaron cambios en la morfología de *G. catenatum*. Además, en presencia del consorcio bacteriano, en la mayoría de las cepas incrementó el contenido de pigmentos accesorios. Los resultados sugieren que el consorcio bacteriano pudiera ser un agente estresante para *G. catenatum* proporcionando nuevas perspectivas de interacción entre las bacterias y *G. catenatum*.

**Palabras clave:** consorcio bacteriano, crecimiento, dinoflagelado, pigmentos, toxinas paralizantes.

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento del fitoplancton está controlado por una combinación de condiciones hidrográficas y fisicoquímicas, tales como la temperatura, la luz y los nutrientes (Noman et al. 2019, Vives et al. 2022). Sin embargo, los factores bióticos también tienen un efecto sinérgico en el crecimiento del fitoplancton, debido a las interacciones con otros microorganismos que favorecen el desarrollo de relaciones ecológicas como el mutualismo, la alelopatía, la depredación y/o el pastoreo (Rooney-Varga et al. 2005).

Particularmente, los dinoflagelados mantienen asociaciones con bacterias simbióticas que colonizan la ficosfera.

Estas proliferan con los compuestos liberados por las algas y llevan a cabo una variedad de funciones biológicas que incluyen la provisión de vitaminas esenciales, la producción de compuestos promotores del crecimiento y la fotosíntesis (Paul y Pohnert 2011, Jauzein et al. 2015); adicionalmente, pueden eliminar al fitoplancton mediante la producción de alguicidas (Zheng et al. 2023). Las bacterias también influyen en el metabolismo a través de los procesos del bucle microbiano, que reabastecen y modulan la concentración de los aportes de nutrientes (Azam 1998), así como de la materia orgánica disuelta (Moran y Miller 2007). A pesar del impacto de la comunidad bacteriana en la dinámica del fitoplancton y ciclos biogeoquímicos, aún

Acceso abierto

En línea ISSN: 2395-9053

Verificado con Similarity Check impulsado por iThenticate

<https://doi.org/10.7773/cm.y2024.3415>



Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite compartir y adaptar el trabajo, siempre y cuando se dé el crédito apropiado a los autores originales y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las figuras, tablas y otros elementos del artículo están incluidos en la licencia CC BY 4.0 del artículo, a menos que se indique lo contrario. Debe solicitar permiso al titular de los derechos de autor para utilizar material no cubierto por esta licencia. El título de la revista está protegido por derechos de autor propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, y el título y el logotipo de la revista no están sujetos a esta licencia.

no se comprenden del todo las asociaciones biológicas entre bacterias y algas (Jauzein et al. 2015). Las interacciones algas-bacterias son complejas, en parte porque pueden ser especie-específicas y variar con las condiciones ambientales (Mayali y Azam 2004, Grossart y Simon 2007). La relación bacteria-dinoflagelado se ha considerado como una relación mutualista debido a que el dinoflagelado no es el único que obtiene beneficios al asociarse con comunidades bacterianas, ellos a su vez proveen un hábitat óptimo para el crecimiento de las bacterias mediante la producción de compuestos orgánicos, además de proporcionar una mayor superficie de fijación (Seibold et al. 2001, Wang et al. 2014, Jauzein et al. 2015).

*Gymnodinium catenatum* es el único dinoflagelado marino desnudo productor de toxinas paralizantes (Hallegraeff 1993) y es uno de los dinoflagelados más estudiados en México (Band-Schmidt et al. 2010). Las investigaciones se han enfocado en el estudio de la dinámica de sus proliferaciones (Hernández-Sandoval et al. 2009, Cortés-Altamirano et al. 2019), sus toxinas (Band-Schmidt et al. 2006, Durán-Riveroll et al. 2017), la autoecología (Band-Schmidt et al. 2004, 2014; Bustillos-Guzmán et al. 2012; Hernández-Sandoval et al. 2022) y las interacciones tróficas (Palomares-García et al. 2006, Bustillos-Guzmán et al. 2013, Fernández-Herrera et al. 2016). Su presencia se ha reportado en más de 23 países (Hallegraeff et al. 2011) y se ha asociado con mortalidades de organismos e intoxicaciones humanas (MacKenzie 2014, Chen 2018). En México, en las últimas décadas, los reportes de esta especie y sus impactos negativos han incrementado (Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna 2003, Medina-Elizalde et al. 2018). Debido a ello existe un mayor interés en describir los efectos de los factores que regulan el crecimiento y la toxicidad de esta especie (Hallegraeff et al. 2011).

A pesar de ser una especie muy estudiada, poco se conoce sobre la interacción que existe entre *G. catenatum* y la comunidad bacteriana. Algunos reportes han demostrado que las bacterias son esenciales para su crecimiento y tienen influencia en su toxicidad, en la absorción de nutrientes, la abundancia y la tasa de crecimiento, pudiendo formar relaciones de mutualismo mediante mecanismos aún desconocidos (Amin et al. 2007, Green et al. 2010, Bolch et al.

2011). También se han observado respuestas contrarias en el crecimiento de *G. catenatum* según los géneros de bacterias con los que interactúa. Las bacterias del género *Roseobacter* favorecen la muerte celular de *G. catenatum*; *Marinobacter* sp. y *Alcanivorax* sp. estimulan su crecimiento (Bolch et al. 2017). La finalidad de este trabajo fue determinar si en presencia de un consorcio bacteriano, aislado de una cepa de *G. catenatum* de las costas de Colima, las cepas de *G. catenatum* de otras regiones de las costas del Pacífico frente a México incrementarían su tasa de crecimiento y abundancia y como se modificaría la longitud de sus cadenas, su morfología, el perfil de pigmentos y el de toxinas paralizantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *Gymnodinium catenatum* y condiciones de cultivo

Se emplearon 4 cepas no axénicas de *G. catenatum* aisladas a partir de células vegetativas durante eventos de florecimientos algales de diversas regiones del Pacífico frente a México con las claves GCCV-7, GCMV-7, 62L y G7 (Tabla 1). Las cepas se mantuvieron en el medio GSe (Blackburn et al. 2001) con extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán et al. 2015). En todas las condiciones experimentales, los cultivos se mantuvieron a  $24 \pm 1$  °C, con una iluminación de  $150 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  utilizando lámparas fluorescentes de luz de día con un fotoperiodo de 12h:12h L:O a una salinidad de 34.

### Obtención y conteos del consorcio bacteriano

Se separaron células bacterianas del dinoflagelado de la cepa G7 de *G. catenatum* mediante fototactismo. A las 12 h se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias que migraron a la zona iluminada y se sembraron en medio GSe con agar al 1.5% en cajas Petri por triplicado. Se obtuvo un consorcio bacteriano compuesto por 3 colonias de bacterias con morfología diferente por medio del método de estría cruzada. Las colonias se mantuvieron en el medio GSe líquido y agar bajo las condiciones mencionadas. La identificación morfológica se realizó en un microscopio óptico mediante tinción de

**Tabla 1.** Cepas de *Gymnodinium catenatum* aisladas de células vegetativas durante florecimientos algales en diversas regiones del Pacífico Mexicano.

Clave	Lugar y año de aislamiento	Aislado por
GCCV-7	Bahía Concepción, B.C.S. 2000	C. Band-Schmidt
GCMV-7	Bahía de Mazatlán, Sin. 2013	L. Morquecho-Escamilla
G7	Bahía de Manzanillo, Col. 2010	S. Quijano-Scheggia
62L	Lázaro Cárdenas, Mich. 2005	M. Rodríguez-Palacio

Gram. Para determinar si las bacterias eran fijadoras de nitrógeno se cultivaron en el medio ASN-III sin fuente de nitrógeno (Rippka et al. 1891).

Para la cuantificación de las bacterias, se recolectaron alícuotas de 1 mL y las muestras se diluyeron en una proporción 1:2 con PBS al 1%, se fijaron con formol al 4% y se almacenaron a 4 °C en oscuridad. A las 24 h se realizó una dilución 1:15 con Tris-EDTA al 1% previamente filtrado a través de membranas de policarbonato de 0.22 µm. La tinción de las bacterias se realizó siguiendo el método de Kepner y Pratt (1994) con el fluorocromo SYBR Gold para teñir el ADN. Se realizaron observaciones en un microscopio de epifluorescencia (Olympus CH30) bajo emisión de luz azul, con una longitud de onda entre 450 y 490 nm a 1,000×, en oscuridad. Los conteos se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus CH30) con un micrómetro ocular cuadrado (10 × 10 mm), dividido en 100 unidades. Se consideraron 10 campos o hasta completar un total de 300 células (Kirchman et al. 1982, Sherr et al. 1993). El número de bacterias se determinó con la siguiente ecuación, con los respectivos ajustes para microscopía de epifluorescencia:

$$\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{(N \times F \times d)}{V}, \quad (1)$$

donde  $N$  es el número de células promedio por retícula,  $F$  es el número de veces que cabe el área de la retícula en el área efectiva de filtración del filtro,  $d$  es la dilución y  $V$  el volumen filtrado de la muestra (mL); el área de filtración se obtuvo a partir de  $\pi \cdot r^2$  (20,106 mm<sup>2</sup>) y el área retícula era 0.01 mm<sup>2</sup> en 100×.

### Curvas, tasas de crecimiento y longitud de cadenas de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano

En matraces Erlenmeyer de 250 mL, se colocaron 150 mL del medio GSe, y cada cepa de *G. catenatum* se inoculó por separado con una densidad inicial de 500 cél·mL<sup>-1</sup> con y sin adicionar el consorcio bacteriano por triplicado. El consorcio microbiano estuvo compuesto por 9,500 cél·mL<sup>-1</sup> de una bacteria filamentosa, 70,000 cél·mL<sup>-1</sup> de bacterias tipo bacilo y 9,000 cél·mL<sup>-1</sup> de bacterias tipo coco. Se tomaron 2 mL de cultivo cada segundo día hasta alcanzar la fase de decaimiento (máximo 26 días) fijando las muestras con Lugol al 1% (Thronsen 1979). Los conteos del dinoflagelado se realizaron utilizando una cámara de Sedgewick-Rafter bajo un microscopio óptico (Labomed CXRII). Se registró el número y el largo de las cadenas celulares. En todos los tratamientos se registraron los cambios morfológicos en células vivas de *G. catenatum* bajo un microscopio óptico Zeiss Axioscope con una cámara ScopePhoto (versión 3.0). La tasa de crecimiento ( $K$ ) se determinó durante la fase de crecimiento exponencial, utilizando la ecuación de Guillard (1973):

$$K = \frac{(\ln C_2 - \ln C_1)}{(t_2 - t_1)}, \quad (2)$$

donde  $C_1$  es el número de células por mililitro al tiempo uno ( $t_1$ ) y  $C_2$  es el número de células por mililitro en el tiempo dos ( $t_2$ ).

### Pigmentos y toxinas paralizantes

Se determinó el perfil de pigmentos y toxinas de *G. catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano durante la fase exponencial de crecimiento. Para ambos análisis se filtraron alícuotas de 25 mL a través de una membrana de fibra de vidrio de 25 mm GF/F (Whatman, Springfield Mill, UK) y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Los análisis de pigmentos se realizaron por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en un equipo Agilent Technologies mod 1100 (Santa Clara, EE. UU.) siguiendo el protocolo de Vidussi et al. (1996). Para la identificación y cuantificación de los pigmentos, se emplearon los tiempos de retención y el espectro de adsorción luminosa obtenidos con estándares comerciales (Agencia Internacional para determinaciones de carbono 14, Dinamarca) (Vidussi et al. 1996, Montoura y Repeta 1997).

Para el análisis de toxinas la extracción e hidrólisis se realizó de acuerdo con Hernández-Sandoval et al. (2022). Los análisis de toxinas se realizaron por CLAR en un equipo Agilent Technologies mod 1260 Infinity II (Santa Clara, EE. UU.) de acuerdo con Hummert et al. (1997) y Yu et al. (1998). Las toxinas se detectaron mediante un detector de fluorescencia (1260 FLD) con una longitud de onda de  $E_x$  de 330 nm y de  $E_m$  de 395 nm. La identificación de los análogos de saxitoxina se llevó a cabo comparando los tiempos de retención con muestras de estándares comerciales (NRC, Canadá).

### Análisis estadísticos

Las diferencias en la abundancia máxima de las cepas de *G. catenatum* se determinaron con un análisis de varianza unifactorial, la normalidad de los datos se probó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad con la prueba de Levene. A los datos que no se ajustaron a la normalidad, se les realizó una prueba de Kruskal Wallis (Zar 1999). Las diferencias en la longitud de cadenas celulares y en el perfil de toxinas paralizantes se evaluaron con la prueba estadística  $\chi^2$ , mientras que las diferencias en el perfil de pigmentos y toxinas se evaluaron con la prueba  $t$  de Student (Zar 1999). Cuando hubo diferencias significativas, se realizaron pruebas *a posteriori* de comparación de medias Tukey (Day y Quinn 1989) para grupos homogéneos. Los análisis se realizaron con el software Statistica v7.0 (StatSoft, Inc.) con un nivel de significancia de 0.05.

## RESULTADOS

### Consortio bacteriano

Mediante la técnica de fototactismo y migración vertical se aisló un consorcio bacteriano asociado a *G. catenatum*.

Mediante el sembrado en placa por estría cruzada se obtuvieron 3 poblaciones de bacterias. La primera población estuvo integrada por bacterias heterótrofas Gram negativas filamentosas con un tamaño entre 7-10  $\mu\text{m}$ ; la segunda, se conformó de bacterias heterótrofas Gram negativas tipo bacilo con un tamaño de  $5.00 \pm 0.55 \mu\text{m}$ ; la tercera, consistió en bacterias Gram negativas, autótrofas, fijadoras de nitrógeno, tipo coco con un tamaño de  $4.00 \pm 0.86 \mu\text{m}$ . La composición del consorcio bacteriano fue  $9,500 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  de una bacteria filamentosas,  $70,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bacterias tipo bacilo y  $9,000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bacterias tipo coco.

### Curvas, tasas de crecimiento y longitud de cadenas de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano

Todas las cepas de *G. catenatum*, sin la adición del consorcio bacteriano, presentaron una fase de aclimatación corta (en caso de presentarse), seguida de una fase exponencial y una fase de decaimiento pronunciada. El inicio de la fase exponencial en todas las cepas inició el día 2 y finalizó entre los días 14 y 20 (Fig. 1 a-d).

Al inocular el consorcio bacteriano, el crecimiento de *G. catenatum* varió con cada cepa. En presencia del consorcio bacteriano, la cepa GCCV-7 prolongó la fase exponencial a 22 d con respecto al control donde terminó el día 12 (Fig. 1a). La abundancia máxima con la inoculación del consorcio bacteriano fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) con respecto al control,  $6,932 \pm 26$  y  $6,463 \pm 25 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 1a). En la cepa GCMV-7, la fase exponencial en presencia del consorcio duró 14 d, mientras que en el control se prolongó a 20 d (Fig. 1b); en presencia del consorcio la abundancia máxima fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) ( $6,334 \pm 25 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que en el control ( $2,840 \pm 38 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

En las cepas G7 y 62L, la adición del consorcio bacteriano no favoreció el crecimiento del dinoflagelado. En la cepa G7, la fase exponencial terminó a los 14 d con la inoculación del consorcio y a los 16 d sin adicionarlas (Fig. 1c). En presencia del consorcio bacteriano la abundancia máxima fue de  $1,146 \pm 5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ , lo cual fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) que al no adicionarlas  $1,625 \pm 5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En la cepa 62L, la fase exponencial duró hasta el día 16 sin el consorcio bacteriano y alcanzó una abundancia máxima de  $6,444 \pm 4 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; la abundancia fue significativamente menor ( $P < 0.05$ )  $628 \pm 317 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  al adicionar el consorcio bacteriano (Fig. 1d).

Las mayores tasas de crecimiento exponencial sin el consorcio bacteriano se obtuvieron en las cepas GCCV-7 y 62L con  $0.215 \pm 0.005$  y  $0.141 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, seguidas de la cepa G7 con una tasa de crecimiento de  $0.094 \pm 0.017 \text{ d}^{-1}$  y la cepa GCMV-7 con la menor tasa de crecimiento ( $0.079 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ ). Con la adición del consorcio bacteriano, las cepas GCCV-7, G7 y 62L disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) sus tasas de crecimiento a  $0.065 \pm 0.00$ ,  $0.044 \pm 0.017$  y  $0.0 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente; en la cepa GCMV-7 la tasa de

crecimiento incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) a  $0.165 \pm 0.001 \text{ d}^{-1}$  (datos no mostrados).

Sin la adición del consorcio bacteriano, el porcentaje de células individuales en la cepa GCMV-7 incrementó hasta el sexto día del cultivo (de 22% a 50%), posterior a este día predominaron las células en cadenas, principalmente de 2-3 células, y variaron entre 20% y 71% (Fig. 2a). Al adicionar el consorcio bacteriano, el porcentaje de células individuales fue significativamente menor al 43% y las cadenas de 4 a 6 células representaron entre el 20% y el 43% ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2b).

Sin la adición del consorcio bacteriano, la cepa G7 tuvo un mayor porcentaje de células individuales hasta el día 8 y 10 (35%) (Fig. 2c). Esta cepa tuvo un predominio de cadenas de más de 4 células (de 36% a 67%). En presencia del consorcio bacteriano, incrementaron significativamente las células individuales (de 24% a 70%) ( $P < 0.05$ ), seguidas de cadenas de 4 a 6 células (de 19% a 44%) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2d).

Sin adicionar el consorcio bacteriano, en la cepa GCCV-7 las células individuales incrementaron de 19% a 70% hasta los 8-10 días (Fig. 2e), seguido de un incremento de células en cadenas. En presencia del consorcio bacteriano, durante la mayor parte de la curva de crecimiento, disminuyó significativamente el porcentaje de células individuales a entre 3% y 32% ( $P < 0.05$ ) e incrementó la formación de cadenas de 4 a 6 células (entre 30% a 62%) y de  $\geq 7$  células (entre 10% y 40%) (Fig. 2f).

En la cepa 62L, sin el consorcio bacteriano, predominaron células individuales (entre 18% y 54%) durante la mayor parte de la curva de crecimiento (Fig. 2g). En presencia del consorcio bacteriano, el porcentaje de células individuales disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) (entre el 5% y el 12%), al igual que las cadenas de 2 a 3 células (entre 15% y 26%) ( $P < 0.05$ ) y las cadenas de 4 a 6 y  $\geq 7$  células incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) (de 67% a 87%).

### Cambios morfológicos de *Gymnodinium catenatum* en presencia del consorcio bacteriano

Los cambios morfológicos en *G. catenatum* con la adición del consorcio bacteriano fueron el desarreglo en el sulcus y cíngulo, la ruptura de la membrana celular, la presencia de células trapezoidales, los desarreglos en material citoplasmático, la presencia de cromosomas condensados y la presencia de quistes temporales y lisis (Fig. 3). Un alto porcentaje de células (80-90%) mostraron estos cambios a las 3 h de haber inoculado el consorcio bacteriano. Solo la cepa G7 no presentó cambios en su morfología, cepa de la cual se obtuvo el consorcio bacteriano.

Se observaron quistes temporales (15%) en la cepa GCCV-7 durante la fase de decaimiento. La inhibición en el crecimiento de la cepa 62L también se debió a un alto porcentaje de quistes temporales (95%) al adicionar el consorcio bacteriano. En las cepas GCCV-7 y GCMV-7, además de los cambios morfológicos antes descritos, se observó un cambio en la coloración de los cultivos al adicionar el consorcio

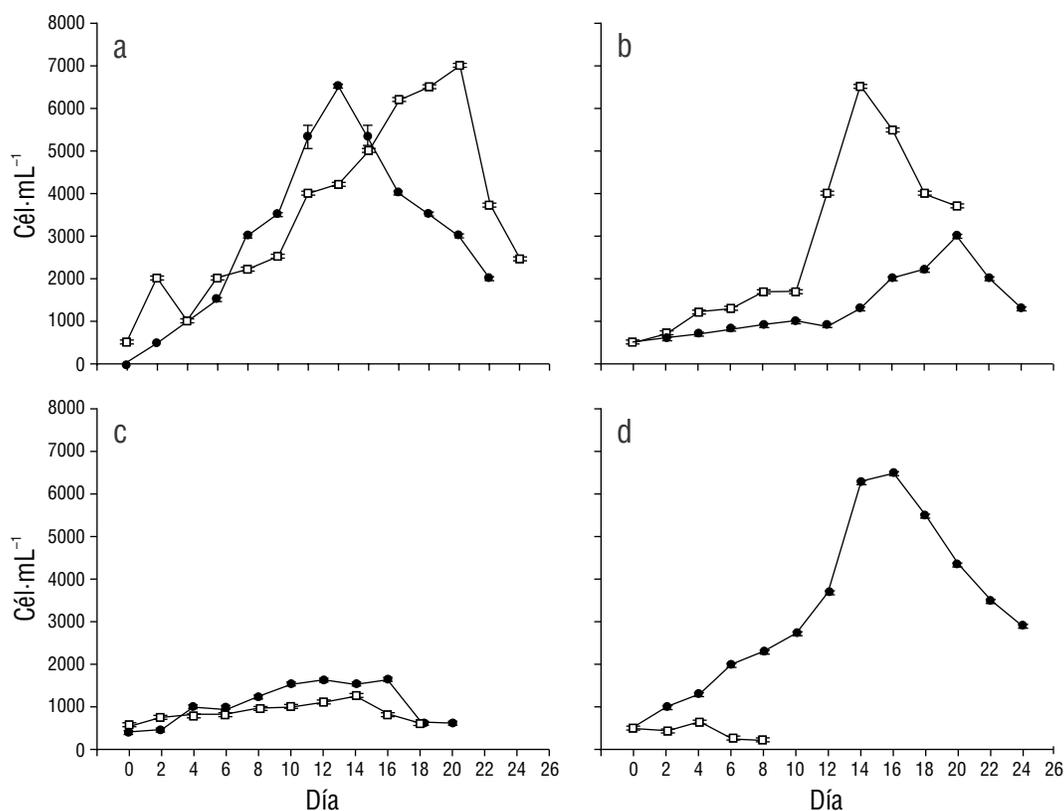
bacteriano, los cuales adquirieron un tono verde intenso; dicha coloración se presentó durante la fase exponencial; no se inhibió el crecimiento de *G. catenatum*.

### Perfil de pigmentos y toxinas paralizantes

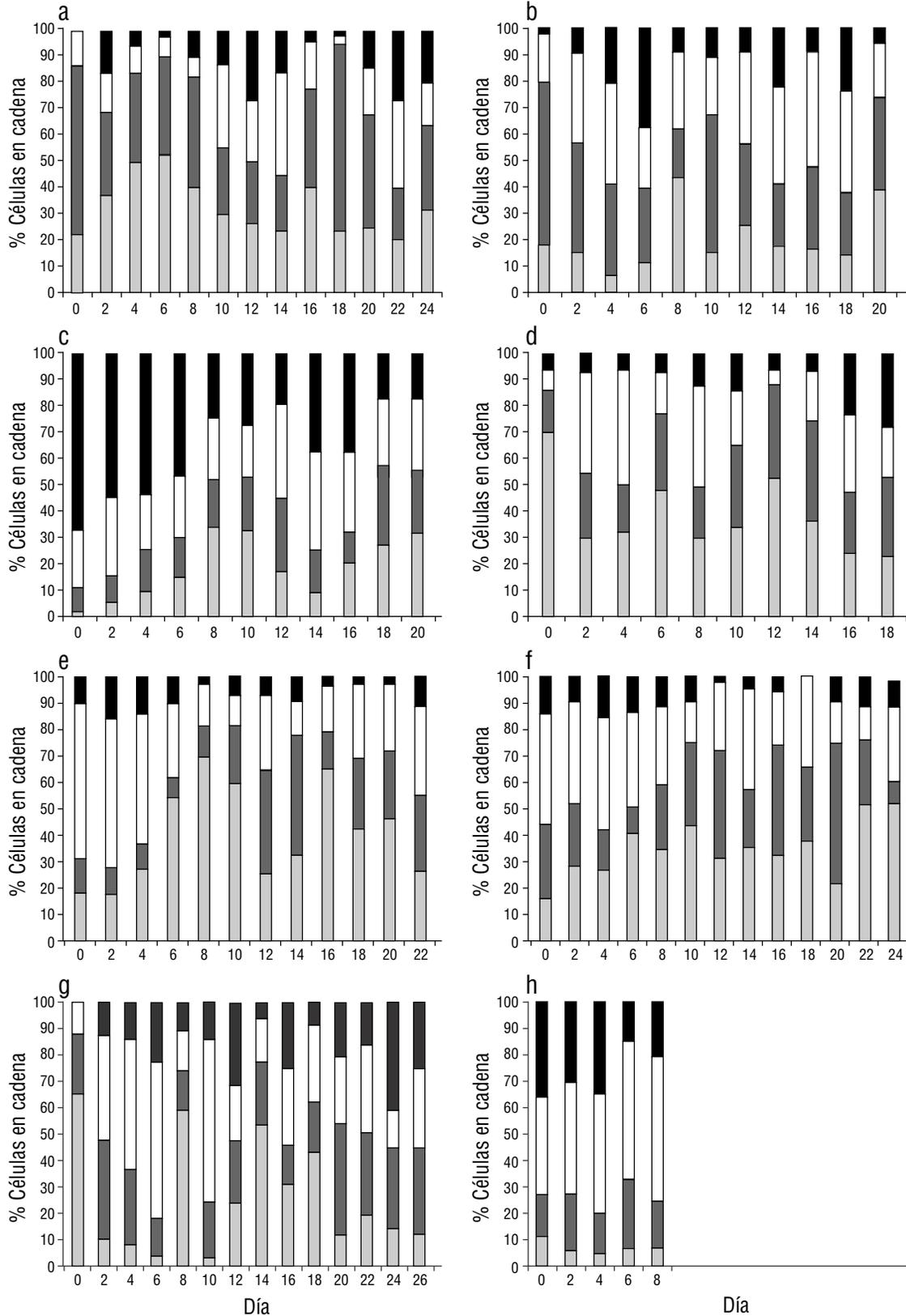
El perfil de pigmentos en los cultivos de *G. catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano se integró por 8 pigmentos fotosintéticos. La clorofila *a* fue el pigmento más abundante (de  $47.52 \pm 2.52\%$  a  $52.96 \pm 1.65\%$ ) sin diferencias significativas entre tratamientos; el porcentaje de clorofila *c2*, carotenoides (zeaxantina,  $\beta$ -caroteno) y xantofilas (diadinoxantina, dinoxantina, diatoxantina) variaron entre cepas y algunos pigmentos variaron entre tratamientos. La presencia del consorcio bacteriano en las cepas GCMV-7 y GCCV-7 aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) el porcentaje de zeaxantina (de 0.0 a  $4.46 \pm 0.57\%$  y de 0.0 a  $6.93 \pm 3.81\%$ , respectivamente) y de  $\beta$ -caroteno (de  $0.24 \pm 0.08$  a  $2.46 \pm 0.58$  % y de  $0.40 \pm 0.06$  a  $2.83 \pm 0.74\%$ , respectivamente) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4a, b). En presencia del consorcio bacteriano, la cepa 62L no registró cambios significativos en el contenido de pigmentos ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4c); en la cepa G7, se incrementó significativamente ( $P > 0.05$ ) el porcentaje de clorofila *c2* y de peridinina y disminuyó significativamente la zeaxantina y el  $\beta$ -caroteno (Fig. 4d).

En todas las cepas de *G. catenatum* se identificaron 8 análogos de toxinas paralizantes: C1/2, dcNEO, dcSTX, dcGTX 2/3 y GTX2/3. Estos se agruparon en función del grupo sustituyente en la cadena lateral en toxinas carbamoil (GTX2/3), decarbamoil (dcNEO, dcSTX y dcGTX2/3) y N-sulfocarbamoil (C1/2) (Tabla 2). Con la adición del consorcio bacteriano, la cepa GCMV-7 no mostró cambios significativos en el perfil de toxinas; las toxinas N-sulfocarbamoil fueron las más abundantes (entre  $23.40 \pm 3.81$  y  $21.94 \pm 3.78$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>), seguidas por las decarbamoil (entre  $12.16 \pm 0.52$  y  $15.35 \pm 0.73$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>) y las carbamoil ( $<1.24$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>) (Tabla 2). En la cepa GCCV-7, el consorcio bacteriano incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) el contenido de toxinas N-sulfocarbamoil (de  $43.25 \pm 6.99$  a  $84.03 \pm 14.07$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>), decarbamoil (de  $10.53 \pm 0.43$  a  $14.77 \pm 0.71$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>) y carbamoil (de  $1.87 \pm 0.10$  a  $4.41 \pm 0.13$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>). En presencia del consorcio bacteriano, la cepa 62L presentó un menor ( $P < 0.05$ ) contenido de toxinas decarbamoil (de  $84.23 \pm 3.81$  a  $20.71 \pm 0.92$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>). En la cepa G7, la presencia del consorcio bacteriano disminuyó las toxinas decarbamoil de  $2.04 \pm 0.16$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup> a  $0.69 \pm 0.05$  y las carbamoil no rebasaron  $1.15$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup> (Tabla 2).

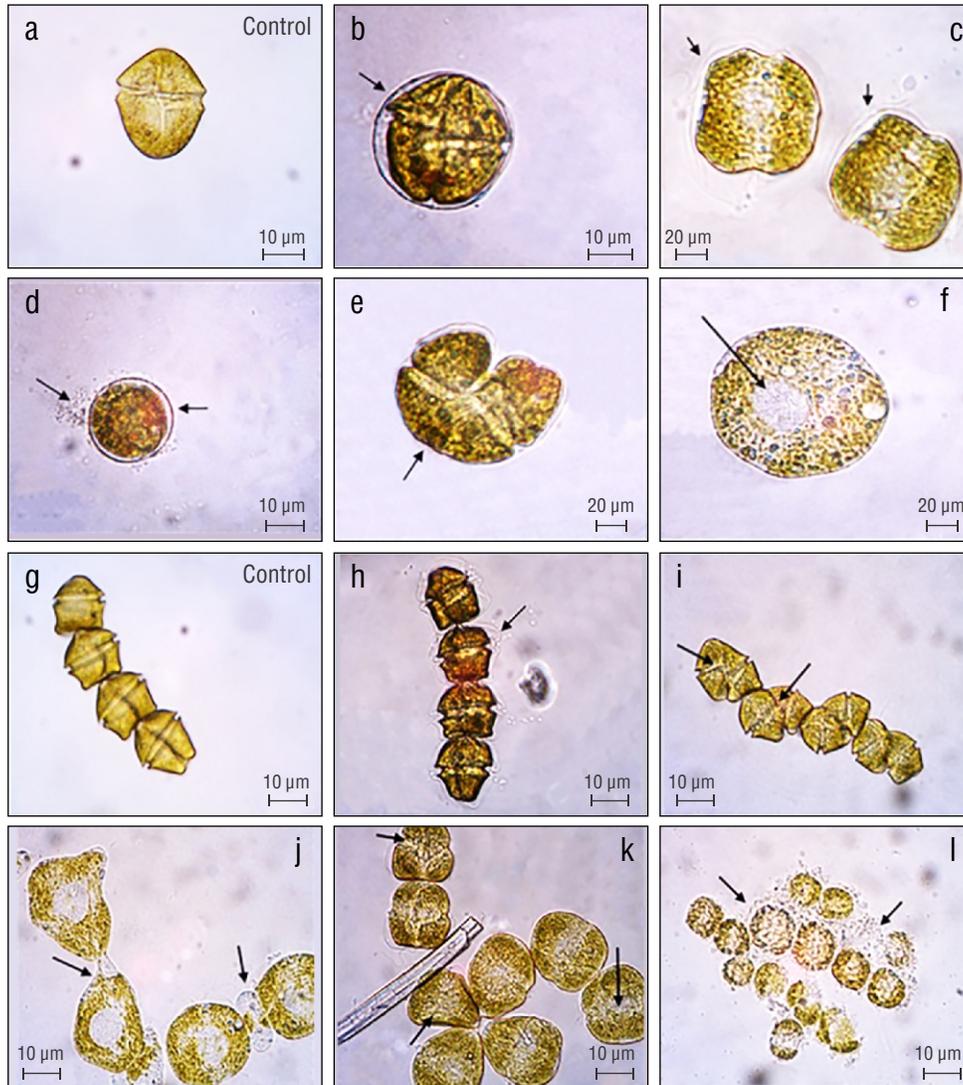
En presencia del consorcio bacteriano, el contenido de toxinas disminuyó significativamente en las cepas 62L y G7



**Figura 1.** Curvas de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe a 24 °C, salinidad de 34 y ciclo 12:12 h L:O en presencia del consorcio bacteriano (cuadros vacíos) y sin adicionar el consorcio bacteriano (círculos negros). Cepas: (a) GCCV-7. (b) GCMV-7. (c) G7. (d) 62L. Líneas verticales: ds.



**Figura 2.** Cadenas celulares durante la curva de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano (CB). Gris claro: células individuales. Gris oscuro: cadenas de 2-3 células. Blanco: cadenas de 4-6 células. Negro: cadenas de  $\geq 7$  células. (a) cepa GCMV-7 sin CB; (b) cepa GCMV-7 con CB; (c) cepa G7 sin CB; (d) cepa G7 con CB; (e) cepa GCCV-7 sin CB; (f) cepa GCCV-7 con CB; (g) cepa 62L sin CB; (h) cepa 62L con CB.



**Figura 3.** Morfología de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano. (a) Célula individual (control). (b) Célula rodeada de una membrana característica de un quiste temporal. (c) Ruptura de membrana, pérdida de flagelo, desarreglo del cíngulo y sulcus. (d) Quiste temporal y bacterias. (e) Célula trapezoidal. (f) Célula redonda con núcleo evidente y cromosomas condensados. (g) Cadena de células (Control). (h) Células en cadena rodeadas por membrana hialina. (i) Desarreglo del cíngulo y sulcus. (j) Ruptura de membrana. (k) Desarreglos en el citoplasma. (l) Lisis.

(de  $126.35 \pm 41.66$  a  $58.47 \pm 18.34$  y de  $3.20 \pm 1.02$  a  $1.76 \pm 0.54$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>, respectivamente). En presencia del consorcio bacteriano, la cepa GCCV-7 incrementó ( $P < 0.05$ ) su contenido de toxinas (de  $55.63 \pm 21.83$  a  $103.22 \pm 43.29$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>), y fue la cepa con el mayor contenido de toxinas (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

El estudio de las interacciones bacterias-microalgas en *G. catenatum* ha tomado relevancia desde la última década y se han descrito varios aspectos como la producción autónoma de toxinas por parte de las bacterias y la intervención que tienen en (1) la síntesis de toxinas, (2) en el proceso reproductivo,

(3) la influencia directa o indirecta en el desarrollo de ciertos estadios del ciclo de vida de los dinoflagelados y (4) en el crecimiento (Bolch et al. 2011, 2017; Albinsson et al. 2014; Jauzein et al. 2015). Sin embargo, debido a la complejidad de las interacciones entre algas y bacterias es necesario comprender estas interacciones en cepas de diversas zonas geográficas y condiciones ambientales. En este trabajo se evaluó el efecto de un consorcio bacteriano en el crecimiento, abundancia, morfología, longitud de cadenas, perfil pigmentario y toxinas paralizantes en *G. catenatum* en 4 cepas de diferentes regiones de la costa del Pacífico frente a México.

Se ha reportado que 15 a 24 genotipos bacterianos integran la comunidad bacteriana asociada a las cepas de *G. catenatum* (Green et al. 2004, 2010). Sin embargo, a pesar de que la

comunidad es tan variable, estudios previos han concluido que el efecto de la comunidad bacteriana en el dinoflagelado se debe a la dominancia de 1 o 2 especies, no a la coexistencia de estas, debido a que, en cultivos mixtos, la bacteria dominante afecta el crecimiento del dinoflagelado e inhibe el crecimiento del resto de las bacterias asociadas (Albinsson et al. 2014). Se observaron 2 patrones de crecimiento en las curvas de crecimiento de *G. catenatum* (Fig. 1a-d) en presencia del consorcio bacteriano.

El primero es un mayor crecimiento del dinoflagelado, reflejado en una mayor abundancia. En la cepa GCCV-7 además de incrementar su abundancia, la fase de crecimiento exponencial se alcanzó en un mayor número de días y la tasa de crecimiento fue menor cuando se cultivó con el consorcio bacteriano (Fig. 1a). Esto coincide con lo reportado para cepas de *Alexandrium* spp. donde la presencia de bacterias prolongó el crecimiento exponencial, lo que moduló la disponibilidad de nutrientes con tasas de crecimiento menores que derivó de un letargo en el crecimiento (Hold et al. 2001). El segundo patrón que se observó fue la inhibición en el crecimiento en las cepas 62L y G7 de *G. catenatum* (Fig. 1c, d). En la cepa 62L se observó un descenso significativo en la abundancia en más del 90% con la adición del consorcio bacteriano. Alavi et al. (2001) y Matsumoto (2011) describieron una respuesta similar. Alavi et al. (2001) evaluaron el efecto de la interacción física en 4 cepas del dinoflagelado *Pfiesteria* sp. en presencia de un consorcio bacteriano conformado por 34 especies y obtuvieron una inhibición en el crecimiento de *Pfiesteria* sp., el cual volvió a crecer al re-aislar las células en ausencia del consorcio bacteriano. Por otro lado, Matsumoto (2011) evaluó el efecto de los filtrados celulares bacterianos de *Alcanivorax* sp. en *G. catenatum* y encontró

que inhibieron el crecimiento del dinoflagelado contrario a lo observado en experimentos con contacto celular, donde el crecimiento de *G. catenatum* fue mayor. Dicho comportamiento pudo deberse a la liberación de alguicidas al medio de cultivo por parte de las bacterias; sin embargo, ni Alavi et al. (2001) ni Matsumoto (2011) evaluaron dicho parámetro, pero sus resultados sugieren que la sustancia promotora del crecimiento no se exuda al medio de cultivo sino que las especies requieren estar en contacto para favorecer su crecimiento, además de que la dinámica de crecimiento que se establece depende de la especie de bacteria, lo que fomenta la formación de diversas asociaciones ecológicas (Skovgaard 2000).

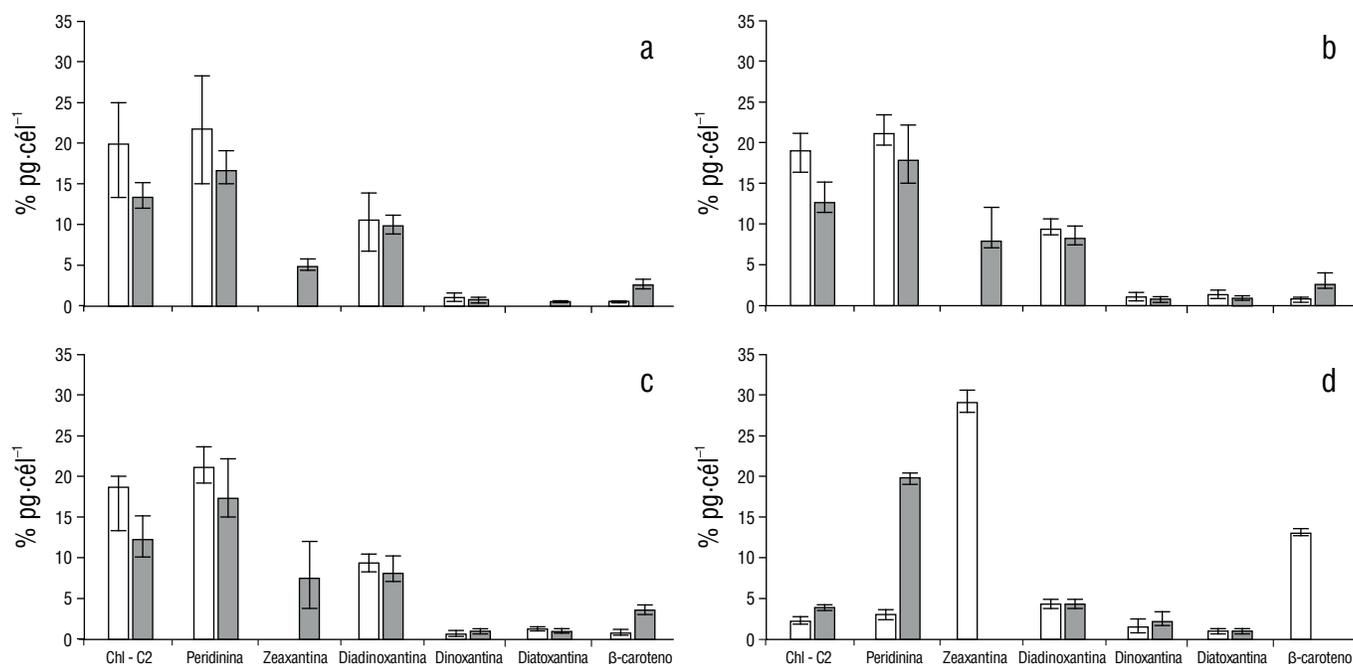
La longitud de las cadenas en *G. catenatum* es un indicador de condiciones de estrés, como la edad del cultivo (Blackburn et al. 1989, Band-Schmidt et al. 2004), la salinidad, la luz y las temperaturas extremas (Band-Schmidt et al. 2014; Vale 2015, 2017), las concentraciones limitantes de fosfatos y nitratos (Lin et al. 2022), y por alelopatía (Fernández-Herrera et al. 2016, 2021; Band-Schmidt et al. 2020). Se ha propuesto que las alteraciones en los patrones de las longitudes en el ambiente natural pueden afectar la velocidad de migración vertical de este dinoflagelado (Fraga et al. 1989, Vale 2015). El incremento en el porcentaje de células en cadena en presencia del consorcio bacteriano en este trabajo pudiera indicar que las bacterias promueven la formación de cadenas. La cepa G7 no presentó un incremento en el porcentaje de cadenas largas (Fig. 2d), esto pudiera deberse a que de esta cepa se aisló el consorcio bacteriano.

Varios estudios de la interacción bacteria-microalga se han basado en la influencia de las bacterias en la germinación de quistes de resistencia en *G. catenatum*. Células recién germinadas de *G. catenatum* requieren de la presencia de bacterias

**Tabla 2.** Perfil de toxinas paralizantes y contenido de toxinas de cepas de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano en la fase exponencial tardía.

Clave	N-sulfocarbamoyl	Decarbamoyl	Carbamoyl	Contenido de toxinas
	pg STXeq·cél <sup>-1</sup>			
GCMV-7	23.40 ± 3.81	15.35 ± 0.73	1.00 ± 0.08	39.74 ± 11.35
GCMV-7 + CB	21.94 ± 3.78	12.16 ± 0.52	1.24 ± 0.07	35.33 ± 10.36
GCCV-7	43.25 ± 6.99	10.53 ± 0.43	1.87 ± 0.10	55.63 ± 21.83
GCCV-7 + CB	84.03 ± 14.07	14.77 ± 0.71	4.41 ± 0.13	103.22 ± 43.29
62L	41.18 ± 6.87	84.24 ± 3.81	0.94 ± 0.08	126.35 ± 41.66
62L + CB	37.18 ± 6.65	20.71 ± 0.92	0.57 ± 0.08	58.47 ± 18.34
G7	0.01 ± 0.04	2.04 ± 0.16	1.15 ± 0.21	3.20 ± 1.02
G7 + CB	-	0.69 ± 0.05	1.06 ± 0.18	1.76 ± 0.54

+CB: con el consorcio bacteriano



**Figura 4.** Pigmentos de *Gymnodinium catenatum* en presencia y ausencia del consorcio bacteriano (CB). Cepas: (a) GCMV-7; (b) GCCV-7; (c) G7; (d) 62L. Barras blancas: sin CB. Barras grises: con CB. Líneas verticales: ds. No se incluye la clorofila *a*.

de los géneros *Marinobacter* sp. y *Brachy bacterium* sp. para sobrevivir y crecer (Bolch et al. 2011). En este estudio se formaron quistes temporales de *G. catenatum* al estar en contacto con el consorcio bacteriano. También se observaron cambios morfológicos en *G. catenatum* sugiriendo que estas alteraciones pudieran influir en su ciclo de vida: pérdida de flagelos, desarreglo en el citoplasma, en el cíngulo y sulcus, además de un núcleo evidente con cromosomas condensados, característico de la fusión de gametos (Fig. 3) previamente descritos por Figueroa et al. (2006, 2008). Dichas observaciones sustentan una de las hipótesis establecidas por los mismos autores que indica que los procesos sexuales se desencadenan como resultado de la adición de nutrientes, provenientes quizá de los exudados bacterianos.

Al exponer a *G. catenatum* a células de otras especies fitoplanctónicas o a sus filtrados también se observaron cambios en su morfología, tales como disminución en la longitud de cadenas celulares, formación de quistes temporales y lisis (Fernández-Herrera et al. 2016, 2021; Band-Schmidt et al. 2020), lo cual demostró que el contacto directo entre especies de fitoplancton también puede modificar la estructura de la población del dinoflagelado.

El perfil de pigmentos de *G. catenatum* está conformado por 8 pigmentos: clorofila *a*, clorofila *c2*, peridina, zeaxantina, diadinoxantina, dincoxantina, diatoxantina, y β-caroteno, coincidiendo con el perfil de pigmentos reportado por Hallegraeff et al. (1991). Debido a que la única variante en los experimentos fue la adición del consorcio bacteriano, se asume que la variación en el contenido de pigmentos se debió a la presencia/ausencia del consorcio; este último factor de

estrés modificó la capacidad fotosintética del dinoflagelado a través de la modificación en el contenido de pigmentos accesorios (Fig. 4).

El perfil de toxinas paralizantes de *G. catenatum* comprende al menos 3 docenas de análogos descritos en varias cepas y poblaciones geográficas, las cuales se caracterizan por el dominio de toxinas sulfocarbamoil que representan más del 85% molar, seguido por las decarbamoil y, finalmente, las carbamoil un porcentaje <1% (Negri et al. 2007, Band-Schmidt et al. 2019). A pesar de que se ha determinado que la presencia, ausencia y proporción de los análogos varía entre cepas, existe una alta similitud en el perfil de toxinas paralizantes entre los ecotipos, sugiriendo una baja variabilidad genética entre poblaciones (Cembella y Band-Schmidt 2018). En esta investigación, el perfil de toxinas de las cepas concuerda con reportes previos (Band-Schmidt et al. 2010). La mayoría de las cepas, con excepción de la cepa G7, presentaron una dominancia de toxinas sulfocarbamoil, y se registró una abundancia relativa superior al 70% molar. La cepa G7, se caracterizó por la dominancia de toxinas decarbamoil, seguidas por las sulfocarbamoil y carbamoil. Dicho perfil también se ha reportado en muestras ambientales de *G. catenatum* (Gárate-Lizárraga et al. 2006). Los análogos de saxitoxina del grupo de las carbamoil (GTX2/3) se encontraron en bajas proporciones, <2% del total, lo cual es una característica de la especie (Hallegraeff et al. 2011). En la cepa GCCV-7, la presencia del consorcio bacteriano incrementó el contenido de toxinas sulfocarbamoil y disminuyó el contenido de toxinas carbamoil; mientras que en las cepas 62L y G7, disminuyó el contenido de análogos decarbamoil (Tabla 2).

El contenido de toxinas de esta especie es relativamente bajo en comparación a otras especies, y se han reportado diferencias entre muestras ambientales de *G. catenatum* natural y muestras obtenidas de cepas de laboratorio, además de diferencias en la toxicidad con el origen de la cepa (Band-Schmidt et al. 2006, Negri et al. 2007). En este trabajo, la cepa con mayor contenido de toxinas fue la cepa de las costas de Michoacán seguida por las cepas de Bahía Concepción, Bahía de Mazatlán y, finalmente, la de Manzanillo con una amplia variación de  $1.76 \pm 0.54$  a  $103.22 \pm 43.29$  pgSTX eq·cél<sup>-1</sup>. Sin embargo, es importante señalar que el dato de una sola cepa de cada región geográfica es insuficiente para confirmar estas diferencias en el contenido de toxinas entre diversas regiones geográficas.

La adición del consorcio bacteriano no mostró un patrón claro en el contenido de toxinas de las cepas. El contenido de toxinas en la cepa GCCV-7 incrementó, mientras que en las cepas 62L y G7 disminuyó y en la cepa GCMV-7 no mostro cambios significativos. El contenido de toxinas en las cepas de *G. catenatum* aisladas de costas mexicanas ha sido variable, y se han registrado valores de 2 a 370 pgSTX eq·cél<sup>-1</sup> (Band-Schmidt et al. 2005, 2006; Fernández-Herrera et al. 2022). No se ha encontrado una relación clara con la temperatura (Band-Schmidt et al. 2014) ni con las proporciones de N:P (Bustillos-Guzmán et al. 2012, Hernández-Sandoval et al. 2022), lo cual sugiere que las diferencias son cepa-específicas. Solo en el caso de la exposición de *G. catenatum* a medios de cultivo de *Chattonella marina* y *Gymnodinium impudicum* hubo un incremento en el contenido de toxinas (Fernández-Herrera et al. 2022), lo cual sugiere que este incremento pudiera ser una estrategia de supervivencia de *G. catenatum* al estar en presencia de otras especies de fitoplancton.

Con la adición del consorcio bacteriano en *G. catenatum*, no se observó un efecto claro en el crecimiento, la abundancia, el perfil de toxinas y el contenido de toxinas, pero sí se observó un incremento en el número de células en cadena. Adicionalmente, se observaron cambios en la morfología celular. En presencia del consorcio bacteriano, en la mayoría de las cepas incrementó el contenido de pigmentos accesorios (zeaxantina, diatoxantina y  $\beta$ -caroteno), lo cual sugiere que las bacterias pudieran ser agentes estresantes para *G. catenatum* proporcionando nuevas perspectivas de interacción entre bacterias y dinoflagelados.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se financio con el proyecto institucional SIP (20231019) y los proyectos SEP-CONACyT (178227 y A1-S-14968). Se agradece al Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico, al CIBNOR con su PACE, al CONACyT (beca 21751) y a la Red Temática de Florecimientos Algales Nocivos por el apoyo económico recibido. Agradecemos a la Colección de Dinoflagelados Marinos del CIBNOR, a MC Rodríguez

Palacio de la UAM por proporcionarnos algunas de las cepas utilizadas y a Lic. Adriana Landa Blanco del departamento de extensión y divulgación Científica del CIBNOR por la edición de las figuras.

## REFERENCIAS

- Alavi M, Miller T, Erlandson K, Schneider R, Belas R. 2001. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environ Microbiol.* 3:380-396. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.0>
- Albinsson ME, Negri AP, Blackburn SI, Bolch CJS. 2014. Bacterial community affects toxin production by *Gymnodinium catenatum*. *PLoS ONE.* 9:e104623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104623>
- Alonso-Rodríguez R, Páez-Osuna F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture.* 219:317-336. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00509-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00509-4)
- Amin S, Küpper FC, Green DH, Harris WR, Carrano CJ. 2007. Boron binding by a siderophore isolated from marine bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J Am Chem Soc.* 129:478-479. <https://doi.org/10.1021/ja067369u>
- Azam F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science.* 280:694-696.
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, Lechuga-Devéze CH, Reinhardt K, Luckas B. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae.* 4(1):21-31. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.10.004>
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, Hernández-Sandoval FE, Núñez-Vázquez EJ, López-Cortés DJ. 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.002>
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vázquez E, Hernández-Sandoval, FE. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: a review. *Mar Drugs.* 8:1935-1961. <https://doi.org/10.3390/md8061935>
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, Morquecho L, Gárate-Lizárraga I, Alonso-Rodríguez R, Reyes-Salinas A, Erler K, Luckas B. 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. *J Phycol.* 42:757-768. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00234.x>
- Band-Schmidt CJ, Durán-Riveroll LM, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez EJ, Hernández-Sandoval FE, Ramírez-Rodríguez DV. 2019. Paralytic toxin producing dinoflagellates in Latin America: Ecology and Physiology (a review). *Front Mar Sci.* 6:42. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00042>
- Band-Schmidt CJ, Morquecho L, Lechuga-Devéze CH, Anderson DM. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J Plankton Res.* 26:1459-1470. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh133>

- Band-Schmidt CJ, Zumaya-Higuera MG, López-Cortés DJ, Leyva-Valencia I, Quijano-Scheggia SI, Hernández-Guerrero CJ. 2020. Allelopathic effects of *Margalefidinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum* in the growth of *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*. 96:101846. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101846>
- Blackburn SI, Bolch CJS, Haskard KA, Hallegraeff GM. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycol*. 40:78-87. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-1-78.1>
- Blackburn SI, Hallegraeff GM, Bolch CJ. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J Phycol*. 25:577-590. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00264.x>
- Bolch CJS, Bejoy TA, Green DH. 2017. Bacterial associates modify growth dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Front Microbiol*. 8:670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00670>
- Bolch CJ, Subramanian TA, Green HG. 2011. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) requires marine bacteria for growth. *J Phycol*. 47:1009-1022. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01043.x>
- Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ, Durán-Riveroll LM, Hernández-Sandoval FE, López-Cortés DJ, Núñez-Vázquez EJ, Cembella A, Krock B. 2015. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Mexican Pacific as revealed by LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A*. 32:1-15. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.1000978>
- Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ, López-Cortés DJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vázquez EJ, Hernández-Sandoval FE. 2012. Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gymnodinium catenatum* Graham del Golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. *Cienc Mar*. 38:101-117.
- Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ, López-Cortés DJ, Hernández-Sandoval FE, Núñez-Vázquez EJ, Gárate-Lizárraga I. 2013. Pastoreo del dinoflagelado *Noctiluca scintillans* sobre el dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *Gymnodinium catenatum*: ¿Elimina el pastoreo células durante un florecimiento? *Cienc Mar*. 39:291-302.
- Cembella A, Band-Schmidt CJ. 2018. *Gymnodinium catenatum*. Harmful algal species fact sheets. In: Shumway SE, Burkholder JM, Morton SL (eds.), *Harmful Algal Blooms: A compendium desk reference*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell. p. 605-611.
- Chen H. 2018. Emergency treatment and reflection of red tide event of *Gymnodinium catenatum* in Fujian Sea area in 2017. *J Fisheries Res*. 40(4):308-314.
- Cortés-Altamirano R, Alonso-Rodríguez R, Salas-de-León DA. 2019. Historical observations of algal blooms in Mazatlan Bay, Sinaloa, Mexico (1979-2014). *PLoS ONE*. 14(1):e0210631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210631>
- Day RW, Quinn GP. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecol Mon*. 59(4):433-463. <https://doi.org/10.2307/1943075>
- Durán-Riveroll L, Krock B, Cembella A, Peralta-Cruz J, Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ. 2017. Characterization of benzoyl saxitoxin analogs from the toxigenic marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by hydrophilic interaction liquid ion chromatography-tandem mass spectrometry. *Nat Prod Chem Res*. 5:275.
- Fernández-Herrera LJ, Band-Schmidt CJ, López-Cortés DJ, Hernández-Guerrero CJ, Bustillos-Guzmán JJ, Núñez-Vázquez E. 2016. Allelopathic effect of *Chattonella marina* var. *marina* (Raphidophyceae) on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Harmful Algae*. 51:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.009>
- Fernández-Herrera LJ, Band-Schmidt CJ, Zenteno-Savín T, Leyva-Valencia I, Hernández-Guerrero CJ, Hernández-Sandoval FE, Bustillos-Guzmán JJ. 2022. Changes in toxin production, morphology and viability of *Gymnodinium catenatum* associated to allelopathy of *Chattonella marina* var. *marina* and *Gymnodinium impudicum*. *Toxins*. 14:616. <https://doi.org/10.3390/toxins14090616>
- Fernández-Herrera LJ, Band-Schmidt CJ, Zenteno-Savín T, Leyva-Valencia I, Hernández-Guerrero CJ, Muñoz-Ochoa M. 2021. Cell death and metabolic stress in *Gymnodinium catenatum* induced by allelopathy. *Toxins*. 13:506. <https://doi.org/10.3390/toxins13070506>
- Figueroa RI, Bravo I, Ramilo I, Pazos Y, Moroño A. 2008. New life-cycle stages of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae): laboratory and field observations. *Aquat Microb Ecol*. 52:13-23. <https://doi.org/10.3354/ame01206>
- Figueroa RI, Garcés E, Ramilo I. 2006. Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *J Phycol*. 42:67-77. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00181.x>
- Fraga S, Gallagher SM, Anderson DM. 1989. Chain-forming dinoflagellates: an adaptation to red tides. In: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. New York (NY): Elsevier. p. 281-284
- Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Hernández-Sandoval F, Erler K, Luckas B. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles in net phytoplankton samples from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Mar Poll Bull*. 52:800-815. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.003>
- Green DH, Hart MC, Blackburn SI, Bolch CJS. 2010. Bacterial diversity of *Gymnodinium catenatum* and its relationship to dinoflagellate toxicity. *Aquat Microb Ecol*. 61:73-87. <https://doi.org/10.3354/ame01437>
- Green DH, Llewellyn LE, Negri AP, Blackburn SI, Bolch CJ. 2004. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microb Ecol*. 47:345-357. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00298-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00298-8)
- Grossart HP, Simon M. 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat Microb Ecol*. 47:163-176.
- Guillard RRL. 1973. Division rates. In: Stein JT (ed.), *Handbook of phycological methods*. Cambridge (UK): Cambridge University Press. p. 289-312.
- Hallegraeff GM. 1993. Review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycology*. 32:79-99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-2-79.1>
- Hallegraeff GM, Blackburn SI, Doblin MA, Bolch CJS. 2011. Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chain forming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*. 14:130-143. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.018>
- Hallegraeff GM, Nichols P, Volkman JK, Blackburn SI, Everitt DA. 1991. Pigments, fatty acids and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J Phycol*. 27(5):591-599. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00591.x>
- Hernández-Sandoval F, Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ, Núñez-Vázquez EJ, López-Cortés DJ, Fernández-Herrera LJ, Poot-Delgado CA, Moreno-Legorreta M. 2022. Effects of different N:P ratios on the growth, toxicity, and toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from the Gulf

- of California. *Toxins*. 14:501.  
<https://doi.org/10.3390/toxins14070501>
- Hernández-Sandoval FE, López-Cortés DJ, Band-Schmidt CJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vázquez EJ, Bustillos-Guzmán JJ. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica*. 19:245-256.
- Hold GL, Smith EA, Birkbeck TH, Gallacher S. 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 Microbiol Ecol*. 36:223-234.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00843.x>
- Hummert C, Ritscher M, Reinhardt K, Luckas B. 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.  
<https://doi.org/10.1007/BF02505576>
- Jauzein C, Evans AN, Erdner DL. 2015. The impact of associated bacteria on morphology and physiology of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 50:65-75.
- Kepner RL, Pratt JR. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Aquat Microb Ecol*. 54:603-615.  
<https://doi.org/10.1128/mr.58.4.603-615.1994>
- Kirchman D, Sigda J, Kapuscinski R, Mitchell R. 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Appl Env Microb*. 44:376-382.
- Lin Z-R, Geng H-X, Zhang Q-C, Chen Z-F, Dai L, Yu R-C. 2022. Toxin production of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from the East China Sea. *Harmful Algae*. 113:102188.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102188>
- MacKenzie LA. 2014. The risk to New Zealand shellfish aquaculture from paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *N Z J Mar Freshw Res*. 48:430-465.  
<https://doi.org/10.1080/00288330.2014.911191>
- Matsumoto M. 2011. Aspects of the interaction between the marine bacterium *Alcanivorax* DG881 and the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [dissertation]. [Australia]: University of Tasmania. 96 p.
- Mayali X, Azam F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J Eukaryot Microbiol*. 51:139-144.
- Medina-Elizalde J, García-Mendoza E, Turner AD, Sánchez-Bravo YA, Murillo-Martínez R. 2018. Transformation and depuration of paralytic shellfish toxins in the geoduck clam *Panopea globosa* from the Northern Gulf of California. *Front Mar Sci*. 5:335.  
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00335>
- Montoura RFC, Repeta D. 1997. Calibration methods for HPLC. In: SW Jeffrey, Mantoura RFC, Wright SW (eds.), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris (France): UNESCO. p. 407-428.
- Moran MA, Miller WL. 2007. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nat Rev Microbiol*. 5:792-800.  
<https://doi.org/10.1038/nrmi-cro1746>
- Negri AP, Bolch CJS, Geier S, Green DH, Park T-G, Blackburn SI. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*. 6:774-780.
- Noman MA, Sun J, Gang Q, Guo C, Islam MS, Li S, Yue J. 2019. Factors regulating the phytoplankton and tintinnid microzooplankton communities in the East China Sea. *Cont Shelf Res*. 181:14-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.csr.2019.05.007>
- Palomares-García R, Bustillos-Guzmán J, Band-Schmidt CJ, López-Cortés D, Luckas B. 2006. Efecto del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* sobre el consumo, la producción de huevos y la tasa de eclosión del copépodo *Acartia clausi*. *Cienc Mar*. 32:111-119.
- Paul C, Pohnert G. 2011. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis. *PLoS ONE*. 6:e21032.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021032>
- Rippka R, Waterbury JB, Stanier RY. 1981. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In: Starr P, Stol P, Tripper H, Balows A, Sahegel H (eds.), *The prokaryotes a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. p. 212-220.
- Rooney-Varga JN, Giewat MW, Savin MC, Sood S, LeGresley M, Martin JL. 2005. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *FEMS Microb Ecol*. 49:75-163.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-003-1057-0>
- Seibold A, Wichels A, Schütt C. 2001. Diversity of endocytic bacteria in the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *Aquat Microb Ecol*. 25:229-235.
- Sherr EB, Caron DA, Sherr BF. 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. 213-228. In: Kemp P, Sherr B, Sherr E, Cole J (eds.), *Current Methods in Aquatic Microbial Ecology*. New York (NY): Lewis Publishing Company.
- Skovgaard A. 2000. A phagotrophically derivable growth factor in the plastidic dinoflagellate *Gyrodinium resplendens* (Dinophyceae). *J Phycol*. 36:1096-1078.
- Thronsen J. 1979. Special methods-micromanipulators. In: Stein RJ (ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge (UK): Cambridge University Press. p. 139-144.
- Vale P. 2015. Effects of light and salinity stresses in production of mycosporine-like amino acids by *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Photochem Photobiol*. 91:1112-1122.
- Vale P. 2017. Influence of static magnetic fields in phototaxis and osmotic stress in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Gen Physiol Biophys*. 36:235-245.
- Vidussi F, Claustre H, Bustillos-Guzmán JJ, Cailleau C, Marty JC. 1996. Rapid HPLC method for determination of phytoplankton chemotaxonomic pigments: separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J Plank Res*. 18:2377-2382.
- Vives CR, Schallenberg C, Strutton PG, Westwood KJ. 2022. Iron and light limitation of phytoplankton growth off East Antarctica. *J Mar Syst*. 234:103774.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2022.103774>
- Wang H, Tomasch J, Jarek M, Wagner-Döbler I. 2014. A dual-species co-cultivation system to study the interactions between *Roseobacters* and dinoflagellates. *Front Microbiol*. 5:00311.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00311>
- Yu RC, Hummert C, Luckas B, Qian PY, Zhou MJ. 1998. Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia*. 48:671-676.  
<https://doi.org/10.1007/BF02467597>
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis* (4th ed.). Saddle River (NJ): Prentice-Hal. 1046 p.
- Zheng L, Lin H, Balaji-Prasath B, Su Y, Wang Y, Zheng Y, Yu G. 2023. A novel algicidal properties of fermentation products from *Pseudomonas* sp. Ps3 strain on the toxic red tide dinoflagellate species. *Front Microbiol*. 14:1146325.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146325>