

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**



**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**EFFECTOS DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA PRODUCIDA  
POR EL OSTIÓN *CRASSOSTREA GIGAS*, EN LAS TASAS DE  
CRECIMIENTO DEL DINOFLAGELADO *LINGULODINIUM POLYEDRUM***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**JOSÉ ERNESTO SAMPEDRO AVILA**

**Ensenada, Baja California, México**

**Enero 2017**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

EFFECTOS DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA PRODUCIDA  
POR EL OSTIÓN *CRASSOSTREA GIGAS*, EN LAS TASAS DE  
CRECIMIENTO DEL DINOFLAGELADO *LINGULODINIUM POLYEDRUM*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

JOSÉ ERNESTO SAMPEDRO AVILA

APROBADA POR



\_\_\_\_\_  
Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre  
Directora de tesis



\_\_\_\_\_  
Dr. Ramón Cajal Medrano  
Sinodal



\_\_\_\_\_  
Dr. Helmut Maske  
Sinodal

## **Dedicatoria**

A mi eterna familia

## **Agradecimientos**

A mi directora, Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre, por su guía desde el ingreso a la maestría y hasta la culminación de esta tesis. Por su enseñanza sobre esta línea de investigación, y sobre la aplicación a convocatorias de carácter científico. Por todo su trabajo, necesario para lograr este proceso, y su confianza al apoyarme en mis intereses académicos.

A mi sinodal, Dr. Helmut Maske, por su apoyo con el espacio y material para realizar los experimentos. Por facilitar la instrumentación y por su instrucción para realizar las mediciones. Por sus esenciales ideas para el diseño del proyecto de tesis. Por su disposición para ayudarme a resolver preguntas.

A mi sinodal, Dr. Ramón Cajal Medrano por su enseñanza dentro y fuera del aula de clases. Por sus aportaciones en el diseño de los experimentos, de la interpretación de resultados y en la resolución de problemáticas con los cultivos. Por facilitar el material y su instrucción para la preparación y lectura de muestras de bacterias.

A todos los compañeros del Laboratorio de Ecología de Microbios Marinos en CICESE, además de a mi comité de tesis, a César Almeda, Ricardo Cruz, Josué Villegas, Cristian Hakspiel, Manet Peña, Esperanza Valdez, Valeria Ahumada, Karina Hernández, Paola Valdés, Adolfo López y Eisenia Guardado. Por su apoyo técnico en el laboratorio, por su participación durante las reuniones, y por todas sus aportaciones que enriquecieron mis resultados y mi forma de trabajo.

Al Prof. Gustaaf Hallegraeff, por recibirme para la estancia académica y brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por estar al pendiente del progreso de los experimentos. Al Dr. Juan José Dorantes Aranda, por su gran dedicación al enseñarme técnicas de laboratorio y el procesamiento de resultados de la estancia. Por todo su trabajo para ayudarme a realizar los experimentos.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza, por brindarme la cepa de cultivo del Laboratorio de Cultivo de Microalgas en el IIO. Por su enseñanza y la motivación para trabajar con cultivos de microalgas.

Al Dr. Pablo Jorgensen y la Dra. Clara Hereu por su enseñanza sobre el diseño y elaboración de experimentos, y por sus valiosos comentarios a lo largo del desarrollo de mi maestría.

A toda mi familia, amigos, profesores, compañeros y toda persona que de alguna forma contribuyó para que cumpliera este objetivo, que yo solo no hubiera logrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para el estudio de maestría. A la RedFAN de CONACyT por el financiamiento para su curso emblemático y por la beca de movilidad en la convocatoria de 2015.

A la Facultad de Ciencias Marinas por todo el apoyo para la realización de la maestría y por la beca para la estancia académica en Australia.

A los proyectos PROMEP NPTC MCRuiz 384, Convocatoria Interna Especial MCRuiz 385 y Fisheries Research and Development Corporation 2014/032

Al NF-POGO Alumni Network por la aceptación y financiamiento para el Training Programme 2015.

## Índice general

Dedicatoria .....	i
Agradecimientos .....	ii
Índice general .....	iii
Índice de figuras .....	v
Índice de tablas.....	vii
Resumen .....	1
Introducción.....	2
1. Fitoplancton generador de florecimientos nocivos.....	2
2. Mixotrofia como estrategia de nutrición para el fitoplancton .....	3
3. Migración vertical de dinoflagelados .....	4
4. Compuestos que inhiben el crecimiento de fitoplancton .....	4
Justificación.....	6
1. Efecto de los cultivos marinos en la generación de FAN .....	6
2. Florecimientos de <i>A. tamarensis</i> en la costa este de Tasmania, Australia .....	6
3. Florecimientos de <i>L. polyedrum</i> en la costa del Pacífico de Baja California, México .....	7
Hipótesis .....	8
Objetivo general .....	8
Objetivos particulares.....	8
Materiales y métodos .....	9
1. Experimentos de <i>A. tamarensis</i> con MOD producida por ostiones.....	9
2. Experimentos de <i>L. polyedrum</i> con MOD producida por ostiones.....	11
3. Ajuste de la fluorescencia <i>in vivo</i> de <i>A. tamarensis</i> y <i>L. polyedrum</i> a curvas de crecimiento, cálculo de sus tasas de crecimiento específico y análisis estadísticos.....	15
Resultados .....	17
1. Fluorescencia <i>in vivo</i> y ajuste a curvas de crecimiento de los experimentos con <i>Alexandrium tamarensis</i> .....	17
2. Fluorescencia <i>in vivo</i> y ajuste a curvas de crecimiento de los experimentos con <i>Lingulodinium polyedrum</i> .....	19
3. Análisis estadísticos de las tasas de crecimiento de <i>A. tamarensis</i> y <i>L. polyedrum</i> .....	23

<b>Discusión .....</b>	<b>27</b>
<b>1. Crecimiento de <i>Alexandrium tamarense</i> en los tratamientos con MOD producida por los ostiones.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Inhibición de <i>L. polyedrum</i> en los tratamientos con MOD producida por los ostiones..</b>	<b>28</b>
<b>3. Tasas de crecimiento de <i>A. tamarense</i> y <i>L. polyedrum</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>33</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Diseño experimental de los recipientes con 1.5 L de agua en la que se mantuvieron ostiones, la cual se utilizó para cultivar <i>A. tamarense</i> . Los tratamientos experimentales se detallan en la Tabla I. A) Tratamiento OST; B) Tratamiento ONA; C) Control TET; D) Control AM. ....	9
Figura 2. Matraz Erlenmeyer en el que se suplementó el agua, con vitaminas y metales traza, en la que se mantuvieron los ostiones. Se transfirieron por triplicado 1.5 mL del agua a las microplacas de 24 pozos, para cultivar <i>A. tamarense</i> . ....	11
Figura 3. Diseño experimental de los recipientes con 1.5 L de agua en la que se mantuvieron ostiones, la cual se utilizó para cultivar <i>L. polyedrum</i> . Los tratamientos experimentales se detallan en la Tabla I. A) Tratamiento OST; B) Tratamiento ONA; C) Control TET; D) Control AM. ....	12
Figura 4. Valores de pH en el agua para el período de 24 horas durante el cual se mantuvieron los ostiones. Se realizaron las mediciones en cada tratamiento. ....	13
Figura 5. Valores de irradianza ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) para las horas de luz del período durante el cual se mantuvieron los ostiones. Se realizaron las mediciones en los extremos del arreglo de los recipientes y entre cada par de estos recipientes. ....	13
Figura 6. Tubos de ensayo en los que por quintuplicado se transfirieron 10 mL del agua en la que se mantuvieron los ostiones, y que fue suplementada con vitaminas para cultivar <i>L. polyedrum</i> . ....	14
Figura 7. Valores de fluorescencia <i>in vivo</i> de <i>A. tamarense</i> cultivado en cuatro tratamientos experimentales preparados con dos períodos diferentes de mantenimiento de ostiones. Las barras horizontales representan la desviación estándar. A) Tratamientos preparados con agua en la que se mantuvieron ostiones durante un día. B) Tratamientos de agua en la que se mantuvieron ostiones durante tres días. ....	17
Figura 8. Ajustes libres de modelo de los valores de fluorescencia <i>in vivo</i> de los cultivos de <i>A. tamarense</i> , a curvas de crecimiento con <i>splines</i> cúbicos suavizados con un parámetro de 0.5. A) Ajustes del experimento con agua de mar en la que se mantuvieron ostiones por 1 día. B) Ajustes del experimento con agua de mar en la que se mantuvieron ostiones por un día. C) Ajustes de los promedios del experimento en el que se mantuvieron los ostiones por un día. D) Ajustes de los promedios del experimento en el que se mantuvieron los ostiones por tres días. ....	18
Figura 9. Valores de fluorescencia <i>in vivo</i> de <i>L. polyedrum</i> cultivado en cuatro tratamientos experimentales de agua en la que se mantuvieron ostiones durante 1 día. Las barras horizontales representan la desviación estándar. A) Primera repetición del experimento. B) Segunda repetición del experimento. ....	20

**Figura 10. Ajustes libres de modelo de los valores de fluorescencia *in vivo* de los cultivos de *L. polyedrum*, a curvas de crecimiento con *splines* cúbicos suavizados con un parámetro de 0.5. A) Ajustes de la primera repetición del experimento. B) Ajustes de la segunda repetición del experimento. C) Ajustes de los promedios de la primera repetición del experimento. D) Ajustes de los promedios de la segunda repetición del experimento. .... 21**

**Figura 11. Gráfica de los valores de los valores de fluorescencia *in vivo* de cada cultivo del trabajo, en función de la densidad celular determinada para los mismos cultivos..... 22**

**Figura 12. Probabilidad y estadística de las tasas de crecimiento específico de los experimentos (n=32). A) Histograma de frecuencias de las tasas de crecimiento específico de todas las muestras. B) Histograma de frecuencias de las tasas de crecimiento específico transformadas a la escala z. C) Gráfica Q-Q de las tasas de crecimiento específico. D) Gráfica de cajas y bigotes de las tasas de crecimiento por tratamiento experimental. .... 24**

## Índice de tablas

Tabla I. Tratamientos de agua en la que se mantuvieron los ostiones, para cultivar los dinoflagelados <i>A. tamarense</i> y <i>L. polyedrum</i> . Los tratamientos para <i>A. tamarense</i> fueron iguales para los periodos de mantenimiento de los ostiones de un día (1d) y tres días (3d). Los tratamientos para <i>L. polyedrum</i> fueron idénticos para la primera (1ra) y la segunda repetición del experimento (2da). .....	10
Tabla II. Tasas de crecimiento específico de todos los experimentos con ambas especies de dinoflagelado. Los valores para cada tratamiento representan la tasa de crecimiento específica ( $d^{-1} \pm SD$ ). 1d = Experimento en el que se mantuvieron los ostiones durante un día. 3d = Experimento en el que se mantuvieron los ostiones durante tres días. 1ra = Primera repetición del experimento. 2da = Segunda repetición del experimento. n = número de réplicas del tratamiento. ....	19
Tabla III. Comparaciones múltiples con la prueba t de Student de las tasas de crecimiento para todos los tratamientos evaluados. ....	25
Tabla IV. Comparaciones múltiples con la prueba Wilcoxon de las tasas de crecimiento para todos los tratamientos evaluados. ....	26

## Resumen

Para conocer los efectos de la materia orgánica disuelta (MOD) excretada por ostiones en el crecimiento de dinoflagelados, se mantuvieron en laboratorio seis ejemplares de *Crassostrea gigas* de Tasmania, Australia y otros seis de Bahía Falsa, Baja California, México, durante periodos de 1 y 3 días. Tres ostiones de cada sitio fueron alimentados una vez al día y los otros tres se mantuvieron en inanición (ONA). El agua en la que se mantuvieron los ostiones de Tasmania se utilizó para cultivar una cepa australiana de *Alexandrium tamarense* (suplementada con vitaminas y metales traza, n=3) y el agua de los ostiones de Bahía Falsa para *Lingulodinium polyedrum* (con metales traza, n=5). Se evaluaron los cultivos por fluorescencia *in vivo* y se ajustaron los datos a curvas de crecimiento *spline* libres de modelo, para calcular tasas de crecimiento específico ( $\mu$ ). *A. tamarense* presentó tasas de crecimiento significativamente mayores (Wilcoxon,  $\alpha = 0.05$ ) al cultivarse en agua de ostiones en inanición ( $0.07 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ ), que con agua de ostiones que fueron alimentados ( $0.01 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ ). Además, este dinoflagelado no creció en controles de agua en la que hubo ostiones. Los resultados sugieren que la MOD de los ostiones promovió el crecimiento de *A. tamarense*, especialmente de los ostiones en inanición. *L. polyedrum* no creció en el agua de los ostiones y disminuyó su motilidad, pero en los controles tuvo tasas de crecimiento significativamente mayores ( $0.12 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ) que las de *A. tamarense*. Probablemente los ostiones y su MOD estén asociados a compuestos, como los biosurfactantes, que inhibieron el crecimiento y la motilidad de *L. polyedrum*. Este trabajo explora una aproximación para investigar el rol de la ostricultura en la generación de florecimientos nocivos de dinoflagelados, y sienta las bases para identificar qué compuestos asociados a esta actividad podrían inhibir los FAN.

Palabras clave: Dinoflagelados; mixotrofia; tasa de crecimiento específico; motilidad; biosurfactantes; ostricultura

## Introducción

### 1. Fitoplancton generador de florecimientos nocivos

Desde las exploraciones antiguas del océano se han observado fenómenos de decoloración del agua (Darwin, 1839), a los que popularmente se les conoce como *mareas rojas*. Sin embargo, ahora se sabe que estos procesos pueden presentar diferentes tonalidades (o ninguna) y que no son propiamente mareas, por lo que su nombre actual más aceptado es el de *florecimientos algales nocivos* (FAN). Los FAN son eventos en los que una o más poblaciones de fitoplancton crecen a tal magnitud, que causan daños en ecosistemas acuáticos y/o en el ámbito social. La definición de estos eventos ha carecido de precisión en la literatura, ya que es común que sólo se puedan definir cualitativamente, con términos como crecimiento “masivo”, “explosivo”, “excepcional”, etc. (Smayda, 1997a). El criterio que se suele considerar para definir un florecimiento es la desviación en la biomasa o en el tamaño de una población de fitoplancton con respecto a su ciclo normal (Parker, 1987; Richardson, 1997), que es la variación promedio de una especie y en un sitio particular, a lo largo del año. La ocurrencia de un florecimiento depende de la especie, de la temporada y de la región, no sólo de la cantidad de biomasa o densidad (Smayda, 1997b). En la literatura se han utilizado diferentes valores como referencias de escenarios particulares para considerar cierta abundancia de fitoplancton como un florecimiento, tanto en su densidad celular ( $1000 \text{ células mL}^{-1}$ ; (Kim et al., 1993) como en la concentración de clorofila en el agua ( $>100 \text{ mg clorofila m}^{-3}$ ; Tett, 1987). Smayda (1997) argumenta que una población o comunidad de fitoplancton puede considerarse como florecimiento, independientemente de que alcance una alta densidad, sino con el hecho de que el crecimiento del fitoplancton se eleve algunos órdenes de magnitud sobre la línea base. Los florecimientos son comúnmente expresados en biomasa de la comunidad y cantidad de clorofila, sin embargo, esto no permite visualizar que los efectos en la red trófica son particulares para cada especie de generadora de un florecimiento.

Los clásicos florecimientos de primavera dominados por diatomeas en zonas templadas fueron en un inicio los más estudiados (Margalef, 1978), mientras que otros florecimientos a lo largo del año fueron menos atendidos, incluyendo a los generados por otros grupos filogenéticos. Los FAN en particular, pueden ser generados por especies pertenecientes a diversos grupos: Diatomeas, cianofitas, coccolitofóridos, rafidofitas y dinoflagelados (Granéli and Turner, 2006).

Los efectos que pueden provocar los FAN en ecosistemas acuáticos varían según la especie de fitoplancton. Algunos ejemplos de daños en los ecosistemas son la deficiencia de oxígeno disuelto (condiciones de hipoxia y anoxia), el sombreado a comunidades bentónicas, la obstrucción de branquias de peces y la transferencia de toxinas a niveles tróficos superiores (Smayda, 1997a). Algunas especies de fitoplancton producen toxinas con efectos adversos en animales acuáticos y en la salud humana, son llamadas algas nocivas aunque se encuentren en densidades celulares

bajas (GEOHAB, 2006). Existen alrededor de 150 especies de fitoplancton consideradas nocivas (Landsberg, 2002). En los últimos años se ha prestado más atención a estos eventos, debido a una tendencia en el incremento de su intensidad, amplitud y frecuencia a nivel global (Anderson, 1995; Hallegraeff, 1993; Smayda, 1990). Los FAN se inician y se mantienen debido a una combinación de factores biológicos y químicos, que se regulan por los procesos físicos del océano (Granéli and Turner, 2006). La tasa de *A. tamarense* en particular, se puede controlar por la disponibilidad de nitrato, mientras que su biomasa máxima se controla por la disponibilidad de fosfato (Fauchot et al., 2005). Florecimientos de *L. polyedrum* han sido favorecidos por la abundancia de vitamina B<sub>12</sub> en el agua (Carlucci, 1967; Panzeca et al., 2009; Pena-Manjarrez et al., 2009), dependencia que se ha comprobado en laboratorio (Cruz-López, 2014).

Las tasas de crecimiento son un parámetro útil para comparar medios de cultivo o conocer la contribución de muestras de agua para los requerimientos de fitoplancton. La tasa de crecimiento es un indicio de la salud del organismo en ese medio, sin embargo, este parámetro no siempre coincide con el de la biomasa máxima del cultivo (Andersen, 2005). La tasa de crecimiento se puede evaluar por medio de la fluorescencia *in vivo* del cultivo, que es directamente proporcional a su densidad celular y funciona como un *proxy* de este valor (Brand et al., 1981).

Los dinoflagelados componen uno de los grupos más abundantes de fitoplancton. Estos organismos son productores primarios dominantes en océanos tropicales, con tasas máximas de crecimiento ( $1 - 2 \text{ d}^{-1}$ ; Smayda, 1997b) durante el final de la primavera, y también se encuentran en menores abundancias en zonas templadas y subárticas (Granéli and Turner, 2006). Los dinoflagelados tienen requerimientos fisiológicos esenciales para su crecimiento poblacional. Los factores requeridos por estos organismos que han sido más estudiados son la luz, los nutrientes y la temperatura. Algunas características que diferencian a este grupo y que se pueden considerar como ventajas competitivas, son la mixotrofia y la migración vertical (Granéli and Johansson, 2003).

## **2. Mixotrofia como estrategia de nutrición para el fitoplancton**

El concepto general dentro del cual se tiene al fitoplancton es que obtiene la energía que necesita para sus funciones fisiológicas por medio de la fotosíntesis, proceso en el que se utiliza la energía solar para transformar moléculas inorgánicas a orgánicas (Lalli and Parsons, 1995). Sin embargo, entre los diferentes grupos de fitoplancton existen especies que además de la fotosíntesis, son capaces de consumir materia orgánica directamente, lo que resulta en que intervengan en otros niveles tróficos además de ser productores primarios (Cloern and Dufford, 2005; Sanders and Porter, 1988). A estos organismos que pueden realizar autotrofia y heterotrofia, se les conoce como mixótrofos. Diferentes especies pueden consumir materia orgánica de forma particulada y/o disuelta. Se le llama fagotrofia a la ingesta de otros organismos o de partículas orgánicas no vivas,

el fitoplancton digiere este material en vacuolas especializadas (revisado en Burkholder et al., 2008). A diferencia de organismos heterótrofos, el fitoplancton mixótrofo además de mostrar las vacuolas para fagotrofia, conserva plástidos que contienen pigmentos para realizar fotosíntesis a la vez.

La osmotrofia es la obtención de moléculas orgánicas disueltas en el agua por medio de ósmosis o por adquisición directa (Granéli and Turner, 2006). Se ha demostrado el consumo de carbono orgánico disuelto por diferentes especies del género *Alexandrium* en forma de urea (Chang and McClean, 1997; Collos et al., 2004; Dyrman, S. T. and Anderson, 2003; Leong et al., 2004; Leong and Taguchi, 2004), sustancias húmicas (Carlsson et al., 1999; Cawley et al., 2013; Doblin et al., 2001) y dextranos de alto peso molecular (Legrand and Carlsson, 1998).

*Lingulodinium polyedrum* también se ha reportado como mixótrofo, al consumir materia orgánica en forma particulada y disuelta. Este dinoflagelado puede depredar sobre células de *Isochrysis galbana*, de 8 especies de dinoflagelados más pequeños (incluso a *A. tamarense*), una criptofita (Jeong et al., 2005) y *Synechococcus* (Jeong et al., 2005). Un florecimiento de *L. polyedrum* en la costa del sur de California fue sustentado por urea como fuente de N (Kudela and Cochlan, 2000).

### **3. Migración vertical de dinoflagelados**

Uno de los rasgos ecológicos que caracterizan a los dinoflagelados de entre otros grupos de fitoplancton, es la migración vertical. Estos organismos pueden desplazarse a lo largo de la columna de agua, hasta la profundidad a la cual encuentran un balance óptimo en los factores ambientales. Esta adaptación constituye una ventaja ecológica para los dinoflagelados sobre otros organismos que no tienen comportamiento de nado. En aguas estratificadas, los dinoflagelados pueden aprovechar la luz y dióxido de carbono que se encuentra cerca de la superficie durante el día, y pueden migrar a través de la piconclina durante la noche para buscar nutrientes (Eppley et al., 1968; Kamykowski, 1979; Santos and Carreto, 1992). Este mecanismo se define como migración vertical diurna (Pearre, 2003). El dinoflagelado *A. tamarense* se mantiene en la profundidad en la que la luz sea de  $300 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y puede migrar durante la noche para alcanzar el reservorio profundo de nitrato (Fauchot et al., 2005). Se han reportado dinoflagelados que migran hasta el fondo para aprovechar los nutrientes que se encuentran en el agua intersticial (Schaeffer et al., 2009; Sinclair et al., 2006). *L. polyedrum* tiene una velocidad de migración vertical de  $278 \mu\text{m s}^{-1}$ , que le permite alcanzar la profundidad de 12 m en un periodo de medio día (Smayda, 2010). La velocidad de nado de este dinoflagelado en laboratorio llega hasta  $400 \mu\text{m s}^{-1}$ , mientras que la especie *Alexandrium catenella* se registra en  $105 \mu\text{m s}^{-1}$  (Smayda, 2010).

### **4. Compuestos que inhiben el crecimiento de fitoplancton**

El aumento reciente del interés por los FAN ha promovido que se investiguen los compuestos químicos que pueden ser utilizados para controlar y mitigar estos eventos. Algunos ejemplos de compuestos que se han reportado con efectos adversos sobre especies de fitoplancton nocivo son el sulfato de cobre, compuestos de cisteína, hipoclorito de sodio, ozono, peróxido de hidrógeno y diferentes tipos de surfactantes (Revisado en Secher, 2009). Los surfactantes son moléculas compuestas por fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas, que reducen la tensión superficial o interfacial entre líquidos, sólidos y gases (Sun et al., 2004b). Los surfactantes forman microemulsiones en las cuales un hidrocarburo se puede disolver en agua (Desai and Banat, 1997).

El efecto de los surfactantes en las especies de fitoplancton depende del grosor y la composición de la pared celular de la especie (Ukeles, 1965). Se ha sugerido que el efecto de los surfactantes en el fitoplancton es debido a que el compuesto penetra en la membrana celular y provoca una fuga de material citoplasmático, que hace que la célula se hinche y eventualmente se lise (Baek et al., 2003). Especies con pared celular rígida son menos susceptibles a dañarse como efecto de los surfactantes (Gustafsson et al., 2009). Además de afectar el crecimiento de fitoplancton, algunos biosurfactantes inhiben también su motilidad, como los cocamidopropyles, ramnolípidos y soforolípidos (Baek et al., 2003; Gustafsson et al., 2009; Sun et al., 2004a).

Algunos surfactantes se producen sintéticamente y otros llamados biosurfactantes son producidos por organismos. Los biosurfactantes pueden provenir de microorganismos y macro-, de todos los dominios (Jackson et al., 2015). Las bacterias marinas pueden producir algunos biosurfactantes (Desai and Banat, 1997), las cuales mantienen interacciones con el fitoplancton por ser el mayor aporte de MOD para sus requerimientos (Becker et al., 2014). Además, existen diversos géneros de levaduras conocidas como productoras de soforolípidos (Mulligan et al., 2010), y algunos de estos taxa de levaduras se pueden asociar con moluscos bivalvos (Buck et al., 1977; de Araujo et al., 1995).

## Justificación

### 1. Efecto de los cultivos marinos en la generación de FAN

En la actualidad existe controversia en relación al impacto de la acuicultura marina en los ecosistemas naturales. La eutrofización, aporte excesivo de nutrientes como resultado de actividades humanas, se ha analizado como un detonador de FAN (GEOHAB, 2006). Se ha observado menor impacto de cultivos de moluscos bivalvos que de peces sobre comunidades bentónicas y en la columna de agua (Crawford et al., 2003; La Rosa et al., 2002). Debido a que los moluscos bivalvos se alimentan por filtración de material particulado en suspensión, estos organismos son capaces de reducir la abundancia de fitoplancton en un sitio (Dupuy et al., 2000; Lucas et al., 1987). Sin embargo, las excreciones particuladas y disueltas de los bivalvos, pueden ser una fuente de nutrientes inorgánicos y orgánicos que pueden ser aprovechados por el fitoplancton para su crecimiento (Baudinet et al., 1990; Prins et al., 1998; Weiss et al., 2002). Solamente en un aproximado del 7% de los ecosistemas con granjas de bivalvos que se han evaluado, se ha reportado eutrofización (Burkholder and Shumway, 2011).

Entre los compuestos inorgánicos que se conoce que excretan los ostiones son  $\text{NH}_4$  ( $0.64 \text{ P h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) y  $\text{PO}_4$  ( $5.40 \mu\text{mol N h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ; Mao et al., 2006), y los compuestos orgánicos son ácido úrico ( $0.028 \mu\text{mol d}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ), urea ( $0.318 \mu\text{mol d}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) y aminoácidos ( $0.194 \mu\text{mol d}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ; Hammen, 1969). En particular, la cantidad de  $\text{NH}_4$  que excretan los moluscos depende las condiciones ambientales, pero se ha encontrado que es un producto final de la catálisis de proteínas (Bayne and Newell, 2013; Bayne and Scullard, 1977). El incremento de la excreción de amonio durante la inanición es común, debido a que los organismos son obligados al catabolismo de proteínas (Bayne and Newell, 2013). Durante invierno y primavera, individuos de mejillones pequeños reducen su excreción de  $\text{NH}_4$  como resultado de su dependencia de carbohidratos como energía para su metabolismo, mientras que los organismos más grandes excretan más  $\text{NH}_4$  por su dependencia de proteínas (Bayne and Scullard, 1977). Otro ejemplo con ostiones es sobre la excreción de aminoácidos para el ajuste osmótico

### 2. Florecimientos de *A. tamarensis* en la costa este de Tasmania, Australia

En octubre y noviembre de 2012 ocurrió un FAN de *A. tamarensis* en Tasmania, Australia, a más de 200 km de la costa (Campbell et al., 2013). Un cargamento de mejillones que fue probado por las autoridades de importación de Japón resultó con niveles por encima de los límites permisibles de toxinas parálíticas por consumo de mariscos (PST, por sus siglas en inglés). Posteriormente otras especies de moluscos y crustáceos también se contaminaron con las toxinas. Aunque otros animales de importancia pesquera fueron evaluados y resultaron con niveles bajos de las toxinas, el gobierno japonés estableció un régimen de prueba para toda la importación de moluscos de

Australia. Este incidente afectó la imagen del producto marino australiano, y causó una pérdida de 23 millones de dólares australianos a la economía de Tasmania (Hallegraeff, comunicación personal). Además, este evento afectó las actividades recreativas y económicas por cierre del área durante 3 a 6 meses. El FAN se generó a lo largo de la costa este de Tasmania, donde se encuentran distribuidas las granjas de ostiones y mejillones (en Spring Bay) del estado. Un evento similar de la misma especie recurrió en el año 2015, lo que confirma la importancia de estudiar las causas para que se generen FAN en esta región utilizada para el consumo de moluscos bivalvos.

### **3. Florecimientos de *L. polyedrum* en la costa del Pacífico de Baja California, México**

En la Bahía de Todos Santos, México, se reportaron concentraciones altas de ácido okadaico y las toxinas DTX2 y PTX2 en tejido de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), desde julio a octubre de 2012, que coincidieron con densidades celulares altas de especies de *Dinophysis* (García-Mendoza et al., 2014). Los mejillones fueron recolectados de áreas de cultivo. Además, en junio del mismo año se encontró una acumulación de yessotoxinas de  $1080 \mu\text{g kg}^{-1}$  de tejido, toxinas que suelen producir algunas cepas de *L. polyedrum*. Sin embargo, la presencia de toxinas no coincidió con la abundancia de *L. polyedrum*. Aunque sí se han presentado FAN de esta especie en la Bahía, en varias ocasiones (Carlucci, 1967; Pena-Manjarrez et al., 2009). En esa zona, Rincón de Ballenas, se encuentran varias granjas de mejillones y una granja de ostiones.

En diciembre de 2016 se generó un FAN de *L. polyedrum* en Bahía Falsa, San Quintín, México. En muestra con red de arrastre para fitoplancton, se encontró una abundancia del 41% de la muestra de este dinoflagelado (Comité Estatal de Sanidad Acuícola e Inocuidad de Baja California, comunicación personal). Bahía Falsa es reconocida internacionalmente por su producción y exportación de ostiones hacia Asia. Esta bahía tiene un tiempo de residencia de agua relativamente constante de 6 días durante el año, mientras que toda la laguna costera de San Quintín a la cual pertenece, tiene un tiempo de residencia máximo de 26 días en febrero (Camacho-Ibar et al., 2003).

## **Hipótesis**

La MOD que excretan los ostiones, puede ser consumida por los dinoflagelados *A. tamarense* y *L. polyedrum*, y promover su crecimiento.

## **Objetivo general**

Evaluar los efectos de la MOD excretada por ostiones *C. gigas* sobre los dinoflagelados *A. tamarense* y *L. polyedrum*

## **Objetivos particulares**

Determinar el efecto de la MOD excretada por *C. gigas* en la tasa de crecimiento de *A. tamarense*.

Determinar el efecto de la MOD excretada por *C. gigas* en la tasa de crecimiento de *L. polyedrum*

## Materiales y métodos

### 1. Experimentos de *A. tamarense* con MOD producida por ostiones

Para los experimentos con *A. tamarense*, se utilizaron seis ostiones de la especie *Crassostrea gigas*, que se obtuvieron de la granja de cultivo Barilla Bay, ubicada en el sureste de Tasmania, Australia. Los organismos se aclimataron a condiciones controladas de luz y temperatura durante cuatro semanas previas a los experimentos, con alimentación diaria de un cultivo de *Tetraselmis suecica*. Para preparar los tratamientos de agua que se utilizaron para cultivar el dinoflagelado, se mantuvieron tres ostiones en cada uno de dos recipientes de vidrio cilíndricos, con 1.5 L de agua de mar (salinidad 33) con aireación constante (Figura 1). El agua de mar que se utilizó para mantener los ostiones se recibió del Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) de Hobart, Tasmania. Esta agua fue recolectada de superficie en la costa este de Tasmania, donde no hay influencia de asentamientos urbanos, se pasó por filtro mecánico grueso y se dejó envejecer durante algunos meses antes de los experimentos.



Figura 1. Diseño experimental de los recipientes con 1.5 L de agua en la que se mantuvieron ostiones, la cual se utilizó para cultivar *A. tamarense*. Los tratamientos experimentales se detallan en la Tabla I. A) Tratamiento OST; B) Tratamiento ONA; C) Control TET; D) Control AM.

El cuarto donde se mantuvieron los ostiones tuvo una temperatura constante de 17 °C y un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas. Se mantuvieron los ostiones durante dos periodos diferentes, un día (experimento 1d) y tres días (experimento 3d), para utilizar el agua en dos experimentos independientes con *A. tamarense*. Se prepararon dos tratamientos experimentales con los ostiones y dos controles que no contenían ostiones (Tabla I). Los ostiones de uno de los recipientes fueron alimentados diariamente con 200 mL del cultivo de *T. suecica*, que tenía una densidad de  $\sim 450 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> (tratamiento OST). Los ostiones del segundo recipiente no fueron alimentados durante los periodos de mantenimiento (tratamiento ONA). Se montaron otros dos

recipientes con agua de mar a las mismas condiciones ambientales que los anteriores, en los cuales no se introdujeron ostiones para que actuaran como controles de los tratamientos experimentales anteriores. El agua de uno de los dos recipientes controles se mantuvo sin manipular durante los periodos de mantenimiento (control AM). Al otro control se le agregaron diariamente 200 mL del cultivo de *T. suecica*, y una hora después se filtró toda el agua de ese recipiente por 3 µm para remover las células de esta microalga (tratamiento TET). Al concluir cada periodo de mantenimiento, se filtró el agua de los cuatro recipientes por 0.2 µm para remover la mayoría de las bacterias y se ajustó el pH a 8.1.

**Tabla I. Tratamientos de agua en la que se mantuvieron los ostiones, para cultivar los dinoflagelados *A. tamarense* y *L. polyedrum*. Los tratamientos para *A. tamarense* fueron iguales para los periodos de mantenimiento de los ostiones de un día (1d) y tres días (3d). Los tratamientos para *L. polyedrum* fueron idénticos para la primera (1ra) y la segunda repetición del experimento (2da).**

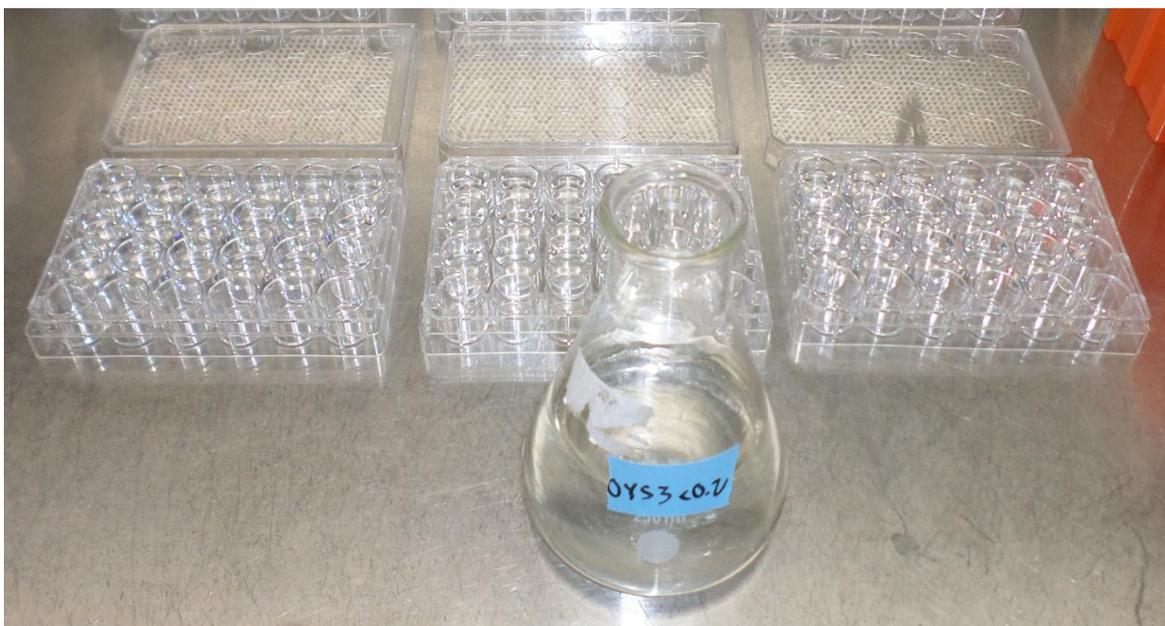
Tratamiento		<i>A. tamarense</i> (+MT y +Vit)	<i>L. polyedrum</i> (+MT)
OST	Excreciones de ostiones	Agua en la que se mantuvieron tres ostiones durante uno y tres días, y se alimentaron diario.	Agua en la que se mantuvieron tres ostiones durante 24 horas y se alimentaron en una ocasión.
ONA	Excreciones de ostiones no alimentados	Agua en la que se mantuvieron tres ostiones que no fueron alimentados durante uno y tres días.	Agua en la que se mantuvieron tres ostiones que no fueron alimentados durante 24 horas.
TET	Control de <i>Tetraselmis suecica</i>	Agua a la que se agregaron 200 mL de cultivo de <i>T. suecica</i> , y se filtró por 0.3 µm.	Agua a la que se agregaron 200 mL de cultivo de <i>T. suecica</i> previamente filtrado por GF/F.
AM	Control de agua de mar	Agua de mar.	Agua de mar.

+MT = Suplementado con metales traza; +Vit = Suplementado con vitaminas

Para evaluar el efecto de la MOD de ostiones en *A. tamarense*, se utilizó la cepa ATTR/F de la colección del Algae Laboratory del Institute of Marine and Antarctic Studies. Esta cepa fue aislada en Spring Bay, Tasmania, del florecimiento que ocurrió entre finales de 2012 e inicios de 2013 (Campbell et al., 2013). Los experimentos se realizaron en el cuarto de cultivo en el que se mantiene la cepa, por lo que ya se encontraba aclimatada a las condiciones de 17° C y 600 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradianza en un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas, en recipientes plásticos con 30 ml de medio de cultivo GSe (Blackburn et al., 2001).

Se prepararon los cuatro tratamientos experimentales con agua de mar en la que se mantuvieron los ostiones durante cada uno de los dos periodos (Tabla I). Todos los tratamientos se

suplementaron con vitaminas y metales traza de la receta de cultivo GSe (Blackburn et al., 2001) y se filtraron por 0.2  $\mu\text{m}$  para remover la mayoría de las bacterias marinas. En condiciones de esterilidad, se vertieron 1.5 mL de cada tratamiento por triplicado, en microplacas estériles de 24 pozos. Se inocularon todos los micropozos con 8,250 células  $\text{mL}^{-1}$  en 0.150 mL del cultivo de *A. tamarensis* en fase exponencial. Estos cultivos se crecieron en condiciones controladas de 17° C y 600  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradianza en un ciclo de luz:oscuridad de 14:10 horas.



**Figura 2. Matraz Erlenmeyer en el que se suplementó el agua, con vitaminas y metales traza, en la que se mantuvieron los ostiones. Se transfirieron por triplicado 1.5 mL del agua a las microplacas de 24 pozos, para cultivar *A. tamarensis*.**

El crecimiento de los cultivos de *A. tamarensis* se evaluó por fluorescencia *in vivo* de forma similar al procedimiento de Ravizza y Hallegraef (2015), pero en las microplacas 24 pozos. Las mediciones se realizaron cada dos días con un lector de placas FLUOstar OPTIMA, Bmg Labtech con excitación/emisión de 450/680 nm y agitación automática.

## **2. Experimentos de *L. polyedrum* con MOD producida por ostiones**

La preparación de los tratamientos experimentales de agua para *L. polyedrum* fue similar a la que se realizó para los experimentos con *A. tamarensis*. Seis ostiones *Crassostrea gigas* cultivados en Bahía Falsa, San Quintín, se aclimataron a condiciones de laboratorio durante seis semanas previas a los experimentos. Estos ostiones se alimentaron cada dos días con pasta comercial de *Isochrysis galbana*. Para preparar los tratamientos experimentales, se mantuvieron tres ostiones por 24 horas en cada uno de dos recipientes de vidrio cilíndricos, con 1.5 L de agua de mar (salinidad 36) con aireación constante (Figura 3). El agua utilizada se recolectó de profundidad, en

una estación fuera de la costa de la Bahía de Todos Santos, se filtró por GF/F y se dejó envejecer durante 5 meses en un garrafón de vidrio almacenado en la oscuridad. Las condiciones de luz y pH a las que estuvieron expuestos los ostiones se muestran en las figuras Figura 4 y Figura 5, respectivamente, mientras que la temperatura fue de  $22 \pm 0.1$  °C. Los ostiones para el tratamiento OST se alimentaron al inicio con 200 mL de cultivo de *T. suecica*, que tenía una concentración de  $\sim 300 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Los tratamientos ONA y AM se prepararon de forma similar a los experimentos con *A. tamarense*. Al recipiente con agua para TET se le agregaron 200 mL de cultivo de *T. suecica* previamente filtrado por GF/F. Al concluir el periodo de mantenimiento de 24 horas, se filtró el agua de los cuatro recipientes por 0.2 µm, se ajustó su pH a 8.1 y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.



**Figura 3.** Diseño experimental de los recipientes con 1.5 L de agua en la que se mantuvieron ostiones, la cual se utilizó para cultivar *L. polyedrum*. Los tratamientos experimentales se detallan en la Tabla I. A) Tratamiento OST; B) Tratamiento ONA; C) Control TET; D) Control AM.

Antes de realizar los experimentos se prepararon los tubos de ensayo que se utilizaron para los cultivos de *L. polyedrum*. Los tubos se dejaron con agua de mar durante un mes y después se lavaron con detergente libre de fosfatos. Posteriormente se dejaron los tubos en ácido clorhídrico al 10% por 72 horas y se enjuagaron completamente con agua destilada. Los tubos se calcinaron en mufla por 4 horas a 450 °C. Finalmente se esterilizaron en autoclave, junto con sus tapones de silicón, por 15 minutos a 121 °C y 15 psi.

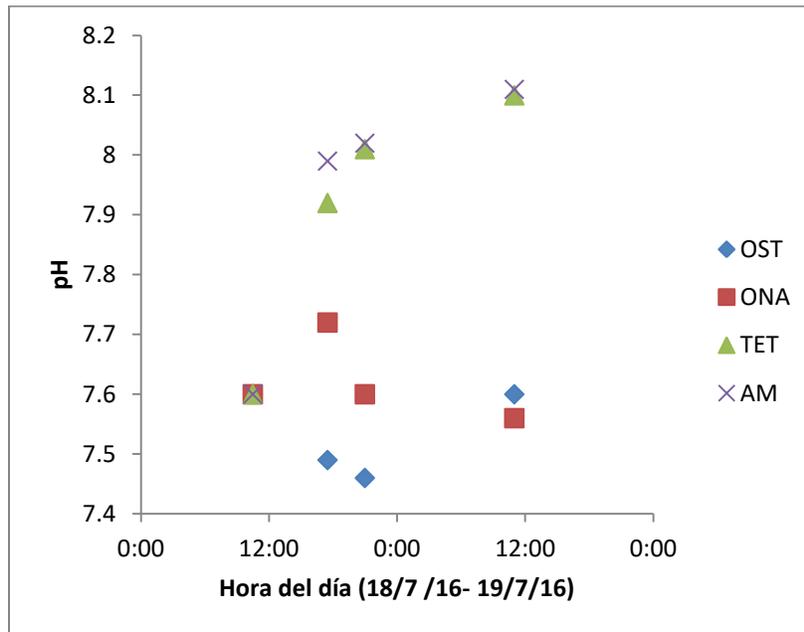


Figura 4. Valores de pH en el agua para el período de 24 horas durante el cual se mantuvieron los ostiones. Se realizaron las mediciones en cada tratamiento.

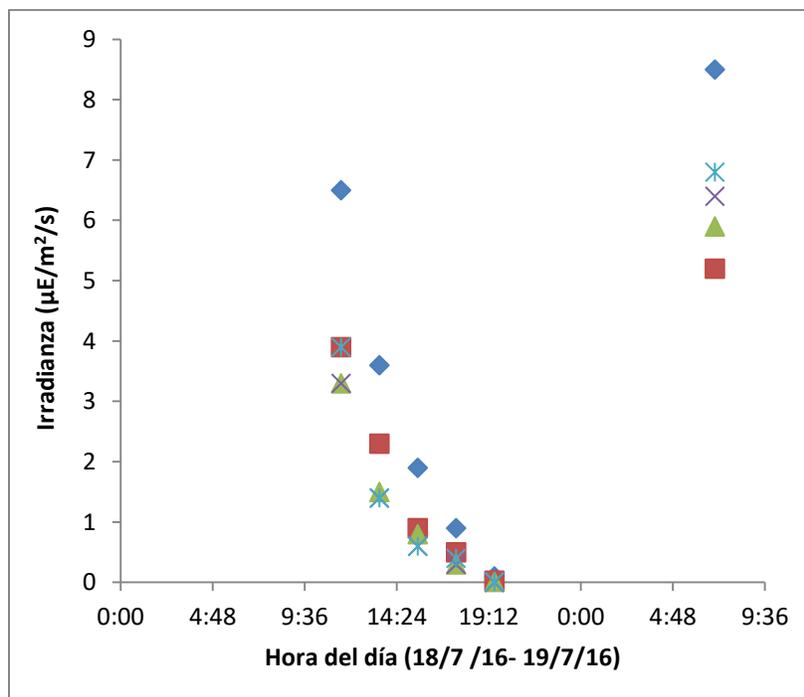


Figura 5. Valores de irradiancia ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) para las horas de luz del período durante el cual se mantuvieron los ostiones. Se realizaron las mediciones en los extremos del arreglo de los recipientes y entre cada par de estos recipientes.

La cepa de *L. polyedrum* utilizada en todos los experimentos se obtuvo de la colección del Laboratorio de Cultivo de Microalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California. Previo al experimento, se realizó más de una decena de transferencias en la fase exponencial del cultivo para aclimatarlo a medio f/2 (Guillard, 1975), en condiciones controladas de 20 °C y 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradianza con un ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas.

Se montaron cuatro tratamientos experimentales preparados con el agua de mar que se recolectó de cada uno de los cuatro recipientes cilíndricos de vidrio descritos antes (Figura 3, Tabla I). En condiciones de esterilidad, se vertieron 10 mL del agua de cada uno de los cuatro tratamientos en cinco tubos de ensayo. Se suplementó el agua de los tubos con metales traza de la receta del medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975) y se inoculó con 1 mL de cultivo de *L. polyedrum* con 6,400 células  $\text{mL}^{-1}$  y al inicio de su fase exponencial. Los cultivos en tubos se crecieron en condiciones controladas de 20°C y 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradianza con ciclo luz:oscuridad de 12:12 horas.



Figura 6. Tubos de ensayo en los que por quintuplicado se transfirieron 10 mL del agua en la que se mantuvieron los ostiones, y que fue suplementada con vitaminas para cultivar *L. polyedrum*.

El crecimiento de *L. polyedrum* se evaluó con el método valorado por Brand et al. (1981), que consistió en el monitoreo diario de cada uno de los cultivos con un flurómetro Turner Designs

modelo 10-AU-005-CE. Antes de realizar la medición se homogenizaron los cultivos de *L. polyedrum* durante 5 minutos en un aparato con una superficie inclinada a 45° de la horizontal, que giraba a 10 rpm. Este aparato permitió homogenizar los cultivos sin dañar las células. Posterior a la homogenización se midió la fluorescencia *in vivo* de cada cultivo en unidades relativas.

Al final del experimento se tomó una muestra de cada cultivo y se le agregó formaldehído al 1% para fijar las células de dinoflagelados y de bacterias marinas. Se contaron todas las células de dinoflagelados contenidas en 1 ml, con una cámara Sedgewick Rafter en microscopio óptico. El resto de la muestra, de una de las réplicas de cada tratamiento, se filtró por 8 µm para remover los dinoflagelados. En 1 ml del filtrado se agregaron 40 µL de DAPI (preparado con una concentración de 200 µg mL<sup>-1</sup>) y se dejó incubando 10 minutos en la oscuridad. Después se filtró esta muestra por un filtro negro de membrana de 0.2 µm. El filtro se montó sobre una gota de inmersión en un portaobjetos y se le vertieron 10 µL antifading antes de colocar el portaobjetos. Estas muestras de bacterias se almacenaron en el congelador a 4 °C. Para los conteos se observaron las muestras en microscopio de epifluorescencia y debido a la abundancia de células, se contaron 100 campos por cada muestra.

Se compararon las densidades celulares de *L. polyedrum* obtenidas por los conteos, con los datos de fluorescencia *in vivo* medidos al final del experimento. Se evaluó la relación de ambas variables en una gráfica de dispersión, con la fluorescencia en un eje y la densidad celular en el otro. Además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de correlación de Spearman (en caso de que los datos no tuvieran una distribución *gaussiana* ni una dependencia lineal).

Los datos de los conteos de bacterias se procesaron de la siguiente forma,

$$\text{Células mL}^{-1} = \frac{A_r}{A_f} \times \frac{N}{V}$$

donde  $A_r$  es el área de la rejilla en el ocular del microscopio,  $A_f$  es el área efectiva de filtración que depende del diámetro de la torre,  $N$  es el promedio de los conteos de 100 campos y  $V$  es el volumen de la muestra filtrado.

### **3. Ajuste de la fluorescencia *in vivo* de *A. tamarense* y *L. polyedrum* a curvas de crecimiento, cálculo de sus tasas de crecimiento específico y análisis estadísticos**

Se utilizó la paquetería Grofit (Kahm et al., 2010) en el entorno de programación R (R Core Team, 2016), para ajustar los resultados de fluorescencia *in vivo* a curvas de crecimiento de los cultivos a lo largo del tiempo. El paquete busca el mejor ajuste para los datos de cada cultivo, según su valor de AIC (Akaike Information Criterion, Akaike; Akaike, 1973), en estos modelos paramétricos: Logístico, Gompertz, Gompertz modificado y Richards (revisado en Zwietering et al., 1990). En los

casos en los que los modelos paramétricos no explican correctamente el comportamiento de los datos de un cultivo, el programa realiza un ajuste libre de modelo, que consiste en una función cúbica *spline* suavizada. Debido a que varios cultivos no se ajustaron a los modelos paramétricos, se utilizaron los ajustes *spline* para obtener las tasas de crecimiento específico.

La tasa de crecimiento específico del ajuste de cada cultivo se calculó en la fase exponencial con la siguiente ecuación,

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico,  $N_t$  es el valor de fluorescencia *in vivo* al final del crecimiento exponencial del ajuste,  $N_0$  es el valor de fluorescencia al inicio,  $t_1$  es el día final del crecimiento exponencial y  $t_0$  es el día inicial.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de programación *R* (R Core Team, 2016) y se consideró una significancia  $\alpha$  de 0.05. Se evaluó la *gaussianidad* de todas las tasas de crecimiento en conjunto (de los cultivos que crecieron en los experimentos), debido a que el tamaño de muestra de cada tratamiento era relativamente pequeño ( $n = 3$  en los tratamientos de *A. tamarense* y  $n = 5$  en los tratamientos de *L. polyedrum*). Para esto se construyó un histograma de frecuencias, una gráfica Q-Q y la prueba de Shapiro-Wilk. Además se transformaron las tasas de crecimiento a la escala *z*, para buscar datos atípicos que se encontraran fuera del intervalo entre -3 y 3 desviación estándar alrededor de la media.

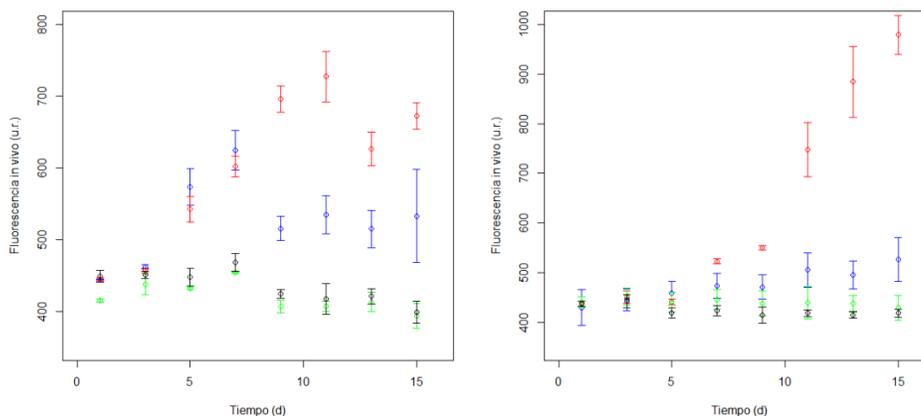
Para evaluar la homocedasticidad entre los tratamientos experimentales, se utilizaron las pruebas de Barlett y de Fligner-Killen, para corroborar la aceptación o rechazo de la hipótesis nula. Esto debido a que la prueba de Barlett es más sensible al escenario en el que los datos se desvíen de una distribución gaussiana.

Para llegar a conclusiones más certeras, se compararon las tasas de crecimiento tanto por estadística paramétrica como no paramétrica. Además se construyó una gráfica de cajas y bigotes para visualizar gráficamente las diferencias entre los tratamientos experimentales. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para evaluar de forma paramétrica la igualdad de las medias de todos los tratamientos. Posteriormente se hicieron comparaciones múltiples para buscar igualdad de medias entre pares de tratamientos con la prueba *t* de Student con la modificación de Welsh, para muestras no homocedásticas. Para la comprobación por estadística no paramétrica se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, para evaluar si las diferencias entre las medias de todos los tratamientos fueron igual a cero. Se realizó la comparación no paramétrica entre pares de tratamientos por medio de la prueba Wilcoxon.

## Resultados

### 1. Fluorescencia *in vivo* y ajuste a curvas de crecimiento de los experimentos con *Alexandrium tamarens*

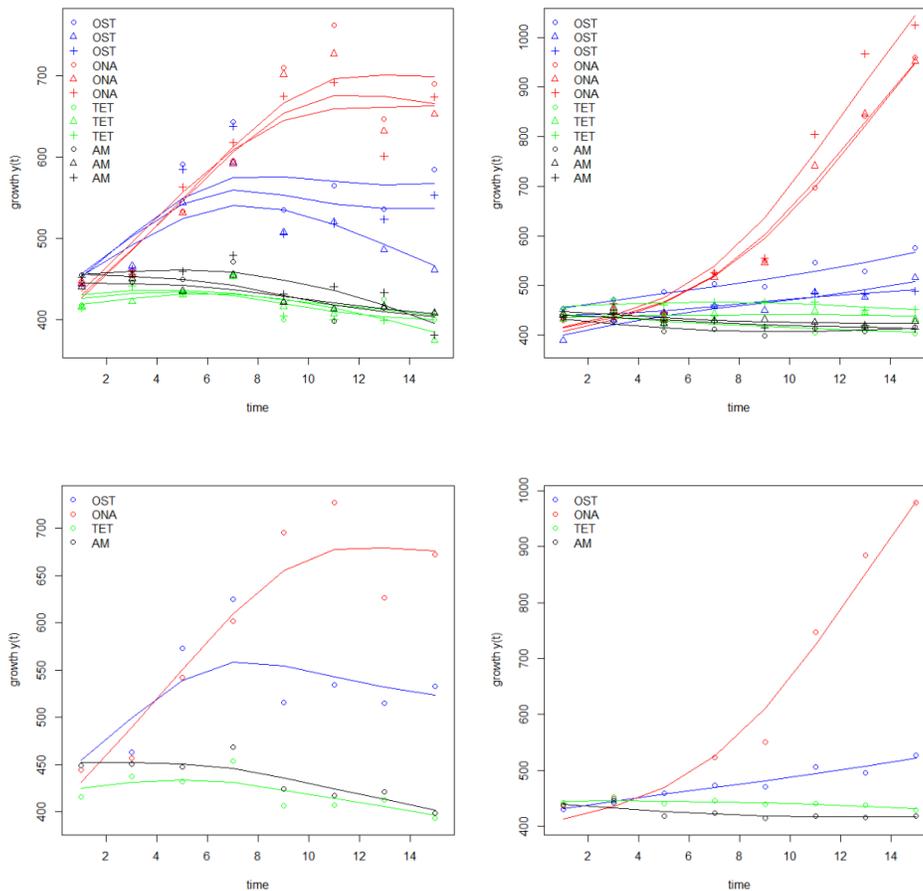
La fluorescencia *in vivo* de *Alexandrium tamarens* cultivado en los controles TET y AM no aumentó durante ninguno de los dos experimentos realizados con agua en la que se mantuvieron ostiones durante dos periodos diferentes (fig. 7). En el experimento de un día de mantenimiento de los ostiones, la fluorescencia en TET y AM disminuyó hacia el final del período evaluado (fig. 7A), hasta llegar a valores cercanos a un blanco de agua de mar estéril sin cultivo (~380 u.r., datos no mostrados). Con estos resultados se entendió que estos cultivos se mantuvieron durante los primeros siete días y posteriormente decayeron, hasta que en la última medición la cantidad de células con fluorescencia no fue suficiente para que el aparato detectara una señal. Por otro lado, la fluorescencia de los cultivos TET y AM, en el experimento de tres días de mantenimiento de los ostiones, se mantuvo constante y en valores bajos (fig. 7B). La fluorescencia de los cultivos en los tratamientos de agua en la que se mantuvieron ostiones, OST y ONA, incrementó a lo largo del tiempo de ambos experimentos. El tratamiento ONA alcanzó valores promedio más altos de fluorescencia *in vivo* con respecto a OST, lo cual se observó claramente con la interpretación visual de las barras de desviación estándar (fig. 7). En particular, los cultivos ONA crecieron más en el experimento de tres días que en el de un día de mantenimiento de los ostiones.



**Figura 7. Valores de fluorescencia *in vivo* de *A. tamarens* cultivado en cuatro tratamientos experimentales preparados con dos períodos diferentes de mantenimiento de ostiones. Las barras horizontales representan la desviación estándar. A) Tratamientos preparados con agua en la que se mantuvieron ostiones durante un día. B) Tratamientos de agua en la que se mantuvieron ostiones durante tres días.**

La mayoría de los cultivos de *A. tamarens* no se ajustaron a los modelos de crecimiento evaluados (Tabla I). Únicamente las seis curvas que representaron crecimiento de cultivos

(tratamientos OST y ONA) en el experimento de 1 día de mantenimiento de ostiones, se ajustaron al modelo de Gompertz modificado (Kahm et al., 2010), mientras que sólo dos del otro experimento se ajustaron al modelo logístico. Se realizó el ajuste *spline* suavizado a todos los cultivos para aplicar el mismo método para todas las curvas de crecimiento. Por medio de una validación generalizada cruzada se obtuvieron los mejores valores del parámetro de suavizado para las curvas de crecimiento (datos no mostrados), y en base a estos se utilizó el valor 0.5 para todos los cultivos.



**Figura 8. Ajustes libres de modelo de los valores de fluorescencia *in vivo* de los cultivos de *A. tamarense*, a curvas de crecimiento con *splines* cúbicos suavizados con un parámetro de 0.5. A) Ajustes del experimento con agua de mar en la que se mantuvieron ostiones por 1 día. B) Ajustes del experimento con agua de mar en la que se mantuvieron ostiones por un día. C) Ajustes de los promedios del experimento en el que se mantuvieron los ostiones por un día. D) Ajustes de los promedios del experimento en el que se mantuvieron los ostiones por tres días.**

El comportamiento de las curvas de crecimiento ajustadas para los cultivos OST y ONA difirió entre ambos experimentos (fig. 8). En el experimento de un día de mantenimiento de los ostiones, las curvas de OST y ONA comenzaron en fase de crecimiento y pasaron a la fase estacionaria

aproximadamente en los días 5 y 9, respectivamente (figs. 8A y 8C). En el otro experimento, los cultivos de OST crecieron con una pendiente poco abrupta, mientras que los cultivos ONA mostraron una fase de acondicionamiento o *lag* entre los días 1 y 3, y posteriormente crecieron exponencialmente hasta el final del experimento (figs. 8B y 8D).

**Tabla II. Tasas de crecimiento específico de todos los experimentos con ambas especies de dinoflagelado. Los valores para cada tratamiento representan la tasa de crecimiento específica ( $d^{-1} \pm SD$ ). 1d = Experimento en el que se mantuvieron los ostiones durante un día. 3d = Experimento en el que se mantuvieron los ostiones durante tres días. 1ra = Primera repetición del experimento. 2da = Segunda repetición del experimento. n = número de réplicas del tratamiento.**

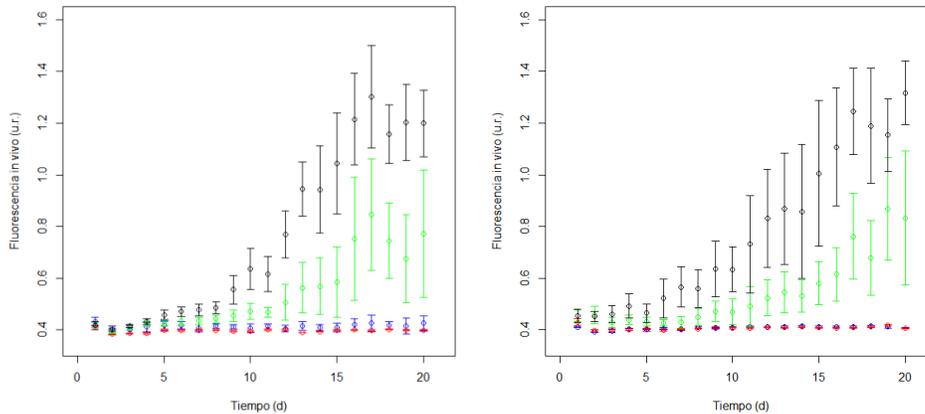
Especie	Experimento	OST (n=3)	ONA (n=3)	TET (n=5)	AM (n=5)
<i>A. tamarense</i>	1d	0.04 ± 0.06	0.06 ± 0.01	-	-
	3d	0.01 ± 0.05	0.07 ± 0.002	-	-
<i>L. polyedrum</i>	1ra	-	-	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.01
	2da	-	-	0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.01

A partir de los ajustes se lograron obtener tasas de crecimiento específico en todos los cultivos de OST y ONA, pero en ningún cultivo de TET y AM (Tabla I), debido a que estos últimos no crecieron (fig. 8). La sección de las curvas de crecimiento que presentó una pendiente recta, ideal para calcular la tasa específica, fue entre los días 1 y 5 para el experimento de 1 día de mantenimiento de los ostiones (fig. 8A) y entre los días 11 y 15 para el experimento de 3 días de los ostiones (fig. 8B). El promedio de las tasas de crecimiento obtenidas en estos períodos fue mayor en el tratamiento ONA de los dos tiempos de mantenimiento de los ostiones ( $0.06 \pm 0.01 d^{-1}$  y  $0.07 \pm 0.002 d^{-1}$ ; Tabla I). A pesar de que las desviaciones estándar de las tasas de crecimiento de OST fueron grandes, esta diferencia entre los tratamientos se observó en las pendientes de las curvas de crecimiento de la figura 8. Más adelante se presentan las pruebas estadísticas para estas tasas de crecimiento.

## **2. Fluorescencia *in vivo* y ajuste a curvas de crecimiento de los experimentos con *Lingulodinium polyedrum***

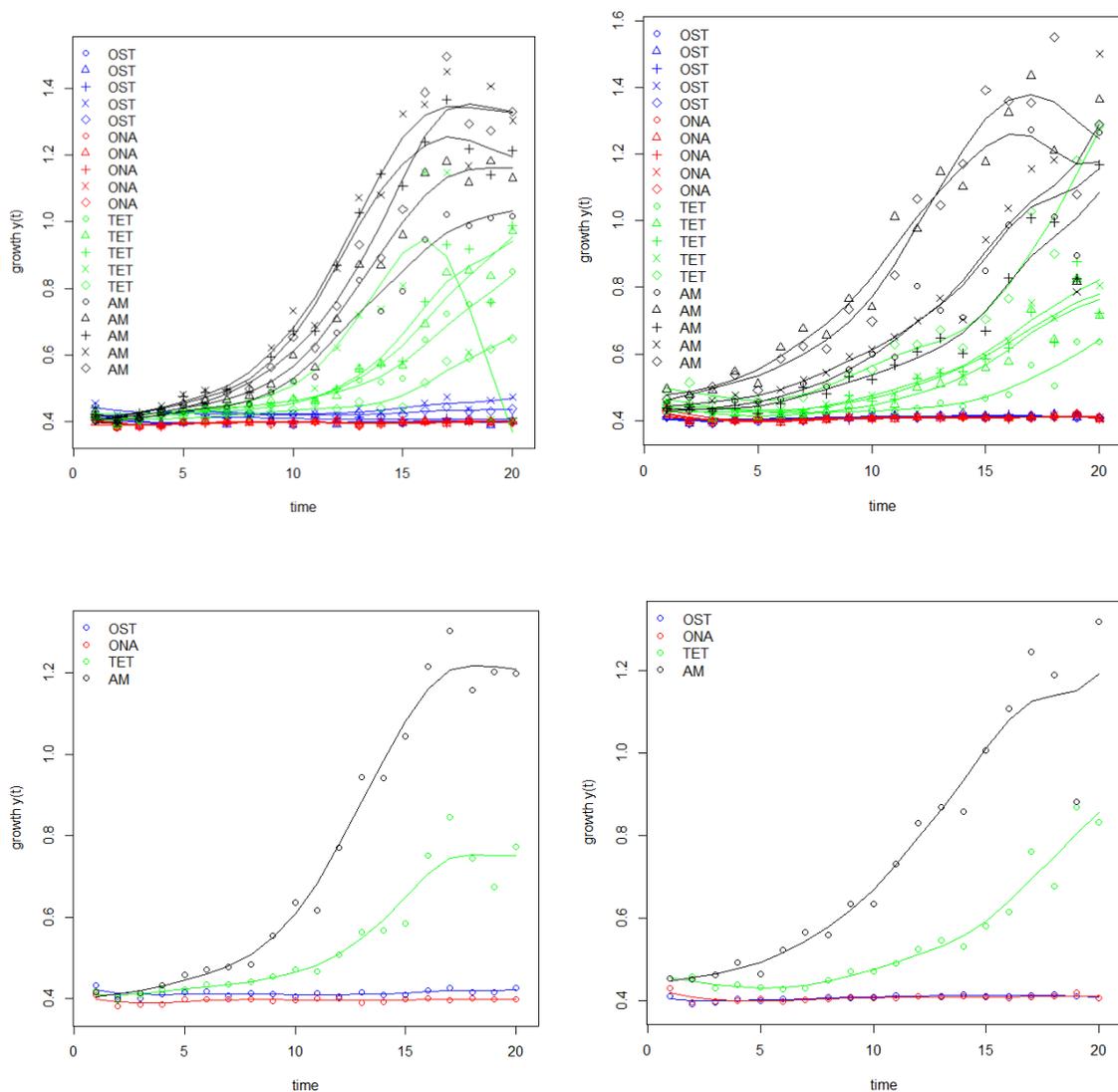
La señal de fluorescencia *in vivo* de *L. polyedrum* en los tratamientos experimentales OST y ONA no cambió durante las dos repeticiones del experimento (fig. 9), y su valor fue igual al de un blanco preparado con agua de mar estéril ( $\sim 0.4$  u.r., datos no mostrados). Esto indicó que los cultivos OST y ONA no crecieron y su densidad celular no era suficiente para que el instrumento detectara una señal de fluorescencia clara. Sin embargo, por medio de un microscopio óptico se observaron algunas células vivas en estos tratamientos, aunque presentaron un movimiento lento con respecto a lo normal en esta especie. La fluorescencia *in vivo* de TET y AM se mantuvo en valores cercanos al blanco durante los primeros cinco días y aumentó aceleradamente a partir del día 5 y del día 10,

respectivamente (fig. 9). Este aumento acelerado se extendió hasta el día 15 en la mayoría de los cultivos de AM, después detuvieron su crecimiento y se mantuvieron así hasta el final del experimento. Por otro lado, el crecimiento se mantuvo hasta el final del experimento para varios cultivos de TET, con excepción de una réplica de la primera repetición del experimento, que inició su crecimiento acelerado antes que las otras cuatro y presentó un rápido decaimiento a partir del día 16 (fig. 9A).



**Figura 9. Valores de fluorescencia *in vivo* de *L. polyedrum* cultivado en cuatro tratamientos experimentales de agua en la que se mantuvieron ostiones durante 1 día. Las barras horizontales representan la desviación estándar. A) Primera repetición del experimento. B) Segunda repetición del experimento.**

Los datos de fluorescencia *in vivo* de varios cultivos se ajustaron a los modelos de crecimiento logístico y de Gompertz modificado (Kahm et al., 2010). Sin embargo, el comportamiento de aproximadamente la mitad de los cultivos de todo el experimento, no se ajustó a ninguno de los cuatro modelos evaluados (Tabla I). Para tener homogéneas todas las curvas de crecimiento, se hizo el ajuste *spline* suavizado a los valores de fluorescencia de todos los cultivos del experimento. La validación cruzada generalizada dio valores cercanos a 0.5 para el parámetro de suavizado ideal para los ajustes las curvas (datos no mostrados), por lo que se utilizó este valor para todos los cultivos.

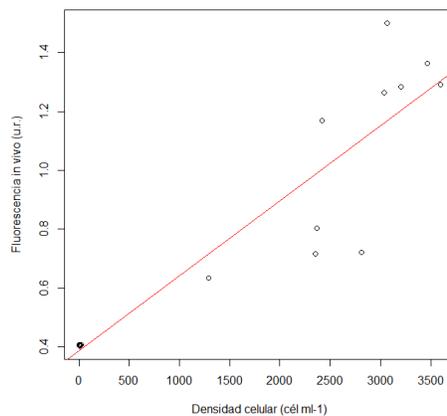


**Figura 10. Ajustes libres de modelo de los valores de fluorescencia *in vivo* de los cultivos de *L. polyedrum*, a curvas de crecimiento con *splines* cúbicos suavizados con un parámetro de 0.5. A) Ajustes de la primera repetición del experimento. B) Ajustes de la segunda repetición del experimento. C) Ajustes de los promedios de la primera repetición del experimento. D) Ajustes de los promedios de la segunda repetición del experimento.**

Las tres primeras fases típicas de las curvas de crecimiento (acondicionamiento o *lag*, exponencial y estacionaria) en TET y AM fueron más claras en los cultivos de la primera repetición del experimento (figs. 10A y 10C). En esta primera repetición, el promedio de los cultivos alcanzó la fase estacionaria, mientras que en la segunda repetición las curvas continuaron creciendo hasta el final del experimento (fig. 10D). Solamente en la primera repetición, la curva de crecimiento promedio de los cultivos de OST sobresalió con respecto a ONA (fig. 10C), sin embargo las desviaciones estándar de los valores de fluorescencia *in vivo* se traslapan (fig. 10A). El valor de

fluorescencia *in vivo* más alto de estos experimentos con *L. polyedrum*, que se observa en los ajustes como el crecimiento máximo, se registró al final del tratamiento ONA de la segunda repetición (figs. 10B y 10D).

Se calcularon las tasas de crecimiento específico a partir de los ajustes de todos los cultivos de TET y AM, ya que estos fueron los que crecieron en ambas repeticiones del experimento con *L. polyedrum*, a diferencia de los tratamientos OST y ONA (Tabla II). Los promedios de las tasas de crecimiento fueron más altos en la primera repetición del experimento. En particular, los promedios de las tasas en AM ( $0.12 \pm 0.01$  y  $0.09 \pm 0.01$   $d^{-1}$ ) fueron mayores que los del tratamiento TET ( $0.09 \pm 0.02$  y  $0.07 \pm 0.03$   $d^{-1}$ ). Sin embargo, las desviaciones estándar se traslaparon entre ambos tratamientos. En figura 10 se observó que aunque el crecimiento máximo de los cultivos de AM fue mayor que los de TET, las pendientes en la fase exponencial fueron similares. Más adelante en este escrito, se explican las diferencias estadísticas de estas tasas de crecimiento.



**Figura 11. Gráfica de los valores de los valores de fluorescencia *in vivo* de cada cultivo del trabajo, en función de la densidad celular determinada para los mismos cultivos.**

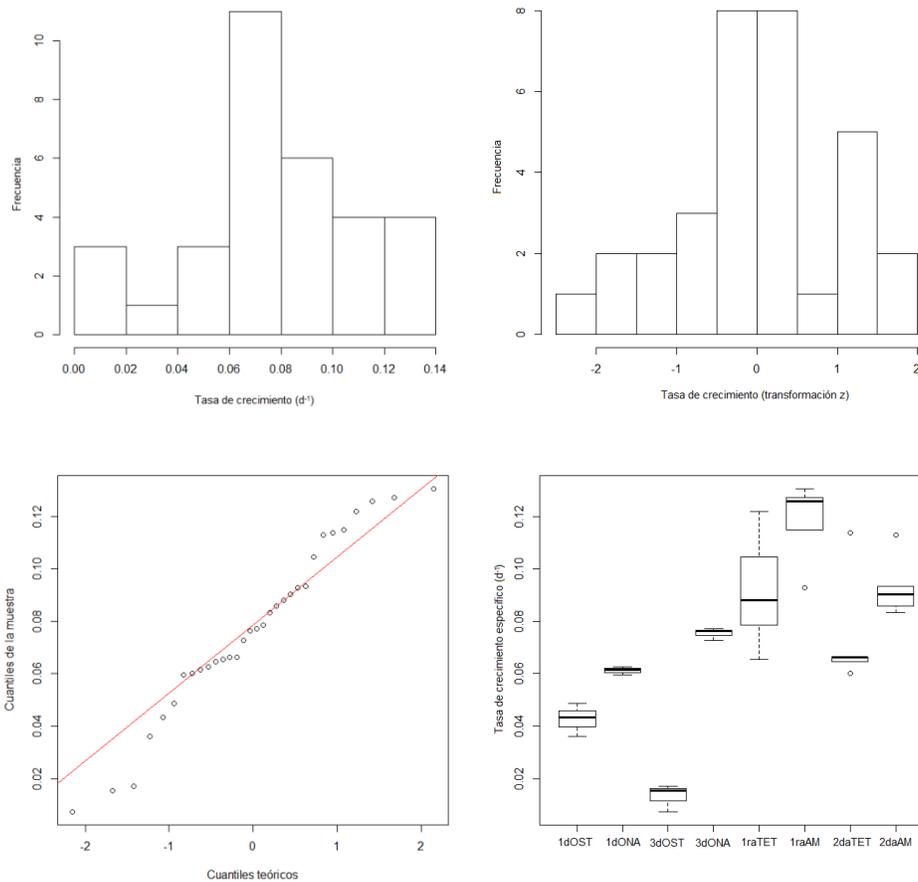
Los conteos celulares de *L. polyedrum* en los diferentes tratamientos al final del experimento tuvieron un comportamiento similar a los valores de fluorescencia, ya que la densidad celular fue mayor en el tratamiento AM ( $3119 \pm 462$   $cél\ mL^{-1}$ , fig. 11) y fue seguida por TET ( $2407 \pm 716$   $cél\ mL^{-1}$ ). La densidad celular en los tratamientos OST ( $12 \pm 7$   $cél\ mL^{-1}$ ) y ONA ( $4 \pm 2$   $cél\ mL^{-1}$ ) fue mucho más baja. Se obtuvo la correlación de la densidad celular con la fluorescencia *in vivo* del final del experimento por Pearson y por Spearman (en caso de que los datos no siguieran una distribución *gaussiana* y la dependencia entre ambas variables no fuera lineal). El índice de correlación de Pearson fue  $r=0.93$ , que indicaría una correlación positiva, sin embargo el resultado no fue significativo ( $p<0.01$ ,  $\alpha=0.05$ ). El resultado de la correlación de Spearman fue similar ( $\rho=0.89$ ) y tampoco fue significativo ( $p<0.01$ ,  $\alpha=0.05$ ). En la gráfica de dispersión de las dos

variables (fig. 11) se observó que aunque los datos no se ajustaron a una correlación lineal (línea diagonal roja), su comportamiento con respecto a los tratamientos experimentales fue similar.

Se cuantificó la abundancia de bacterias en una réplica por cada tratamiento, al finalizar la segunda repetición del experimento con *L. polyedrum*. En el microscopio de epifluorescencia se observaron 100 campos por cada muestra, entre los cuales se contaron entre alrededor de 300 bacterias en total, entre los diferentes tratamientos. Las mayores abundancias se registraron en los controles TET (60,131 células ml<sup>-1</sup>) y AM (61,315 células ml<sup>-1</sup>), seguidos por el tratamiento experimental ONA (39,417 células ml<sup>-1</sup>) y por OST (13,257 células ml<sup>-1</sup>). Los dos tratamientos con mayor abundancia de bacterias también fueron los que presentaron valores mayores de fluorescencia *in vivo* y densidad celular de *L. polyedrum*.

### **3. Análisis estadísticos de las tasas de crecimiento de *A. tamarensis* y *L. polyedrum*.**

Todos los análisis estadísticos se realizaron considerando una significancia  $\alpha$  de 0.05. Debido a que el tamaño de muestra de las tasas de crecimiento por tratamiento individual fue pequeño ( $n=3$  para *Alexandrium tamarensis* y  $n=5$  para *Lingulodinium polyedrum*), se evaluó la *gaussianidad* de todos los datos en conjunto. El mayor número de clases posibles para la construcción del histograma de frecuencias fue de siete (fig. 12A). El histograma presentó una moda principal en la clase central del histograma, sin embargo presentó una segunda moda más pequeña en el extremo izquierdo de la distribución de los datos. En la gráfica Q-Q se observó una acumulación de datos en el centro y su aproximación a una línea recta esperada, que pasa por los cuartiles 1 y 3 de la distribución de los datos (fig. 12C). Sin embargo, los datos de los extremos de la distribución se separaron de la línea recta, principalmente los valores más pequeños. La prueba Shapiro-Wilk no rechazó la hipótesis nula de que los datos poseen una distribución *gaussiana* ( $p=0.39$ ). Debido a que el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño ( $n=32$ ), la prueba pudo haber sido poco sensible a pequeñas desviaciones de la distribución *gaussiana*. Además, se transformaron los datos a la escala  $z$  para identificar valores atípicos. La distribución de los datos después de haber sido transformados se observó entre los valores  $-3$  y  $3$  (fig. 5B), por lo que ninguno de estos datos se encontró fuera del intervalo comprendido entre la media menos tres veces la desviación estándar y la media más tres veces la desviación estándar. Esto indicó que ningún dato fue atípico, por lo que todos pertenecieron a la misma distribución.



**Figura 12. Probabilidad y estadística de las tasas de crecimiento específico de los experimentos (n=32). A) Histograma de frecuencias de las tasas de crecimiento específico de todas las muestras. B) Histograma de frecuencias de las tasas de crecimiento específico transformadas a la escala z. C) Gráfica Q-Q de las tasas de crecimiento específico. D) Gráfica de cajas y bigotes de las tasas de crecimiento por tratamiento experimental.**

Las pruebas de Bartlett y de Fligner-Killen para homocedasticidad de varianzas resultaron en conclusiones diferentes. La prueba Bartlett rechazó la hipótesis nula de que las varianzas de todas las muestras fueron iguales ( $p=0.01$ ), mientras que Fligner-Killen no lo hizo ( $p=0.49$ ). La prueba Bartlett es más sensible a la desviación de la *gaussianidad*, por lo la discrepancia entre las dos pruebas también sugirió que los datos presentaron dicha desviación de una distribución *gaussiana*.

Debido a que algunos de los análisis explicados anteriormente no comprobaron que los datos tuvieran una distribución *gaussiana*, se compararon las tasas de crecimiento por estadística paramétrica y no paramétrica. El análisis de varianza (ANOVA) de una vía rechazó la hipótesis nula de que las medias de las tasas de crecimiento de todos los tratamientos experimentales fueron iguales ( $p<0.001$ ). La comparación múltiple por la prueba t de Student con modificación de Welsh, para muestras no homocedásticas, rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias para la

mayoría de los pares de tratamientos (Tabla III). Únicamente las medias de siete comparaciones no fueron diferentes.

**Tabla III. Comparaciones múltiples con la prueba t de Student de las tasas de crecimiento para todos los tratamientos evaluados.**

	1dOST	1dONA	3dOST	3dONA	1raTET	1raAM	2daTET	2daAM
1dOST	-	N	N	N	*	*	*	*
1dONA	-	-	N	N	*	*	N	*
3dOST	-	-	-	N	*	*	*	*
3dONA	-	-	-	-	N	*	N	*
1raTET	-	-	-	-	-	N	N	N
1raAM	-	-	-	-	-	-	*	*
2daTET	-	-	-	-	-	-	-	N
2daAM	-	-	-	-	-	-	-	-

\* =  $p < 0.05$ , N =  $p \geq 0.05$ .

Las tasas de crecimiento de *L. polyedrum* en general fueron significativamente mayores que las tasas de *A. tamarensis*, con excepción de *L. polyedrum* en TET de la primera repetición (con respecto a *A. tamarensis* en ONA con 3 días de mantenimiento de los ostiones) y en TET de la segunda repetición (con respecto a ONA con 1 día y ONA con 3 días de mantenimiento de ostiones). Las tasas de crecimiento de *A. tamarensis* fueron diferentes entre las cuatro muestras (combinación de experimento y tratamiento) evaluadas para esta especie (ver fig. 12D). El tratamiento ONA fue significativamente mayor que OST en los dos experimentos de mantenimiento de ostiones. Las diferencias entre las tasas de crecimiento de *L. polyedrum* sólo fueron significativas en dos comparaciones de las cuatro muestras. La tasa de crecimiento en AM de la primera repetición del experimento fue mayor que las tasas de AM y TET de la segunda repetición (ver figura 12D).

Por otro lado, la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis no asumió una distribución gaussiana en los datos y al igual que el ANOVA de una vía, rechazó la hipótesis nula de que las medias de las tasas de crecimiento fueron iguales entre todos los tratamientos experimentales ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, a diferencia de la prueba t de Student, la prueba no paramétrica Wilcoxon, sólo rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias para la mitad de las comparaciones múltiples entre pares de tratamientos (Tabla IV). Al igual que con la prueba paramétrica, la mayoría de las tasas de crecimiento de *L. polyedrum* fueron significativamente mayores que las de *A. tamarensis*, con las mismas tres excepciones en las comparaciones múltiples (1raTET con 3dONA, 2daTET con 1dONA y 2daTET con 3dONA; Tabla IV). Sin embargo, Wilcoxon no rechazó la igualdad de medias en las tasas de crecimiento de *A. tamarensis* para ninguna de las comparaciones entre las muestras. Probablemente la discrepancia se debió de nuevo a la distribución de los datos. Las

tasas de crecimiento de *L. polyedrum* sí presentaron las mismas diferencias significativas que con la prueba paramétrica (1raAM mayor que 2daTET y 2daAM).

**Tabla IV. Comparaciones múltiples con la prueba Wilcoxon de las tasas de crecimiento para todos los tratamientos evaluados.**

	1dOST	1dONA	3dOST	3dONA	1raTET	1raAM	2daTET	2daAM
1dOST	-	*	*	*	*	*	*	*
1dONA	-	-	*	*	*	*	N	*
3dOST	-	-	-	*	*	*	*	*
3dONA	-	-	-	-	N	*	N	*
1raTET	-	-	-	-	-	N	N	N
1raAM	-	-	-	-	-	-	*	*
2daTET	-	-	-	-	-	-	-	N
2daAM	-	-	-	-	-	-	-	-

\* =  $p < 0.05$ , <sup>N</sup> =  $p \geq 0.05$ .

## Discusión

### 1. Crecimiento de *Alexandrium tamarense* en los tratamientos con MOD producida por los ostiones

Los cultivos de *A. tamarense* crecieron en los tratamientos de agua de mar que estuvo expuesta a la excreción de materia orgánica disuelta (MOD) por ostiones (hasta  $0.07 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ ), en contraste con los controles preparados con la misma agua pero sin la exposición a los ostiones. Esto cumplió con lo esperado de que esta materia orgánica podría ser aprovechada para el requerimiento nutricional de este dinoflagelado mixotrófico, y así promover su crecimiento (Burkholder et al., 2008; Granéli and Legrand, 1999). Se ha demostrado el consumo de materia orgánica disuelta por diferentes especies del género *Alexandrium* en forma de urea (Chang and McClean, 1997; Collos et al., 2004; Dyhrman, S. T. and Anderson, 2003; Leong et al., 2004; Leong and Taguchi, 2004), sustancias húmicas (Carlsson et al., 1999; Cawley et al., 2013; Doblin et al., 2001) y dextranos de alto peso molecular (Legrand and Carlsson, 1998). Si el agua recolectada fuera de la costa que se utilizó para el experimento no contenía la cantidad de nutrientes necesaria para *A. tamarense*, la MOD de los ostiones podría satisfacer el requerimiento del dinoflagelado y así promover su crecimiento.

En un experimento similar al del trabajo presente, Arzul et al. (2001) mantuvieron un ejemplar de *C. gigas* en 5 L de agua de mar, que posteriormente utilizaron para cultivar cuatro especies de fitoplancton. La tasa de crecimiento específica de *Chaetoceros gracilis* fue intensificada ( $0.96 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ) con respecto a un control ( $0.70 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ ), sin embargo las tasas de *Alexandrium minutum* ( $0.35 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ ), *Gymnodinium mikimotoi* ( $0.49 \pm 0.04 \text{ d}^{-1}$ ) y *Heterosigma akashiwo* ( $0.46 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ ) no fueron afectas por el tratamiento del ostión. Además, estos autores evaluaron agua de mar expuesta a un mejillón *Mytilus chilensis*, que intensificó la tasa de crecimiento de *Heterosigma akashiwo* ( $1.63 \pm 0.35 \text{ d}^{-1}$ , en contraste con  $0.80 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$  del control) pero no afectó la tasa de *Alexandrium catenella* ( $0.43 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ ). Los dinoflagelados son conocidos por presentar florecimientos cuando los nutrientes comienzan a escasear, por lo que en aguas templadas típicamente proliferan después que las diatomeas, las cuales crecen cuando existe un exceso de nutrientes (Margalef, 1978; Wyatt, 2014). Aunque Arzul et al. (2001) no lo sugieren, el contenido de nutrientes disponible en el agua que recolectaron para preparar su experimento ( $3.9\text{-}10 \mu\text{M N-NO}_3$  y  $0.5\text{-}2 \mu\text{M P-PO}_4$ ) podría haber sido suficiente para el requerimiento de los dinoflagelados, mientras que la diatomea y la rafidofita podrían haber estado limitadas. En contraste, el agua de mar utilizada en el trabajo presente debe haber tenido una concentración escasa de nutrientes. Otro punto a considerar es que Arzul et al. (2001) utilizaron un solo organismo de cada bivalvo y se mantuvo por menos tiempo (5 horas para el ostión y 18 horas para el mejillón) que en el presente trabajo, por lo que la acumulación de MOD pudo haber sido menor.

En otra investigación (Grzebyk et al., 2003), *A. minutum* incrementó su tasa de crecimiento en agua proveniente de una zona de cultivo de ostiones ( $0.83 \text{ d}^{-1}$ ), que fue suplementada con metales traza en laboratorio, con respecto a un control de agua recolectada lejos de la costa y enriquecida sólo con las mismas cantidades de N y P inorgánico que contenía el agua de la zona de cultivo cuando se recolectó ( $29 \mu\text{M N-NO}_3$  y  $1.14 \mu\text{M P-PO}_4$ ). Estos autores atribuyeron su resultado a la posible presencia de moléculas orgánicas para las que este dinoflagelado es auxótrofo, y que pudieron promover su crecimiento y el consumo de  $\text{N-NO}_3$ . Esto lo comprobaron con el hecho de que el crecimiento de *A. minutum* fue mayor cuando el agua de la zona de cultivo de ostiones no fue filtrada por  $0.2 \mu\text{m}$ , por lo que la fuente de esas moléculas pudo haber sido de bacterias. Grzebyk et al. (2003) no agregaron vitaminas ni metales traza al agua en la que cultivaron *A. minutum*, dos micronutrientes en los que intervienen bacterias. Existen bacterias que producen sideróforos, que se enlazan con especies de Fe que no pueden ser aprovechadas por el fitoplancton y forman un complejo (Carrano et al., 2011). Este complejo se degrada con la luz y se crea una forma utilizable por el fitoplancton. Por otro lado, bacterias pueden producir vitaminas de las cuales los dinoflagelados son auxótrofos, como la vitamina  $\text{B}_{12}$  (Cruz-López, 2014).

A los experimentos realizados con *A. tamarense* en el presente trabajo se les agregaron vitaminas y metales traza de la receta del medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975). Por esto es poco probable que bacterias asociadas a los ostiones hayan intervenido en el experimento al proveer vitaminas y metales de cualquier forma. Además, entre las diferentes interacciones que pueden ocurrir entre bacterias y fitoplancton, está el suplemento de nutrientes inorgánicos por la remineralización de las bacterias (Grossart and Simon, 2007). Sin embargo, el agua con la que se preparó el cultivo de *A. tamarense* fue filtrada previamente por  $0.2 \mu\text{m}$ , lo que debió retirar la mayor parte de las bacterias asociadas a los ostiones. Los conteos de bacterias realizados en los cultivos de *L. polyedrum* del presente trabajo, también cultivados en agua de ostiones que se filtró previamente por  $0.2 \mu\text{m}$ , resultaron en densidades de  $13,257 - 61,315 \text{ cél mL}^{-1}$ . Por esta causa es poco probable que el tratamiento experimental de los ostiones, haya contenido una carga bacteriana importante para promover el crecimiento de *A. tamarense* con respecto al agua control.

## **2. Inhibición de *L. polyedrum* en los tratamientos con MOD producida por los ostiones**

Los tratamientos experimentales con MOD de ostiones, afectaron negativamente el crecimiento de *L. polyedrum*. Si la causa hubiera sido que el agua en la que se mantuvieron los ostiones, y que fue suplementada con metales traza, no hubiera satisfecho los requerimientos nutrimentales del dinoflagelado, los cultivos de control tampoco hubieran crecido.

En los cultivos de *L. polyedrum* ocurrió lo contrario a lo esperado (Arzul et al., 2001; Grzebyk et al., 2003), ya que el dinoflagelado creció en los controles (hasta  $0.12 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ) y no en los tratamientos con agua en la que se mantuvieron ostiones. Este resultado fue contrario a lo

encontrado con *A. tamarense* y tampoco coincidió con las observaciones de Arzul et al. (2001). Si *L. polyedrum* hubiera crecido en los controles con la misma tasa que en el agua que estuvo expuesta a los ostiones, se podría entender que la MOD producida por los ostiones no afectó al dinoflagelado. El agua utilizada para los tratamientos experimentales fue obtenida de profundidad, por lo que no sería raro que fuera rica en nutrientes inorgánicos. Se han reportado valores promedio de  $\text{NO}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{PO}_4$  (2.5  $\mu\text{M}$ ) a 800 m de profundidad para el océano Pacífico (Sverdrup et al., 1942). Además, otros cultivos de fitoplancton mostraron altas densidades al cultivarse con agua, suplementada con vitaminas y metales traza, recolectada a profundidad del mismo sitio que la del presente trabajo (Cristian Hackspiel-Segura, comunicación personal). Por lo tanto el resultado sugirió que la MOD de los ostiones inhibió el crecimiento de *L. polyedrum*.

Se observó en microscopio óptico que las células de *L. polyedrum* de los cultivos que no crecieron estaban vivas, pero se encontraban principalmente en el fondo y no presentaban el comportamiento de motilidad típico de la especie, que sí se observó en los controles. Esto sugirió que la MOD producida por los ostiones además inhibió la motilidad del dinoflagelado. El interés de tener diferentes alternativas para mitigar florecimientos algales nocivos (FAN) ha promovido el descubrimiento de compuestos orgánicos que inhiben el crecimiento de fitoplancton nocivo, como el aponin, el soforolípido y el cocamidopropil (Secher, 2009). Los cocamidopropyles, ramnolípidos y soforolípidos son biosurfactantes que se han demostrado como inhibidores del crecimiento de fitoplancton nocivo y de su motilidad (Baek et al., 2003; Gustafsson et al., 2009; Sun et al., 2004b). El efecto de estos biosurfactantes en dinoflagelados es similar a lo ocurrido con *L. polyedrum* en el trabajo presente.

Los biosurfactantes son producidos por organismos de todos los dominios, se ha reportado para macro- y microorganismos en el océano (Jackson et al., 2015). Se ha comprobado la producción de soforolípidos por más de una decena de especies de levaduras (Revisado en Mulligan et al., 2010). Levaduras marinas se pueden encontrar en aves, peces, algas, mamíferos e invertebrados (Kutty and Philip, 2008). Comunidades de levaduras de Ascomycetes que se encontraron asociadas a tres moluscos bivalvos de una zona de manglar, presentaron mayor densidad en estos organismos que en cuatro crustáceos y en el agua en la que habitaban (de Araujo et al., 1995). Estos autores atribuyeron la densidad mayor en estos organismos, a su actividad de alimentación y a la cantidad de nutrientes en su sistema digestivo. Especies de levaduras asociadas a humanos se encontraron en ostiones y mejillones (Buck et al., 1977).

En particular, Baek et al. (2003) encontraron que el soforolípido fue más efectivo que otros ocho surfactantes para inhibir el crecimiento de tres dinoflagelados y una rafidofita, además de inhibir su motilidad. Estos autores demostraron cuantitativamente la sedimentación de las células. En tiempos de exposición prolongados y concentraciones altas del compuesto, no hubo recuperación de motilidad por los organismos. Sun et al. (2004) encontraron resultados similares de inhibición

con soforolípidos en *A. tamarense*. Baek et al. (2003) argumentaron que la inhibición de la motilidad de estos organismos suele afectar su actividad fisiológica, por lo que pudo influenciar su crecimiento. El comportamiento de motilidad de los dinoflagelados responde a las condiciones ambientales y al estado fisiológico de la población (Kamykowski, 1979).

En particular, los dinoflagelados poseen el rasgo ecológico de la migración vertical, en la que pueden desplazarse a una profundidad de la columna de agua en la cual exista un balance óptimo de condiciones ambientales, principalmente temperatura, luz y nutrientes (Kamykowski, 1981; Richardson, 1984; Smayda, 2010). En el mecanismo de migración vertical diurna, los dinoflagelados se desplazan hacia la superficie durante el día y hacia el sedimento durante la noche (Eppley et al., 1968; Pearre, 2003; Schaeffer et al., 2009). En el presente trabajo se notó a simple vista la migración vertical de *L. polyedrum* cuando se retiraban los cultivos del incubador en el que se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controlados. Probablemente la inhibición en la motilidad de *L. polyedrum* pudo haber afectado su crecimiento. La inhibición de la motilidad y del crecimiento (directa o indirectamente) del dinoflagelado podría haber sido causado por biosurfactantes similares a los soforolípidos, que podrían ser producidos por levaduras o bacterias asociadas a los ostiones, o por estos mismos animales.

### **3. Tasas de crecimiento de *A. tamarense* y *L. polyedrum***

En general las tasas de crecimiento específico que se calcularon para *L. polyedrum* fueron significativamente mayores ( $\alpha = 0.05$ ) que las de *A. tamarense*. La tasa más alta de *L. polyedrum* fue de  $0.12 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ , en un control de agua de mar con metales traza de la receta f/2 (Guillard, 1975). Por otro lado, la tasa más alta en *A. tamarense* fue de  $0.07 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$  en un tratamiento en el que se mantuvieron ostiones. El crecimiento de *A. tamarense* fue promovido por la MOD de ostiones y en *L. polyedrum* no se observó esto. Se ha observado que *A. tamarense*, (incluyendo a la cepa del presente trabajo) y *A. minutum* crecen mejor en medio GSe (Blackburn et al., 2001) que está suplementado con extracto de suelo (Juan Dorantes-Aranda, comunicación personal). Esto concuerda con lo reportado por Prakash et al. (1973), quienes lo atribuyen a sustancias húmicas.

La formación de cadenas es una estrategia de dinoflagelados para una motilidad más eficiente (Fraga et al., 1989; Smayda, 2010). El hecho de que *A. tamarense* forme cadenas podría ser una ventaja sobre *L. polyedrum*, que es un dinoflagelado unicelular. Está reportado que es raro que *A. tamarense* forme cadenas de dos células (John et al., 2014), sin embargo en los experimentos de este trabajo se observaron en microscopio óptico cadenas de hasta cuatro células. El hecho de que se han reportado resultados de inhibición con soforolípidos en *A. tamarense* (Sun et al., 2004a), sugiere que la diferencia de resultados entre los experimentos de este dinoflagelado y *L. polyedrum*, podría ser independiente de la resistencia de la especie a la inhibición por sustancias como los biosurfactantes.

Por otro lado, las tasas de crecimiento específico obtenidas en el presente trabajo fueron bajas en comparación de otras reportadas anteriormente. En un trabajo previo con la misma cepa de *L. polyedrum* se reportó una tasa de crecimiento de  $0.74 \text{ d}^{-1}$  entre los días 9 y 10 de un cultivo que llegó a una densidad celular máxima de  $9,056 \pm 0.15 \text{ cél mL}^{-1}$  (Sampedro-Avila et al., 2013). Cruz-López (2014) obtuvo tasas de crecimiento de alrededor de  $0.15 \text{ d}^{-1}$  en cultivos de *L. polyedrum* también cultivados en tubos de ensayo y evaluados por fluorescencia *in vivo*. *L. polyedrum* incrementó su tasa de crecimiento cuando se alimentó mixotróficamente en medio f/2 y con otras especies de fitoplancton como presas ( $0.303 \text{ d}^{-1}$  en comparación a  $0.157 \text{ d}^{-1}$  sin presa).

Ravizza y Hallegraeff (2015) reportaron un valor de  $0.42$  divisiones  $\text{d}^{-1}$ , que equivale a una tasa de  $0.29 \text{ d}^{-1}$ , en una diatomea cultivada y evaluada por el mismo método que *A. tamarense* en el trabajo presente. En Leong and Taguchi (2004) *A. tamarense* tuvo la tasa de crecimiento más alta ( $0.34 \text{ d}^{-1}$ ) al cultivarse con amonio como fuente de nitrógeno, en comparación con cultivos preparados con nitrato y urea.

Se comprobó que la determinación de tasas de crecimiento por medio de fluorescencia *in vivo* para cultivos de dinoflagelados ya aclimatados, aclimatados por lo menos durante tres semanas previas, tuvo solamente un error de entre 3 y 4% (Brand et al., 1981). Esto y los resultados de Cruz-López (2014) y de Ravizza y Hallegraeff (2015) descartó la posibilidad de que las tasas de crecimiento calculadas en el presente trabajo hubieran sido subestimadas por el método de evaluación de los cultivos con fluorescencia. Grzebyk et al. (2003) encontraron tasas de crecimiento de  $0.19 \text{ d}^{-1}$  en un control y  $0.83 \text{ d}^{-1}$  al cultivar *A. minutum* en agua de estuario. El control en que el dinoflagelado tuvo menor crecimiento tenía concentraciones de N ( $29 \mu\text{M}$ ) y P ( $1.14 \mu\text{M}$ ), similares a las que se esperan en agua de mar profunda del Pacífico. Entonces es probable que las tasas de crecimiento específico del presente trabajo hayan sido más bajas que las mencionadas de la literatura, por haber tenido concentraciones menores de nutrientes orgánicos e inorgánicos.

## Conclusiones

Se encontró que *A. tamarense* puede incrementar sus tasas de crecimiento específico con la disponibilidad de MOD excretada por ostiones ( $0.01 \pm 0.05 \text{ d}^{-1}$ ), y principalmente cuando estos bivalvos se encuentran en inanición ( $0.07 \pm 0.002 \text{ d}^{-1}$ ). Por otro lado, *L. polyedrum* tuvo mayores tasas de crecimiento ( $0.12 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ) que *A. tamarense* en agua de mar control, pero no creció con la MOD de ostiones y disminuyó su motilidad. Este resultado con *L. polyedrum* difiere de estudios anteriores en laboratorio (Arzul et al., 2001; Grzebyk et al., 2003) y de observaciones en campo (Burkholder and Shumway, 2011), ya que no se habían reportado evidencias de que los ostiones inhibieran el crecimiento de fitoplancton. Queda pendiente por resolver si los ostiones y su MOD están asociados a biosurfactantes y si estos compuestos inhibieron el crecimiento y la motilidad de *L. polyedrum* (Baek et al., 2003; Gustafsson et al., 2009; Sun et al., 2004b). El trabajo presente explora una aproximación para estudiar cuál es el rol que tiene la acuicultura de moluscos bivalvos en la generación de florecimientos nocivos de dinoflagelados.

## Bibliografía

- Akaike, H., 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *Int. Symp. Inf. Theory* 267–281. doi:10.1016/j.econlet.2011.12.027
- Andersen, R., 2005. *Algal Culturing Techniques*.
- Anderson, D.M., 1995. Toxic red tides and harmful algal blooms: A practical challenge in coastal oceanography. *Rev. Geophys.* doi:10.1029/95rg00440
- Arzul, G., Seguel, M., Clement, A., 2001. Effect of marine animal excretions on differential growth of phytoplankton species. *ICES J. Mar. Sci.* 58, 386–390. doi:10.1006/jmsc.2000.1038
- Baek, S.H., Sun, X.X., Lee, Y.J., Wang, S.Y., Han, K.N., Choi, J.K., Noh, J.H., Kim, E.K., 2003. Mitigation of harmful algal blooms by sophorolipid. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 651–659.
- Baudinet, D., Alliot, E., Berland, B., Grenz, C., Plante-Cuny, M.R., Plante, R., Salen-Picard, C., 1990. Incidence of mussel culture on biogeochemical fluxes at the sediment-water interface. *Hydrobiologia* 207, 187–196. doi:10.1007/BF00041456
- Bayne, B., Newell, R., 2013. *Physiological Energetics of Marine Molluscs, Physiology*. ACADEMIC PRESS, INC. doi:10.1016/B978-0-12-751404-8.50017-7
- Bayne, B.L., Scullard, C., 1977. Rates of nitrogen excretion by species of mytilus (bivalvia: Mollusca). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 57, 355–369. doi:10.1017/S0025315400021809
- Becker, J.W., Berube, P.M., Follett, C.L., Waterbury, J.B., Chisholm, S.W., DeLong, E.F., Repeta, D.J., 2014. Closely related phytoplankton species produce similar suites of dissolved organic matter. *Front. Microbiol.* 5, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2014.00111
- Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Haskard, K.A., Hallegraeff, G.M., 2001. Reproductive Compatibility Among Four Global Populations of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia* 40, 78–87.
- Brand, L.E., Guillard, R.L., Murphy, L.S., 1981. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.* 3, 193–201.
- Buck, J.D., Bubucis, P.M., Combs, T.J., 1977. Occurrence of human-associated yeasts in bivalve shellfish from Long Island Sound. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 370–378.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8, 77–93.

doi:10.1016/j.hal.2008.08.010

- Burkholder, J.M., Shumway, S.E., 2011. Bivalve Shellfish Aquaculture and Eutrophication, Shellfish Aquaculture and the Environment. doi:10.1002/9780470960967.ch7
- Camacho-Ibar, V.F., Carriquiry, J.D., Smith, S. V, 2003. Non-conservative P and N fluxes and net ecosystem production in San Quintin Bay, México. *Estuaries* 26, 1220–1237.
- Campbell, A., Hudson, D., McLeod, C., Nicholls, C., Pointon, A., 2013. The 2012 paralytic shellfish toxin event in Tasmania associated with the dinoflagellate alga, *Alexandrium tamarense*.
- Carlsson, P., Granéli, E., Segatto, a. Z., 1999. Cycling of biologically available nitrogen in riverine humic substances between marine bacteria, a heterotrophic nanoflagellate and a photosynthetic dinoflagellate. *Aquat. Microb. Ecol.* 18, 23–36. doi:10.3354/ame018023
- Carlucci, A., 1967. Part II. Vitamin B12, Thiamine and Biotin, in: Strickland, J.D.H. (Ed.), *The Ecology of the Plankton off La Jolla, California, in the Period April through September*. pp. 23–31.
- Carrano, C.J., Kuepper, F., Green, D., 2011. The Role of Symbiotic Bacteria in Iron Acquisition and Algal Bloom Formation. *Calif. Sea Grant Coll. Progr.*
- Cawley, K.M., Koerfer, V., Mcknight, D.M., 2013. The role of dissolved organic matter (DOM) quality in the growth enhancement of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) in laboratory culture. *J. Phycol.* 49, 546–554. doi:10.1111/jpy.12063
- Chang, F.H., McClean, M., 1997. (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 31, 1–7. doi:10.1080/00288330.1997.9516740
- Cloern, J., Dufford, R., 2005. Phytoplankton community ecology: Principles applied in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 285, 11. doi:10.3354/meps285011
- Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., Souchu, P., 2004. Nitrogenous Nutrition of *Alexandrium Catenella* (Dinophyceae) in Cultures and in Thau Lagoon, Southern France<sup>1</sup>. *J. Phycol.* 40, 96–103. doi:10.1046/j.1529-8817.2004.03034.x
- Crawford, C.M., Macleod, C.K.A., Mitchell, I.M., 2003. Effects of shellfish farming on the benthic environment. *Aquaculture* 224, 117–140. doi:10.1016/S0044-8486(03)00210-2
- Cruz-López, R., 2014. Bacteria, vitamins and *Lingulodinium polyedrum* – a bloom forming dinoflagellate. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Darwin, C., 1839. *The Voyage of the Beagle*. Cambridge Univ. Press. New York.

- de Araujo, F. V., Soares, C.A.G., Hagler, A.N., Mendonça-Hagler, L.C., 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. *Antonie Van Leeuwenhoek* 68, 91–99. doi:10.1007/BF00873096
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6
- Doblin, M., Legrand, C., Carlsson, P., Hummert, C., Granéli, E., Hallegraeff, G., 2001. Uptake of radioactively labeled humic substances by the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. In: Hallegraeff, G., Blackburn, S., Bolch, C., Lewis, R. (Eds.), IOC-UNESCO. pp. 336–339.
- Dupuy, C., Pastoureaud, A., Ryckaert, M., Sauriau, P.G., Montanié, H., 2000. Impact of the oyster *Crassostrea gigas* on a microbial community in Atlantic coastal ponds near La Rochelle. *Aquat. Microb. Ecol.* 22, 227–242. doi:10.3354/ame022227
- Dyhrman, S. T. and Anderson, D.M., 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. *Limnol. Oceanogr.* 48, 647–655. doi:10.4319/lo.2003.48.2.0647
- Eppley, R.W., Holm-Harisen, O., Strickland, J.D.H., 1968. Some observations on the vertical migration of dinoflagellates. *J. Phycol.* 4, 333–340.
- Fauchot, J., Levasseur, M., Roy, S., 2005. Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 296, 241–250. doi:10.3354/meps296241
- Fraga, S., Gallagher, S.M., Anderson, D.M., 1989. Chain-forming dinoflagellates: an adaptation to red tides, in: *Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. pp. 281–284.
- García-Mendoza, E., Sánchez-Bravo, Y. a., Turner, A., Blanco, J., O’Neil, A., Mancera-Flores, J., Pérez-Brunius, P., Rivas, D., Almazán-Becerril, A., Peña-Manjarrez, J.L., 2014. Lipophilic toxins in cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Baja California, Mexico. *Toxicon* 90, 111–123. doi:10.1016/j.toxicon.2014.07.017
- GEOHAB, 2006. *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Harmful Algal Blooms in Eutrophic Systems*, in: Glibert, P. (Ed.), IOC and SCOR. Paris and Baltimore.
- Granéli, E., Johansson, N., 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions. *Harmful Algae* 2, 135–145. doi:10.1016/S1568-9883(03)00006-4
- Granéli, E., Legrand, C., 1999. The role of C, N and P in dissolved and particulate organic matter as

- a nutrient source for phytoplankton growth, including toxic species. *Aquat. Ecol.* 33, 17–27.
- Granéli, E., Turner, J., 2006. *Ecology of harmful algae*. Springer.
- Grossart, H.-P., Simon, M., 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat. Microb. Ecol.* 47, 163–176. doi:10.3354/ame047163
- Grzebyk, D., Béchemin, C., Ward, C.J., Vérité, C., Codd, G. a., Maestrini, S.Y., 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *J. Plankton Res.* 25, 1185–1199. doi:10.1093/plankt/fbg088
- Guillard, R.R., 1975. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, Culture of Marine Invertebrate Animals. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4615-8714-9
- Gustafsson, S., Hultberg, M., Figueroa, R.I., Rengefors, K., 2009. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. *Harmful Algae* 8, 857–863. doi:10.1016/j.hal.2009.04.002
- Hallegraeff, G.M., 1993. Harmful algal blooms in the Australian region. *Mar. Pollut. Bull.* 25, 186–190. doi:10.1016/0025-326X(92)90223-S
- Hammen, C.S., 1969. Metabolism of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Am. Zool.* 9, 309–318.
- Jackson, S.A., Borchert, E., O’Gara, F., Dobson, A.D.W., 2015. Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 176–182. doi:10.1016/j.copbio.2015.03.004
- Jeong, H.J., Jae, Y.P., Jae, H.N., Myung, O.P., Jeong, H.H., Kyeong, A.S., Jeng, C., Chi, N.S., Kwang, Y.L., Won, H.Y., 2005. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.* 41, 131–143. doi:10.3354/ame041131
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., 2014. Formal Revision of the *Alexandrium tamarensis* Species Complex (Dinophyceae) Taxonomy: The Introduction of Five Species with Emphasis on Molecular-based ( rDNA ) Classification. *Ann. Anat.* 165, 779–804. doi:10.1016/j.protis.2014.10.001
- Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-frate, H., Ludwig, J., Kschischo, M., 2010. Grofit: Fitting biological growth curves. *J. Stat. Softw.* 33, 1–21. doi:10.1038/npre.2010.4508.1
- Kamykowski, D., 1981. Laboratory experiments on the diurnal vertical migration of marine dinoflagellates through temperature gradients. *Mar. Biol.* 62, 57–64. doi:10.1007/BF00396951

- Kamykowski, D., 1979. The growth response of a model *Gymnodinium splendens* in stationary and wavy water columns. *Mar. Biol.* 50, 289–303. doi:10.1007/BF00387006
- Kim, H., Paiik, J., Lix, S., An, K., 1993. Population cell volume and carbon content in monospecific dinoflagellate blooms. *Toxic Phytoplankt. Bloom. sea. Proc. 5th Int. Conf. Toxic Mar. Phytoplankton.* Elsevier. 769–773.
- Kudela, R.M., Cochlan, W.P., 2000. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off southern California. *Aquat. Microb. Ecol.* 21, 31–47. doi:10.3354/ame021031
- Kutty, S.N., Philip, R., 2008. Marine yeasts—a review. *Yeast* 25, 465–483. doi:10.1002/yea.1599
- La Rosa, T., Mirto, S., Favaloro, E., Savona, B., Sarà, G., Danovaro, R., Mazzola, A., 2002. Impact on the water column biogeochemistry of a Mediterranean mussel and fish farm. *Water Res.* 36, 713–721. doi:10.1016/S0043-1354(01)00274-3
- Lalli, C.M., Parsons, T.R., 1995. *Biological Oceanography: An Introduction.*
- Landsberg, J.H., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.* doi:10.1080/20026491051695
- Legrand, C., Carlsson, P., 1998. Uptake of high molecular weight dextran by the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 81–86. doi:10.3354/ame016081
- Leong, S.C.Y., Murata, A., Nagashima, Y., Taguchi, S., 2004. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon* 43, 407–415. doi:10.1016/j.toxicon.2004.01.015
- Leong, S.C.Y., Taguchi, S., 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* to a range of nitrogen sources and concentrations: Growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* 515, 215–224. doi:10.1023/B:HYDR.0000027331.49819.a4
- Lucas, M.I., Newel, R.C., Shumway, S.E., Seiderer, L.J., Bally, R., 1987. Particle clearance and yield in relation to bacterioplankton and suspended particulate availability in estuarine and open coast populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 36, 215–224. doi:10.3354/meps036215
- Mao, Y., Zhou, Y., Yang, H., Wang, R., 2006. Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture* 253, 322–333. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.05.033
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment.

- Mulligan, C.N., Sharma, S.K., Ackmez, M., Mudhoo, A., Sharma, S.K., 2010. Biosurfactants : research trends and applications 328.
- Panzeca, C., Beck, A.J., Tovar-Sanchez, A., Segovia-Zavala, J., Taylor, G.T., Gobler, C.J., Sañudo-Wilhelmy, S. a., 2009. Distributions of dissolved vitamin B12 and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85, 223–230. doi:10.1016/j.ecss.2009.08.016
- Parker, M., 1987. Exceptional plankton blooms conclusion of discussions: Convener's report. Rapp. PV. Reun. Cons. Int. 187, 108–114.
- Pearre, S., 2003. Eat and run? The hunger/satiation hypothesis in vertical migration: history, evidence and consequences. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 78, 1–79.
- Pena-Manjarrez, J., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Environmental factors influencing the variability of *Lingulodinium polyedrum* and *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) cyst production. *Ciencias Mar.* 35, 1–14.
- Prakash, A., Rashid, M.A., Jensen, A., Subba Rao, D. V., 1973. Influence of Humic Substances on the Growth of Marine Phytoplankton: Dinoflagellates1. *Limnol. Oceanogr.* 18, 516–524.
- Prins, T.C., Smaal, A.C., Dame, R.F., 1998. A review of the feedbacks between bivalve grazing and ecosystem processes. *Aquat. Ecol.* 31, 349–359. doi:10.1023/a:1009924624259
- R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> [WWW Document].
- Ravizza, M., Hallegraeff, G., 2015. Environmental conditions influencing growth rate and stalk formation in the estuarine diatom *Licmophora flabellata* ( Carmichael ex Greville ) C . *Agardh* 30, 197–208. doi:10.1080/0269249X.2015.1020071
- Richardson, D.K., 1984. DINOPHYTE FLAGELLA : A COST-BENEFIT ANALYSIS 259–276.
- Richardson, K., 1997. Harmful or Exceptional Phytoplankton Blooms in the Marine Ecosystem, *Advances in Marine Biology*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60225-4
- Sampedro-Avila, J.E., Valenzuela-Espinoza, E., León-Mancilla, S., Bonnet-Calzada, B., Nava-Gómez, B., 2013. Cultivo estático del dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* en diferentes concentraciones de nutrientes, in: Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología Del Mar XX. p. 6.
- Sanders, R., Porter, K., 1988. Phagotrophic phytoflagellates, in: Marshall, K. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York, pp. 167–192.

- Santos, B.A., Carreto, J.I., 1992. Migraciones verticales de *Alexandrium excavatum* (Braarud) Balech et Tangen en columnas experimentales. *Bol. do Inst. Ocean.* 40, 15–25.
- Schaeffer, B. a., Kamykowski, D., Sinclair, G., McKay, L., Milligan, E.J., 2009. Diel vertical migration thresholds of *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 8, 692–698. doi:10.1016/j.hal.2009.01.002
- Secher, S., 2009. Measures to Control Harmful Algal Blooms. *Plymouth Student Sci.* 2, 212–227.
- Sinclair, G., Kamykowski, D., Milligan, E., Schaeffer, B., 2006. Nitrate uptake by *Karenia brevis*. I. Influences of prior environmental exposure and biochemical state on diel uptake of nitrate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 328, 117–124. doi:10.3354/meps328117
- Smayda, T.J., 2010. Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellate species in upwelling systems. 2. Motility and migratory behaviour. *Prog. Oceanogr.* 85, 71–91. doi:10.1016/j.pocean.2010.02.005
- Smayda, T.J., 1997a. Bloom dynamics: Physiology, behavior, trophic effects. *Limnol. Oceanogr.* 1132–1136.
- Smayda, T.J., 1997b. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1137–1153. doi:10.4319/lo.1997.42.5\_part\_2.1137
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic, in: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton: Proceedings of the Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Lund, Sweden, pp. 29–40.
- Sun, X.X., Choi, J.K., Kim, E.K., 2004a. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 304, 35–49. doi:10.1016/j.jembe.2003.11.020
- Sun, X.X., Han, K.N., Choi, J.K., Kim, E.K., 2004b. Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 937–945. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.11.021
- Sverdrup, H., Johnson, M., Fleming, R., 1942. *The Oceans, Their Physics, Chemistry, and General Biology*. New York: Prentice-Hall.
- Tett, P., 1987. The ecophysiology of exceptional blooms. *Rapp. Proces-verbaux des Reun. Cons. Int. pour l'Exploration la Mer* 187, 47–60.
- Ukeles, R., 1965. Inhibition of Unicellular Algae By Synthetic Surface???Active Agents. *J. Phycol.* 1,

102–110. doi:10.1111/j.1529-8817.1965.tb04566.x

Weiss, E.T., Carmichael, R.H., Valiela, I., 2002. The effect of nitrogen loading on the growth rates of quahogs (*Mercenaria mercenaria*) and soft-shell clams (*Mya arenaria*) through changes in food supply. *Aquaculture* 211, 275–289. doi:10.1016/S0044-8486(02)00018-2

Wyatt, T., 2014. Margalef's mandala and phytoplankton bloom strategies. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 101, 32–49. doi:10.1016/j.dsr2.2012.12.006

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x