



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas



**Caracterización de aislados de *Chattonella* spp.
de la Bahía de Todos Santos, y evaluación de su efecto sobre
estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

O C E A N Ó L O G O

PRESENTA

NORMA VALERIA AHUMADA FIERRO

Ensenada, Baja California 2017.

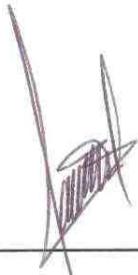
**Caracterización de aislados de *Chattonella* spp.
de la Bahía de Todos Santos, y evaluación de su efecto sobre
estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas***

T E S I S

QUE PRESENTA:

NORMA VALERIA AHUMADA FIERRO

APROBADA POR:



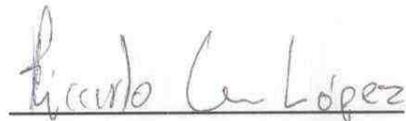
Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre
Director



Dr. Ernesto García Mendoza
Co-director



Dra. Ana María De Monserrat Iñiguez Martínez
Sinodal



Dr. Ricardo Cruz López
Sinodal

Caracterización de aislados de *Chattonella* spp. de la Bahía de Todos Santos y evaluación de su efecto sobre estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas*

Resumen

Chattonella es un género de rafdofitas marinas que produce metabolitos secundarios tóxicos que ocasionan la muerte de peces, moluscos bivalvos y otros organismos marinos, lo cual tiene repercusiones directas con la maricultura a nivel mundial. En el verano del 2016 se presentó un florecimiento algal nocivo (FAN) de *Chattonella* spp. en la Bahía Todos Santos (BTS), Ensenada, B.C que ocasionó una mortandad masiva de atún aleta azul en encierros. Esto afectó a las empresas que se dedican a la captura, engorda y exportación de atún aleta azul en la región. Además, durante el periodo de ocurrencia del FAN se presentaron altas mortalidades de larvas y semilla del ostión *Crassostrea gigas* en laboratorio. No existe información sobre la ecología y potencial toxico de especies de *Chattonella* de la región. Por lo tanto, en este trabajo se establecieron dos cultivos de *Chattonella* spp. aisladas de la región, que presentaron morfología y características de crecimiento distintos. Asimismo, se evaluó su efecto nocivo sobre el movimiento de estadios tempranos de *Crassostrea gigas*. El aislado denominado como A presento un crecimiento celular mayor que el aislado denominado como B en tres de cuatro condiciones de cultivo probadas. Las tasas de crecimiento más altas de 1.44 y 0.68 día⁻¹ se detectaron a 16 °C y 190 µmol quanta m⁻² s⁻¹ para el aislado A y el aislado B respectivamente. Sin embargo, se registró una mayor abundancia celular (3,607 células mL⁻¹ aislado A y 3,357 células mL⁻¹ el aislado) a 20 °C y 190 µmol quanta m⁻² s⁻¹. Se identificó que los aislados de *Chattonella* (1x10³, 1x10⁴, 2x10⁴ cel mL⁻¹) disminuyen el movimiento de las larvas D y umbonada de *Crassostrea gigas* después de las primeras 12 horas de estar en contacto directo. Asimismo, se observó que el extracto crudo de *Chattonella* (2x10⁴ cel mL⁻¹) tiene un efecto paralizante sobre estas primeras etapas larvarias del ostión. Por lo tanto, *Chattonella* spp. de la BTS presenta un potencial nocivo importante para etapas tempranas del ostión *Crassostrea gigas*.

Palabras clave: *Chattonella*, microalgas, ictotóxicas, tasa de crecimiento

Dedicatoria

A mis padres, con amor.

Agradecimientos.

A mis directores por su guía y consejos, a la Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre por su apoyo y confianza durante todo el proceso, y al Dr. Ernesto García por el interés y entusiasmo en este proyecto.

Agradezco a mis sinodales, al Dr. Ricardo Cruz por su paciencia y el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo, por las sugerencias y por su crítica constructiva, y a la Dra. Ana María De Moncerrat Íñiguez por sus comentarios para mejorar este trabajo, y por el espacio brindado para realizar los bioensayos.

Al laboratorio Maxmar Mariscos S.A. DE C.V. por el apoyo y la confianza brindado al facilitar las larvas, en especial a Ma. del Carmen Álvarez que fue muy amable todo el tiempo.

A la Dra. Christine Band-Schmidt y a su equipo de trabajo en el IPN-CICIMAR, por la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, por el apoyo, las atenciones y los conocimientos brindados. Asimismo gracias por proporcionar las cepas.

Al Dr. Helmut Maske, por permitirme trabajar en el laboratorio de Microbios Marinos del CICESE, así como al M. en C. Cesar Almeda Jauregui.

Al Dr. Ulises Pacheco por facilitarme la cámara y el microscopio para realizar mis bioensayos. Al Dr. Carlos Alberto Flores y al Dr. Ricardo Valencia por su colaboración en la parte de los análisis moleculares. Al M. en C. David Ramírez Delgado por su ayuda en la aparte estadística.

A todos los que forman parte del equipo de trabajo de Biología Algal y FICOTOX, Jennifer, Yaireb, Michelle, Ramón, Viridiana y Patricia.

A la Red temática sobre Florecimientos Algales Nocivos (RedFAN) por su apoyo durante mi estancia en el IPN-CICIMAR.

Al CONACYT por el apoyo económico mediante el proyecto CB-2012-10-181078 "Factores ambientales que afectan la fotoprotección y eficiencia fotosintética en el sargazo gigante, *Macrocystis pyrifera* II".

A mis padres por su apoyo incondicional, y a mis hermanas Flor, Michelle y Marlene por estar siempre presente, aun en la distancia. Gracias por todo su amor.

Tabla de contenido

Resumen	
Dedicatoria	
Agradecimientos	
Lista de figura	
Lista de tablas	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	4
III. Justificación	9
IV. Objetivo general	10
IV.I. Objetivos particulares	10
V. Métodos	11
V.I. Recolección de muestras y aislamiento	11
V.II. Identificación molecular	12
V.III. Tasa de crecimiento de las cepas bajo diversas condiciones de temperatura e irradiancia	13
V.IV. Bioensayos	15
VI. Resultados	18
VI.I. Aislados de <i>Chattonella</i> spp.	18
VI.II. Identificación celular	20
VI.III. Tasa de crecimiento de los aislados bajo diferentes condiciones de intensidad de irradiancia y temperatura	21
VI.IV. Efecto de los aislados de <i>Chattonella</i> sobre estadios tempranos de <i>Crassostrea gigas</i>	27
VII. Discusión	38
VII.I. Identificación	38
VII.II. Identificación molecular de los aislados de <i>Chattonella</i>	39
VII.III. Crecimiento de los aislados de <i>Chattonella</i> spp.	40
VII.IV. Efecto de <i>Chattonella</i> sobre el movimiento de larvas de <i>Crassostrea gigas</i>	42
VIII. Conclusiones	44
Lista de referencias	45
Anexos	49

Lista de Figuras

Figura 1. Morfologías de *Chattonella* spp. aislada de la Bahía de Todos Santos fijadas con una dilución de una solución amortiguadora de Hepes (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1% (Katano *et al.*, 2009). Aislado A (a-d) y aislado B (e-g). El flagelo señalado con flecha (\leftarrow).

Figura 2. Electroforesis de productos de PCR con cebadores Chamo-ITS: L escalera (100 pb), aislado A, aislado B, *Chattonella ovata*, *C. marina*, una mezcla de los aislados A y B y el control negativo. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% TAE 1X, teñido con bromuro de etidio corrida a 90 v, durante 40 min.

Figura 3. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 20°C y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día de muestreo del aislado A (\bullet) y B (\circ). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas. Ecuación del ajuste de Gompertz para *Chattonella* A=2972*exp(-exp(2.28-(0.60*x))) con $r^2=0.85$, y *Chattonella* B=2355*exp(-exp(1.97-(0.61*x))) con $r^2=0.80$.

Figura 4. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 16 °C y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día de muestreo del aislado A (\bullet) y B (\circ). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas. Ecuación de Gompertz: *Chattonella* A=2338*exp(-exp(6.31-1.44)*x) con $r^2=0.84$ y *Chattonella* B=3176*exp(-exp(3.38-0.68)*x) con $r^2=0.94$.

Figura 5. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 20°C y 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día de muestreo del aislado A (\bullet) y B (\circ).

Figura 6. . Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 16°C y 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día de muestreo del aislado A (\bullet) y B (\circ). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante una línea. Ecuación del ajuste de Gompertz para *Chattonella* A=213*exp(-exp(-0.12-(0.41*x))) con $r^2=0.84$.

Figura 7. Porcentaje de larva D que perdió el movimiento debido a la exposición directa del aislado A de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 8. Porcentaje de larva D sin movimiento después de la exposición directa del aislado B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 9. Porcentaje de larva umbonada que perdió el movimiento debido a la exposición directa del aislado A de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 10. Porcentaje de larva umbonada sin movimiento después de la exposición directa del aislado B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 11. Porcentaje de larva D sin movimiento después de agregar los extractos de los aislado A y B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 12. Respuesta del movimiento de la larva umbonada después de la aplicación de los extractos de los aislado A y B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 13. Porcentaje de larva D sin movimiento como resultado del bioensayo de separación física. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Figura 14. Porcentaje de larva umbonada sin movimiento como resultado del bioensayo de exposición sin contacto directo. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

Lista de Tablas

Tabla I. Descripción de las cepas CMCV-1 y COPV-1 que se utilizaron como control positivo.

Tabla II. Contenido de la solución de la reacción en cadena de la polimerasa (Qiagen).

Tabla III. Diseño de los bioensayos implementados para identificar el efecto que tienen los aislados de *Chattonella* sobre las larvas de *Crassostrea gigas*.

Tabla IV. Tamaño celular de los dos aislados de *Chattonella* (A y B) cultivados en medio L1 a 20°C, en un ciclo 12:12 luz a oscuridad.

Tabla V. Tasas de crecimiento (I: $\mu = \ln\left(\frac{Nt_2/Nt_1}{t_2-t_1}\right)$, II: ajuste de Gompertz) y abundancias celulares de los aislados cultivadas en medio L1 con un ciclo luz oscuridad 12:12, a dos temperaturas (16 y 20 °C) y dos intensidades de irradiancia (30 y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

I. Introducción

Las acumulaciones de fitoplancton nocivo asociadas a un impacto negativo sobre el ambiente, la salud pública y/o actividades económicas (acuicultura, pesquerías y turismo) han incrementado recientemente su prevalencia y distribución geográfica a escala mundial, específicamente en la costa oeste de Norteamérica (Band-Schmidt *et al.*, 2003 en Mendoza-Flores, 2013; Lewitus *et al.*, 2012; García-Mendoza *et al.*, 2016). Tal es el caso de los florecimientos de la rafidofita *Chattonella*, que eran registrados principalmente en regiones tropicales y subtropicales; sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una aparente ampliación de su rango de distribución geográfica hacia regiones templadas.

Chattonella es un género de fitoflagelados marinos pertenecientes a la clase Raphidophyceae, del filo Ochrophyta. Se conocen cinco especies de este género: *C. antiqua*, *C. marina*, *C. minima*, *C. ovata* y *C. subsalsa* (Imai y Yamaguchi, 2012).

Las células de *Chattonella* son móviles e independientes, miden de 20 a 130 µm de largo, y tienen una forma ovoide, alargada o piriforme (Imai y Yamaguchi, 2012). Presentan un gran número de cloroplastos de color amarillo, dorado y verde, con clorofila a y c (Band-Schmidt *et al.*, 2004). Poseen dos flagelos, de los cuales uno le permite moverse de forma dinámica, y el otro no se mueve (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Imai y Yamaguchi, 2012). La membrana celular carece de una estructura rígida que las proteja y solo poseen un glicocálix en la superficie. Por lo tanto, las células son frágiles y es difícil conservarlas con métodos tradicionales de preservación, debido a la ocurrencia de cambios osmóticos durante la fijación lenta

(Katano *et al.*, 2009). Las células de *Chattonella* se multiplican por división binaria (Imai y Yamaguchi, 2012).

La ocurrencia de los florecimientos algales nocivos (FAN) de *Chattonella* está relacionada con condiciones ambientales (irradiancia, temperatura del agua, salinidad y nutrientes) adecuadas para su crecimiento, así como sus respuestas fisiológicas ante cambios ambientales y características de desarrollo, como por ejemplo la formación de quistes de resistencia (Imai y Yamaguchi, 2012; García-Mendoza *et al.*, 2016).

Los FAN de *Chattonella* están asociados a la mortandad de peces y algunos moluscos bivalvos, esto ha afectado de manera importante a la maricultura a nivel mundial (Cortez- Altamirano *et al.*, 2006; Imai y Yamaguchi, 2012). No se conoce cuál es el mecanismo preciso que causa la muerte de distintos organismos, se ha mencionado que está asociada a la producción de ácidos grasos altamente insaturados (Okaichi, 1987 en Band-Schmidt *et al.*, 2011), así como brevetoxinas y compuestos análogos (Keppler *et al.*, 2006; Pérez-Morales y Band-Schmidt, 2011). Sin embargo, se considera que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) desempeña un papel clave en la muerte de los peces, ya que la glicocálix de la membrana celular tiene un sistema de generación de O_2^- dependiente de NADPH. Por lo tanto, la acumulación de glicocálix en las branquias provoca daños severos en los tejidos branquiales mediante las ROS que conduce a la muerte del pez (Kim y Oda, 2010).

Estudios previos han identificado el mecanismo tóxico de *Chattonella* sobre peces y moluscos adultos (Pérez-Morales *et al.*, 2013). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre los efectos sobre las etapas larvianas de moluscos. En la mayoría de las ocasiones las pérdidas económicas sobre el proceso de cultivo de moluscos están relacionadas a la mortandad de las larvas (trocófora y D), ya que al ser planctónicas se ven afectados directamente por la formación o persistencia de un FAN (Basti *et al.*, 2016; Matsuyama *et al.*, 2001).

Existen estudios sobre los efectos dañinos de los dinoflagelados sobre las larvas de especies de bivalvos del Pacífico, *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *Mercenaria mercenaria*, *Pecten maximus* y *Argopecten irradians*; sin embargo, se desconoce el efecto que tiene *Chattonella* sobre las primeras etapas de vida de los bivalvos de importancia comercial (Basti *et al.*, 2016).

En verano del 2016 se presentó en la Bahía de Todos Santos B. C., México un FAN de *Chattonella* que causó la muerte de atún aleta azul en encierros. Asimismo, durante este periodo se presentó muerte en los estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas* en un laboratorio de producción comercial localizado en la Bahía. Por lo tanto, es importante aislar células de *Chattonella*, conocer las condiciones ambientales que favorecen su crecimiento, formación o persistencia de un FAN, así como su efecto nocivo sobre estadios tempranos del ostión *C. gigas* como una posible causa de las mortandades reportadas en el laboratorio de producción de semilla de este organismo.

II. Antecedentes.

El primer reporte de un florecimiento del género *Chattonella* fue en la Costa de Malabar, India, originalmente *C. marina* se asignó como *Hornellia marina* (Subrahmanyam, 1954). Después de este evento se han reportado florecimientos de este género relacionadas con muertes masivas de peces en diversas partes del mundo, como las regiones tropicales y subtropicales (Japón, Corea, China, la India, Sur de África); sin embargo, existen registros de su presencia en aguas templadas del Atlántico Norte como en Dinamarca y Noruega (Imai y Yamaguchi, 2012; Moestrup, 2002).

En Estados Unidos se tienen registro de la presencia de especies de *Chattonella* desde 1998 en Salton Sea, California, USA pero, no siempre relacionada con mortandad de peces (Tiffany *et al.*, 2001; Tomas, 1998 en Band-Schmidt *et al.*, 2004). También se ha reportado este género en Brasil desde hace más de dos décadas (Odebrecht y Abreu, 1995 en Moestrup, 2002).

Chattonella marina y *C. antiqua*, así como el dinoflagelado *Karenia mikimotoi*, son las tres especies que frecuentemente causan severos daños (alrededor de un millón de dólares USD) en la maricultura japonesa (Taylor y Trainer, 2002). El récord de daños causados en la maricultura por la presencia de *C. antiqua* fue en 1972 en Harima Nada, Japón, donde se perdieron cerca de 90 millones de dólares por muerte en encierros del pez pelágico *Seriola* spp. (Imai y Yamaguchi, 2012).

Si bien los florecimientos de este género son conocidos por el daño a peces, también existen registros de los efectos que provoca *Chattonella* sobre algunos invertebrados marinos como camarón, almejas, pulpos y ostiones (Basti *et al.*, 2016). Keppler *et al.* (2005) mencionan que los efectos sobre los invertebrados son subletales y, por lo tanto, menos obvios y más difíciles de detectar y documentar.

Se han realizado diversos estudios con el propósito de identificar los efectos que provoca *Chattonella* a diversos moluscos bivalvos; por ejemplo se ha estudiado la desestabilización lisosomal en los hepatopáncreas del ostión *Crassostrea virginica* tras la exposición experimental a *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella subsalsa* y *Fibrocapsa japonica*, indicándose que las rafdofitas ponen en peligro la salud de este bivalvo (Keppler *et al.*, 2005, 2006). Por otro lado, Kowk *et al.* (2012) mencionan que la exposición a *C. marina* no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática antioxidante ni sobre la peroxidación lipídica de adultos del mejillón *Perna viridis*, lo que sugiere que los altos niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producidos por *C. marina* no parecen ser tóxicos para esta especie de almeja.

Matsuyama *et al.* (2001) mencionan que la exposición a *Chattonella antiqua* a una abundancia de 1x10⁴ cel mL⁻¹ durante 10 horas, no tiene efectos sobre larvas trocóforas de *Crassostrea gigas*.

Por otro lado, Bastie *et al.* (2016) observó que la tasa de actividad de la larva D de *Pinctada fucata martensii* se redujo significativamente a las 24 horas de ser expuesta a *C. antiqua* (8x10³ cel mL⁻¹) y *C. marina* (8x10³ cel mL⁻¹), e identificó una mortandad significativa a las 86 horas de exposición.

En México se han registrado FAN de *Chattonella* dentro del Golfo de California. El primer caso se presentó en 2003 en la Bahía de Kun-kaak, Sonora, con abundancias de *C. marina* y *C. ovata* de 267 y 546 células mL⁻¹, respectivamente. En este FAN se observó una mortandad de peces y algunas especies de almejas y pepinos de mar (Barraza-Guardado *et al.*, 2004). En 2004, Band-Schmid *et al.* (2005) reportó un florecimiento de *C. marina* en Bahía de La Paz, con abundancias de 1.9 a 3.5 x 10⁶ cel L⁻¹; sin embargo no se observó mortandad de organismos.

En 2005, se registró por primera ocasión la presencia de *C. subsalsa*, en la Laguna Navachiste, Sinaloa en la costa este del Golfo, con abundancias de 5 a 9.6 x10⁵ cel l⁻¹ (Martínez-López *et al.*, 2006). En 2006, se presentó mortandad de peces de entre 12 y 15 toneladas en algunas playas de Sinaloa, las cuales fueron asociadas a florecimientos de *C. marina* y *C. ovata* (Cortés-Altamirano *et al.*, 2006).

En el Golfo de México y las costas del Pacífico se ha reportado a *Chattonella* acompañadas de *Fibrocapsa japonica* y *Heterosigma akashiwo*, especies que también pertenecen a la clase Raphidophyceae (Band-Schmidt *et al.*, 2004; Rodríguez-Palacios *et al.*, 2011). En el Golfo de California se ha documentado la presencia de *Chattonella* con abundancias altas durante abril y mayo y se ha registrado su presencia hasta octubre con menores abundancias a las de primavera (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005). Por otro lado existe literatura donde, se reporta un florecimiento en el cual coocurrieron *Gymnodinium catenatum* y *Chattonella marina*, con una dominancia de esta última sobre el dinoflagelado (López-Cortés *et al.*, 2011).

Band-Schmidt *et al.* (2012), confirmaron la presencia de *Chattonella subsalsa* y *C. marina*, en las costas del Golfo de California mediante el uso de genes ribosomales (5.8S) y del gen COI. Asimismo, identificó que las cepas del Golfo de California predicen el radical superóxido y peroxidación lipídica, además de tener la composición típica de ácidos grasos de la clase Raphidophyceae. Se demostró que las fases iniciales del pez cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus* son altamente sensibles a la exposición a cepas de *Chattonella*, además de que no es necesario una exposición directa para causar la mortalidad de las larvas (Pérez-Morales *et al.*, 2014).

Los FAN tienen una repercusión directa sobre los ecosistemas y la salud pública, por eso es importante estudiar la cinética del crecimiento de especies con potencial nocivo, e identificar el cambio de la velocidad del crecimiento al modificarse las condiciones ambientales. Se reconocen diferentes fases de crecimiento, las cuales describen la forma en la cual cambia la abundancia celular:

- a) Fase lag o de acondicionamiento: muestra el comportamiento inicial en el cual las células se ajustan a las condiciones del medio. Los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo.
- b) Fase de crecimiento exponencial: se observa un crecimiento exponencial debido a la falta de factores limitantes, existe los nutrientes adecuados y el ambiente es el favorable.

- c) Fase de desaceleración: existe menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo que la tasa de división celular disminuye, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máxima abundancia.
- d) Fase estacionaria: las condiciones de cultivo son limitantes y el crecimiento es igual a la mortalidad, la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes.
- e) Fase de muerte o decaimiento: la tasa de mortalidad es superior a la de crecimiento, por lo tanto la concentración disminuye. Existe una muerte o lisis celular debido a la ausencia de nutrientes y del incremento en la proporción respiración fotosíntesis (Arredondo *et al.*, 1997).

III. Justificación

Durante el 2016 se presentó un florecimiento algal nocivo (FAN) de *Chattonella* spp. en la Bahía Todos Santos (BTS), Ensenada, B.C, el cual causó una mortandad masiva de atún aleta azul (*Thunnus thynnus orientalis*) cultivados encierros. Esto, afectó a las empresas que se dedican a la captura, engorda y exportación del atún. Además, en el mismo periodo se presentó una alta mortandad tanto de larva como de semilla de ostión en un laboratorio ubicado en la BTS. No se conoce cuáles fueron las causas de este evento y probablemente estuvo relacionado a la presencia de *Chattonella* en la BTS. Sin embargo no existen estudios que expliquen los efectos nocivos de *Chattonella*, aun cuando es una especie potencial a formar FAN y ocasionar daños a la actividad acuícola y pesquera de la región. Por lo tanto, es necesario identificar a las especies de *Chattonella* que causaron el FAN y conocer sus condiciones óptimas de crecimiento. Asimismo, es necesario evaluar los posibles efectos negativos sobre estadios larvarios de ostión, organismo de importancia comercial en la región.

IV. Objetivo general.

Conocer las características de crecimiento de *Chattonella* spp. aislada de la Bahía Todos Santos en condiciones de cultivo y evaluar su potencial nocivo sobre estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas*.

IV.I. Objetivos particulares.

1. Aislar y establecer cultivos estáticos de *Chattonella* spp. de la Bahía Todos Santos (BTS).
2. Establecer la identidad taxonómica de los aislados.
3. Estimar la tasa de crecimiento de los aislados bajo diversas condiciones de irradiancia y temperatura.
4. Evaluar el efecto de los aislados de *Chattonella* spp. sobre el movimiento de estadios tempranos de *Crassostrea gigas*.

V. Métodos

IV.I. Recolección de muestras y aislamiento

Se aislaron células de *Chattonella* de muestras de fitoplancton colectadas durante el verano del 2016 en la Bahía Salsipuedes y Rincón de Ballenas en la Bahía de Todos Santos, B.C. México ambos lugares son de importancia para la actividad de la maricultura en el estado de Baja California. Las muestras se colectaron mediante arrastres verticales con una red de 20 μm de apertura de malla hasta una profundidad máxima de 15 metros. Asimismo, se colectaron muestras de agua en superficie y a 10 metros de profundidad con una botella Niskin de 5L (General Oceanics, Florida, USA). Las muestras se filtraron a través de una malla de 50 μm para eliminar organismos de mayor tamaño (zooplancton).

Las células vegetativas se aislaron con la técnica de pipeteo capilar, para ello se colocó una gota de la muestra de fitoplancton en un portaobjeto y se observó bajo un microscopio invertido Olympus CK2 (Olympus Microsystems, USA). La célula de interés se succionó por capilaridad y se transfirió a un portaobjetos excavado con una gota del medio de cultivo L1 (Anexo 1) estéril. El procedimiento se repitió hasta obtener un aislado con solamente las células de interés. Posteriormente, se transfirieron las células a placas estériles de 96 pozos de 200 μL de capacidad, los cuales fueron previamente llenados con medio L1. Conforme se obtuvo mayor abundancia celular se realizaron varios pasos de escalamiento hasta obtener cultivos en matraces Erlenmeyer de un volumen de 200 mL. Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas a 20 °C, con un ciclo de luz a oscuridad (L:O), 12:12 a una irradiancia de 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

V.II. Identificación molecular

Con el propósito de identificar los aislados se centrifugaron durante 20 minutos a 3,000 rpm, 20 mL de los cultivos de los aislados A (CA) y B (CB), así como de las cepas de *Chattonella marina* (CMCV-1) y *C. ovata* (COPV-1) (donadas por la Dra. Band-Schmidt, IPN-CICIMAR) que se utilizaron como control positivo (Tabla I). Después se descartó el sobrenadante, y el pellet se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos, y se incubó a 98 °C durante 20 minutos.

Tabla I. Descripción de las cepas CMCV-1 y COPV-1 que se utilizaron como control positivo.

Especie	Clave	Lugar y año de aislamiento	Responsable de aislamiento
<i>Chattonella marina</i> <i>var. Marina</i>	CMCV-1	Bahía Concepción, B.C.S., 2000	Band-Schmidt
<i>Chattonella marina</i> <i>var. Ovata</i>	COPV-1	Bahía de La Paz, B.C.S., 2009	Band-Schmidt

Se amplificó la región del *espaciador transcrito interno* de genes ribosomales (nrITS) mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) directamente del cultivo, como una especie de PCR de colonia. Se utilizó un perfil térmico de 94 °C por 2 minutos, una alineación de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos y 72 °C 45 segundos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos en un sistema de termociclador My Cycler. El contenido de la reacción de 20 µl se observa en la tabla II. Se realizaron 6 reacciones: aislado A (1),

aislado B (2), cepa *C. ovata* COPV-1 (3), cepa *C. marina* CMCV-1(4), una mezcla de los aislados A y B (5) y el control negativo (6).

Tabla II. Contenido de la solución de PCR (Qiagen).

Reactivo	Volumen
ddH_2O	7 μ l
PCR buffer (2x)	10 μ l
Primer Chamo-ITSF (59-TAGAGGAAGGTGAAGTCG-39) (10 μ M)	1.0 μ l
Primer Chamo-ITSR (59-TTACTAGGGGAATCCGAG-39) (10 μ M)	1.0 μ l
<i>Chattonella</i>	1.0 μ l

V.III. Tasa de crecimiento de las cepas bajo diversas condiciones de temperatura e irradiancia

Para estimar la tasa de crecimiento, se monitoreó la abundancia celular de los aislados expuestos a dos condiciones de irradiancia (30 y 190 μ mol quanta $m^{-2} s^{-1}$) y dos temperaturas (16 y 20 °C). Se evaluó el cambio de la abundancia en el tiempo para caracterizar las diferentes fases de la curva de crecimiento (acondicionamiento, exponencial, estacionaria, y decaimiento), a través de conteos de alícuotas de 1 mL fijadas con una dilución de una solución amortiguadora de Hepes (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1% (Katano *et al.*, 2009). El conteo se realizó en celdas Sedwick Rafter por triplicado

y bajo microscopio de luz invertido LEICA DM13000B 10x (Leica Microsystems, Alemania).

El cambio de la abundancia celular en el tiempo de los aislados se ajustó al modelo de crecimiento de Gompertz:

$$\ln \frac{N}{N_0} = a \exp(-\exp(b - ct))$$

donde $y = \ln(\frac{N}{N_0})$ es la concentración celular a diferentes tiempos de cultivo. La concentración celular inicial es N_0 , y N es a un al tiempo t y los parámetros a , b y c describen la forma de la curva; $a > 0$ describe la abundancia máxima, el parámetro $c > 0$ describe la tasa específica de crecimiento (divisiones dia^{-1}), y el parámetro $b > 0$ controla la diferencia entre la abundancia inicial y la final a un tiempo t . El ajuste se realizó con el uso de la paquetería de SigmaPlot v11.0 (Systat Software, San Jose, CA).

Además, se calculó la tasa de crecimiento (μ) como $\mu = \ln(\frac{N_{t2}/N_{t1}}{t2-t1})$. Se tomó el cambio en la abundancia de células durante la fase exponencial, N_{t2} equivale a la abundancia celular al final de la fase exponencial de crecimiento y N_{t1} es la abundancia celular al inicio de la fase exponencial de crecimiento, $t2-t1$ fue la duración de esta fase en cada condición de cultivo.

V.IV. Bioensayos

Con el fin de identificar el efecto de los aislados de *Chattonella* sobre larvas de *Crassostrea gigas* en su fase D (24 horas después de eclosión, 50 a 100 μm) y en fase umbonada (6-13 días después de eclosión, 100 a 150 μm) se realizaron tres tipos de bioensayos: i) exposición directa, ii) exposición a extracto celular y iii) exposición sin contacto directo (Tabla III). Se utilizaron estos estadios larvarios porque fueron los que presentaron altas mortalidades durante el tiempo que se presentó el FAN de *Chattonella* en la BTS en el verano de 2016. Las larvas fueron proporcionadas por el laboratorio de producción de semilla de la empresa Maxmar Mariscos S.A. DE C.V. ubicados en el Rincón de Ballenas Ensenada, Baja California.

i) Exposición directa: El bioensayo se realizó en placas de 96 micropozos de 120 μL de capacidad. Se expuso a las larvas del ostión (50 larvas mL^{-1}) directamente a células de *Chattonella* durante 72 horas. Se probaron cuatro abundancias de *Chattonella* (0, 1×10^3 , 10×10^4 , 20×10^4 cel mL^{-1}) además de un tratamiento donde las larvas se mantuvieron con *Isochrysis* sp., que son las microalgas proporcionadas como alimento en el laboratorio de producción. Cada 12 horas se tomaron videos de 2 minutos de duración con una cámara ZEISS AxioCam ERc 5s acoplada a un microscopio estereoscópico Zeiss. Para establecer el efecto del contacto de *Chattonella*, se cuantificó la cantidad de larvas que no estaban en movimiento

ii) Exposición a extracto celular: el bioensayo se realizó para evaluar si el contenido celular de *Chattonella* afecta a las larvas de ostión. Se utilizaron placas de 96 micropozos con 120 μL de capacidad con una abundancia de 30 larvas por mL^{-1} por

tratamiento. A cada pozo se le aplicaron 20 μL de extracto de *Chattonella*. Se monitoreó el movimiento de las larvas los primeros minutos seguidos a la aplicación del extracto, a la primera hora y después cada 12 horas hasta las 72 horas. Se tomó un video de 2 minutos en cada tiempo de evaluación con una cámara ZEISS AxioCam ERc 5s acoplada a un microscopio estereoscópico Zeiss. El experimento se realizó para los dos estadios larvarios, y se probaron los extractos de cada aislado de *Chattonella*. Para obtener el extracto se centrifugaron 20,000 células durante 10 minutos a 3,000 rpm, el pellet fue resuspendido en 200 μL de H_2O de mar estéril. Enseguida se añadieron perlas de sílice y zirconio para romper las células. Se aplicaron 3 pulsos de 1 minuto en el homogenizador (Bead Beater, BioSpec Products, USA). Para finalizar se centrifugó la mezcla por 3 min a 3,000 rpm y el sobrenadante fue utilizado en el experimento.

iii) Exposición sin contacto directo: el tercer bioensayo se realizó en placas de 24 pozos, en donde se agregaron 50 larvas mL^{-1} . Por otro lado, en viales de 5 mL se agregó *Chattonella* (0 y 20,000 cel mL^{-1}) y se aforó a 3 mL con agua de mar estéril, los tubos fueron cubiertos con red de 5 μM de luz de malla. Se colocaron los tubos en las placas con precaución de no dañar las larvas. El tamaño de la red evitó el contacto entre las larvas y las rafidofitas; sin embargo, por el tamaño de malla si hubo un intercambio de agua y exudados. El experimento se realizó para ambos estadios y con los dos aislados (Tabla III). Para ello se tomaron videos de dos minutos de duración cada 12 horas por 36 horas, en donde se identificó cuantas larvas no se movían. Todos los bioensayos se mantuvieron a 20 °C en condiciones de luz natural.

Tabla III. Diseño de los bioensayos implementados para identificar el efecto que tienen los aislados de *Chattonella* sobre las larvas de *Crassostrea gigas*.

Bioensayo	Exposición directa cel mL ⁻¹	Efecto de extracto celular cel mL ⁻¹	Separación física (Red 5µm) cel mL ⁻¹
	0		
	0 + <i>Isochrysis</i> sp.	0	
		0 + <i>Isochrysis</i> sp.	0
	1 x 10 ³		
Larva D	Aislado A	1 x 10 ⁴	Aislado A: 2 x 10 ⁴
		2 x 10 ⁴	Aislado A: 2 x 10 ⁴
		1 x 10 ³	Aislado B: 2 x 10 ⁴
	Aislado B	1 x 10 ⁴	
	2 x 10 ⁴		Aislado B: 2 x 10 ⁴
	0	0	0
	0 + <i>Isochrysis</i> sp.	0 + <i>Isochrysis</i> sp.	
	1 x 10 ³		
Larva Umbonada	Aislado A	1 x 10 ⁴	Aislado A: 2 x 10 ⁴
		2 x 10 ⁴	
		1 x 10 ³	Aislado B: 2 x 10 ⁴
	Aislado B	1 x 10 ⁴	Aislado B: 2 x 10 ⁴
	2 x 10 ⁴		

VI. Resultados

VI.I. Aislados de *Chattonella* spp.

Se establecieron dos cultivos a nivel matraz (250 mL) de *Chattonella* spp. aislados de las muestras colectadas de junio a agosto de 2016 en la Bahía Todos Santos, B.C. Las células aisladas presentan características típicas del género *Chattonella*; muestran dos flagelos (anterior y posterior), el posterior es dinámico y permite el movimiento de las células, y un gran número de cloroplastos en las células que tienen una coloración que va de dorado a verde (Figura 1).

Los aislados presentaron en general dos formas celulares, el asilado A es piriforme, mientras que el asilado B presenta una forma ovoide (Figura 1). La longitud y el ancho de las células son diferentes entre los aislados. El aislado A presentó un tamaño de célula mayor que el asilado B. El primer aislado presentó una longitud promedio de $20.794 \pm 3.77 \mu\text{m}$ y un ancho de célula promedio de $13.10 \pm 0.86 \mu\text{m}$. El aislado B presento una longitud promedio de $17.02 \pm 4.43 \mu\text{m}$ y un ancho de $11.79 \pm 2.65 \mu\text{m}$ (Tabla IV).

Tabla IV. Tamaño celular de los dos aislados de *Chattonella* (A y B) cultivados en medio L1 a 20°C, en un ciclo 12:12 luz a oscuridad.

Aislado	Longitud (μm)			Ancho (μm)		
	Promedio	Mínimo	Máximo	Promedio	Mínimo	máximo
A	20.79 ± 3.77	11.94	27.88	13.1 ± 0.86	11.19	14.5
B	17.02 ± 4.43	9.13	26.07	11.79 ± 2.65	6.42	9.13

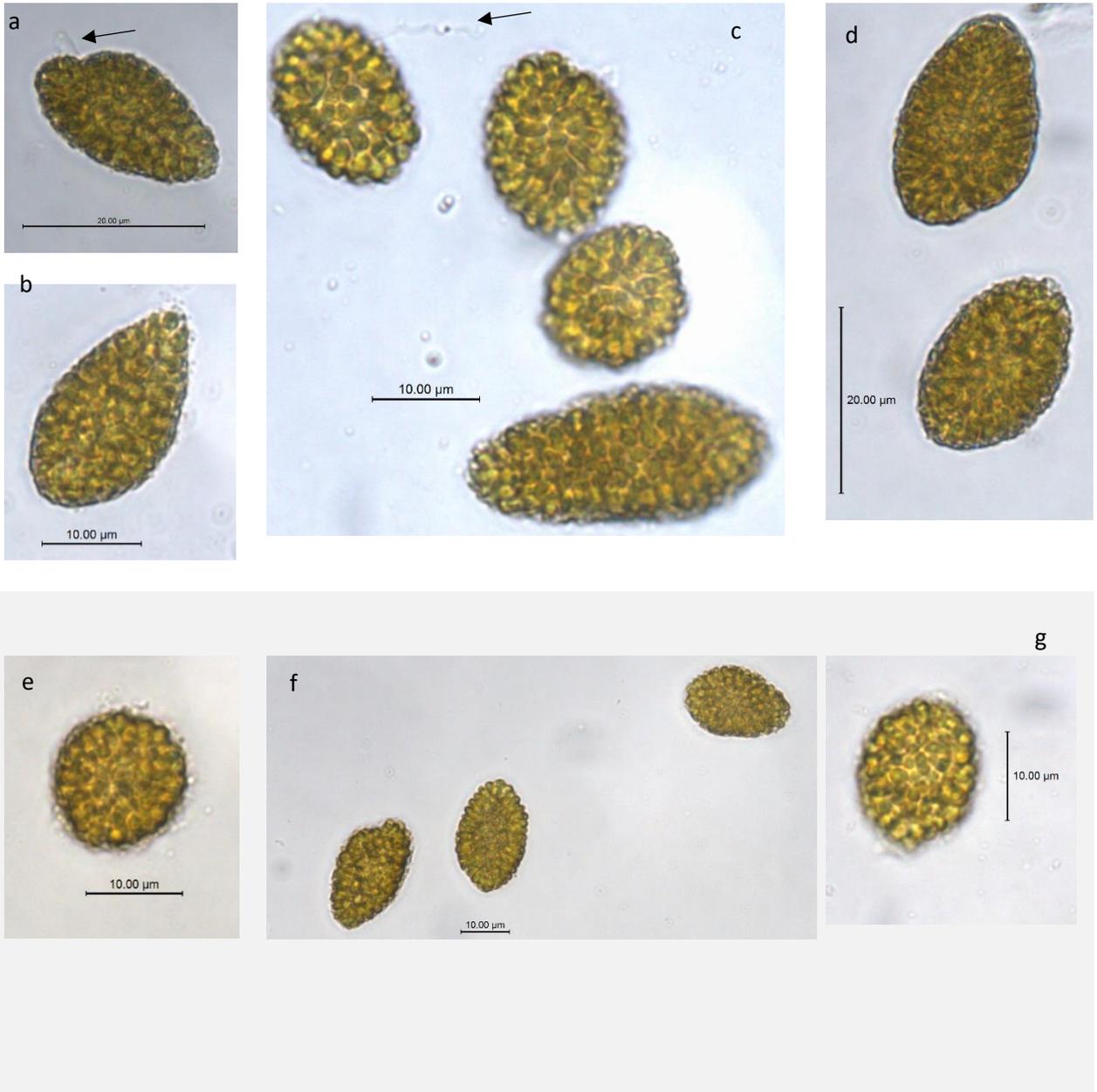


Figura 1. Morfologías de *Chattonella* spp. aisladas de la Bahía de Todos Santos fijadas con una dilución de una solución amortiguadora de HEPES (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1% (Katano *et al.*, 2009). Aislado A (a-d) y aislado B (e-g). El flagelo señalado con flecha (←).

VI.II. Identificación celular

Los productos de PCR de los aislados de *Chattonella* y los controles se observan en la Figura 2. Los carriles 1, 2, 3, 5 y 6 no mostraron una amplificación. Por otra parte, la reacción 4 en la que se utiliza el control positivo de la cepa CMCV-1(*C. marina*), amplificó un fragmento mayor a 600 pares de bases (pb)

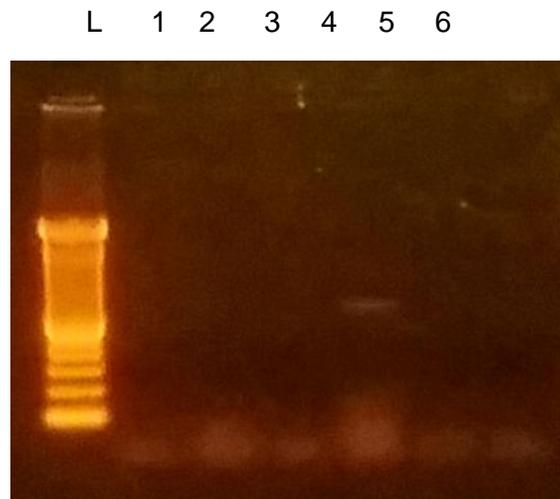


Figura 2. Electroforesis de productos de PCR con cebadores Chamo-ITS: L escalera (1000 pb), aislado A (1), aislado B (2), COPV-1 (3) CMCV-1(4), una mezcla de los aislados A y B(5) y el control negativo(6). Electroforesis en gel de agarosa 1.5% TAE 1X, teñido con bromuro de etidio corrida a 90 v, durante 40 min.

VI.III. Tasa de crecimiento de los aislados bajo diferentes condiciones de intensidad de irradiancia y temperatura

Los aislados de *Chattonella* presentaron una fase de acondicionamiento de cuatro días, y una fase de crecimiento exponencial de cuatro días cultivados a 190 de irradiancia y 20 °C. En estas condiciones el aislado A obtuvo una abundancia máxima de 3,607 células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.60 día⁻¹ (estimada mediante el modelo de Gompertz), mientras que el aislado B presentó una abundancia máxima de 3,357 células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.61 día⁻¹ (estimada mediante el modelo de Gompertz) (Tabla V) (Figura 3).

Al cultivar los aislados a 16 ° C y 190 de irradiancia, se observó una fase de acondicionamiento de cuatro días y dos días de crecimiento exponencial (Figura 4). El aislado de *Chattonella* A presentó 3,004 células mL⁻¹ como abundancia máxima y una tasa de crecimiento de 1.44 día⁻¹ (estimada mediante el modelo de Gompertz), mientras que el aislado B alcanzó una abundancia máxima de 3,325 células mL⁻¹ y con una tasa de crecimiento de 0.68 día⁻¹ (estimada mediante el modelo de Gompertz) (Tabla V) (Figura 4).

El aislado A mostró una fase de acondicionamiento de dos días, y cuatro días de crecimiento en condiciones de 30 de irradiancia. A 20° C la abundancia máxima fue de 577 células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.03 día⁻¹ (estimada mediante el modelo de Gompertz). A 16 °C y la misma irradiancia, el aislado A presentó una abundancia máxima de 222 células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento de 0.41 día⁻¹

(estimada mediante el modelo de Gompertz) (Tabla V) (Figuras 5 y 6). En condiciones de baja irradiancia, la abundancia celular fue muy baja.

De manera similar, no se observó un crecimiento poblacional del aislado de *Chattonella* B en las dos temperaturas experimentadas bajo 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por lo que no hubo un ajuste al modelo de Gompertz (Figuras 5 y 6).

Tabla V. Tasas de crecimiento (I: $\mu = \ln\left(\frac{Nt_2/Nt_1}{t_2-t_1}\right)$, II: ajuste de Gompertz) y abundancias celulares de los aislados cultivadas en medio L1 con un ciclo luz oscuridad 12:12, a dos temperaturas (16 y 20 °C) y dos intensidades de irradiancia (30 y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Aislado	Condiciones		Abundancia máxima (cel mL ⁻¹)	μ_{max} (día ⁻¹)		Tiempo de duplicación (día)		Días en crecimiento exponencial
	Temp (°C)	Irradiancia ($\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		I	II	I	II	
A	20	190	3607	0.35	0.60	2.86	1.67	4.00
	20	30	577	SC	ND	SC	ND	SC
	16	190	3004	0.72	1.44	1.39	0.69	2.00
	16	30	222	0.16	0.41	SC	2.44	4.00
B	20	190	3357	0.31	0.61	3.23	1.64	4.00
	20	30	132	SC	ND	SC	ND	SC
	16	190	3325	0.75	0.68	1.33	1.47	2.00
	16	30	93	SC	ND	SC	ND	SC

SC= Sin Crecimiento, NA= No Ajustado

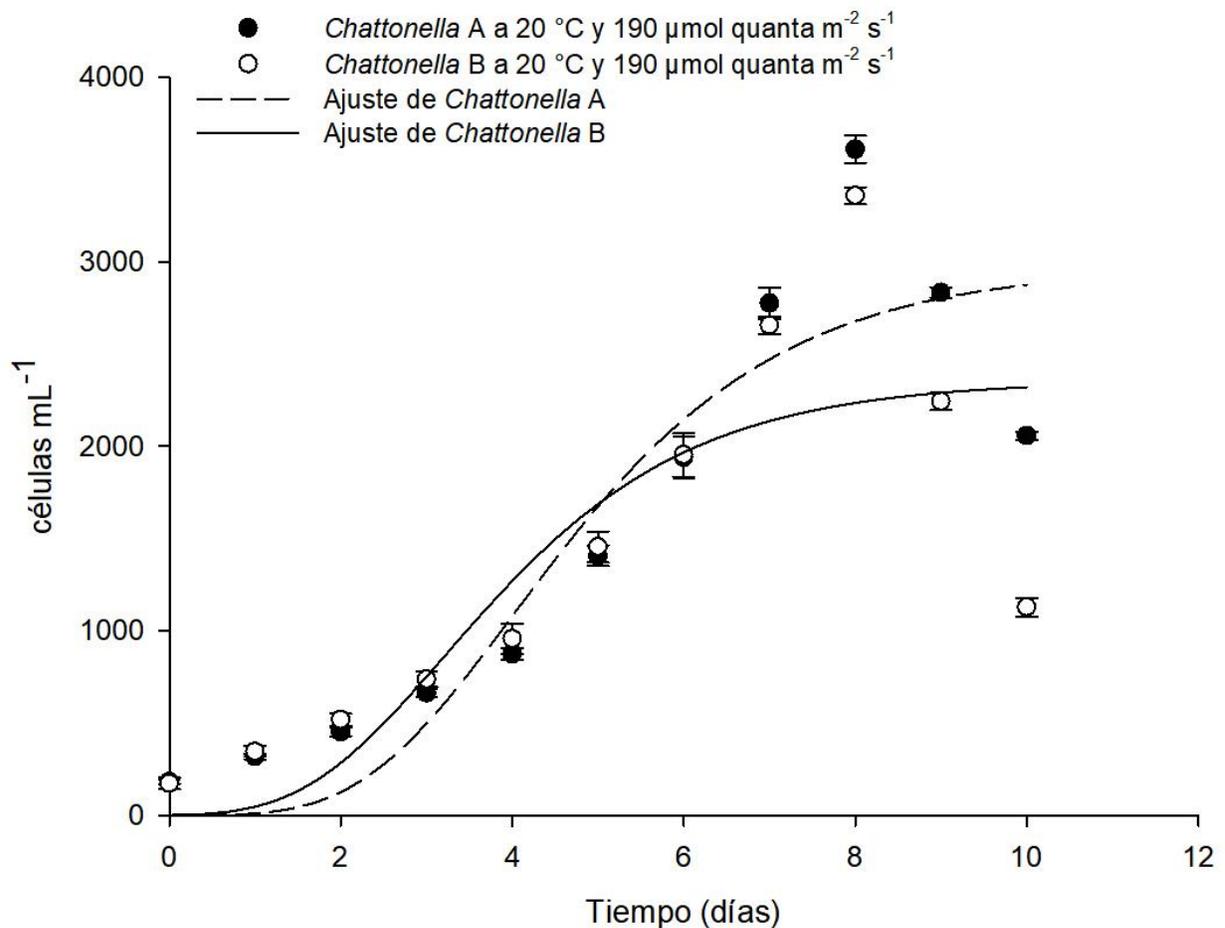


Figura 3. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 20°C y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar ($n=4$) para cada día de muestreo del aislado A (●) y B (○). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas. Ecuación del ajuste de Gompertz para *Chattonella A* = $2972 \cdot \exp(-\exp(2.28 - (0.60 \cdot x)))$ con $r^2=0.85$, y *Chattonella B* = $2355 \cdot \exp(-\exp(1.97 - (0.61 \cdot x)))$ con $r^2=0.80$.

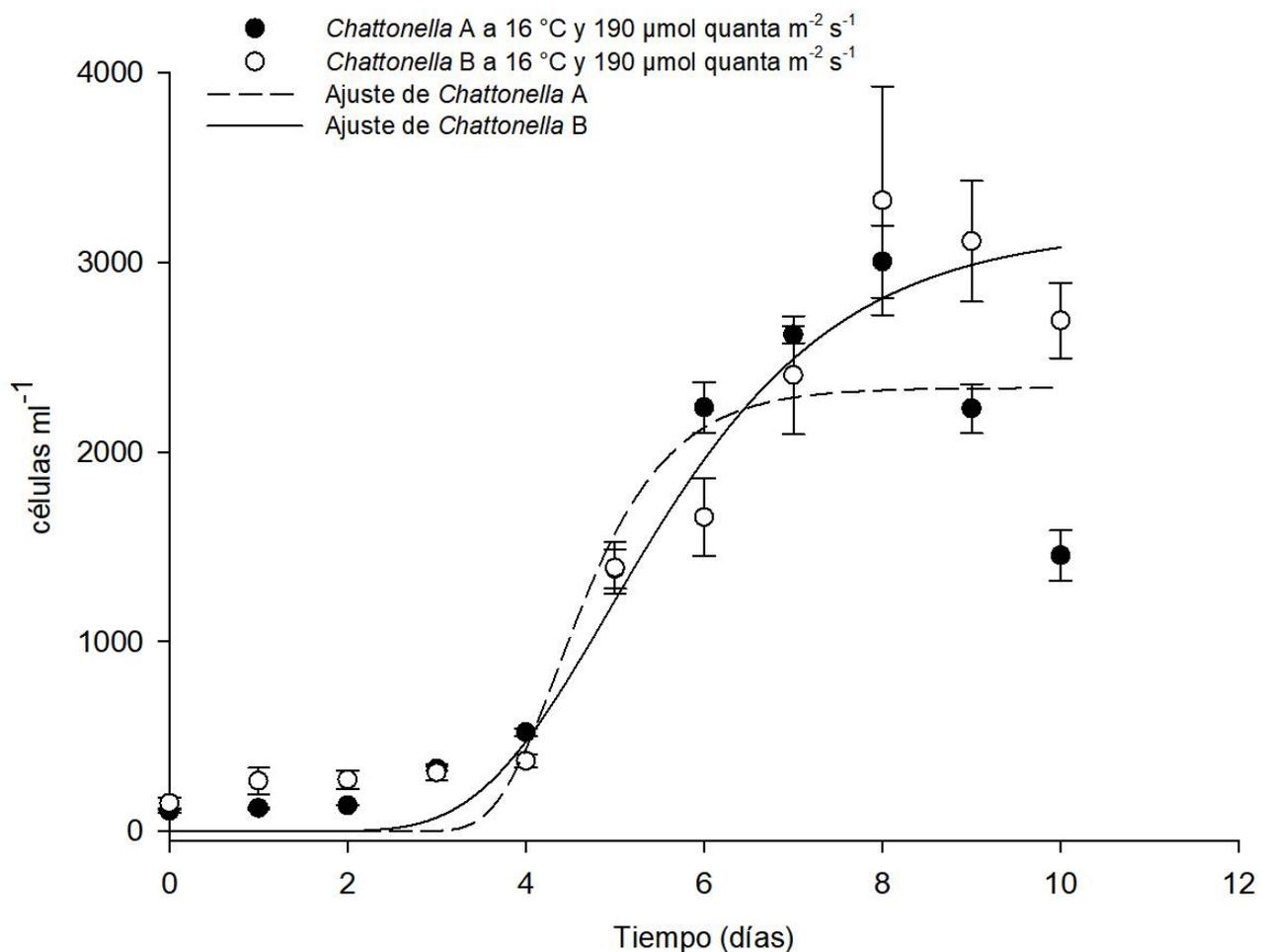


Figura 4. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 16 °C y 190 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar ($n=4$) para cada día de muestreo del aislado A (●) y B (○). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante líneas. Ecuación de Gompertz: *Chattonella* A= $2338 \cdot \exp(-\exp(6.31-1.44) \cdot x)$ con $r^2=0.84$ y *Chattonella* B= $3176 \cdot \exp(-\exp(3.38-0.68) \cdot x)$ con $r^2=0.94$.

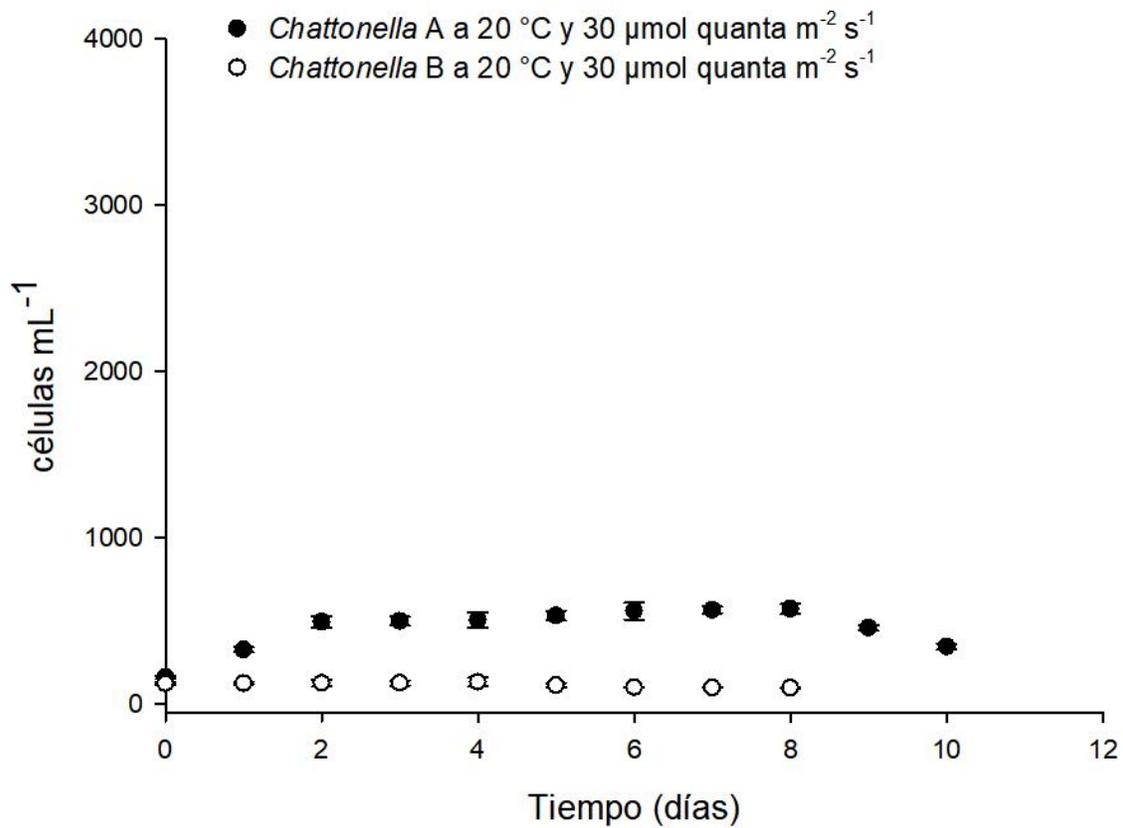


Figura 5. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 20°C y 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar (n=4) para cada día de muestreo del aislado A (●) y B (○).

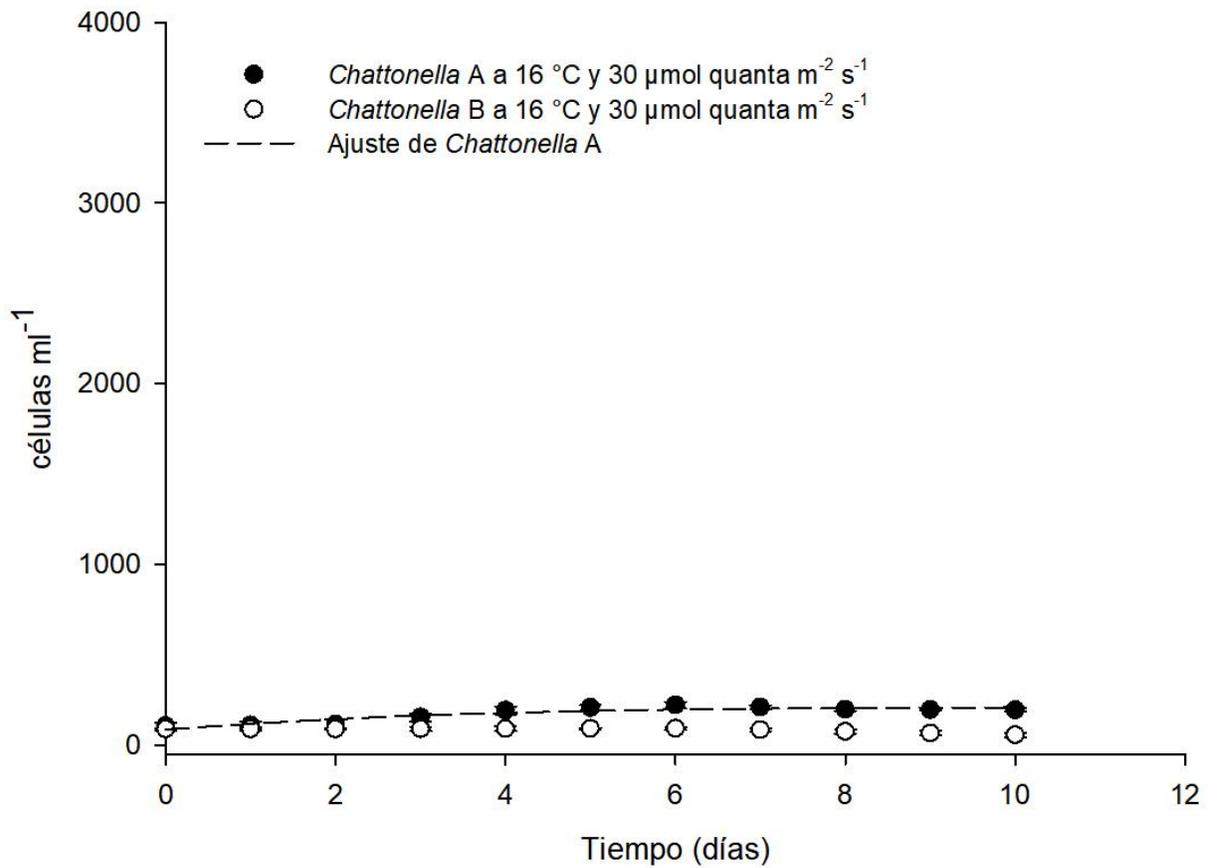


Figura 6. Abundancia celular de los aislados A y B de *Chattonella*, cultivadas a 16°C y 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciclo de luz 12:12 en medio L1. Se muestra el promedio de la abundancia y la desviación estándar ($n=4$) para cada día de muestreo del aislado A (●) y B (○). El ajuste al modelo de Gompertz se presenta mediante una línea. Ecuación del ajuste de Gompertz para *Chattonella A* = $213 \cdot \exp(-\exp(-0.12 - (0.41 \cdot x)))$ con $r^2=0.84$.

VI.IV. Efecto de los aislados de *Chattonella* sobre estadios tempranos de *Crassostrea gigas*

a) Exposición directa.

Se observó un efecto importante de inhibición del movimiento de las larvas D y umbonada del ostión *Crassostrea gigas* al estar en contacto físico con células de los aislados de *Chattonella*.

El efecto de inhibición del movimiento fue inmediato ya que se detectó hasta un 18% de larvas sin movimiento al inicio del experimento en presencia del aislado A (Figura 7). Este porcentaje se incrementó con el tiempo. La larva D perdió movimiento a las primeras 12 horas de tener contacto directo con el aislado A (Figura 7). El 50 % de las larvas no presentaron movimiento a la exposición de 2×10^4 cel mL⁻¹ del aislado, y a las 60 horas de exposición el 100 % de las larvas no se movían. Se identificó un mayor porcentaje de larvas sin movimiento en el tratamiento con 1×10^3 cel mL⁻¹ que a 1×10^4 cel mL⁻¹. Después de 12 horas en contacto el 13 % de las larvas carecieron de movimiento al ser expuestas a 1×10^4 cel mL⁻¹, mientras que el 28% de las larvas D se quedó inmóvil al contacto directo de 1×10^3 cel mL⁻¹ del aislado A. El mayor porcentaje de inhibición de movimiento se observó en el tratamiento 2×10^4 cel mL⁻¹ durante todo el experimento.

Por otro lado, el aislado B causó un impacto negativo mayor sobre el movimiento de la larva D. Un 70% de las larvas perdieron el movimiento inmediatamente al estar en contacto con el aislado B a una abundancia de 2×10^4 cel mL⁻¹ (Figura 8). Se mantuvo este porcentaje de inhibición a las 12 horas de ser expuestas a 2×10^4 cel mL⁻¹ del aislado B, y a las 36 horas el 100% carecía de movimiento. Al exponerlas al aislado B también se observó un mayor porcentaje de larvas sin movimiento a 1×10^3 cel mL⁻¹ que a 1×10^4 cel mL⁻¹. En ambos bioensayos las larvas que no tuvieron contacto con *Chattonella* comenzaron a perder el movimiento a partir de las 48 horas.

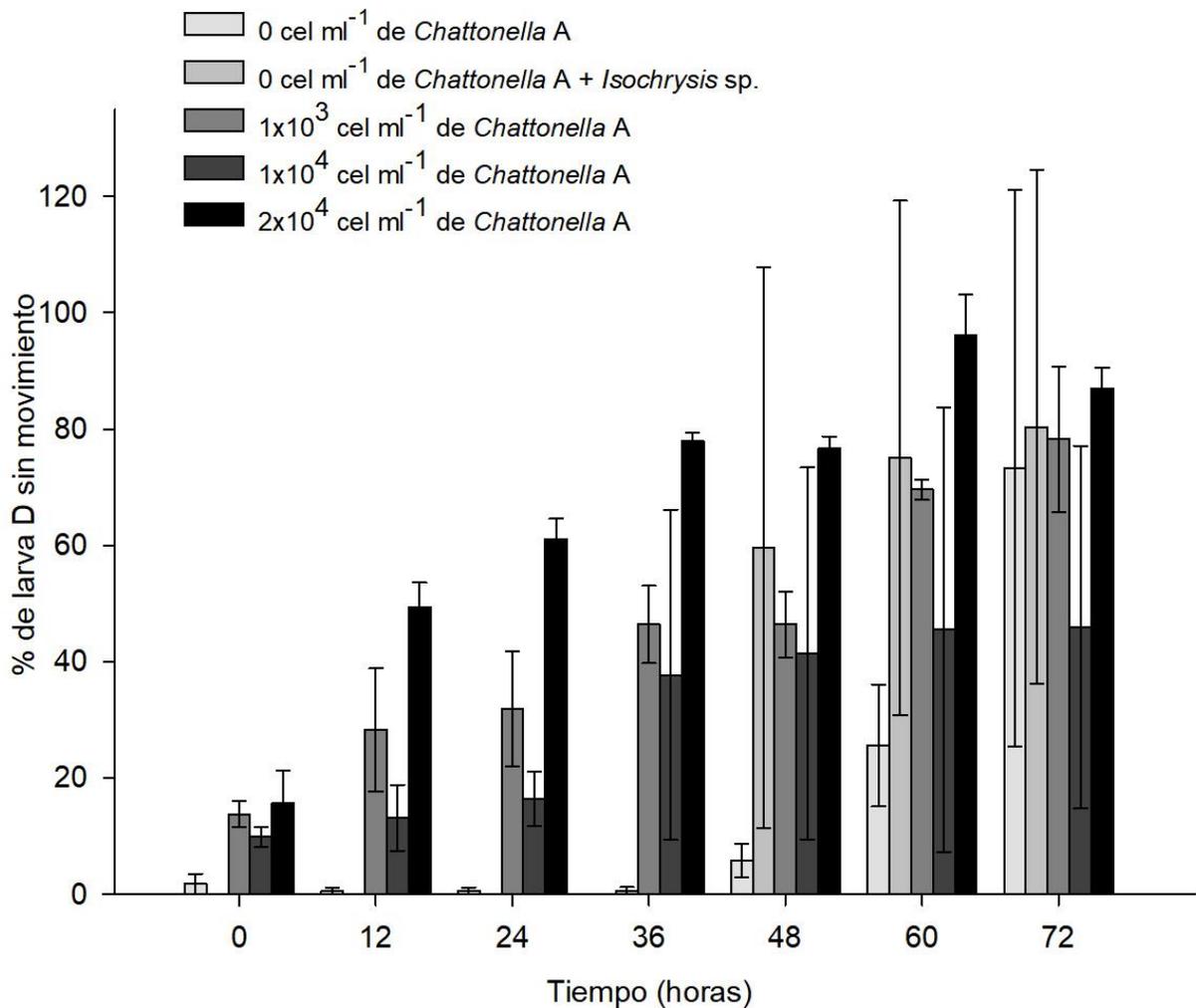


Figura 7. Porcentaje de larva D que perdió el movimiento debido a la exposición directa del aislado A de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

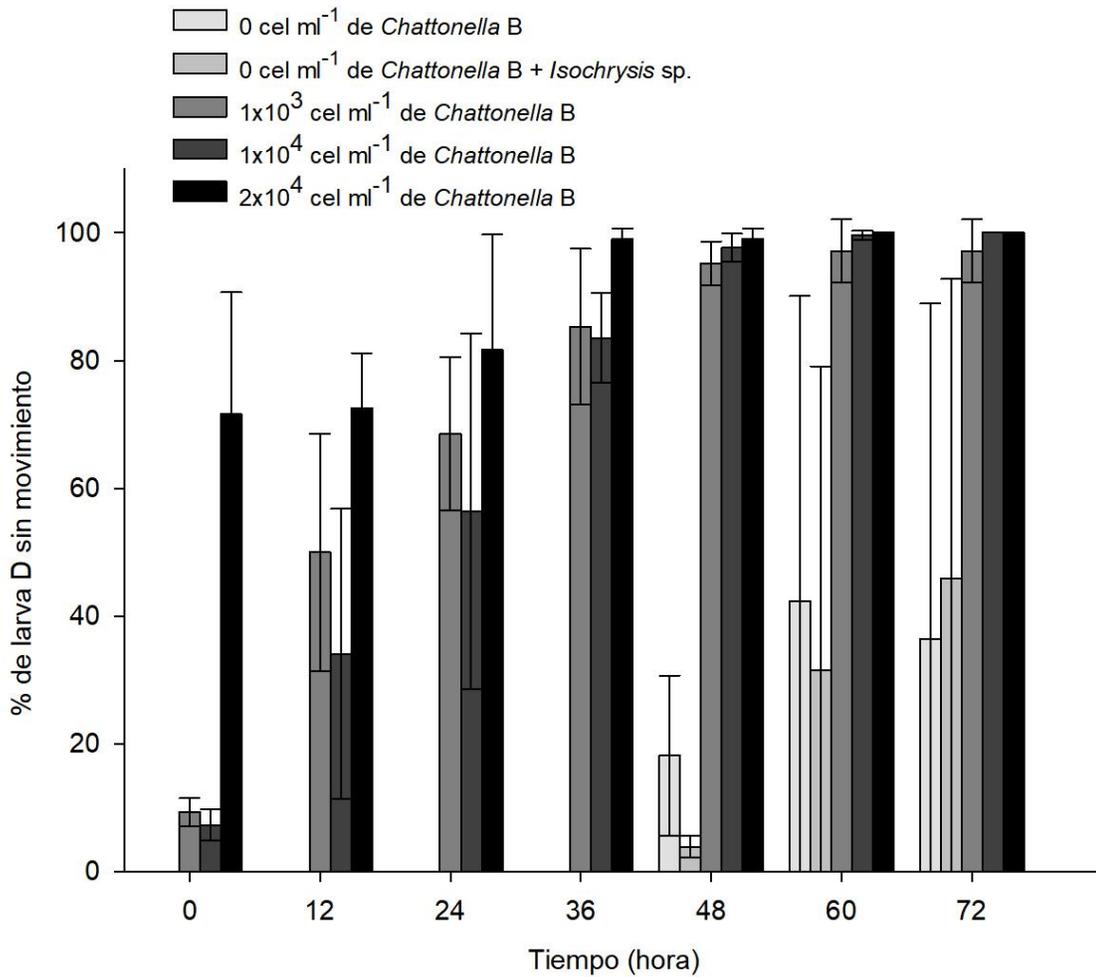


Figura 8. Porcentaje de larva D sin movimiento después de la exposición directa del aislado B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

En el experimento con las larvas en el estadio umbonada se observó que a las 24 horas de exposición a 1×10^4 y 2×10^4 cel mL⁻¹ del aislado A, el 100% de las larvas perdieron su movimiento, y un 92% carecía de movimiento al ser expuesta a 1×10^3 cel mL⁻¹. El 100% de las larvas no presentaron movimiento a las 60 horas de contacto directo con los tres tratamientos experimentadas, mientras que el 100% de las larvas que no estuvieron en contacto con el aislado A presentaban movimiento (Figura 9).

De manera similar a lo observado con el estadio D, las larvas umbonada expuestas al contacto directo del aislado B perdieron el movimiento en un menor tiempo (Figura 10). Después de 12 horas en contacto con 2×10^4 cel mL⁻¹ del aislado B, el 100% de las larvas no presentaron movimiento. Asimismo al tener contacto con 1×10^3 y 1×10^4 cel mL⁻¹, se perdió el movimiento en un 80% y 60% de las larvas, respectivamente.

En general, la larva umbonada fue mas susceptible al contacto de los aislados en comparación con la larva D. Mas del 50% de las larvas umbonada perdieron el movimiento en las primeras 12 horas de tener contacto directo con los aislados de *Chattonella* (Figuras 9 y 10).

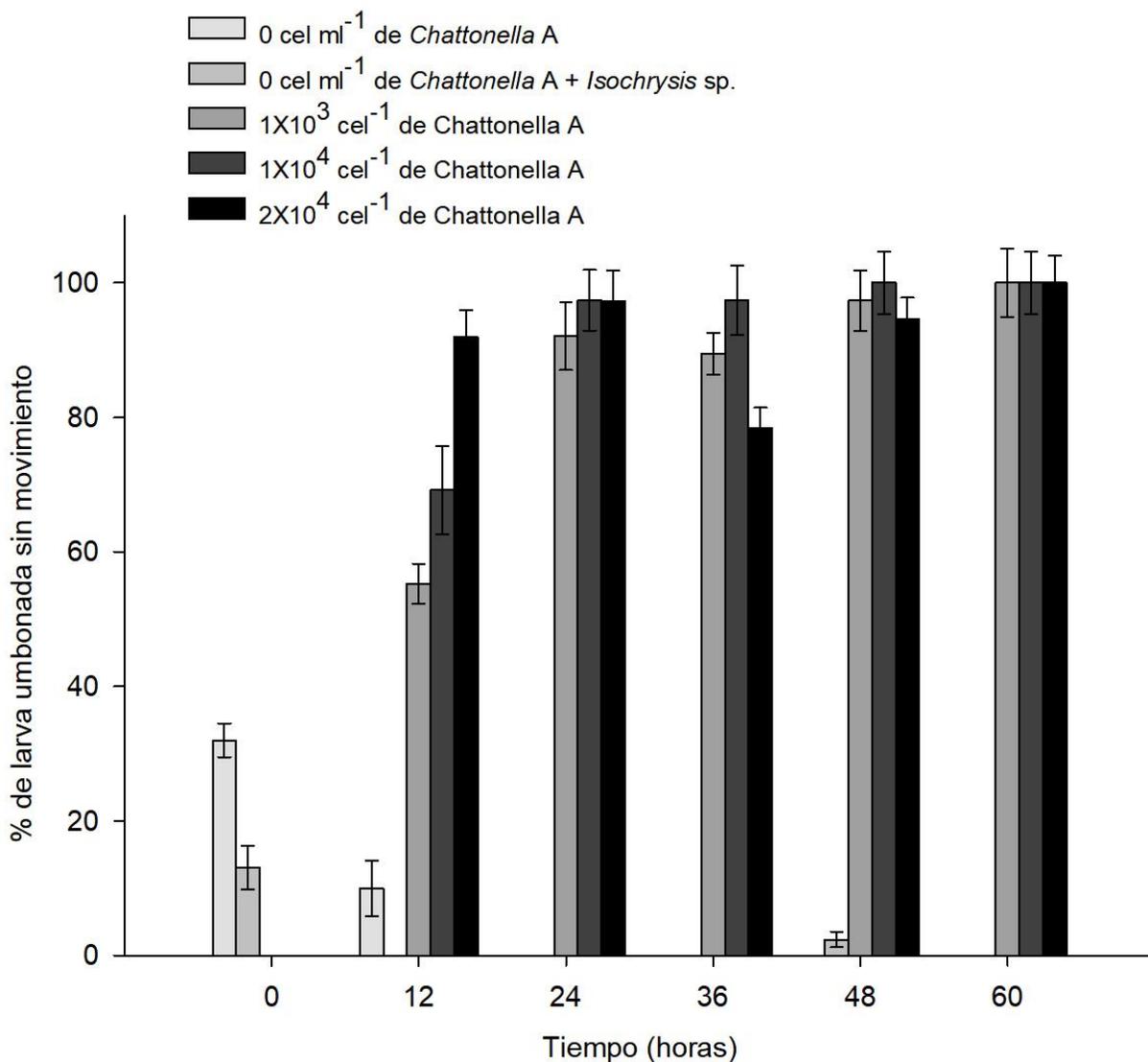


Figura 9. Porcentaje de larva umbonada que perdió el movimiento debido a la exposición directa del aislado A de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

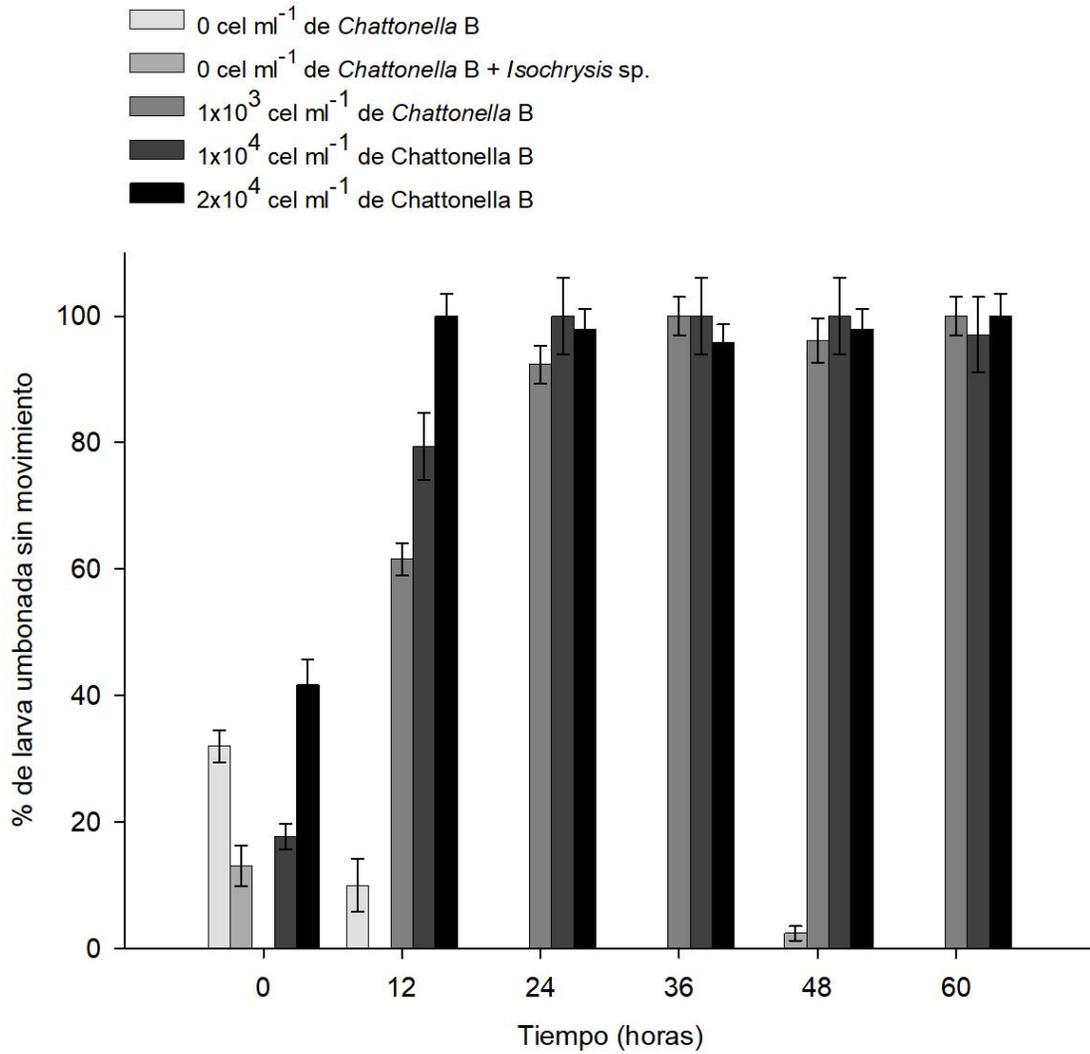


Figura 10. Porcentaje de larva umbonada sin movimiento después de la exposición directa del aislado B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

b) **Exposición a extracto celular.**

El 90% de las larvas D se paralizaron al instante de la aplicación de los extractos de los aislados A y B. Esto se observó también para el extracto donde no existían células de *Chattonella*. Sin embargo, al pasar un minuto de la aplicación un 30% de las larvas recuperaron el movimiento, y las larvas que no fueron expuestas a los extractos de *Chattonella* recuperaron su movimiento casi completamente a la hora de inicio del experimento (10% sin movimiento). A las hasta las 36 horas el 100% de las larvas en el tratamiento control (0 cel ml⁻¹ de *Chattonella*) recuperaron su movimiento, mientras que al estar expuestas a extractos de los aislados de *Chattonella* la inhibición fue mayor a un 80%. Aunque no es tan claro como en los experimentos de exposición directa, el extracto del aislado B provocó una mayor inhibición del movimiento que el extracto del aislado A en larvas D (Figura 11).

Por otro lado, el 70% de las larvas umbonada perdió el movimiento inmediatamente al estar en contacto con el extracto del aislado A, y un 80% con el extracto del aislado B. Después de 2 minutos de la inoculación, 60% de las larvas expuestas al extracto A recuperaron (20% de inhibición; Figura 12) el movimiento, mientras que solo un 30% de las larvas que se les aplicó el extracto B recuperaron el movimiento (50% de inhibición). A la hora de la inoculación más del 95% de las larvas umbonada expuestas al extracto A siguieron moviéndose, no obstante un 89% de las que estuvieron en contacto con el extracto B perdieron el movimiento y esto aumentó hasta que a las 24 horas un 94% de las larvas no se movían (Figura 12). Con este estadio larval fue muy claro el mayor efecto inhibitorio del extracto de aislado B.

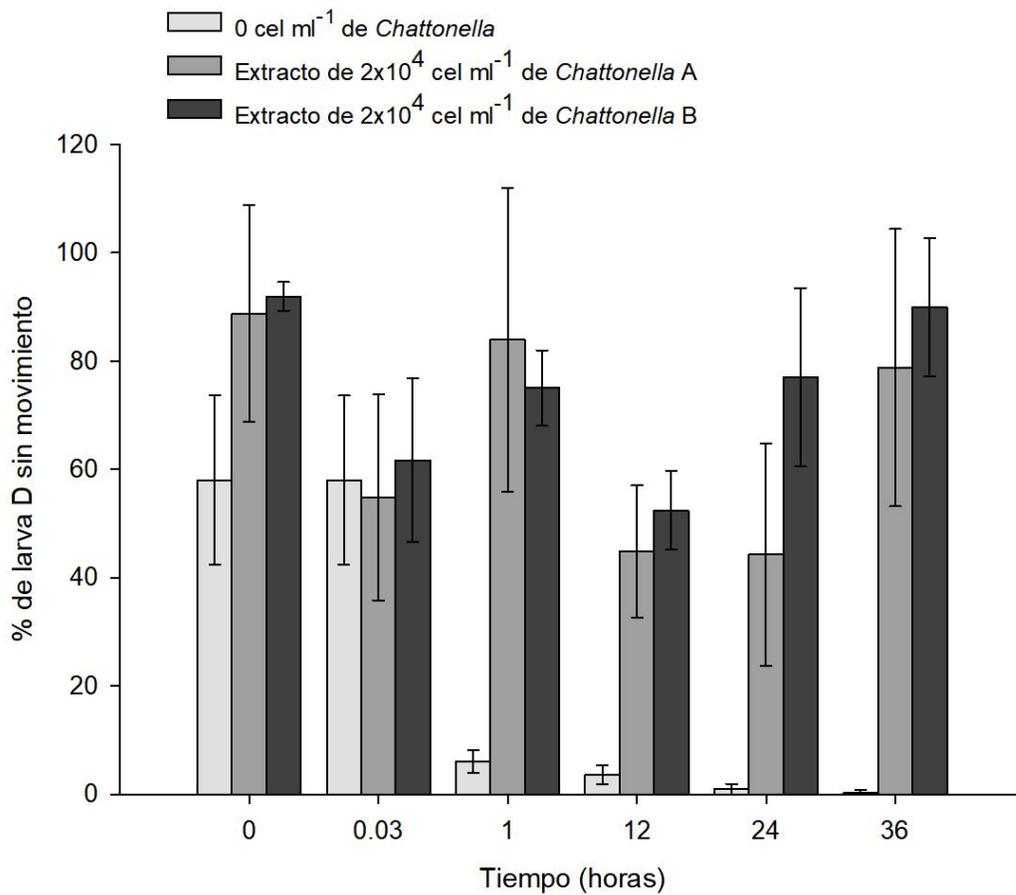


Figura 11. Porcentaje de larva D sin movimiento después de agregar los extractos de los aislado A y B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

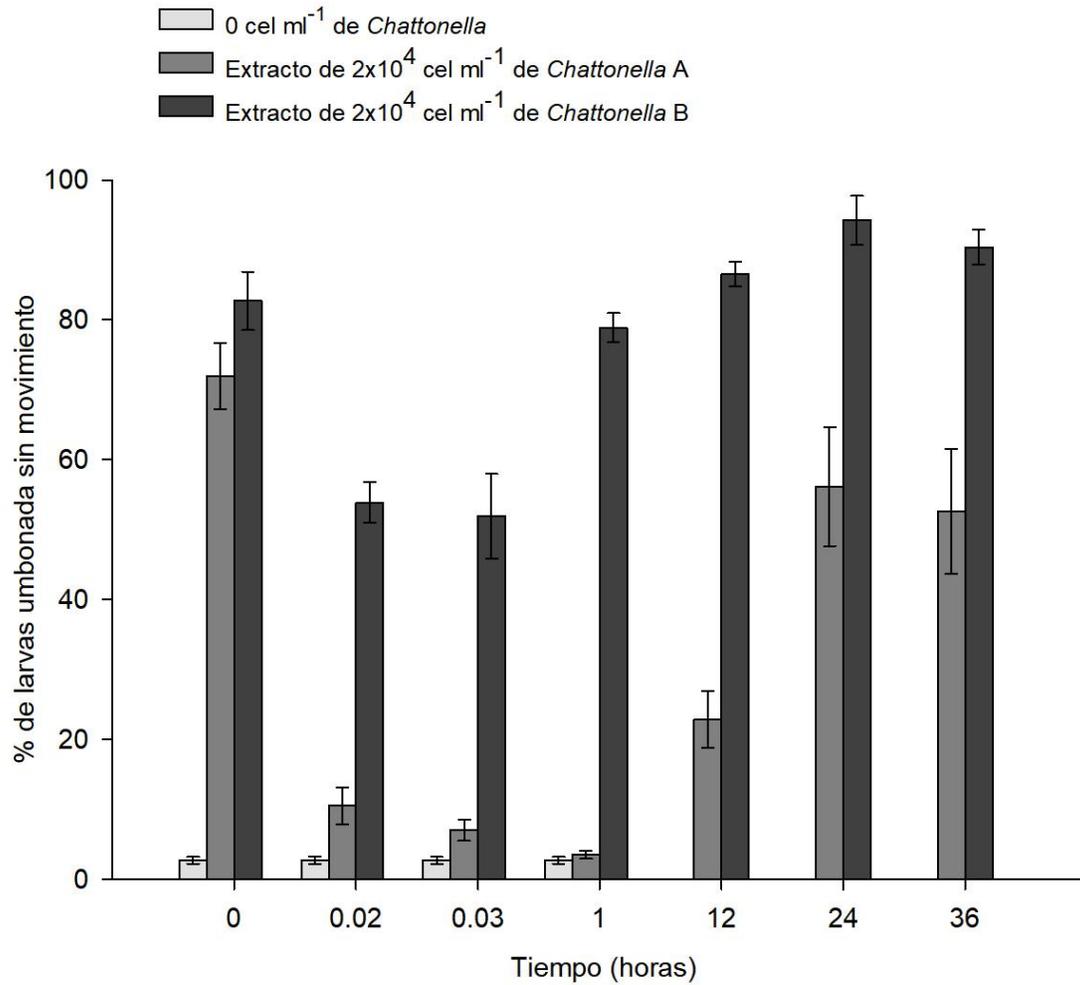


Figura 12. Respuesta del movimiento de la larva umbonada después de la aplicación de los extractos de los aislado A y B de *Chattonella*. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

c) Exposición sin contacto directo

El porcentaje de larvas D sin movimiento después de la exposición sin contacto directo de los aislados de *Chattonella* (A y B) se observan en la Figura 13. A las 24 horas más del 90% de las larvas D no tenían movimiento en los tres tratamientos, tanto las larvas expuestas a los aislados como las que no tuvieron contacto con los aislados.

En la Figura 14 se muestran el porcentaje de larva umbonada sin movimiento como resultado de la exposición sin contacto al aislado de *Chattonella* B. No se observó una diferencia entre los dos tratamientos (0 cel mL^{-1} y $2 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$), en ambos más del 90% del porcentaje de larvas perdieron el movimiento.

Se considera que el método empleado en el bioensayo no fue el adecuado para demostrar el efecto de los exudados de *Chattonella*, pues las larvas del control negativo (0 cel mL^{-1} de los aislados de *Chattonella* A y B) presentaron pérdida del movimiento mayor al 90%

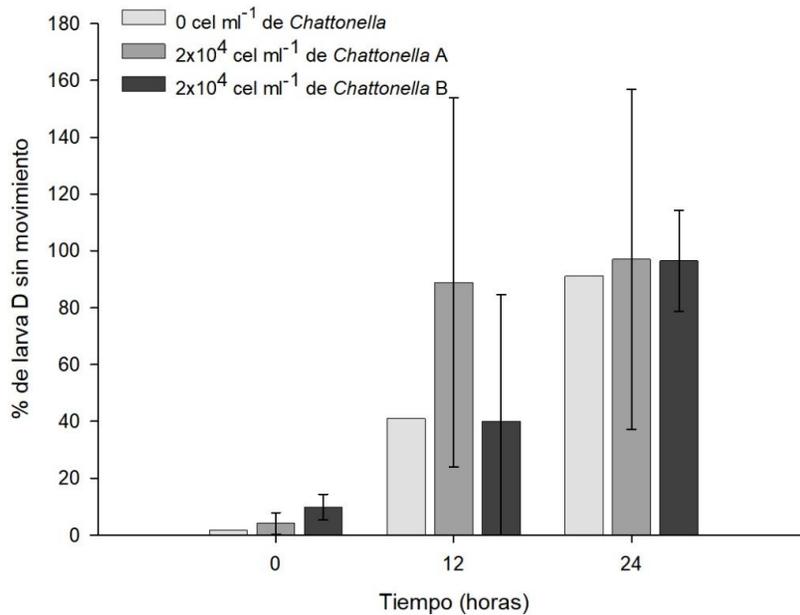


Figura 13. Porcentaje de larva D sin movimiento como resultado del bioensayo de separación física. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

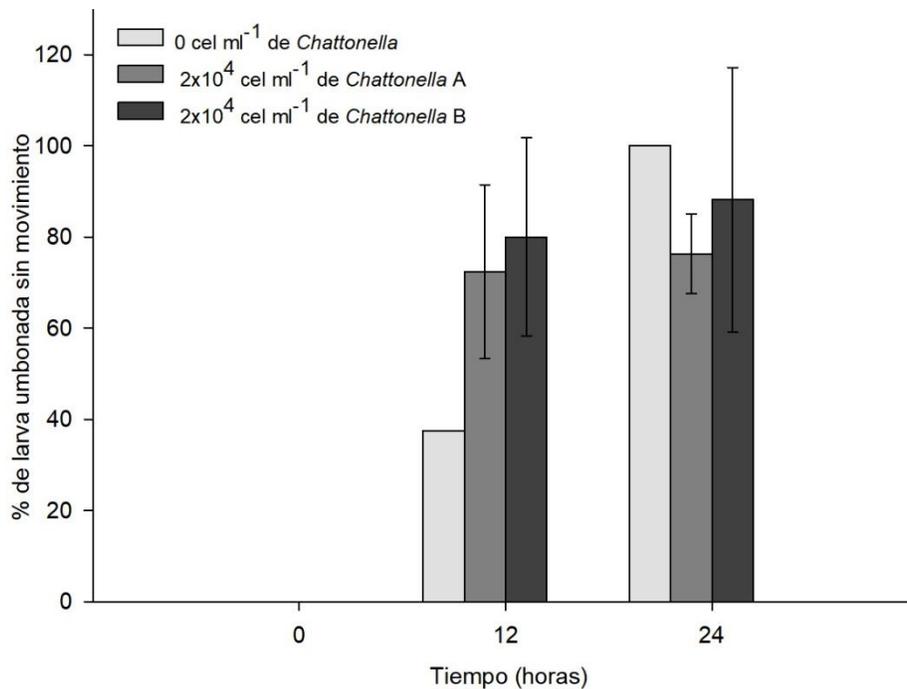


Figura 14. Porcentaje de larva umbonada sin movimiento como resultado del bioensayo de exposición sin contacto directo. Las barras representan el promedio de larvas sin movimiento. Se indica la desviación estándar (n=3).

VII. Discusión

VII.I Identificación

El presente trabajo es el primer reporte de *Chattonella* spp. en la Bahía de Todos Santos. Los reportes sobre la presencia de especies de este género han sido para el Golfo de California y el sureste del Pacífico (Bravo-Sierra, 2004; Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2005, 2012; Martínez-López *et al.*, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; López-Cortés *et al.*, 2011). Asimismo se logró aislar por primera ocasión *Chattonella* de la BTS y sobre todo mantener cultivos a nivel matraz de esta rafdofita.

Los aislados presentaron dimensiones celulares características del género *Chattonella*; el asilado A presenta una morfología piriforme, y el asilado B presenta es ovoide (Figura 1).

Las células del aislado A (11.9- 27.88 μm) tuvieron una longitud mayor que el aislado B (9.13- 26.07); sin embargo, ambos aislados presentaron una menor longitud que los registros anteriores. Band-Schmidt *et al.* (2012) registraron células de *C. marina* de 33.7 a 60 μm , y células de *C. subsalsa* con 48 a 56.7 μm de longitud en el Golfo de California, lo que representa el doble del tamaño de los aislados de la BTS. De igual modo, las células en el Pacífico occidental tienen una longitud mayor a las de la BTS, *C. minima* (20–50 μm), *C. marina* (35-70 μm) y *C. antiqua* (50-130 μm) (Imai y Yamaguchi, 2012).

Demura *et al.* (2009) establecen que no existe un carácter morfológico definitivo que pueda diferenciar entre una especie de *Chattonella* y otra. Una misma cepa puede

presentar células muy distintas en forma y tamaño según de la fase de crecimiento y del estado celular, asimismo algunas presentan una cola alargada mientras otras no. Aunado a esto, las características morfológicas en este estudio se evaluaron en células fijadas con una dilución de una solución amortiguadora de Hepes (30 mM) combinada con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 1%, el cual también puede afectar la morfología de las células. La identificación por medio de caracteres morfológico es difícil en este género, por lo que se realizaron pruebas moleculares para identificar los aislados de la BTS.

VII.II. Identificación molecular de los aislados de *Chattonella*

Se logró amplificar uno de los controles positivos (*C. marina*), sin embargo hasta el momento no se ha logrado amplificar los aislados de *Chattonella* de la BTS.

La reacción de PCR es muy sensible a cambios de iones, temperaturas, contaminantes que pueden estar en el ADN, por eso es necesario repetir el mismo set de reacciones para descartar que los resultados negativos hayan sido errores técnicos en la reacción. Si se obtiene el mismo resultado, se prepararán muestras nuevas y se hará de nuevo PCR con éstas.

Mendoza-Flores (2011) menciona que al realizar las primeras amplificaciones de la región ITS-1 e ITS-2 del ADN ribosomal de cepas de *Chattonella* del Golfo de California, no se obtuvieron productos de PCR en ninguna de las muestras. Sin embargo después de realizar el PCR en gradiente, donde únicamente varió la temperatura de alineación obtuvo un producto de PCR de un tamaño de entre 500

y 1000 pb. No obstante para algunas cepas no logró obtener una banda de amplificación, aunque ya se tenía la temperatura de alineación adecuada.

VII.III Crecimiento de los aislados de *Chattonella* spp.

Los aislados de *Chattonella* a $190 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiancia terminaron su fase exponencial al octavo y noveno día de cultivo. Marshall y Hallegraeff (1999), reportan que *Chattonella marina* llega a su fase estacionaria al décimo día de cultivo, la cual es uno y dos días mayor a la que se obtuvo para los aislados de la BTS. Asimismo, Mendoza-Flores (2011) reporta que tres cepas del género *Chattonella* aisladas del Golfo de California (CSPV-1, CSPV-2 y CSPV-3) alcanzan su fase estacionaria al noveno día de cultivo.

El crecimiento de los aislados se modificó de acuerdo a las condiciones de irradiancia y temperatura a las que fueron expuestas. En tres de las cuatro condiciones experimentadas el aislado A presentó una abundancia celular mayor a la del aislado B (Tabla V).

Zhang *et al.* (2006) menciona que los cultivos de *Chattonella* en condiciones controladas tiene un crecimiento óptimo de los 20 a los 30 °C y este se ve reducido de los 10 a 16 °C. Sin embargo los aislados de la región alcanzaron mayores tasas de crecimiento (1.44 día^{-1} el aislado A y 0.68 día^{-1} el aislado B) a 16 °C y 190 de irradiancia.

La irradiancia fue el factor que afecto mayormente el crecimiento de los aislados de *Chattonella* A y B. Se observó que los aislados presentaron abundancias celulares y tasas de crecimiento más altas cuando se mantuvieron a 190 de irradiancia

(Figuras 3 y 4). Mientras que a 30 el crecimiento celular del aislado A fue mucho más bajo, y el aislado B no presentó crecimiento celular en esta condición (Figuras 4 y 5). Yamaguchi *et al.* (1991) menciona que en cultivos de *C. antiqua* y *C. marina* se observa un crecimiento desde los 30 de irradiancia. Sin embargo Zhang *et al.* (2006) tiene registro que a intensidades bajas de irradiancia (≤ 70) el crecimiento de cepas de *Chattonella* se ve limitada.

En este trabajo se calculó la tasa de crecimiento con el logaritmo natural y con el ajuste del modelo de Gompertz. Se obtuvo una tasa de crecimiento mayor con el modelo de Gompertz, porque al utilizar el logaritmo se analiza el crecimiento solo en la fase exponencial, mientras que el modelo de Gompertz estudia el crecimiento en toda la curva. El cálculo de las dos formas es diferente entre aislados y a lo reportado para cepas aisladas de otras regiones. Las tasas de crecimiento máximas de los aislados de la región son mayores al reportado por Band-Scmith *et al.* (2012) para cepas de *Chattonella* del Golfo de California (0.209 a 0.354 día⁻¹). No obstante, no son mayores a los reportados para *C. ovata* (1.49 - 2.09 día⁻¹ a 178 de irradiancia), *C. subsalsa* (1.26 día⁻¹ a 69 de irradiancia), *C. antiqua* (1.34 día⁻¹ a 42 de irradiancia) y *C. marina* (1.39 día⁻¹ a 63 de irradiancia) (Yamaguchi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006; Imai y Yamaguchi, 2012).

Estas desigualdades se pueden asociar a diferencias fisiológicas entre los aislados, el cual puede ser un grupo filogenético diferente a las cepas de otras regiones. Los resultados de la identidad genética de los aislados de la BTS y su relación filogenética con otros aislados permitirán entender estas diferencias.

VII.IV Efecto de *Chattonella* sobre el movimiento de larvas de *Crassostrea gigas*

Los bioensayos realizados demostraron que los aislados de *Chattonella* spp. tienen un efecto negativo sobre el movimiento de las etapas larvianas D y umbonada de *Crassostrea gigas*. La pérdida de movimiento es provocado tanto por la exposición por contacto directo, como por el extracto de las rafdofitas. Se monitoreo la pérdida de movimiento ya que es un signo inmediato de estrés de los estadios tempranos del ostión ante una condición ambiental desfavorable.

Matsuyama *et al.* (2001), menciona que la exposición directa de *C. antiqua* (1×10^7 cel mL⁻¹) durante 10 horas no tiene ningún un efecto sobre la larva trocófora de *Crassostrea gigas*. Sin embargo este trabajo demuestra que *Chattonella* spp. tiene un efecto negativo sobre las larvas de *Crassostrea gigas*. Aun cuando se trata de otro estadio larvario, se considera que el tiempo de exposición es clave para identificar los efectos negativos que provoca *Chattonella*, ya que en este estudio se observó una disminución del movimiento por arriba del 20% de las células expuestas por contacto en las primeras 12 horas con concentraciones inferiores a las probadas antes.

El efecto negativo de *Chattonella* sobre el movimiento de las larvas de *Crassostrea gigas* que se observó en este trabajo concuerda con la respuesta que han registrado las etapas larvianas de otros moluscos anteriormente. Bastie *et al.* (2016) demostraron que la exposición directa durante 24 horas de concentraciones de 8×10^3 cel mL⁻¹ de *C. antiqua* y *C. marina* promueven significativamente la reducción de la tasa de actividad de la larva D de la almeja *Pinctada fucata martensii*.

Por otro lado, se observó que el extracto crudo de ambos aislados de *Chattonella* tiene un efecto paralizante al ser aplicado a las larvas (D y umbonada) del ostión, se observó una recuperación el movimiento en un periodo corto de tiempo, sin embargo, a las 12 horas se observa una pérdida del movimiento por arriba del 80% de las larvas. Se observó que el aislado B disminuye un mayor porcentaje del movimiento de las larvas, y este dura su efecto perdura más tiempo en comparación con el extracto del aislado A. No se observó otro tipo de afectación sobre las larvas, Hoe *et al.* (2015) observo que la exposición del extracto lipofílico de *C. marina* promueve la desintegración celular de otros grupos de fitoplancton (después de 20 minutos) y la muerte de rotíferos (después de 20 horas).

Se considera que un análisis del contenido del extracto obtenido en este trabajo puede proporcionar una visión más amplia acerca del mecanismo que provoca que las larvas del ostión pierdan el movimiento.

En el tercer set de bioensayos se observó una pérdida del movimiento del 100% de las larvas en los dos tratamientos (0 cel mL^{-1} y $2 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ de los aislados), es por eso que se considera que no fue el tratamiento correcto y que es necesario realizar otras pruebas para conocer si existe un efecto sobre el movimiento de las larvas aun cuando existe una división física entre *Chattonella* y las larvas.

Los aislados de *Chattonella* spp. crecieron en condiciones ambientales que se observan en la BTS, esto tiene implicaciones negativas para la maricultura, pues como se observó en los bioensayos, esta rafidofita puede provocar la pérdida del movimiento en larvas del ostión *Crassostrea gigas*, lo cual se traduce en grandes pérdidas económicas.

VIII. Conclusión

Se logró aislar por primera vez a *Chattonella* spp. de la Bahía de Todos Santos. Se mantuvieron dos cultivos que presentan morfologías y tasas de crecimiento diferentes; sin embargo, es necesario realizar pruebas moleculares para identificarlas taxonómicamente, y ver su relación filogenéticas con cepas de otras regiones. Los caracteres morfológicos varían dependiendo de los cambios en las condiciones del cultivo.

Los aislados A y B presentaron una mayor abundancia celular a temperaturas de 20 °C y una irradiancia de 190. Sin embargo la tasa de crecimiento más alta es a 16 °C y 190 de irradiancia. La irradiancia es el factor más importante que afecta el crecimiento de los aislados.

Se demostró por primera ocasión que tanto la exposición directa, como la aplicación del extracto de los aislados de *Chattonella* de la BTS tienen un efecto negativo sobre el movimiento de las larvas D y umbonada del ostión *Crassostrea gigas*. La presencia de *Chattonella* provoca una disminución paulatina del movimiento de las larvas y, el extracto de *Chattonella* tiene un efecto paralizante inmediato.

Lista de referencias

- Arredondo Vega, B.O., Cordero Esquivel, B., Herrero, C. y Abalde, J. (1997). Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. Manual de Prácticas del Ier. Curso Teórico Práctico: Aplicaciones Biotecnológicas del Cultivo de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, México. Septiembre 1-5, 1997. 40 págs
- Band-Schmidt, C. J., L. Morquecho, D. U. Hernández-Becerril, A. Reyes-Salinas & E. Bravo-Sierra. (2004). Raphidophyceans on the coasts of Mexico. *Hydrobiologia*.515: 79-89.
- Band-Schmidt, C. J., A. Martínez-López & I. Gárate-Lizárraga. (2005). First record of *Chattonella marina* in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Harmful Algae News*. 28: 6-7.
- Band-Schmidt C. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, E. Núñez-Vázquez y F. E. Hernández-Sandoval. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21(3): 381-413.
- Band – Schmidt, C. J., A. Martínez – López, J. J. Bustillos – Guzmán, L. Carreón-Palau, L. Morquecho, N. O. Olguín – Monroy, T. Zenteno – Savín, A. Mendoza– Flores, B. González – Acosta, F. H. Hernández – Sandoval & C. R. Tomas. (2012). Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hidrobiológica*. 693: 81 – 97.
- Barraza-Guardado, R., R. Cortés-Altamirano & A. Sierra-Beltrán. (2004). Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Ch. Cf. ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News*. 25: 7-8.
- Basti L., Nagai K., Go J., Okano S., Oda T., Tanaka Y. (2016). Lethal effects of ichthyotoxic raphidophytes, *Chattonella marina*, *C. antiqua*, and *Heterosigma akashiwo* on post-embyonic stages of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Harmful Algae*. 59:112-122. DOI: 10.1016/j.hal.2016.08.003
- Bravo-Sierra, E. (2004). Fitoflagelados potencialmente tóxicos y nocivos de costas del Pacífico mexicano. *Revista de Biología Tropical*. 52 (Supl 1): 5-16.
- Cortés–Altamirano, R., Sierra, A., Barraza-Guardado, R. (2006). Mortandad de peces debido a microalgas nocivas y toxicas: Cinco casos de marea roja en la costa continental del Golfo de California (2003-2004). pp. 79-90. En S

- Salas, M.A. Cabrera, J. Ramos, D. Flores y J. Sánchez (eds). Memorias Primera Conferencia de Pesquerías Costeras en América Latina y el Caribe. Evaluando, Manejando y Balanceando Acciones. Mérida, Yucatán, México. Octubre 4-8, 2004.
- Demura, M., M. H. Noël, F. Kasai, M. M. Watanabe & M. Kawachi. (2009). Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina* y *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity. *Phycologia*.48 (6): 518-535.
- Gárate-Lizarraga, I., M. Muñetón-Gómez & V. Maldonado-López. (2006). Florecimiento del Dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Revista de Investigación Marina*. 27: 81-89
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez, E. J. (eds.) (2016). Florecimientos Algales Nocivos en México. Ensenada, México. CICESE. 438 p.
- Guillard, R.R.L. & Hargraves, P.E. 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32: 234-236.
- Hoe Chang F. (2015). Cytotoxic Effects of *Vicicitus globosus* (Class Dictyochophyceae) and *Chattonella marina* (Class Raphidophyceae) on Rotifers and Other Microalgae. *Marine Science and Engineering*. 3, 401-411; doi:10.3390/jmse3020401
- Imai I. & M. Yamaguchi. (2012). Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. *Harmful Algae*. 14. 46–70. DOI: 10.1016/j.hal.2011.10.014
- Katano, T., M. Yoshida, J. Lee, M. Han & Y. Hayami. (2009). Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphidophyceae) using Hepes-buffered paraformaldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy. *Phycologia*.48 (6): 473-479. DOI: 10.2216/08-102.1
- Keepler C.K., Houser J., Smith K., Ringwood A.H. & A: J: Lewitus. (2005). Sublethal effects of the toxic alga *Heterosigma akashiwo* on the southeastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 4, 275-285.
- Keepler C.K., Lewitus A. J., Ringwood A.H. Houser J. & T. Staton. (2006). Sublethal effects of short-term raphidophyte and brevetoxin exposures on the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*. 312, 141-147.
- Kim, D & T. Oda. (2010). Possible factors responsible for the fish-killing mechanisms of the red tide phytoplankton, *Chattonella marina* and

- Cholodinium polykrikoides*. En: Ishimatsu, A, Lie, H.j. (Eds). Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea. TERRAPUB/Nagasaki University, Tokyo/Nagasaki, pp. 246-268.
- Kwok C.-T., de Merwe J.P., Chiu J.M. Y. & Wu R.S.S. (2012). Antioxidant responses and lipid peroxidation in gills and hepatopancreas of the mussel *Perna viridis* upon exposure to the red-tide organism *Chattonella marina* and hydrogen peroxide. *Harmful Algae*. 13, 40-46
- Lewitus, A., Horner, R., Caron, D., García-Mendoza, E., Hickey, B., Hunter, M., Huppert, D., Kudela, R., Langlois, G., Largier, J., Lessard, E., RaLonde, R., Rensel, J., Strutton, P., Trainer, V., Tweddle, J. (2012). Harmful algal blooms along the North American west coast region: history, trends, causes and impacts. *Harmful Algae*. 19:133–159.
- López-Cortés, D. J., C. J. Band-Schmidt, I. Gárate-Lizárraga, J. J. Bustillos-Guzmán, F. E. Hernández-Sandoval & E. J. Núñez-Vázquez. (2011). Co-ocurrencia de *Chattonella marina* y *Gynodinium catenatum* en la Bahía de La Paz, Golfo de California (primavera 2009). *Hidrobiológica*. 21: 185-196
- Marshall, J. A. y G. M. Hallegraeff. 1999. Comparative ecophysiology of the harmful alga *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from South Australian and Japanese waters. *J. Plankton Res.* 21 (10): 1809-1822.
- Martínez-López, A., C. J. Band-Schmidt, D. Escobedo-Urías & A. E. Ulloa-Pérez. (2006). Bloom of *Chattonella subsalsa* in an impacted coastal lagoon in the Gulf of California. *Harmful Algae News*.31: 1-5.
- Matsuyama Y., Usuki H., Uchida T., Y. Kotani. (2001). Effects of harmful Algae on the early planktonic larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. En Hallegraeff, G., Blackburn S. I., Bolch C. J., R.J. Lewis.(Eds).Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001.
- Mendoza-Flores A. (2011). Desarrollo de sondas para la detección *Chattonella spp.* (Raphidophyceae) mediante hibridación fluorescente in situ. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur.
- Mendoza-Flores A. (2013). Identificación de cepas del género *Chattonella* (clase: Raphidophyceae) aisladas del Golfo de California a partir de la región 5.8S del Ácido Ribonucleico Ribosomal (ARNr) y del Gen Citocromo C Oxidasa Subunidad 1 (COI). (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California Sur.

- Moestrup, Ø., (2002). Fitoflagelados potencialmente toxígenos en el cono sur Americano. In Sar, E. A., M. E. Ferrario & B. Reguera (eds), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Vigo: 157–166.
- Pérez-Morales, A. & C. J. Band-Schmidt. (2011). Brevetoxinas en las costas de México: efectos potenciales en la salud pública. *CICIMAR Oceánides*, 26(2): 59-68.
- Perez-Morales, A, C. J. Band-Schmidt, J. L. Ortiz-Galindo & A. S. Sobrino-Figueroa. (2014). Mortality in the initial ontogeny of *Paralabrax maculatofasciatus* (Serranidae) (*Actinopterygii*, Perciformes) caused by *Chattonella* spp. (Raphidophyceae). *Hydrobiologia*. 722: 247-261. DOI 10.1007/s10750-013-1707-2
- Rodríguez-Palacios, M. C., L. Crisóstomo-Vázquez, S. Álvarez-Hernández & C. Lozano-Ramírez. (2011). Strains of toxic and harmful microalgae, from waste water, marine, brackish and fresh water. *Food Addit. Contam.* 29: 304-313.
- Subrahmanyam, R. (1954). On the life-history and ecology of *Hornellia marina* gen. et sp. nov. (Chloromonadineae), causing green discoloration of the sea and mortality among marine organisms of the Malabar Coast. *Indian Journal of Fisheries* 1: 182-203.
- Tang and Gobler, 2009
- Taylor F.J.R. & Trainer V. L Eds. (2002). Harmful algal blooms in the PICES region of the North Pacific. North Pacific Marine Science Organization (PICES). Scientific Report No. 23.
- Tiffany, M. A., S. B. Barlow, V. E. Matey & S. H. Hulbert. (2001). *Chattonella marina* (Raphidophyceae), a potentially toxic alga in the Salton Sea, California. *Hydrobiologia* 466: 187–194.

Anexo 1

Medio L1 (Guillard&Hargraves, 1993).

Componente	Cantidad
NaNO_3	1 mL
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 mL
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	1 mL
Solución de elementos traza	1 mL
Solución de vitaminas	0.5 mL

Solución de elementos traza.

Componentes	Cantidad
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.36 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 mL
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mL
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mL
H_2SeO_3	1 mL
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mL
Na_3VO_4	1 mL
K_2CrO_4	1 mL

Solución de vitaminas.

Componentes	Cantidad
Tiamina · HCl (vit. B ₁)	200 mg
Biotina (vit. H)	10 mL
Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	1 mL