



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD Iztapalapa

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE DINOFLAGELADOS

DEL PACÍFICO MEXICANO

**La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de Postgrados de Excelencia del CONACyT**

**Tesis
Que para obtener el grado de
Maestra en Biología
PRESENTA**

Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Septiembre de 2006

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

HIDROBIÓL. MÓNICA CRISTINA RODRÍGUEZ PALACIO

El día 19 de SEPTIEMBRE del año 2006

Comité Tutorial

Firma

Tutora: Dra. Graciela De Lara Isassi

Asesor: M. en B. E. Sergio Álvarez Hernández

Asesora: Dra. Maria Esther Angélica Meave Del Castillo

Sinodal: Dra. Rosa Olivia Cañizares

Sinodal: Dr. Fernando Martínez Jerónimo

A Rebek y Rey, porque han sido mi apoyo en todo momento y me han impulsado y ayudado a realizar mis metas y alcanzar mis sueños.

*A mi comité tutorial por el apoyo incondicional
....y por haber creído en que se podía.*

A la Dra. Grace y a Sergio por la paciencia que me tuvieron y por todo su cariño

A Cruz por apoyarme y estar siempre que lo necesito.

Resumen

Los cultivos de dinoflagelados han sido utilizados para dilucidar diversos problemas de la biología de estos organismos, particularmente en lo que se refiere a variabilidad morfológica, plasticidad fisiológica y a diversos procesos bioquímicos. Gracias a cultivos *in vitro* ha sido posible generar datos para redefinir los límites taxonómicos de algunos taxa, así como para incrementar el conocimiento de los ciclos de vida.

Esta tesis es resultado del subproyecto de cultivos dentro del proyecto “Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacífico Mexicano” financiado por el CONACyT y aporta la materia prima para la obtención de perfiles moleculares, toxinas, pigmentos y lípidos de los dinoflagelados en cultivo de importancia para México. Los organismos aislados fueron colectados en dos localidades del Pacífico Mexicano, Acapulco, Guerrero y Lázaro Cárdenas, Michoacán. Logrando así 21 cepas de los géneros *Prorocentrum*, *Ceratium*, *Ceratocorys*, *Gymnodinium* y *Gyrodinium*. Los cultivos son no axénicos, clonales, semicontinuos, con ciclo de luz oscuridad de 12:12, se mantienen a dos temperaturas 18 y 20 °C \pm 1 °C y con una irradiación de 90.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 166.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De alguna de las especies cultivadas no existen registros en otros ceparios en el mundo como *Ceratium falcatum*, *Ceratocorys armata*.

La metodología descrita a detalle para el establecimiento de los cultivos, su escalamiento y manutención como cepas puras abre un importante campo de investigación que sobrepasa los objetivos iniciales del proyecto.

Abstract

Different issues related to the biology of dinoflagellate were studied through cultures of these organisms. The culture of these organisms can be used to investigate morphological variability, plasticity, and some chemical processes. Moreover, in vitro cultures has been used to obtain data for redefining the taxonomical boundaries of some taxa, Cultures are a good aid in improvement the knowledge of dinoflagellates life cycles.

This Dissertation is a research part of the “Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacifico Mexicano” proyect. Who is funded by the National Council of Science and Technology (CONACyT). This research provided the biomass of dinoflagellates to obtain molecular profiles, toxins, pigments, and lipids. Isolated organisms were collected in two different localities of the Mexican Pacific Coast: Acapulco, Guerrero and Lázaro Cárdenas, Michoacán. The collected samples produced 21 strains: among them, *Prorocentrum*, *Ceratium*, *Ceratocorys*, *Gymnodinium* and *Gyrodinium* several species. The cultures are not axenic, clonal, or semi-continuous. The light cycles were of 12:12. The cultures were kept at two different temperatures of 18 and 20 °C \pm 1 °C. The irradiance was of 90.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 166.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. This is the first research work reporting cultures of *Ceratium falcatum*, *Ceratocorys armata*.

Finally, this research goes beyond its initial goal by giving a detailed description of the methodology for generating the cultures its scaling and conservation as pure strains.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II
1 Introducción.....	4
1.1 Cultivos de microalgas marinas.....	10
1.2 Medios de cultivo.....	11
1.3 Tipos de cultivo.....	13
1.4 Fases de crecimiento.....	15
1. Antecedentes.....	18
2. Justificación.....	26
3. Objetivo general.....	27
4. Objetivos específicos.....	27
5. Hipótesis.....	28
6. Área de Estudio.....	28
7. Metodología.....	33
8. 1 Medios de cultivo.....	33
8.2 Colecta y aislamiento.....	37
8.3 Mantenimiento de las cepas (resiembra).....	41
8.4 Medición de la tasa de crecimiento.....	41
8.5 Preparación de material para microscopio electrónico de barrido.....	43
8. Resultados.....	46
9.1 Cepas obtenidas.....	46
9.2 Descripción de las especies en cultivo.....	48

9.3 Curvas de crecimiento de las cepas.....	59
9.4 Especies con crecimiento inicial.....	62
9.4.1 Curvas de crecimiento de especies con crecimiento inicial.....	63
9. Discusión.....	65
10. Conclusiones.....	79
11. Literatura Citada.....	82
Láminas Fotográficas.....	99
Lámina 1 Fig. a-f, <i>Prorocentrum micans</i>	100
Lámina 2 Fig. a-f, <i>Prorocentrum gracile</i>	101
Lámina 3 Fig. a-f, <i>Prorocentrum rhathymum</i>	102
Lámina 4 Fig. a-d, <i>Ceratocorys armata</i>	103
Lámina 5 Fig. a-e, <i>Ceratium fusus</i>	104
Lámina 6 Fig. a-d, <i>Ceratium falcatum</i>	105
Lámina 7 Fig. a-h, <i>Gymnodinium</i> sp.....	106
Lámina 8 Fig. a-f, <i>Gyrodinium uncatenum</i>	107
Lámina 9 Fig. a-i, Especies con crecimiento inicial.....	108

1. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados son después de las diatomeas, los productores primarios más importantes del fitoplancton marino (Lara *et al.*, 1996); estos organismos presentan varias peculiaridades: forman las mareas rojas, algunos son bioluminiscentes, producen diversas toxinas, son en su mayoría unicelulares, sus microfósiles son indicadores paleogeográficos y estatigráficos de los cuales se encuentran registros desde el Triásico y además, presentan características celulares y bioquímicas inusuales (Fensome *et al.*, 1993; Lara *et al.*, 1996). Algunos forman cadenas o estados palmeloides, la mayoría presenta asimetría característica, con pigmentos fotosintéticos particulares (clorofila c_2 , peridinina, dinoxantina y diadinoxantina) y dos flagelos distintos. Las células son generalmente uninucleadas o binucleadas, móviles ó inmóviles, pláncnicas, bénticas, simbiontes o parásitas. Otros organelos que son detectables en microscopia de luz son las púsculas (fagocitos), ocelos, estigmas, nematocistos y tricocistos (Fensome *et al.*, 1993; Licea *et al.*, 1995).

Dentro del fitoplancton, se han identificado 200 especies nocivas de un total de aproximadamente 4000 microalgas marinas descritas (Zingone y Enevoldsen, 2000); de las especies nocivas, la mayoría son dinoflagelados y en menor proporción rafidofíceas, primnesiofitas y diatomeas (Balech, 1988; Alonso, 1998).

Desde la década de los setentas en el siglo pasado, se han incrementado los reportes de nuevas apariciones de florecimientos algales nocivos (FAN) en el mundo. Algunas causas de estas proliferaciones pueden ser debidas a la

eutrofización costera, al traslado de dinoquistes en agua de lastre, al calentamiento global, a que han aumentado las investigaciones científicas sobre este tema y por lo tanto ahora se tiene mayor conocimiento y registros al respecto (Fraga y Bakun, 1993; Hallegraeff, 1993; Cortés-Altamirano, 1998). Los FAN son un fenómeno frecuente en las aguas del Pacífico mexicano (Mee *et al.*, 1986; Cortés-Altamirano, 1987; Lassus, 1988; Cortés-Altamirano y Núñez-Pasten, 1992; Cortés-Altamirano y Alonso, 1997; Cortés-Altamirano, 1998).

Una de las características más importantes que se debe tomar en cuenta para poder clasificar a los dinoflagelados, es la ubicación de los flagelos, que pueden ser anteriores en los desmocontes, (Fig. 1A) o ventrales (en los dinocontes Fig. 1B); (Taylor, 1987; Steidinger y Tangen, 1997).

Balech (1988) agrupa a los dinoflagelados en dos grandes grupos, los tecados y los desnudos o atecados. Los primeros tienen una célula encerrada en una teca (Fig. 1C) formada por placas separables y los segundos (Fig. 1D) carecen de ella.

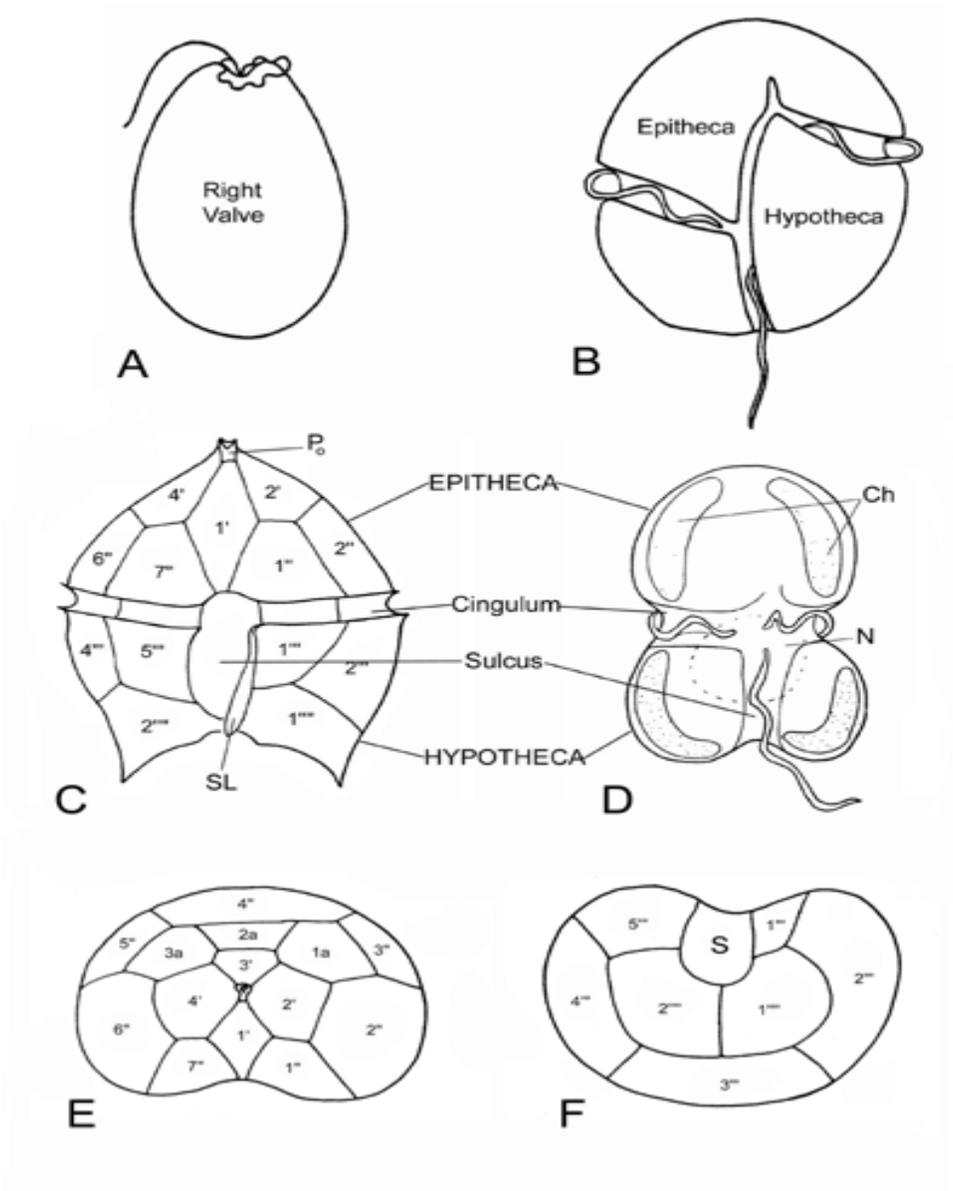


Figura 1. Características morfológicas de los dinoflagelados: A. Vista lateral de una célula tipo desmoconte (dos flagelos diferentes insertados apicalmente); B. Vista ventral de una célula tipo dinoconte (dos flagelos diferentes insertados ventralmente); C. Vista ventral de una célula tecada peridinioide; D. Vista ventral de una célula atecada gymnodinioide; E. Vista apical de placas en la epitheca; F. Vista antapical de placas de la hipoteca. Ch = cloroplastos; N = núcleo; Po = Placa del poro apical; SL = Sulcus (Figs. a-b tomadas de Steidinger y Tangen, 1997; Figs. c-f tomadas de Taylor, 1987).

La estructura celular de los dinoflagelados desnudos o atecados, se divide en dos regiones: una superior llamada epicono (o episoma) y una inferior llamada

hipocono (o hiposoma), ambas separadas por el *cingulum* (o cíngulo) que corresponde a un surco transversal que rodea a toda la célula y que aloja al flagelo transversal. En el hipocono y en posición ventral, se encuentra el *sulcus*, el cual corresponde a un surco longitudinal que aloja al flagelo longitudinal. La cara por la que se puede ver el *sulcus* se llama ventral y la contraria dorsal (Llorente y Cereceda, 2001). En los organismos tecados, la estructura celular se basa también en dos regiones denominadas epiteca, la superior, e hipoteca la inferior; al igual que en los atecados, ambas se encuentran separadas por el *cingulum*, que aloja el flagelo transversal y en la región ventral de la hipoteca se encuentra el *sulcus* que aloja el flagelo longitudinal. Los dinoflagelados tecados además de diferenciarse de los atecados por la presencia de placas, también lo hacen porque generalmente la epiteca e hipoteca presentan prolongaciones llamadas cuernos (Llorente y Cereceda, 2001). Las placas pueden ser de celulosa o de un carbohidrato afín, forman parte de la pared de estos organismos y son consideradas como la característica taxonómica más importante, ya que su forma, número y posición es propia de cada especie. (Balech, 1988; Llorente y Cereceda, 2001).

Estos organismos presentan diferentes tipos de nutrición, por lo que encontramos dinoflagelados autótrofos, auxótrofos, heterótrofos o mixótrofos (combinación de autotrofia y fagotrofia) (Taylor, 1987; Stoecker, 1998; Coats, 2002). Los dinoflagelados heterotróficos son muy abundantes y llegan a causar florecimientos excepcionales como es el caso de *Protoperidinium depressum*, *Oxiris marina* (Steidinger y Tangen, 1997) y *Protoperidinium steinii* (Olseng et al.,

2002). Entre los mixotróficos sobresalen *Ceratium furca*, *Akashiwo sanguinea* y *Gyrodinium uncatenum* que son principalmente autótrofos pero consumen nanoplancton y microciliados, compitiendo directamente con copépodos y otros organismos del zooplancton por una fuente de alimentación común (Smalley *et al.*, 2001).

En cuanto a los ciclos de vida, es importante establecer cultivos de dinoflagelados para poder estudiarlos y así evitar confusiones taxonómicas como las que se dieron en *Pyrocystis lunula* y *Dissodinium pseudolunula*, que por más de un siglo las etapas en la historia de vida de ambos organismos, fueron consideradas como un solo ciclo de vida incompleto y solo después de cultivarlos, fue posible demostrar la existencia de dos especies, una de vida libre y otra parásita y complementar sus ciclos de vida, revelando así que los dos organismos pertenecen a órdenes separados (Coats, 2002).

La ventaja de cultivar estos organismos radica en poder determinar la sexualidad y el enquistamiento que sucede en los ciclos de vida de los dinoflagelados, ya que exceptuando a *Noctiluca*, todos los dinoflagelados tienen una fase haplónica en su ciclo de vida, dominado por la reproducción asexual de células vegetativas haploides. La reproducción asexual es por mitosis; en las formas desnudas la célula se divide en dos y en las formas tecadas la teca se divide a la mitad y después se forma un complemento nuevo o bien la pared se reconstituye después de la ecdisis (Coats, 2002 y de la Cruz *et al.*, 2002).

La deficiencia de nitrógeno desencadena la reproducción sexual en los dinoflagelados (Pfiester y Anderson 1987). Las células vegetativas sufren mitosis para producir gametos desnudos que, luego de ser liberados de la teca madre, forman su propia teca. Los gametos se unen por el *sulcus* y forman un tubo de fertilización donde los núcleos se fusionan y forman un cigoto móvil llamado planocigoto, este se mantiene móvil durante dos semanas (dependiendo la especie), durante este tiempo se incrementa considerablemente su tamaño, luego pierde su movilidad, contrae su protoplasto y desarrolla cuerpos rojizos y una tercera pared gruesa de quitina; en este estado recibe el nombre de hipnocigoto, que llega a ser un quiste de resistencia, porque entra en fase de latencia y su germinación puede ocurrir hasta unos cuatro meses después, durante la germinación experimenta meiosis para formar células vegetativas haploides y por ello, tanto las células vegetativas como los gametos son haploides (Pfiester y Anderson, 1987; Lara *et al.*, 1996 y Hoek *et al.*, 1997). La reproducción sexual se ha observado en más de 20 especies de dinoflagelados marinos entre los cuales están *Ceratium horridum*, *Ceratium cornutum* (Pfiester y Anderson, 1987 y Hoek *et al.*, 1997), *Gymnodinium catenatum* (Band-Schmidt *et al.*, 2004), *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* (Ustup y Aranza, 1998) y en algunos de agua dulce como en *Gymnodinium pseudopalustre*, *Woloszynskia apiculata* (Stosch, 1973) y *Ceratium hirundinella* (Taylor y Pollinger, 1987).

1.1 Cultivos de microalgas marinas

Las microalgas crecen en el medio natural en comunidades y cuando se desea hacer un estudio de una especie en particular, una opción es aislar la especie de interés para cultivarla sin la interferencia de otros organismos. El establecimiento y crecimiento exitoso de cualquier especie en un laboratorio, dependerá de varios factores como los químicos, físicos y de hábitat, una vez logrado el establecimiento, se considerarán cultivos a aquellas poblaciones de organismos que puedan mantenerse indefinidamente en condiciones artificiales (González *et al.*, 1995).

Pringsheim, es considerado en la actualidad como el padre de los cultivos de microalgas, ya que en 1912 introdujo el uso de extracto de suelo en los medios y en 1913 obtuvo cultivos libres de bacterias con técnicas aplicables a cualquier microalga. Este mismo autor en 1921 recomendó el método de pipeteo para aislar microalgas y fue el primero en establecer una colección de cultivos de microalgas (Pringsheim, 1912; 1921; González *et al.*, 1995).

Mas adelante, Provasoli hizo grandes aportes al estudio de los requerimientos nutricionales de las microalgas marinas (Provasoli y Pintner, 1953; Provasoli y Mc Laughlin, 1955; Provasoli, 1963, 1964, 1971) y también diseñó medios de cultivo artificiales y naturales enriquecidos que se utilizan a la fecha (Provasoli *et al.*, 1957; Provasoli, 1963).

Se hicieron adelantos importantes como los descubrimientos de los quelantes como el EDTA, el Tris que es un amortiguador y las tres vitaminas solubles, biotina, tiamina y cianocobalamina, que son esenciales para el crecimiento de los dinoflagelados, ya que aumentan los beneficios del uso del extracto de suelo y su adición hace que los cultivos de especies fotosintéticas sean más confiables y constantes. Aunque los primeros estudios de sustancias quelantes en los medios de cultivo utilizaron algas verdes o diatomeas, las primeras demostraciones de requerimientos de vitaminas fueron hechas con flagelados heterótrofos (Jeffrey, 1979; González *et al.*, 1995).

Dentro de las siguientes décadas, diferentes especies de dinoflagelados marinos pudieron ser cultivados, gracias al desarrollo de nuevos medios de cultivo, los cuales contienen los requerimientos necesarios para los diferentes tipos de nutrición, como son autotrofia, heterotrofia y mixotrofia (Spector, 1984).

1.2 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo debe proporcionar los requerimientos mínimos necesarios de la especie a cultivar, tales como, agua, sales minerales (macro y micronutrientes), una fuente de nitrógeno, pH adecuado, compuestos orgánicos y factores de crecimiento (vitaminas, hormonas). Estos medios pueden ser naturales o sintéticos. Los naturales se preparan con agua de mar enriquecida con sales minerales y vitaminas y los sintéticos, se preparan de igual manera pero con agua destilada como base, en vez del agua de mar, a la cual le son adicionados los

componentes naturales del agua de mar. Varios autores recomiendan utilizar el agua de mar de donde se aisló la especie de microalga para la elaboración del medio de cultivo (Álvarez-Arellano, 1994; González *et al.*, 1995; Arredondo y Band, 2000).

La colecta del agua de mar debe hacerse lo más alejado de la costa para asegurarnos que no esté contaminada, nunca debe ser colectada durante los florecimientos, especialmente de organismos tóxicos. Para remover los contaminantes orgánicos se le adiciona de uno a tres gramos de carbón activado por litro mezclándolo bien, al día siguiente el carbón debe quitarse a través de decantación o filtración, toda el agua de mar que se use en los cultivos, debe ser filtrada y esterilizada (Álvarez-Arellano, 1994; González *et al.*, 1995; Arredondo y Band, 2000).

Los medios que se utilizan para el cultivo de dinoflagelados son principalmente el f/2 (Guillard y Ryther, 1962), el K (Keller *et al.*, 1987), el ES (Harrison *et al.*, 1980; Berges *et al.*, 2001), el GP (Loeblich y Smith, 1968), el GSe que es una modificación del GP que utiliza extracto de suelo (Arredondo y Band, 2000) y el L1 (Guillard y Hargraves 1993) que es una modificación del F/2 que contiene óxido de selenio, el cual ayuda a la proliferación de dinoflagelados y algunas combinaciones del L1 como es el L1SE. Se recomienda que no se deben incluir metasilicatos ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), ya que favorecen el crecimiento y proliferación de diatomeas (Arredondo y Band, 2000).

1.3 Tipos de Cultivo

Para poder realizar estudios ecológicos y fisiológicos se necesitan cultivos puros, unialgales o clonales, así como para estudios de resistencia antimicótica e investigaciones bioquímicas y genéticas (Jeffrey, 1979). Existen diferentes tipos de cultivo como son:

Cultivos mixtos: Son los que contienen más de una especie de microalga, los cuales pueden ser axénicos o no. Se debe considerar que algunas formas algales pueden crecer más rápidamente que otras en un período de tiempo, por lo que si no se reemplaza o enriquece el medio, este cambia gradualmente afectando el crecimiento de las especies originalmente predominantes e incrementando la competencia interespecífica con la consecuencia de que otras especies pueden llegar a ser dominantes (Morales y De Velotti, 1990).

Cultivos unialgales: Son los que contienen poblaciones de una sola especie de alga, aunque existan otros microorganismos asociados como bacterias; a estos cultivos también se les llama cultivos puros. Este tipo de cultivo se puede iniciar con un solo individuo (clonal) o con varios (Morales y De Velotti, 1990; Arredondo y Band, 2000).

Cultivos axénicos: son aquellos cultivos que están libres de bacterias, hongos y protozoarios, que se mantienen en condiciones de asepsia total. Algunas veces es difícil lograr esto ya que en el caso de los dinoflagelados, algunos viven en sinergismo con bacterias por lo que eliminarlas con antibióticos, sería perjudicial

para el crecimiento del cultivo (Morales y De Velotti, 1990 y Arredondo y Band, 2000).

Cultivos clonales: se refieren a las poblaciones de algas que descienden de la reproducción asexual de un individuo. Este tipo puede ser o no axénico (Morales y De Velotti, 1990).

Según la forma de cosechar y mantener estos cultivos, se pueden clasificar en:

Cultivos continuos. Son aquellos en los que se mantiene la población en fase exponencial de crecimiento “steady-state” durante largos períodos de tiempo. Para que esto sea posible, se mantiene un flujo constante de entrada de requerimientos y salida de productos. En cultivos continuos la densidad, el medio utilizado, la temperatura y la luz son constantes por períodos prolongados (Spector, 1984; Morales y De Velotti, 1990; Abalde *et al.*, 1995).

Cultivos en lote “batch”. Este cultivo se implementa una vez y se cosecha luego que la población ha alcanzado su nivel apropiado de densidad o sea la fase exponencial de crecimiento. En un cultivo “batch” no hay resiembras ni mantenimiento de la cepa (Spector, 1984; Morales y De Velotti, 1990).

Cultivos semicontinuos. Es una combinación de los dos métodos anteriores, con la diferencia que se cosecha una parte del cultivo según la producción y se renueva el volumen cosechado, añadiendo la misma cantidad de medio de cultivo que el

cosechado y así el cultivo se recupera y mantiene constante su volumen. Estos cultivos, se pueden mantener por tiempo indefinido ya que una vez que el cultivo alcanza la fase exponencial se lleva a cabo la cosecha-reposición de medio fresco y estéril y cuando este mismo alcanza su fase exponencial se repite la operación y así sucesivamente. La desventaja de este cultivo es que puede contaminarse fácilmente con bacterias debido a la manipulación (Morales y De Velotti, 1990).

1.4 Fases de Crecimiento

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en número de células (células por ml), peso seco (total y orgánico), cantidad de proteína, pigmentos, volumen de las células y/o carbono celular total, en un período de tiempo o en una fase de crecimiento determinados.

En todo cultivo de microalgas se debe llevar un registro de crecimiento, para identificar la etapa de mayor densidad de las microalgas y así poder determinar el momento adecuado en que este debe transferirse a un volumen mayor de medio o diluirse si el recipiente tiene el volumen disponible (Stein, 1973; Paniagua *et al.*, 1988; Arredondo y Band, 2000).

Fase de inducción. Es la primera fase de crecimiento del cultivo y se le llama también fase de latencia (LAG). Se presenta cuando al inocular las microalgas al medio, a menudo no se registra un incremento en el número de células. Esta fase puede tardar varios días dependiendo del tamaño y del estado del inóculo y se

puede evitar si inoculamos cultivos en fase de crecimiento exponencial (Paniagua *et al.*, 1988; Morales y De Velotti, 1990; Becker, 1994).

Fase exponencial: Es la etapa en la que la densidad de las microalgas aumenta de manera geométrica (exponencial). Esta fase puede presentarse al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse por varios días hasta semanas, dependiendo del tipo de microalga (Paniagua *et al.*, 1988; Morales y De Velotti, 1990; Becker, 1994).

Fase estacionaria. Esta se reconoce por un decremento en la velocidad de reproducción de las células, debido al agotamiento de nutrientes del medio ocasionado por el crecimiento del cultivo, dando como consecuencia que el número de microalgas permanezca sin cambio, en ocasiones el fenómeno apenas se detecta (Paniagua *et al.*, 1988; Morales y De Velotti, 1990; Becker, 1994).

Fase de muerte. Ocurre cuando se incrementa el número de células muertas por las condiciones desfavorables, provocando así que aumente el número de bacterias, hongos y espuma, producto de la destrucción celular, generando el colapso total del cultivo (Paniagua *et al.*, 1988; Morales y De Velotti, 1990; Becker, 1994).

La duración de cada fase de crecimiento puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse, dependiendo de diversos factores como la temperatura, fuente de luz, la composición química del medio de cultivo, tamaño del inóculo y las

características propias de cada especie de microalga (Stein, 1973; Paniagua *et al.*,1988; Morales y De Velotti, 1990; Becker, 1994).

2. ANTECEDENTES

Los cultivos de microalgas han sido utilizados para dilucidar diversos aspectos sobre la biología de estos organismos, particularmente en lo referente a su variabilidad morfológica, plasticidad fisiológica y atributos bioquímicos. También ha sido posible, gracias a los cultivos *in vitro*, generar datos para redefinir los límites taxonómicos de algunos taxa, así como incrementar el conocimiento de los ciclos de vida. Otros cultivos se utilizan para bioensayos, particularmente para la detección de tóxicos en cuerpos de agua (González *et al.*, 1995), debido al incremento de las mareas rojas y la problemática que esto representa para la salud pública (Hallegraeff, 1993). Se han realizado también experimentos para probar los factores limitantes del crecimiento de las microalgas (Terlizzi, *et al.*, 2002).

Con un cultivo de dinoflagelados se pueden llegar a desarrollar modelos estadísticos para medir la dinámica de las poblaciones, incluyendo todas las variables como son: competencia interespecífica, concentración de nutrientes y cambios en las concentraciones celulares (Krivtsov *et al.*, 2000). Otros estudios de dinoflagelados se han enfocado en mejorar los actuales medios de cultivo, o bien a innovar formulaciones, con el principal objetivo de cultivar especies que no han podido ser cultivadas, como es el caso de algunas del género *Ceratium* (Álvarez *et al.*, 1997 y De Lara-Isassi *et al.*, 2006 en prensa).

Actualmente existen diferentes ceparios en el mundo donde se pueden comprar cepas de dinoflagelados para fines particulares y entre estos tenemos los siguientes:

1. ATCC (American Type Culture Collection). La colección de la ATCC se ha formado por colaboraciones de numerosas instituciones, para proveer material a la comunidad científica en general. Las instituciones que participan donando las cepas para la formación de estas colecciones especiales, se benefician ya que la ATCC las mantiene y distribuye. La más reciente colección que estableció la ATCC es la de microorganismos aislados de parques naturales de Estados Unidos. En cuanto a dinoflagelados en la ATCC se mantienen varias cepas diferentes de la especie *Cryptocodinium cohnii* (Seligo) Javornicky (<http://www.atcc.org>).

2. UTEX (University of Texas at Austin). La colección incluye cerca de 2000 cepas diferentes de microalgas, de aproximadamente 200 géneros diferentes, representantes de la mayoría de las divisiones o grupos algales. La función primordial de UTEX es proveer de cultivos algales a la comunidad científica. Los cultivos en la colección de UTEX se utilizan por la mayoría de investigadores, profesores, biotecnólogos y varios otros proyectos alrededor del mundo. Esta colección de algas designada UTEX, ha estado en operación continua desde 1953 y fue establecida por Richard C. Starr en la Universidad de Indiana. La colección consta de algas verdes y cianobacterias de agua dulce, macrofitas marinas, dinoflagelados marinos y algas rojas. Todas las cepas de la colección fueron

obtenidas del medio natural y no están genéticamente alteradas. Casi todas las cepas de UTEX son axénicas y todos los cultivos son unialgales. (<http://www.utex.org>).

3. CCAP (La colección de cultivos de algas y protozoarios, de la Asociación Escocesa para la Ciencia Marina). Esta colección fue fundada por el profesor Ernst Georg Pringsheim, quien colaboró con Victor Czurda y Felix Mainx, estableciendo cultivos en el Instituto de Botánica de la Universidad de Alemania, Praga en los años veintes. Esta colección tiene cerca de 2000 cepas de algas y protozoarios que se distribuyen a la comunidad industrial y científica en todo el mundo. Sus investigaciones se caracterizan por interrelacionar el fitoplancton con bacterias heterotróficas y se enfocan en investigar el papel que juegan las bacterias en el crecimiento del fitoplancton, en el desarrollo de las mareas rojas y en la producción primaria.

Las cerca de 2000 cepas de algas y protozoarios que mantiene la CCAP, incluyendo cianobacterias, algas rojas, pastos marinos, protozoarios no patógenos de vida libre, protozoarios potencialmente patógenos (como todas las especies de *Acanthamoeba* spp.) son mantenidas en subcultivos semicontinuos y las de protozoarios son criopreservadas (<http://www.sams.ac.uk>).

4. La CCAC (Culture Collection of Algae at the University of Cologne). Es una colección que consta de aproximadamente 1400 cultivos clonales. Alrededor de dos tercios de los cultivos son flagelados. La colección tiene cepas axénicas de

algas de agua dulce y marina y se identifican con la clave CCAC. La CCAC ha adquirido recientemente diversas cepas de la colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Viena, que son no axénicas ni unialgales, los cuales no se han nombrado con las siglas CCAC por no cumplir con las características típicas de cultivos axénicos. La fundación de esta colección de cultivos de algas inició en 1974, donde las primeras células fueron aisladas de una muestra de agua natural, obteniéndose cultivos clonales de algas. La Colección de Cultivos de la Universidad de Colonia fue establecida formalmente en la primavera del 2001 y se encuentra incluida en la lista de Centro de Datos de Microorganismos en el mundo con el número de registro 807 (<http://www.ccac.uni-koeln.de>).

5. MIB (Marine Biotechnology Institute). Corresponde a la colección del Instituto de Biotecnología Marina de Japón, que se caracteriza por preservar bacterias y microalgas marinas. La MIB contiene un catálogo *on line* de ambos tipos de cepas, caracterizadas taxonómicamente por sus secuenciaciones de rDNA y/o DNA y secuencias de genes B (gyrB).

El MIB ha cultivado bacterias, hongos y microalgas de mar abierto, costas y aguas estuarinas; posee cerca de 700 cepas de bacterias marinas y 300 de microalgas. Gracias a la secuenciación del rDNA de todas las cepas fue como construyeron su base de datos, que incluye características fenotípicas y genotípicas. Las secuencias SSU rDNA fueron usadas para construir su página WEB.

En cuanto a dinoflagelados, el MIB tiene 9 diferentes especies en 15 cepas (<http://seasquirt.mbio.co.jp/mbic/index.php?page=mbichome>).

6. CCCM (Centro Canadiense de cultivo de microorganismos). La colección de este centro, mantiene especímenes vivos de fitoplancton marino, microalgas de agua dulce y hongos de uso comercial, aislados por investigadores y profesores.

La colección de algas marinas y de agua dulce consta de aproximadamente 300 cepas representadas en 15 clases de algas, la mayoría de los grupos del fitoplancton marino. Aunque incluye varias especies de microflagelados oceánicos aislados del Pacífico Noreste, el mayor énfasis se ha hecho en especies locales de importancia ecológica, toxicológica y biotecnológica. Aproximadamente el 75% de los aislamientos se han realizado en aguas de la Columbia Británica y el remanente, de aguas tropicales y templadas de otras regiones.

La colección de dinoflagelados dentro del CCCM es una de las más grandes del mundo y se reconoce como NEPCC (The North East Pacific Culture Collection). (<http://www.botany.ubc.ca/cccm/index.html>). Es la colección de microalgas marinas vivas formada por el Dr. Taylor durante los años 90, cuando solamente se tenían especies comunes en los ceparios como: *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis galbana*, que eran utilizadas en estudios ecológicos. El objetivo de la colección fue aislar especies ecológicamente importantes del Pacífico Norte, lo cual se mantiene vigente hoy día, sin embargo, también se tienen especies de otras localidades, incluyendo los trópicos. Los cultivos se mantienen a 16° C en un ciclo de luz:oscuridad de 14:10. Los cultivos tropicales son incubados aproximadamente a 25°C. La salinidad del medio varía

de 28 a 35 ups. El medio que utilizan para mantener los cultivos es el propuesto por Harrison *et al.* (1980) modificado con agua de mar natural, sin embargo algunos clones crecen en ese mismo medio, pero elaborado con agua de mar artificial

<http://www.botany.ubc.ca/cccm/NEPCC/NEPCC%20isolates/nepccdino.html>.

7. CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton).

Este centro de cultivo de dinoflagelados marinos fue inicialmente dedicado o desarrollado para cultivos de colecciones establecidas por el Doctor Luigi Provasoli de la Universidad de Yale y el Dr. Robert R.L. Guillard de la Institución Oceanográfica de Woods Hole, ambas en Estados Unidos. En marzo de 1980 estos investigadores publicaron el trabajo “Taller sobre recomendaciones para el establecimiento de colecciones de cultivo de dinoflagelados marinos”, donde sugieren el establecimiento de una sola colección de fitoplancton marino a nivel nacional con el Dr. Guillard como director. La CCMP forma parte de los Laboratorios Bigelow para las Ciencias Oceánicas y ofrece en su catalogo *on line*, información general y específica sobre las 1500 cepas que tiene: su identificación taxonómica, su distribución geográfica, las características del aislamiento, el medio de cultivo, las condiciones de crecimiento, el banco de genes, el mapa del lugar de colecta y fotos de los organismos. Ofrecen además cursos de cultivo de fitoplancton y facilidades para científicos visitantes.

Las cepas del CCMP llevan muchos años en cultivo y la mayoría son de fitoplancton marino, aunque también tienen algunas macrofitas y microalgas de

agua dulce. Sus cultivos se realizan a 5 temperaturas: -2°, 4°, 14°, 20° y 25° C. Cada cepa es conservada en tres cámaras de cultivo separadas y se mantienen por cuadruplicado. En la página electrónica del Centro, también se puede acceder a las formulaciones de los medios de cultivo que actualmente se utilizan para los dinoflagelados y alguna información relevante sobre la historia de los primeros cultivos de estos organismos (<http://ccmp.bigelow.org>).

8. COV (Centro Oceanográfico Vigo, España). En este Centro existe una colección de cultivos de fitoplancton que incluye la mayor parte de las microalgas relacionadas con florecimientos tóxicos o nocivos de la costa de la península Ibérica. En su página electrónica, se muestran los resultados de estudios realizados con los dinoflagelados que tienen en cultivo, pero no aparece el listado de especies con las que cuenta la colección, ya que es una colección exclusiva para sus propias investigaciones <http://www.vi.ieo.es/general/principal.aspx?web=covigo.aspx>.

9. CODIMAR (Colección de Dinoflagelados Marinos). En México, contamos desde el 2004 con la CODIMAR a cargo de las doctoras Lourdes Morquecho y Cristina J. Band-Schmidt. Esta Colección de dinoflagelados marinos pertenece al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), en la Paz, B.C.S. México.

El establecimiento de la CODIMAR, fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del financiamiento del proyecto: Hacia el Establecimiento del Primer Banco de Información Taxonómica y Biológica de

Dinoflagelados de México. Cuyo objetivo principal fue el establecimiento de la primera colección de dinoflagelados marinos vivos en México. A partir de octubre del 2000 iniciaron los trabajos tendientes a establecer la colección de dinoflagelados marinos (CODIMAR). La función principal de la colección como la de todos los demás ceparios, es la de proveer cultivos de dinoflagelados a la comunidad científica y académica nacional e internacional, para que sean utilizados en investigación y enseñanza.

La CODIMAR está constituida principalmente de dinoflagelados marinos aislados de Bahía Concepción, Bahía de la Paz y Bahía de Mazatlán en el Golfo de California. La obtención de las cepas, se lleva a cabo mediante dos estrategias metodológicas; la inducción a la germinación de quistes de acuerdo al método biológico y de limpieza y concentración de quistes y el aislamiento con micropipeta de formas móviles a partir de muestras de fitoplancton colectadas con red. Las cepas son mantenidas en medio líquido y se utilizan los medios de cultivo modificados F/2 (Guillard y Ryther 1962) y GSe (Blackburn *et al.*, 1989), las condiciones del cuarto de cultivo se mantienen a una temperatura de $20 \pm 3^\circ \text{C}$, con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas de intensidad lumínica promedio. La resiembra de las cepas se realiza quincenalmente.

Hasta ahora la CODIMAR cuenta con 120 cepas de dinoflagelados pertenecientes a las ordenes Gymnodiniales, Gonyaulacales, Prorocentrales y Peridinales. La CODIMAR representa la primera colección en su tipo en México y es de referencia a nivel internacional para el estudio de los dinoflagelados nocivos (www.cibnor.mx/colecciones/codimar/ecodimar.php).

Los avances en el conocimiento de la Ficología en el mundo y particularmente en México han aumentado considerablemente, sin embargo, el conocimiento de los ciclos de vida y los metabolitos de interés que producen muchos dinoflagelados, aún es incompleto. Para ello, una forma de poder obtener este conocimiento es aislar del medio natural a los dinoflagelados y cultivarlos.

Esta tesis es el resultado de la investigación realizada en el “Subproyecto de Cultivos” parte del proyecto “Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacífico Mexicano” financiado por el CONACYT (G37560-V) y fue realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los cultivos de especies selectas de dinoflagelados son la base de este proyecto, ya que se utilizarán para realizar estudios de morfometría, biología molecular, toxinas, pigmentos y así resolver la problemática taxonómica de las especies selectas.

3. JUSTIFICACIÓN

Como parte integral del “Subproyecto de Cultivos”, el establecimiento de cultivos de dinoflagelados brindará la materia prima para los subproyectos de Filogenia Molecular, Pigmentos y Toxinas.

A pesar de existir un cepario de dinoflagelados en el país (CIBNOR), esta investigación tiene gran importancia ya que las cepas obtenidas provienen de organismos aislados de dos zonas de muestreo diferentes (Acapulco, Gro. y Lázaro Cárdenas, Mich.), por lo que las especies a cultivar también son diferentes, además de que no sólo se aislaron especies nocivas como en el cepario del CIBNOR, sino también las presentes en la zona y/o que representan una problemática taxonómica.

OBJETIVO GENERAL

Establecimiento de cultivos de dinoflagelados del Pacífico Mexicano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer una metodología para el aislamiento y cultivo de dinoflagelados planctónicos.

Realizar la identificación taxonómica a nivel especie o variedad, de los organismos en cultivo.

Medir las tasas de crecimiento de los organismos en cultivo y en base a la identificación de la fase exponencial establecer cultivos semicontinuos.

Cosechar los cultivos en la fase exponencial para que sean utilizados en los proyectos de Biología Molecular, Pigmentos y Toxinas o en algún proyecto del laboratorio de Ficología Aplicada.

6. HIPÓTESIS

Si la metodología establecida es la adecuada (elaboración de los medios de cultivo, colecta, técnica de aislamiento, mantenimiento de la cepa) entonces se podrán establecer los cultivos de dinoflagelados de dos regiones del Pacífico Mexicano.

7. ÁREA DE ESTUDIO

Las colectas se realizaron en dos localidades del Pacífico Mexicano cercanas a la Ciudad de México, la Bahía de Acapulco, Gro. y el Puerto de Lázaro Cárdenas en Mich. A N 17°55'02.5" y W 102°09'36.3". (Fig 2).



Figura 2. Ubicación geográfica de los dos puntos de colecta en el Pacífico Mexicano, Acapulco, Gro. y Lázaro Cárdenas, Mich.

La Bahía de Acapulco se localiza en la plataforma del Estado de Guerrero, con una longitud aproximada de 70 km y con una anchura promedio de 10 km, está cortada por cañones submarinos y tiene un borde localizado a profundidades entre 100 y 220 metros. Es una zona de actividad volcánica, producida por la subducción de la Placa de Cocos bajo la Placa Americana, que penetra en una dirección N-NE con una velocidad de 8 cm /año (Larson y Chase, 1970).

Se ubica entre los 99° 50' y los 99° 56' N y 16° 47' y 16° 53' W, siendo una bahía pequeña y semicircular. La bahía era un valle originalmente, pero las glaciaciones del Eoceno causaron un descenso del nivel del mar de 180 metros, con respecto al nivel del mar actual (Tamayo, 1970).

Hacia el este, a la altura de la desembocadura del río Papagayo, en el estado de Guerrero, existen sedimentos arenosos cerca de la costa los cuales no permiten la deposición de quistes de dinoflagelados. Hacia la región comprendida entre la desembocadura del río Papagayo y Punta Maldonado, la franja de arena presenta sinuosidades con una orientación E-W, quizás como resultado de la refracción del oleaje del litoral. Carranza-Edwards *et al.*, (1986), mencionan que tales sinuosidades pueden deberse también a corrientes de fondo y superficiales que corren paralelamente a la línea de costa en una dirección SE-NW. Para Swift (1978), las corrientes ocasionadas por mareas, por condiciones meteorológicas, por densidad, de fondo y superficiales que actúan en la plataforma del estado de Guerrero no han sido estudiadas plenamente, sin embargo, ha señalado que las corrientes de fondo y superficiales generadas por las corrientes oceánicas y por corrientes fluviales que penetran en la plataforma, parecen ser los factores más importantes en la distribución de arenas finas y lodos hacia mar abierto, al ser transportados fácilmente en suspensión y por ello son depositados ampliamente sobre la plataforma, Emery (1967) y Kulm *et al.* (1975) mencionan que principalmente en época de lluvias, los ríos aportan la mayor cantidad de sedimentos gruesos y que las lagunas actúan como trampas de sedimentos

gruesos, mientras que los sedimentos finos que van en suspensión continúan hacia el mar.

En el estado de Guerrero, el clima es tropical lluvioso con lluvias en verano (Aw) con temperaturas mayores de 18 °C todo el año y precipitaciones que van de 750 a 1300 mm anuales. En los meses de mayo a noviembre, la región es afectada por depresiones tropicales, que más tarde se vuelven tormentas tropicales y en ocasiones forman huracanes o ciclones tropicales (Tamayo, 1970).

Por su parte, el estado de Michoacán se localiza en la región Centro-Occidente entre los paralelos 20° 23' 44' y 18° 09' 49" de latitud norte y los meridianos 100° 04' 48", 103° 44' 20" de longitud oeste. Su posición corresponde fisiográficamente tanto a la depresión del Río Lerma, como a la porción central del Sistema Volcánico Transversal, la depresión del Río Balsas y la Sierra Madre del Sur y Planicies Costeras del Pacífico, abarcando una superficie de 59,864 km, equivalente al 3% de la extensión del país. Por situarse el Estado al sur del trópico de Cáncer, le corresponde la zona tropical (Correa, 1974 y 1978).

El tectonismo del Estado de Michoacán, está también vinculado al choque de la placa oceánica de Cocos con la placa continental Norteamericana y representa la causa más importante de los sismos y del vulcanismo (Correa, 1974 y 1978).

Las corrientes de los ríos se pueden agrupar en exorréicas, que drenan el Estado hacia el Pacífico y en endorréicas, cuyo drenaje es hacia vertientes interiores y que descargan en vasos lacustres. Los principales ríos exorréicos son el Lerma y

el Balsas. El Río Balsas corresponde a una cuenca limitada por el SVT y la SMS cubriendo una área de unos 32,600 km², sus principales afluentes son el Río Cutzamala con 7,120 km², el Río Tacámbaro con 5,300 km² y el Río Tepalcatepec con 15,000 km². El Río Balsas tiene una superficie de 32,758 km² y sus afluentes una superficie de 54.94 km² (Correa, 1974; 1978).

En el estado de Michoacán, el clima es tropical de veranos más cálidos y lluviosos, con temperatura máxima de 40°C registrada antes del solsticio de verano y se extiende al 50% de la extensión estatal entre los 600 y 1600 m de altitud, correspondiendo tanto a las partes bajas del Sistema Volcánico como a las medias y bajas de la Sierra Madre del Sur y a las partes altas de la depresión del Río Balsas. El clima seco estepario, cálido, con lluvia escasa que predomina en verano y la temperatura media anual superior a los 18°C que ocupa el porcentaje restante de la extensión michoacana en las partes medias y bajas de la depresión del Río Balsas (Correa, 1974 y 1978).

8. METODOLOGÍA

8.1 Medios de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó agua de mar de la Bahía de Acapulco, Guerrero y del Puerto de Lázaro Cárdenas, Michoacán, ésta se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm de abertura de poro y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 lb/in² de presión durante 15 min., inmediatamente después de salir de la autoclave, el agua se enfrió con agua corriente fría para evitar el cambio de pH.

Se prepararon los siguientes medios de cultivo, según las formulaciones establecidas: L1 (Guillard y Hargraves, 1993), F/2 (Guillard y Ryther, 1962 y Guillard, 1975), Provasoli (P), (Andersen *et al.*, 1997) y L1SE, que es el medio L1 adicionado con extracto de suelo que proponemos y que se ha elaborado como variante de algunos medios enriquecidos con extracto de suelo (Provasoli *et al.*, 1957; Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975).

Tabla 1. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo L1 (Guillard y Hargraves, 1993).

A 950 ml de agua de mar filtrada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Se lleva el volumen final a 1 L con agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave.

Cantidad	Compuesto	Solución stock
1 mL	NaNO ₃	75 g/L de agua destilada
1 mL	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g/L de agua destilada
1 mL	L1 Solución de Metales Traza	Ver como se prepara abajo
0.5 mL	f/2 solución de vitaminas	Ver como se prepara en la Tabla 2

Para preparar la solución stock de metales traza del Medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993). A 950 mL de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto y se lleva el volumen final a un litro con agua de mar filtrada.

Cantidad	Compuesto	Solución stock
3.15 g	FeCl ₃ · 6H ₂ O	—
4.36 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	—
0.25 mL	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.45 g/L de agua destilada
3 mL	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	19.9 g/L de agua destilada
1 mL	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 g/L de agua destilada
1 mL	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 g/L de agua destilada
1 mL	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	180 g/L de agua destilada
1 mL	H ₂ SeO ₃	1.3 mg/L de agua destilada
1 mL	NiSO ₄ · 6H ₂ O	2.7 g/L de agua destilada
1 mL	Na ₃ VO ₄	1.84 g/L de agua destilada
1 mL	K ₂ CrO ₄	1.94 g/L de agua destilada

Tabla 2. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975).

A 950 ml de agua de mar filtrada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto. Se lleva el volumen final a 1 L con agua de mar filtrada y esterilizada en autoclave.

Cantidad	Compuesto	Solución stock
1 mL	NaNO ₃	75 g/L de agua destilada
1 mL	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g/L de agua destilada
1 mL	f/2 Solución de metales traza	Ver formulación abajo
0.5 mL	f/2 solución de vitaminas	Ver formulación abajo

Para preparar la solución stock de metales traza del medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975). A 950 mL de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto y se lleva el volumen final a un litro con agua destilada y meter en la autoclave.

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
3.15 g	FeCl ₃ · 6H ₂ O	—
4.36 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	—
1 mL	CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8 g/L de agua destilada
1 mL	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.3 g/L de agua destilada
1 mL	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22.0 g/L de agua destilada
1 mL	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10.0 g/L de agua destilada
1 mL	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180.0 g/L de agua destilada

Para preparar la solución stock de vitaminas del medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975). A 950 mL de agua destilada se le adiciona la cantidad indicada de cada compuesto y se lleva el volumen final a un litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se guarda en viales de plástico estériles en el congelador.

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
1.0 mL	Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	1.0 g/L de agua destilada
10.0 mL	Biotina	0.1 g/L de agua destilada
200.0 mg	Tiamina · HCl	—

Tabla 3. Formulación para la preparación del Medio de Cultivo P (CCMP; Andersen *et al.*,1997)

Cantidad	Compuesto
2 partes	H ₂ O
1 parte	Suelo orgánico de jardín, “comercial”, que no tenga pesticidas ni fertilizantes.
2-3 g/L	NaOH

Se prepara el extracto de suelo alcalino añadiendo las cantidades indicadas de cada compuesto. Se esteriliza en autoclave a 20 lb. por 20 min., una vez frío se filtra con filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm. Este concentrado se diluye 50:1 con agua destilada para elaborar el stock final de extracto de suelo. Este stock se vuelve a esterilizar en autoclave bajo las mismas condiciones

Para preparar el Medio P, a 1 litro de medio F/2 le adicionamos 15 ml del stock final de extracto de suelo alcalino.

En el presente trabajo se propone un nuevo medio de cultivo L1SE, este medio se prepara con el extracto de suelo que se prepara como se indica en la Tabla 3. Se añaden 10 ml de extracto de suelo alcalino a un litro de medio L1.

El medio L1SE (L1 con extracto de suelo) se basa en el medio L1 con la ventaja de tener óxido de selenio y estar enriquecido con extracto de suelo. Esta es una variante de algunos medios de cultivo enriquecidos con extracto de suelo como son: Provasoli, Agar estrella azul, Provasoli 50, Provasoli 1000, L1+NH₄ y L1+rice.

8.2 Colecta y aislamiento

Se realizaron cuatro muestreos en la Bahía de Acapulco, Gro. y uno en el Puerto Lázaro Cárdenas, Mich. (Tabla 4), utilizando una botella Van Dorn de tipo horizontal (Fig. 3a) y se colectó a dos profundidades: superficie y cinco metros, tomando una muestra de referencia que fue fijada con lugol y/o formalina hasta alcanzar una concentración final del 4%. En el Puerto de Acapulco, se muestreó a cinco millas de la costa, en mar abierto. En Lázaro Cárdenas, se salió del embarcadero del río Balsas y se midieron cinco millas con un GPS a partir de la desembocadura del río hacia mar abierto y a esta distancia se realizó el muestreo.

La temperatura del agua se midió con un termómetro de inmersión inmediatamente después de que se colectaban las muestras, la salinidad se midió de la misma manera con un refractómetro manual.

Tabla 4. Datos relevantes de las recolectas del material algal

Número de colecta	Localidad	Fecha (2004)	Profundidad	Temperatura en cada profundidad	Salinidad en cada profundidad
1	Acapulco, Gro.	25 marzo	Superficie 5 metros	28°C 28°C	34 ups 34 ups
2	Acapulco, Gro.	29 abril	Superficie 5 metros	26°C 26°C	36 ups 36 ups
3	Acapulco, Gro.	5 junio	Superficie 5 metros	29°C 29°C	35ups 35ups
4	Acapulco, Gro.	27 nov	Superficie	29°C	35ups
1	Lázaro Cárdenas, Mich.	5 nov	Superficie 5 metros	30°C 30°C	28 ups 28 ups

La muestra de agua se colocó en botellas de Poliestireno (PET) de cinco litros de volumen total, hasta que quedaran rebosantes (Fig. 3b), esto con el fin de aminorar el maltrato de los organismos durante el traslado hasta la ciudad de México. Al llegar al Laboratorio de Ficología Aplicada, las muestras se colocaron en la cámara de cultivo y ahí se dejaron 24 horas para que los organismos se aclimataran. Posterior a esto se procedió a concentrar la muestra, utilizando un aparato de filtración inversa (Fig. 3 c-d-e). De este concentrado, se fueron aislando los dinoflagelados que encontrábamos vivos en la muestra con ayuda de pipetas Pasteur de punta adelgazada.



Figura 3 a-j. Metodología para el cultivo de dinoflagelados. a-b. Toma de muestra con botella Van Dorn y envasado para transporte; c-d-e. Concentración de la muestra en aparato de filtración inversa; f. aislamiento con micropipetas en caja de microtitulación para cultivo de tejidos de 96 pozos; g. escalamiento del cultivo en caja de 4 pozos; h. Establecimiento de las cepas en matraces; i-j. Cámaras de cultivo.

Cada dinoflagelado encontrado fue lavado varias veces en gotas de medio de cultivo y entre cada lavado se limpiaba la pipeta añadiendo agua destilada y soplando a presión a través de la manguera.

Una vez lavados, los organismos se colocaron de manera individual en un pozo de las placas de polipropileno estériles para microtitulación (Fig. 3f) que tienen 96 pozos, los cuales fueron llenados previamente con medio de cultivo (F/2, L1, P y L1SE). Las cajas de microtitulación se mantuvieron en la cámara de cultivo (Fig. 3 i,j) durante 8 a 10 días a una temperatura de 19 °C, con ciclo de luz:oscuridad de 12:12, sin aireación, ni agitación y con sello hermético de la caja para evitar evaporación.

Las células vivas que se observaban en los pozos, creciendo en número de organismos, se pasaron a cajas estériles de microtitulación, de polipropileno, para cultivo de tejidos, de 24 o de cuatro pozos (Fig. 3g), indistintamente, al pasarlas se anotaba el número de organismos trasladados, logrando así un registro del crecimiento inicial de cada cepa. Los pozos se llenaron previamente con el mismo medio de cultivo en el que estaba creciendo la especie.

A medida que aumentaba el número de células, se iba escalando el cultivo hasta llegar a resembrarlo en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 50 ml de medio de cultivo (Fig. 3h). En ese momento se consideró que se había logrado establecer el cultivo y se le asignó una clave de identificación a la cepa, utilizando la siguiente nomenclatura: dos números y una letra, el primer número es el número de la cepa,

el segundo corresponde al número de salida de campo y la letra corresponde a la inicial del lugar de procedencia, así la cepa 34A, corresponde a la tercera cepa, de la cuarta salida y su lugar de origen es el puerto de Acapulco.

8.3 Mantenimiento de las Cepas (resiembra)

Los cultivos fueron mantenidos a diferentes densidades celulares en matraces Erlenmeyer, con el fin de ver si esto afectaba su crecimiento como ha sido señalado por varios autores (Becker, 1994; Arredondo y Band, 2000; Berges, *et al.*, 2001).

Cuando los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, se procedió a resembrar la cepa, para lo cual se usó la campana de flujo laminar, tomando un mililitro de la cepa con una pipeta Pasteur esterilizada que servía para inocular otro matraz conteniendo medio de cultivo estéril, se etiquetaba y se colocaba nuevamente en la cámara de cultivo. En la etiqueta que se colocaba en el matraz se escribía la clave de la cepa, el tipo de medio de cultivo y la fecha de inoculación.

8.4 Medición de las tasas de crecimiento

Una vez estables las cepas, al momento de la resiembra se tomaba un mililitro del cultivo viejo y se inoculaba en un matraz con medio de cultivo nuevo, se fijaba y se contaba en cámara de Sedgewick-Rafter a su vez un mililitro de este cultivo viejo,

para determinar el número de células en el inóculo. Cada dos días el contenido de los matraces inoculados se homogenizaba con movimientos manuales suaves, después se tomaba un mililitro de ellos y se fijaba con lugol para los conteos celulares, utilizando además de la cámara, un contador manual KW-trío en un microscopio invertido Karl Zeiss, como lo recomiendan Arredondo y Band (2000) y Morales y De Velotti (1990). Se realizaron 4 repeticiones por cada cepa

Tomando en cuenta las densidades celulares que alcanzan a lo largo del tiempo los cultivos, determinamos la velocidad o tasa de crecimiento μ , según la siguiente ecuación diferencial:

$$DX / Dt = \mu X$$

X= número de células por mililitro

μ = velocidad o tasa de crecimiento

t = tiempo (en días o semanas)

rearrreglando la ecuación tenemos:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

X_2 y X_1 = densidad celular a los tiempos 2 y 1.

Si la μ , se aproxima o es igual a uno, el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial (Guillard, 1973; Paniagua *et al.*, 1988; Arredondo y Band 2000).

Además se elaboraron las curvas de crecimiento de las cepas y los resultados se sometieron a un análisis paramétrico de varianza (ANOVA) para una vía de clasificación con tamaños de muestra diferentes. Los cálculos se realizaron en el programa Statistica StatSoft, Inc. (1988). Lo anterior para saber si había diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de las cepas de la misma especie o género.

8.5 Preparación de Material para Microscopio Electrónico de Barrido

Para su correcta identificación las cepas fueron fotografiadas en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de barrido (MEB).

En el microscopio óptico se tomaron fotografías digitales de organismos vivos y/o fijados con lugol. Varias fotografías se tomaron con el microscopio Leica DMLB con cámara digital integrada y se midieron con el Módulo de medición IM1000 de Leica, versión 1.2.

Para las fotografías en el MEB todo el material fue procesado en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del edificio "W" de la Ciencia y Tecnología Ambiental. UAMI-CENICA. bajo la distinguida supervisión del Dr. José David Sepúlveda Sánchez.

Se seleccionó un fijador apropiado para cada caso, para organismos tecados, glutaraldehído como fijador primario y tetraóxido de osmio como fijador secundario

y para los atecados o desnudos, tetraóxido de osmio como único fijador, esto se determinó mediante la experimentación (Boltovskoy, 1995).

Para eliminar impurezas de la muestra el material se lavó con agua destilada a través de varios pasos de centrifugación a 1500 rpm durante 15 min. (Boltovskoy, 1995).

El material preparado para su examen en el MEB debería estar completamente seco, tanto para permitir el proceso de metalización que consiste en cubrir los especímenes con una película de oro de 10 a 40 nm para que no se colapsen al ser sometidos al vacío. El secado de organismos tecados se realizó a temperatura ambiente, sobre un cubreobjetos redondo, pegándolo a la tachuela de aluminio del MEB con pintura de plata.

En los dinoflagelados desnudos, se efectuó la deshidratación del material sustituyendo el agua destilada en la que se encuentran los organismos por etanol (Boltovskoy, 1995), en forma gradual mediante baños sucesivos de 15 min. cada uno en alcohol al 30, 50 60, 70, 80, 90 % y 100%; repitiéndose el ultimo paso dos veces para asegurar la eliminación total del agua (Boltovskoy, 1995).

Posteriormente, las muestras así procesadas se introdujeron en el aparato de punto crítico (Anderson, 1956). Este es un sistema hermético de líquido-gas a una temperatura asociada con la presión en la cual el líquido, debido a su expansión y el gas debido a la compresión, adquieren la misma gravedad específica y en

consecuencia se mezclan. Al mezclarse, la transición de líquido a gas tiene lugar sin una interfase, porque las densidades de ambos se mantienen iguales, consecuentemente también desaparecen las fuerzas de tensión superficial (Boltovskoy, 1995).

Una vez secos en punto crítico, los dinoflagelados desnudos se introdujeron en la cámara del MEB sobre una tachuela de aluminio de cerca de un cm de diámetro y sobre la base plana de la tachuela se colocó el material directamente o previo montaje sobre otro soporte. En el caso de los organismos tecados, estos se montaron previamente en un cubreobjetos redondo, el cual se pegó a la tachuela con pintura de plata, en los organismos desnudos fue sobre adhesivos de grafito (Boltovskoy, 1995).

Posteriormente los especímenes fueron cubiertos con una película de oro de 10 a 40 nm, con el fin de brindar conductividad eléctrica a la superficie de las muestras para permitir una descarga a tierra a través de la muestra. La cobertura de la muestra se realizó mediante rociado iónico, lo que se llevó a cabo en un recipiente hermético, que permite la creación de vacío en su interior (Echlin, 1978 y Boltovskoy, 1995).

Una vez listas, las muestras se observaron al microscopio electrónico de barrido, obteniéndose fotografías electrónicas de los mejores especímenes.

9. RESULTADOS

9.1 CEPAS OBTENIDAS

A lo largo de la tesis se lograron establecer 21 cepas de dinoflagelados (Tabla 5). Estos cultivos clonales son no axénicos, “semicontinuos” y se mantienen con ciclo de luz oscuridad de 12:12, a dos temperaturas 18 y 20 °C \pm 1 °C y con irradiación de 90.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 166.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente. Las cepas se resiembran según la tasa de crecimiento de cada especie.

En el caso particular de la cepa 81L, para estimular el aumento del número de organismos, se llevaron a cabo experimentos a diferentes salinidades, aumentándola gradualmente desde 28 ups hasta 35 ups y cambiando el medio de cultivo L1 sin silicatos por L1 + VA vitaminas (Davis y Guillard, 1958) + ES extracto de suelo alcalino (Provasoli *et al.*, 1957), similar al utilizado en el Provasolli-Guillard National Center para *C. horrida*. Sin embargo, no se logró estimular el crecimiento con estas condiciones, por lo que las células se mantuvieron por 12 meses en medio de cultivo L1 a 28 ups, que era la condición en que la tasa de reemplazo de la especie permanecía más estable.

Con relación a los dos medios de cultivo utilizados, se observó muerte celular en los ambos a 35 ups e inhibición del crecimiento también en ambos a 32 ups. En

los dos medios de cultivo, las células que se tomaron en fase de división murieron, por lo que no es conveniente aislar las células en condiciones de reproducción, esto ya se había observado en otros dinoflagelados del género *Ceratium*, durante el desarrollo de esta tesis. Las células que no estaban en división se mantuvieron vivas en ambos medios a 28 y 30 ups, pero sólo se reprodujeron en el medio L1 a 28 ups de salinidad.

Tabla 5. Listado de cepas establecidas, lugar y fecha de procedencia, medio de cultivo y clave de cada una.

Clave	Especie	Lugar de Procedencia	Fecha de colecta (2004)	Medio
11A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	1 abril	L1
12A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	4 mayo	L1
22A	<i>Gymnodinium</i> sp. Stein	Acapulco	4 mayo	L1
32A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	4 mayo	L1
13A	<i>Prorocentrum gracile</i> Schütt	Acapulco	7 junio	L1
23A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	9 junio	L1
33A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	8 junio	L1
43A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	7 junio	L1
11L	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
21L	<i>Gyrodinium uncatenum</i> Hulburt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
31L	<i>Prorocentrum rhathymum</i> Loeblich, Sherley et Schmidt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
41L	<i>Gyrodinium uncatenum</i> Hulburt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
51L	<i>Prorocentrum gracile</i> Schütt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
61L	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
71L	<i>Gyrodinium uncatenum</i> Hulburt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
81L	<i>Ceratocorys armata</i> (Schütt) Kofoid	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
91L	<i>Prorocentrum rhathymum</i> Loeblich, Sherley et Schmidt	Lázaro Cárdenas	8 nov	L128 ups
14A	<i>Ceratium fusus</i> (Ehrenberg) Dujardin	Acapulco	29 nov	L1
24A	<i>Prorocentrum rhathymum</i> Loeblich, Sherley et Schmidt	Acapulco	29 nov	L1
34A	<i>Ceratium falcatum</i> (Kofoid) Jörgensen	Acapulco	29 nov	L1
44A	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg	Acapulco	29 nov	L1

9.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES EN CULTIVO

ORDEN PROROCENTRALES Lemmerman

Familia PROROCENTRACEAE Stein

Género *Prorocentrum* Ehrenberg

***Prorocentrum micans* Ehrenberg (Lámina 1, Fig. a-f).**

Schiller (1933, pag. 35, fig.37); Dodge (1975, Fig. 3A, E plate 2A-C, E, F); Dodge (1982, pag. 32, Fig. 2k, lam. I c, d); Balech (1988, pag. 32, lam. 4, Fig. 1); Licea *et al.* (1995, pag. 81-82, lam. 9, Fig. 16); Steidinger y Tangen (1997, plate 8 pag. 421, 424) y Hernández-Becerril *et al.* (2000, pag. 116, Fig. 21).

Sinónimos:

Cercaria sp. Michaelis

P. schilleri Bôhm in Schiller

P. levantinoides Bursa

P. pacificum Wood

Es un dinoflagelado tecado, de talla pequeña que varía de forma acorazonada a esferoide en vista valvar. Las células en vista lateral se ven convexas y delgadas. Es dinoflagelado tipo desmoconte por lo que sus dos flagelos desiguales emergen del poro flagelar. Tienen espinas anteriores llamadas dientes y poros con un patrón característico. Las células viejas tienen zonas muy alteradas y los

márgenes en que se unen las dos valvas son más gruesos y anchos, tal vez debido a la adición de polisacáridos. Es una especie planctónica.

Medidas:

Largo total = 42 - 44 μm

Ancho máximo= 24 - 26 μm

Largo espina= 5.3 - 7 μm

Largo de célula= 36.5 - 38.4 μm

De esta especie tenemos las cepas 11A, 12A, 32A, 23A, 33A, 43A, 11L, 61L, 44A.

***Prorocentrum gracile* Schütt (Lámina 2 Fig. a-f).**

Schütt (1895 plate 1 Fig. 3); Schiller (1933 p. 37, Fig. 39 a-b); Dodge (1975, pág. 144, Fig. 3b,c); Balech (1988, p. 32, lam 4 Fig. 2); Hernández Becerril (1988, p 159, Fig. 1-2); Licea *et al.* (1995, pág. 80-81, lam. 9, Fig. 4); Steidinger y Tangen (1997, plate 8 pag. 421, 423-424) y Hernández-Becerril *et. al.* (2000, pag. 113, Fig. 11,14).

Sinónimos:

P. macrurus Athanassopoulos

P. hentschellii Schiller

P. sigmoides Böhm

P. diamantinae Wood

Es una especie tecada, tipo desmoconte, de talla pequeña a mediana, tiene forma de hoja o gota, es más alargada que las células de *P. micans*. Los poros de

tricocistos son similares a los de *P. micans*, pero el diente anterior es más largo. Son organismos planctónicos de nado rápido, pero se quedan inmóviles ante la luz directa y la manipulación.

Medidas:

Largo total = 41 - 67 μm

Ancho máximo = 15 - 24.8 μm

Largo espina = 7 - 12 μm

Largo célula = 33.8 - 58 μm

De esta especie se lograron las cepas 13A y 51L.

***Prorocentrum rhathymum* Loeblich, Sherley et Schmidt (Lámina 3 Fig. a-f)**

Loeblich, *et al.* (1979); Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003). Además se revisaron las descripciones de *Prorocentrum mexicanum* para contrastar con *P. rhathymum* realizadas por: Osorio-Tafall (1942); Nakajima *et al.* (1981); Carlson y Tindal (1985); Faust (1990); Garate-Lizárraga y Martínez-López, (1997); Steidinger y Tangen, (1997 plate 8 pag. 421, 424); Hernández-Becerril *et al.* (2000); Garate-Lizárraga *et al.* (2001).

Sinónimos:

P. maximum Schiller

Son células ovals, pequeñas, con cloroplastos muy pigmentados, en la parte apical tienen un diente pequeño ubicado a un lado del área periflagelar, los poros

de tricocistos se encuentran distribuidos de manera radial. Como en *P. micans*, la superficie de las células puede cambiar con el tiempo y en las células viejas se observan zonas muy alteradas y los márgenes en que se unen las dos valvas son más gruesos y anchos. Es una especie de nado activo, aunque en el cultivo predominan células en el fondo del matraz libres o bien adheridas a un mucílago. Las células tienen forma de letra D u ovalada. Se suele confundir con *P. mexicanum* pero son claramente diferentes (Fig. 4 a-c).

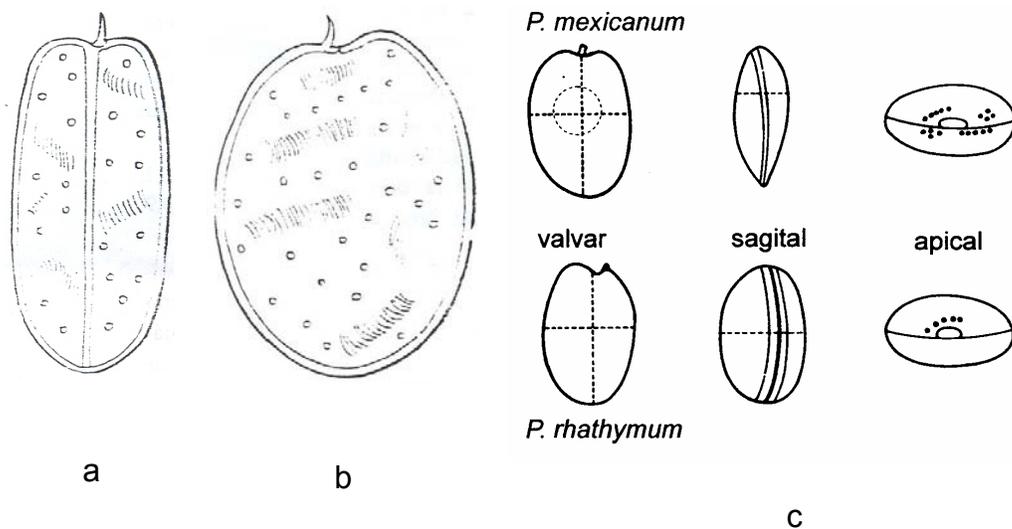


Figura 4. a vista sagital, b. vista valvar, tomadas de Osorio-Tafall (1942). c. Diferenciación de las células de *Prorocentrum mexicanum* y *P. rhathymum* Estas especies se tomaban como sinónimos tomadas de Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán (2003).

Medidas:

Largo total =	33 - 37	µm
Ancho máximo =	25 - 26.5	µm
Largo espina =	2.7 - 3	µm
Largo célula =	30 - 34	µm

De esta especie tenemos las cepas 31L, 91L y 24A

ORDEN GONYAULACALES F.J.R. Taylor

Familia CERATOCORYACEAE Lindemann

Género *Ceratocorys* Stein

***Ceratocorys armata* (Schutt) Kofoid (Lámina 4 Fig. a-d).**

Kofoid (1910); Schiller (1933, Fig. 486 a-e); Taylor (1976, pag. 90, lam. 26, Fig. 269 a-b); Balech (1988, pag. 158, lam. 79, Fig. 5-7); Fensome *et al.* (1993); Licea *et al.* (1995, pág. 50, lam. 6, Fig. 2, lam. 20. Fig. 6); Steidinger y Tangen (1997, pag. 483. plate 30).

Basiónimo:

Goniodoma acuminatum var. *armatum* Schütt

Sinónimo:

Goniodoma fimbriatum Murray *et* Whitting

Ceratocorys spinifera Murray *et* Whitting.

La especie es tecada y grande, con movimientos de nado lentos y escasos. Presenta cuatro espinas cortas en la región antapical, la hipoteca es mayor que la epiteca. La epiteca es plana y comprende una quinta parte del cuerpo de la célula. La célula tiene forma cuadrada angulosa. Cuando se reproduce asexualmente sufre ecdisis, es decir la epiteca se abre y sale el contenido protoplásmico dejando la teca vacía, posterior a esto el contenido protoplásmico se divide dando origen a

una o dos nuevas células. La tasa reproductiva es de reemplazo. Esta especie se diferencia de *Ceratocorys gourretii* Paulsen porque esta última es más pequeña, con formas redondas y espinas en posición dorsal y ventral y de *C. horrida* Stein, en que esta última tiene en la hipoteca un número variable de espinas largas con rebordes y presenta además dos grandes apéndices: uno ventral y otro dorsal.

Medidas:

Largo máximo = 91 - 115 μm

Ancho máximo en vista lateral = 85 - 90 μm

La cepa 81L corresponde a esta especie.

ORDEN GONYAULACALES F.J.R. Taylor

Familia CERATIACEAE Willey *et* Hickson

Género *Ceratium* Schrank

***Ceratium fusus* (Ehrenberg) Dujardin (Lámina 5 Fig. a-e).**

Schiller (1933, pág. 378, Fig. 418a-b); Steemann-Nielsen (1934, pág. 14, Fig. 25); Wood (1954, pág. 282, Fig. 202); López (1966); Sournia (1967, pág. 407, Fig. 32); Wood (1968 pág. 29, Fig. 58); Taylor (1976, pág. 66, plate 13, Fig. 129); Dodge (1982, pág. 231, Fig. 29c); Hernández-Becerril (1989, pág 38, Fig. 15).

Sinónimos

Peridinium fusus Ehrenberg

Peridinium seta Ehrenberg

Ceratium fusus var. *inaequalis* Schröder

C. fusus var. *acus* von Dalay

Ceracia Michaelis

Amphiceratium fusus Vanhoffen

C. pellucidum Gourret

C. berghii Gourret

Los organismos corresponden a células largas y fusiformes que poseen tres cuernos, uno apical y dos antapicales. El cuerno apical es largo y recto. De los cuernos antapicales, el izquierdo es largo y ligeramente curvo y el derecho es corto y rudimentario. Superficialmente tiene costillas. Es similar a *C. extensum* Goürrret (Cléve) pero este último es mucho más largo ya que mide cerca de 1 mm. En comparación con *C. falcatum*, *C. fusus* es más delgado. Es planctónico y tiene un movimiento de nado característico con flexiones por el cingulum que lo hace parecer que se dobla. Presenta reproducción asexual y sexual, se observan gametos masculinos y formación de cigotos en cultivo.

Medidas:

Largo total = 340 - 410 μm

Epiteca = 170 - 220 μm

Hipoteca = 170 - 200 μm

Transdiámetro = 19 - 20 μm

La cepa 14A corresponde a esta especie.

***Ceratium falcatum* (Kofoid) Jörgensen. (Lámina 6 Fig. a-d)**

Jörgensen (1920); Schiller (1933, pág. 377, Fig. 417A); Steemann-Nielsen, (1934, pág 14, Fig. 22); Graham y Bronikovsky (1944, pág. 24, Fig. 11a-w); Wood (1954, pág 281, Fig. 200); López (1966, pág. 330, Fig. 14); Sournia (1967, pág. 414, Fig. 38); Wood (1968, pág 29, Fig. 56); Steidinger y Williams (1970, pág. 45); Taylor (1976, pág. 65-66, Plate 13, Fig. 133); Licea *et al.* (1995, pág. 36, lám. 2, Fig. 7; lám. 18, Fig. 6).

Sinónimos

Ceratium falcatiforme Jörgensen

Ceratium pennatum var. *falcatum* (Kofoid) Jörgensen

Ceratium pennatum f. *falcata* Kofoid,

Es un dinoflagelado tecado, planctónico. Posee tres cuernos, uno apical y dos antapicales. La epiteca es cilíndrica y se funde con el cuerno apical el cual es largo y recto o un poco inclinado y es más largo que el cuerno antapical izquierdo.

El cuerno antapical izquierdo tiene la punta inclinada a la izquierda, cerca de los dos tercios de su largo El cuerno antapical derecho es pequeño y muy rudimentario. El organismo tiene talla relativamente desigual, en la que el largo de la epiteca más el cuerno apical es mayor que el largo de la hipoteca más el cuerno antapical, la célula es robusta y en su nado se mantiene rígida siendo éste

menos rápido que el de *C. fusus*. Difiere de *Ceratium longirostrum* Gourret, en el cuerno antapical izquierdo que en este último, es más curvado y la epiteca está bien diferenciada del cuerno apical. Presenta reproducción asexual y sexual, se observan gametos masculinos y formación de cigotos en el cultivo.

Medidas:

Largo total	= 376 -414	µm
Epiteca	= 228 -242	µm
Hipoteca	= 168 -176	µm
Transdiámetro	= 19 - 20.5	µm

La cepa 34A corresponde a esta especie.

ORDEN GYMNODINIALES Lemmermann.

FAMILIA GYMNODINIACEAE (Bergh) Lankester

Género *Gymnodinium* Stein

***Gymnodinium* sp. (Lámina 7 Fig. a-h).**

Esta cepa se mantuvo durante seis meses en cultivo. Se fotografió, filmó y se fijaron ejemplares con glutaraldehído y lugol para su identificación, así como también se midió la tasa de crecimiento.

Esta cepa de dinoflagelados desnudos tipo dinoconte, presentaba células grandes, de esféricas a piriformes, solitaria no formaba cadenas ni en el medio natural ni en condiciones de cultivo, por lo que se descarta que sea *Gymnodinium catenatum*.

El *cingulum* era ecuatorial, con un ligero desplazamiento. Las especies del género se diferencian basándose en la forma y contorno, talla, formación de cadenas, presencia o ausencia de ranura apical, lo cual no se puede observar en las fotografías, ni en las células fijas ya que se deformaron, su coloración era rojiza.

Medidas:

Organismos Vivos:

Largo Total = 61-66.5 μm

Transdiámetro= 46-52 μm

Organismos fijados con glutaraldehído:

Largo total = 53-65 μm

Transdiámetro = 34-47 μm

Se tuvo en cultivo la cepa 21A.

ORDEN GYMNODINIALES Lemmermann.

FAMILIA GYMNODINIACEAE (Bergh) Lankester

Género *Gyrodinium* Kofoid et Swezy

***Gyrodinium uncatenum* Hulburt (Lámina 8 Fig. a-f).**

Coats *et al.* (1984); Anderson *et al.* (1985a); Cetta y Anderson (1990); Steidinger y Tangen (1997, Plate 19, pag. 453).

Dinoflagelado desnudo tipo dinoconte, que se diferencia de las especies de *Gymnodinium* por el agudo desplazamiento del cingulum que es aproximadamente de más de tres partes del ancho de éste. Es una célula muy variable morfológicamente presentando tamaños pequeño, mediano o grande dentro del cultivo, seguramente como parte de su ciclo de vida. La epiteca es redondeada y la hipoteca bilobulada. El sulcus que invade la hipoteca esta ligeramente curvado a la izquierda. No presenta ranura apical. Presenta cloroplastos y un núcleo esférico en la epiteca, La especie tiene fase planctónica y una fase bentónica, esta última conformada por un mucílago de coloración café-rojiza en el fondo del matraz en donde se encuentra pegada una gran concentración de células. Las células móviles se desplazan con nado rápido. Reproducción sexual y asexual.

Medidas:

Organismos Vivos:

Largo Total = 60-66.5 μm

Transdiámetro= 45-52 μm

Organismos fijados :

Largo total = 58-67 μm

Transdiámetro = 37-49 μm

Se logró conservar a esta especie en las cepas 21L, 41L Y 71L

9.3 Curvas de crecimiento de las cepas

PROROCENTRALES:

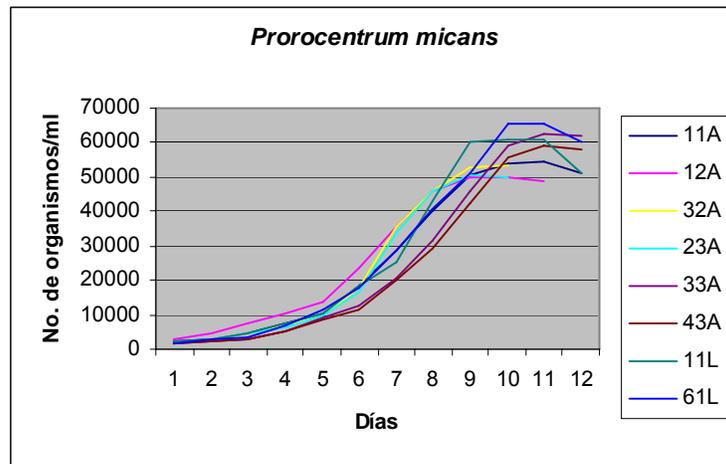


Figura 5. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden a la especie *P. micans*. El ANOVA no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el crecimiento promedio de esta especie. Inicia crecimiento exponencial a los 7 días de inoculación, con una $\mu = 1.01/\text{día}$ las cepas 11A, 12A, 23A y 43A; $\mu = 0.98/\text{día}$ la cepa 32A, $\mu = 0.99/\text{día}$ las cepas 33A, 11L y 61L siendo tiempo óptimo de resiembra para todas a los 10 días.

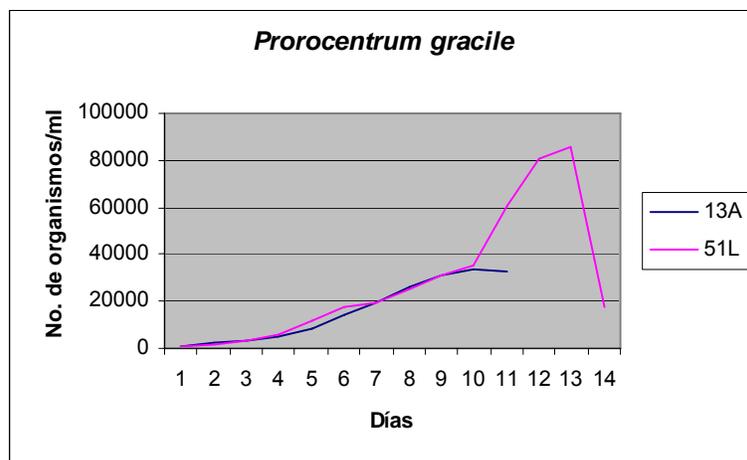


Figura 6. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden a la especie *P. gracile*. El ANOVA mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el crecimiento promedio de esta especie. La cepa 51L inicia crecimiento exponencial a los 7 días de inoculación con una $\mu = 0.89/\text{día}$, siendo tiempo óptimo de resiembra a los 10 días. La cepa 13A no alcanzó crecimiento exponencial.

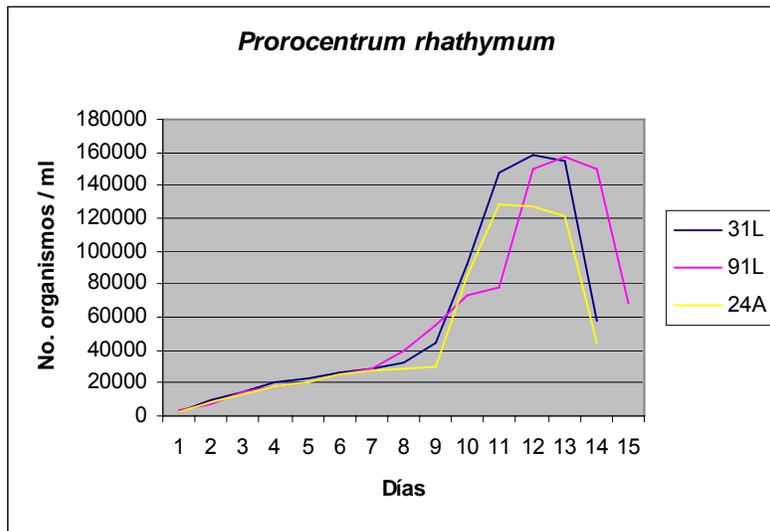


Figura 7. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden a la especie *P. rhathymum*. El ANOVA no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el crecimiento promedio de esta especie. Inician crecimiento exponencial a los 10 días de inoculación con una $\mu = 0.95/\text{día}$ la cepa 31L, $\mu = 0.99/\text{día}$ la cepa 91L y $\mu = 0.97/\text{día}$ la cepa 24A siendo tiempo óptimo de resiembra para todas a los 12 días.

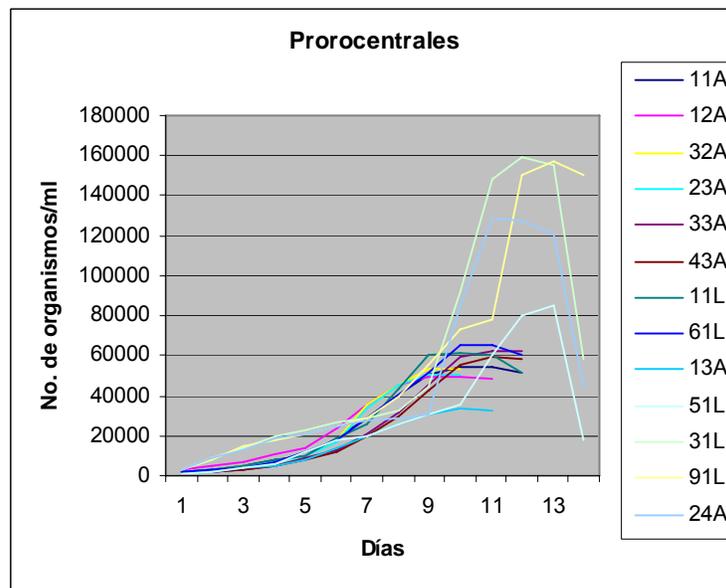


Figura 8. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden al género *Prorocentrum*. Las especies que obtienen mayor número de células corresponden a *P. rhathymum*.

GONYAULACALES

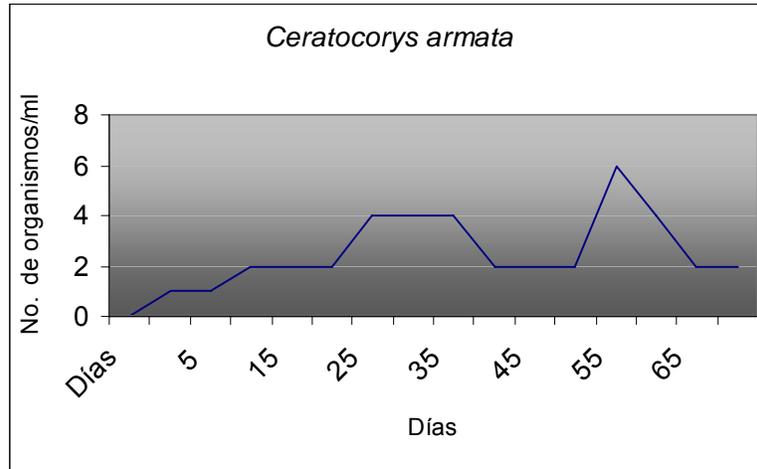


Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa 81L que corresponde a la especie *Ceratoecorys armata*. Tasa de crecimiento de reemplazo, alcanzó mayor número de células a los 55 días de cultivo que corresponde a sólo 6 células. No presentó fase de crecimiento exponencial.

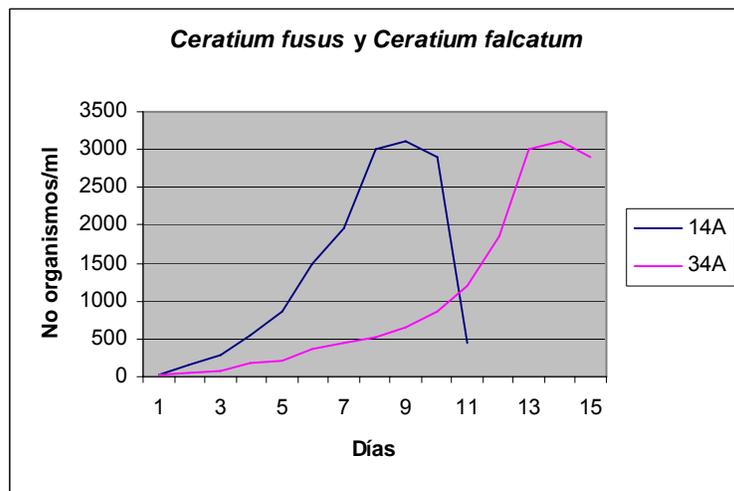


Figura 10. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden a las especies *Ceratiium fusus* y *Ceratiium falcatum*. El ANOVA mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el crecimiento promedio de estas especies. La cepa 14A (*C. fusus*) Alcanzó crecimiento exponencial a los 5 días de inoculación con una $\mu = 1.02/\text{día}$, siendo tiempo óptimo de resiembra a los 7 días. La cepa 34A (*C. falcatum*) alcanzó crecimiento exponencial a los 10 días de inoculación con una $\mu = 0.99/\text{día}$, siendo tiempo óptimo de resiembra a los 12 días.

GYMNODINIALES

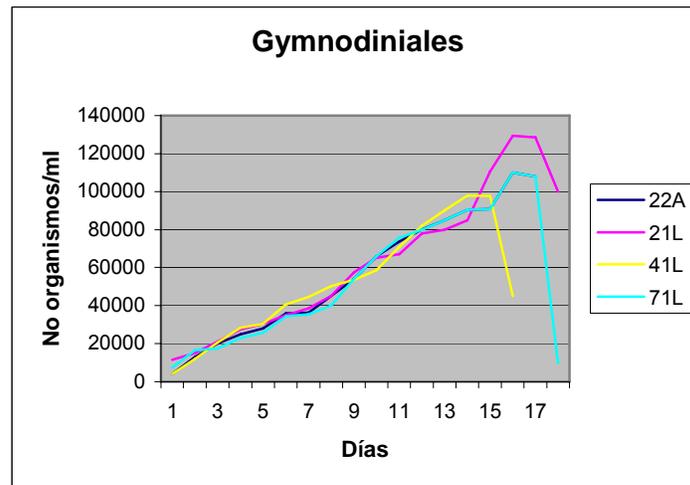


Figura 11. Curva de crecimiento de las cepas que corresponden a dinoflagelados desnudos. Se observó sincronización en los cultivos de las especies. El ANOVA no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el crecimiento promedio de estas cepas. Alcanzaron el crecimiento exponencial a los 7 días de inoculación, con una $\mu = 0.95/\text{día}$ la cepa 22A, $\mu = 1.02/\text{día}$ la cepa 21L, $\mu = 0.98/\text{día}$ la cepa 41L, $\mu = 0.97/\text{día}$ la cepa 71L siendo tiempo óptimo de resiembra a los 11 días.

9.4 Especies con crecimiento inicial (Lámina 9 Fig. a-i).

Durante el desarrollo de la tesis se obtuvo crecimiento de algunas especies aisladas, sin llegar al éxito del cultivo.

Alexandrium Halim

Ceratium balechii Meave, Okolodkov et Zamudio (Meave et al., 2003)

Ceratium breve (Ostenfeld et Schmidt) Schröder

Ceratium furca (Ehrenberg) Claparède et Lachmann

Ceratium fusus (Ehrenberg) Dujardin

Ceratium macroceros (Ehrenberg) Vanhöffen

Ceratium tripos (Müller) Nitzsch

Cochlodinium polykrykoides Margalef

Dinophysis caudata Saville-Kent

9.4.1 Curvas de crecimiento de especies con crecimiento inicial

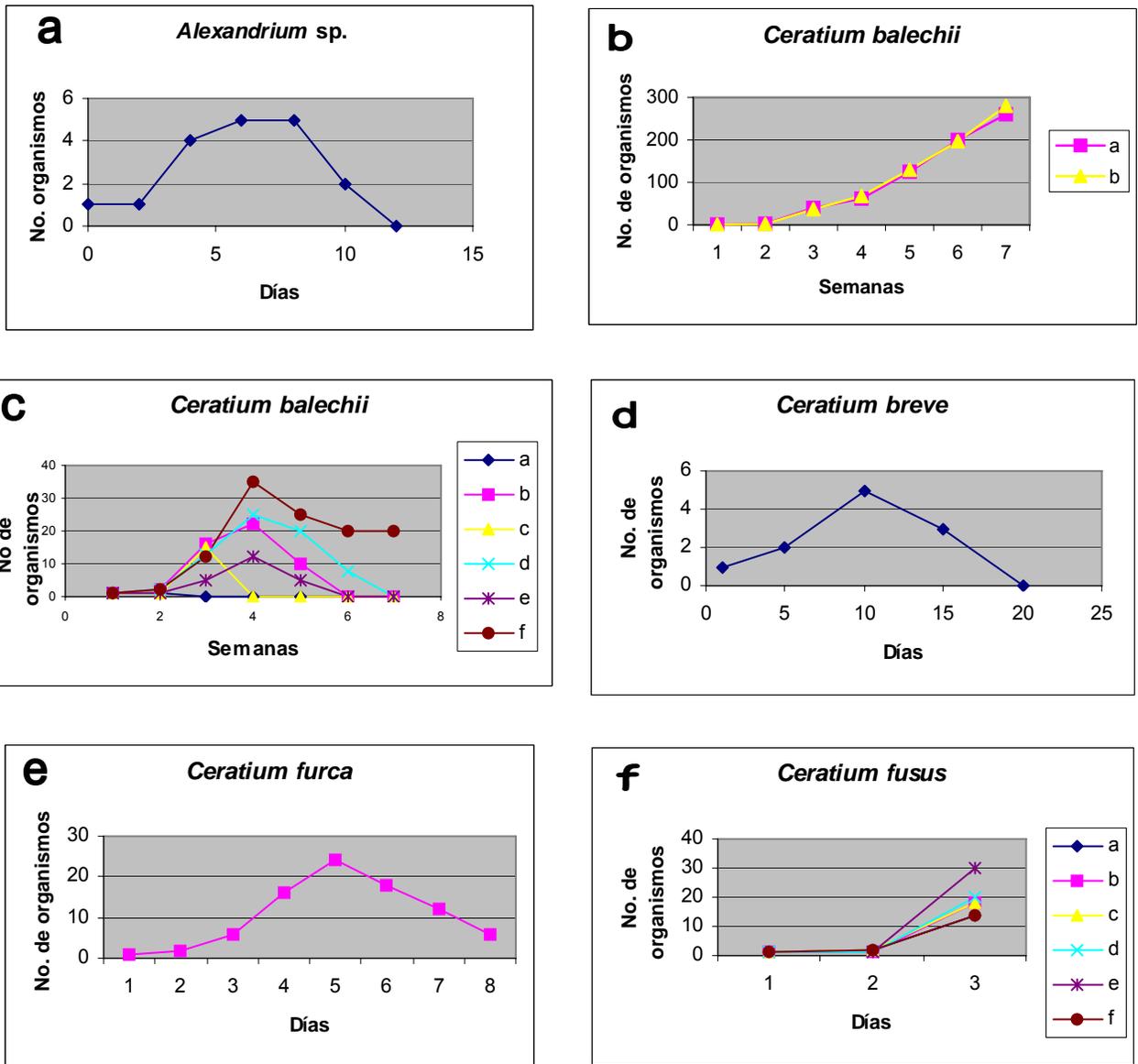
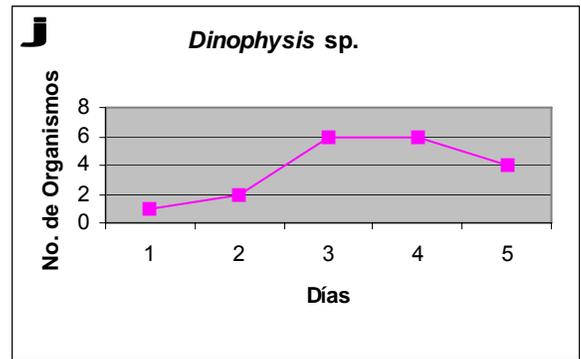
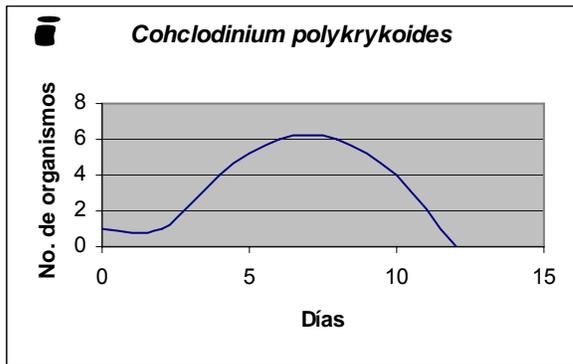
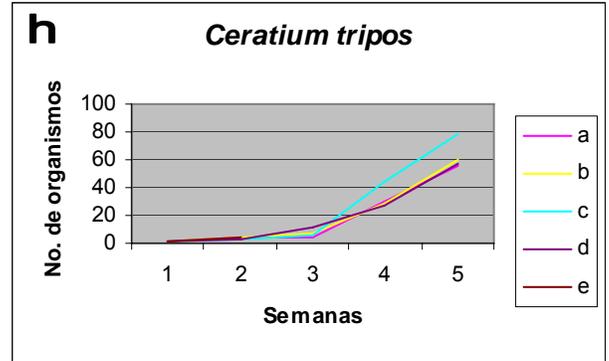
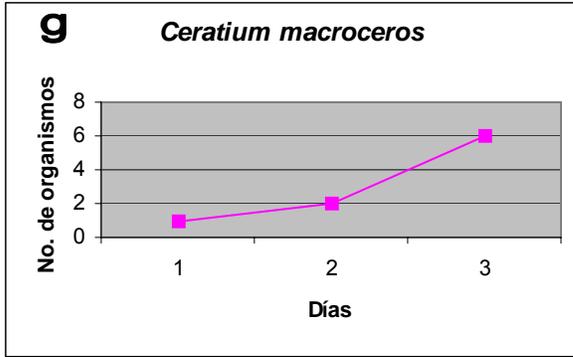


Figura 12 a-j. Organismos mantenidos en diferentes medios de cultivo sin llegar al establecimiento de los mismos. Por un tiempo máximo de 3 meses en el caso de *C. balechii* (Fig c) y un mínimo de 3 días en el caso de *C. macroceros* (Fig. g) logrando en general algunas divisiones celulares, no alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, con μ menores de 0.5/día. Fig. b Las letras a,b indican dos diferentes cultivos clonales. Fig. c y Fig. f se iniciaron seis diferentes cultivos. Fig. h cinco diferentes cultivos clonales.



Continuación de la Figura 12 a-j.

10. DISCUSIÓN

Para facilitar la discusión de los resultados, ésta será abordada por Órdenes taxonómicos:

Orden Prorocentrales

De este Orden se logró establecer el mayor número de cepas en la tesis (ocho de *Prorocentrum micans*, dos de *Prorocentrum gracile* y tres de *Prorocentrum rathymum*), esto nos indica que existe mayor factibilidad de establecer cultivos de especies de este grupo, ya que aparentemente son mas adaptables a la manipulación y a proliferar en condiciones artificiales de cultivo.

Sin embargo, como observación interesante, el establecer los cultivos de las especies que pertenecen a este Orden, fue una tarea difícil, ya que al momento de aislar a los organismos, estos se quedaban inmóviles por la luz del microscopio y la manipulación y al ser lavados varias veces parecían incluso estar muertos, por tal motivo se aislaron en agua de mar filtrada y en diferentes medios de cultivo para ver en cuál se adaptaban mejor.

El mantener en cultivo especies de este orden abre un sin número de posibilidades de investigaciones, ya que las especies del género *Prorocentrum*

constituyen una parte importante de la comunidad fitoplanctónica, particularmente en las aguas del Pacífico Mexicano (Orellana-Cepeda *et al.*,1993; Morquecho-Escamilla *et al.*, 1997; Cortés-Altamirano, 1998; Lechuga-Devéze *et al.*, 2000; Hernández-Becerril *et al.*, 2000). Algunas de las especies del Orden, han representado problemas a la salud pública debido a sus extensos florecimientos que usualmente se consideran peligrosos (Anderson *et al.*,1985b), pueden excretar sustancias que inhiben el crecimiento de las diatomeas, pero aparentemente estas sustancias no ingresan a la cadena alimentaria (Uchida, 1977). Existen algunos reportes que asocian a *P. micans* con muerte de peces en Portugal (Pinto y Silva 1956), en Sudáfrica (Horstman, 1981) y en aguas de Hong Kong (Lu y Hodgkiss, 2004).

La toxicidad de *P. micans* puede confirmarse, gracias al establecimiento de estos cultivos, ya que existen reportes de que esta especie produce PSP (Parallitic Shellfish Poisoning) (Pinto y Silva, 1956) y algunos incidentes recientes de mortalidad en peces han sido atribuidos a la disminución del oxígeno (Faust y Gullede, 2002). Según Sar *et al.* (2002) es muy probable que algunos de los organismos del género sean tóxicos según las condiciones del medio en que se desarrollan.

Las cepas de los organismos colectados en Acapulco se cultivan a 35 ups y las de Lázaro Cárdenas a 28 ups, según la salinidad presente en el momento de la colecta. Podemos observar entonces como *P. rathymum* presenta diferencias en las curvas de crecimiento entre las cepas cultivadas a diferentes salinidades,

mientras que en las cultivadas con la misma salinidad crecen de manera similar (Fig. 7), siendo el crecimiento óptimo a 28 ups.

Al establecer la cepa 13A de *P. gracile*, no obtuvimos durante los conteos densidades celulares similares a la cepa 51L de la misma especie (Fig. 6), consideramos que esto pudo deberse a que la cepa 13A estuvo contaminada con nanoplancton y si bien el nanoplancton no competía con este organismo por espacio, pudo haber competido por nutrientes reflejándose esto en el menor número de células obtenidas. Actualmente el cultivo esta puro, esto se logró utilizando la técnica de diluciones seriadas.

Las cepas de *P. micans* (Fig. 5), presentaron un crecimiento uniforme y al parecer no se vieron afectadas por la salinidad.

A pesar de que los cultivos se establecieron en diferentes tiempos, que las células iniciales fueron obtenidas en distintas fechas, que las muestras provenían de diferentes localidades (Acapulco y el Puerto de Lázaro Cárdenas), todas las cepas que logramos establecer en el laboratorio se sincronizaron en los tiempos de crecimiento. Para lograr la sincronización, normalmente se utiliza un modelo denominado “programación del régimen de luz y oscuridad” (Tamiya 1966), pero en nuestro caso se logró gracias al mantenimiento de los cultivos en las mismas condiciones de irradiación, fotoperíodo, medio de cultivo y temperatura. Se debe resaltar que la sincronía es importante ya que favorece el mantenimiento de los cultivos y permite obtener biomasa y resembrar en tiempos específicos.

Orden Gonyaulacales

Dentro de este orden se logró aislar una cepa (81L) de *Ceratocorys armata*, la cual presentó una tasa reproductiva prácticamente de reemplazo, ya que una célula daba origen a otra o en el mejor de los casos a otras dos y subsecuentemente de estas dos una moría y la que sobrevivía se reproducía de igual manera, por tal motivo el cultivo se ha mantenido durante un año con un número mínimo de organismos.

Debido a que esta especie no presenta reportes de crecimiento en condiciones artificiales de cultivo intentamos estimular el crecimiento con cambios en la salinidad y en el medio de cultivo, sin obtener lo esperado. La tasa de reemplazo de la especie la mantuvo por un período de un año durante el cuál no se observaron cambios morfológicos.

En los dos medios de cultivo, con los que experimentamos, las células que se tomaban en fase de división murieron, por lo que no es conveniente aislar las células en condiciones de reproducción, esto ya se había observado en otros dinoflagelados del género *Ceratium*, durante el desarrollo de esta tesis.

Es interesante la forma de reproducción de la especie *Ceratocorys armata* (Lámina 4 Fig. a-d) pues pudimos observar que para dividirse, la célula sufre ecdisis abriéndose por el *cingulum* y deja salir el contenido protoplásmico, dejando la teca completa y vacía, después el contenido protoplásmico sufre un proceso de

división dando origen a una o dos células hijas idénticas a la original, este proceso tarda de siete a quince días.

Durante el año que fue mantenido este cultivo, el mayor número de organismos obtenidos fue de seis, pero en promedio fueron sólo dos los organismos que se mantenían vivos.

No se tienen registros de florecimientos de esta especie y en los reportes sobre fitoplancton no parece ser muy abundante (Okolodkov y Garate-Lizárraga, 2006; Hulburt y Corwin, 1972; Meave *et.al* 2006; Polat *et al*, 2000; Steidinger *et al.*, 1967). Lo anterior podría explicarse por su baja tasa reproductiva, sin embargo pensamos que en condiciones naturales la tasa reproductiva debe ser diferente y mayor a la obtenida bajo condiciones de cultivo, ya que como una estrategia adaptativa, los organismos deben producir un número tal de descendientes que les permita sobrevivir a la depredación y a la competencia interespecífica e intraespecífica, por lo que se concluye que la tasa de crecimiento de reemplazo obtenida en este trabajo debe interpretarse como un hecho inusual debido a las condiciones de cultivo. No existe ningún registro de cultivos de esta especie, sólo el del presente trabajo.

Orden Gonyaulacales

Familia Ceratiaceae

El establecer cultivos de especies del género *Ceratium*, ha sido un reto en esta tesis, debido a que los reportes de cultivos de organismos de este género se remontan a la década de los cincuenta con los trabajos de Rytter y Nordly (1951) y Nordly (1956;1957), en ellos se muestra que en los cultivos de *C. furca*, *C. tripos*, *C. lineatum* y *C. fusus*, decrece el número de individuos con el aumento de temperatura y que se mantienen bajo condiciones de cultivo a temperaturas más bajas y salinidades más altas que en el medio natural.

Existe un vacío de información sobre este tema, entre los trabajos anteriormente citados y los que se han publicado en la actualidad; de estos últimos sobresalen los de Smalley *et al.* (1999 y 2001), quienes trabajaron con poblaciones naturales de *Ceratium furca*. Tal vez debido al tipo de nutrición de estos organismos, su cultivo ha sido difícil, por lo que es importante considerar lo anterior para proporcionarles un medio de cultivo que se ajuste a sus necesidades. Varias especies del género *Ceratium* son mixotróficos, es decir, presentan una nutrición en la que combinan la fotosíntesis con la capacidad de fagocitar el material orgánico particulado que encuentran en el medio (Taylor, 1976; Smalley *et al.*, 1999).

Como en todos los cultivos, se midió la fase de crecimiento exponencial, y observamos diferencias importantes entre ambas especies.

La cepa de *Ceratium falcatum* 34A, tuvo una tasa reproductiva más lenta que la de *Ceratium fusus*, a pesar de que ambas pertenecen a la misma Sección

taxonómica y se podría esperar que debían tener un crecimiento similar. *C. fusus*, alcanzó la tasa exponencial entre los 5 días con una $\mu = 1.02$, mientras que *C. falcatum* hasta los 10 días con una $\mu = 0.99$. Estas tasas de crecimiento tan dispares, considerando el tiempo, coinciden con el comportamiento de los organismos en el medio natural, ya que *C. fusus* tiende a formar mareas rojas (Lechuga-Devéze *et al.*, 2000; Vargas y Freer, 2004) mientras que *C. falcatum* no ha sido reportado formando florecimientos.

El hecho de que sólo se encuentren cepas de estos organismos en dos ceparios en el mundo, tal vez se debe a que estos no son tóxicos, sin embargo han sido asociados a algunos eventos de mortalidad de otros organismos, como lo documentan en México Cortés-Altamirano y Nuñez-Pasten (2000) y en la Bahía de Chesapeake USA (Hallegraeff *et al.*, 1995).

En el caso particular de *C. fusus* se ha reportado un florecimiento asociado con alta mortalidad de peces en Tailandia y Japón, lo que se atribuye a la disminución de oxígeno disuelto en el medio (Vargas y Freer 2004). Por su parte *C. furca* fue identificado en aguas de Venezuela como causante de la mortalidad de sardinas (*Centengraulis edentulus*), debido a altas concentraciones de toxinas parálíticas presentes en los peces muertos (Mijares *et al.*, 1985), sin embargo, esto no ha sido reportado en otras regiones.

También se ha encontrado a organismos del género *Ceratium* causando mortalidad en larvas de *Ostrea lurida* (Landsberg, 2002), en postlarvas de camarón en México (Cortés-Altamirano y Alonso, 1997) y en larvas de otros invertebrados (Hallegraeff *et al.*, 1995; Vargas y Freer 2004).

En el laboratorio de Ficología Aplicada se han establecido con éxito dos cultivos de *Ceratium*, siendo el de *Ceratium falcatum* el primero registrado para la especie en el mundo. Lo que abre enormes posibilidades de su uso con fines científicos. En el Laboratorio de Ficología Aplicada UAMI, se ha iniciado una nueva etapa de trabajo experimental para estudiar el ciclo de vida de esta especie.

Orden Gymnodiniales

El establecimiento de los cultivos de las especies de dinoflagelados desnudos, tuvo mayor dificultad que el de los tecados, ya que a nuestro parecer, son más difíciles de manipular y algunos explotaban antes de terminar los lavados sucesivos. Otro problema que se presentó fue su identificación morfológica, ya que en organismos tecados, se puede utilizar un gran número de fijadores, cosa que no es posible hacer en los desnudos ya que las células se deforman fácilmente y se pierden sus dimensiones y otros caracteres taxonómicos importantes para su correcta identificación.

La mayoría de los géneros de dinoflagelados fueron descritos en los años de 1800 a 1900, basándose en criterios morfológicos visibles en el microscopio de luz. En

las especies de los géneros *Gyrodinium*, *Gymnodinium* *Amphidinium* y *Karlodinium* las mediciones de epicono e hipocono y el desplazamiento del Cingulum, no son caracteres confiables (Daugbjerg *et al.*, 2000), ya que varían mucho morfológicamente durante su ciclo de vida y además al ser fijados se deforman, por lo que también existe variación dependiendo de si el ejemplar esta vivo o fijado, como se puede observar en nuestras cepas.

La ausencia de placas nos dificultó aún mas la identificación correcta de estos organismos, algunos autores como Daugbjerg *et al.* (2000) utilizando cultivos clonales han realizado extracción y análisis de la subunidad rDNA comparando 1400 pares de bases de más de 40 especies para poder resolver esta cuestión y utilizan un carácter morfológico confiable que es la presencia, ausencia y forma del surco apical.

En esta tesis adicionalmente se utilizó un método ya reportado para la identificación de las especies, el cual implica una observación aún más fina que la que puede brindar la microscopía de luz y fue la microscopía de barrido, donde es importante observar si en la región apical presenta surco y si es así observar el tipo de surco para la ubicación a nivel de género.

Una vez que establecimos la técnica más adecuada para la fijación de las células sin que se deformaran, se pudo fotografiar a los organismos desnudos, logrando diferenciar que en la región apical carecían de surcos o marcas. Así mismo, se pudo observar a detalle el desplazamiento del *cingulum* lo que aunado a

observaciones de su ciclo de vida, nos permitieron identificar a la especie como *Gyrodinium uncatenum* que corresponde a las cepas 21L, 41L y 71L.

Esta especie tiene ciclo de vida sexual y asexual (Coats *et al.*, 1984) pero para poder corroborarlo, es necesario utilizar técnicas citológicas y ultraestructurales como la microscopía de transmisión la cuál permite observar la divisiones del núcleo. En la cepas mantenidas en cultivo sólo se observaron células de diferentes tamaños y algunas nadando unidas por un extremo como a punto de separarse, lo que corresponde con los diagramas y descripciones de reproducción asexual típica de la especie (Coats *et al.*, 1984). Además al estar fotografiando las células en microscopía de luz, se observó claramente que al morir la célula tendía a enquistarse, hinchándose y perdiendo los detalles del *cingulum*, lo que también fue descrito por Coats *et al.*(1984) en su estudio detallado del ciclo de vida de la especie.

Los organismos de las distintas cepas no mostraron diferencias en sus densidades celulares, tal vez debido a las mismas condiciones de salinidad, medio de cultivo, temperatura, fotoperíodo (ciclo de luz: oscuridad) e irradiación ya que pertenecían a la misma recolecta.

El mucílago de coloración café-rojiza que presenta la especie en su fase bentónica concuerda con la coloración típica que presentan sus florecimientos en vida libre (Campbell, 1973; Hasle y Syvertsen, 1996).

Técnicas de Microscopía

Para poder fotografiar e identificar los organismos en cultivo, particularmente los dinoflagelados desnudos, tuvimos que experimentar con diversas técnicas y recetas establecidas, pero logramos un método adecuado para este tipo de microorganismos, que es el que describimos en la metodología.

El glutaraldehído, que utilizamos en la cepa 22A (Lámina 7 Fig. e-h), es buen fijador de las estructuras intracelulares en general, pero es mal fijador de lípidos y no estabiliza las membranas, por lo que permanecen osmóticamente activas, generando el peligro potencial de la deformación de las células después de la fijación (Boltovskoy, 1995), como ocurrió con esta cepa y se puede observar en las fotografías, por lo que no se recomienda este fijador para algunos organismos atecados.

El tetraóxido de osmio que es considerado como el fijador más ampliamente utilizado para MEB, tiene la gran ventaja de que mata instantáneamente a los microorganismos, congelándolos en el estado en que se encontraban en vivo, incluyendo sus estructuras más delicadas (como los flagelos). La fijación con este compuesto parece imprescindible para las células desnudas y las más delicadas. La fijación con OsO_4 al 1%, a temperatura ambiente, durante 30-60 minutos, sin recurrir a una prefijación con glutaraldehído resultó suficiente (Boltovskoy, 1995), en nuestro trabajo.

Especies con crecimientos iniciales

Al inicio de esta tesis se intentaron cultivar sin éxito algunas especies, tal vez debido a la falta de experiencia y a no tener establecida la metodología apropiada para este fin.

También debido a la manipulación y falta de experiencia en la limpieza de los organismos, algunos se contaminaron ocasionando que proliferaran las diatomeas y protozoarios. Por ejemplo, se tuvo un crecimiento inicial de *Dinophysis* sp., lográndose aproximadamente 15 divisiones pero después las células murieron, este crecimiento se dio en el medio L1SE, lo que resulta importante dado que anteriormente se había intentado cultivar sin éxito esta especie en los medios L1, F/2, o P.

Se presentaron varios problemas para establecer los cultivos del género *Ceratium*. Los organismos de *Ceratium breve* que se aislaron, iniciaron un crecimiento, pero las células se veían deformes, como masas con cuernos y aunque se resembraron, no sobrevivieron. De *Ceratium furca* (Ehrenberg), Claparède et Lachmann, sólo se logró el cultivo una vez, pese a que se aislaron las células muchas veces, nunca se había logrado su reproducción en esta investigación. En este caso tuvimos un crecimiento inicial asexual seguido de un declinamiento del cultivo, donde se observaron células deformes, lo que suponemos corresponde a la fase sexual.

En la manipulación durante la limpieza de las células de *C. fusus*, se separaban los organismos que estaban unidos reproduciéndose asexualmente y como aun no estaban bien formados se morían.

Debido a que ya se tiene establecida con éxito la especie, *C. fusus*, podemos asegurar que se podrán establecer los cultivos de todas las especies que tuvieron crecimiento inicial, por el simple hecho de que crecieron en las condiciones artificiales de cultivo y de que hemos establecido la metodología correcta y adquirido experiencia.

En general, los organismos del género *Ceratium* tienen una tasa reproductiva más lenta que otras especies de dinoflagelados, por lo que las alícuotas para medir su tasa de crecimiento se tomaban cada 4 días. Heredia *et al.* (1999) reportan que a *Prorocentrum lima*, se le midieron las tasas de crecimiento en tres medios de cultivo f/2, K y ES, tomando alícuotas para conteo celular cada dos días, debido a que esta especie tiene una alta tasa reproductiva, como la mayoría de las especies de este género. También sobresalen los trabajos de Anderson, *et al.* (1999), Carreto *et al.* (2001), Tamanaha *et al.* (2001), quienes realizaron conteos celulares para determinar la tasa de crecimiento exponencial de algunas especies tóxicas de dinoflagelados, *Alexandrium fraterculus*, *A. fundyense*, *A. tamarense*, *A. catenella* y *A. Minutum*.

Otra manera de establecer tasas de crecimiento es por medición de clorofila *a* como lo hicieron Álvarez *et al.* (1997), quienes trabajaron con tres especies de

dinoflagelados: *A. minutum* (tóxica), *A. affine* (no tóxica) y *G. catenatum* (tóxica), pero siempre se debe contrastar con el método de conteo y luego estandarizar las mediciones.

En la metodología se manejan sólo dos profundidades de colecta: superficie y cinco metros, esto es basado en experimentación, ya que cuando colectamos a mayores profundidades, los organismos aunque permanecían vivos durante el aislamiento, no crecieron en las condiciones de cultivo, entonces en base a nuestra experiencia personal sólo colectamos muestras de estas dos profundidades para cultivo.

11. CONCLUSIONES

El material usado para el cultivo debe de estar limpio de cualquier contaminante, de preferencia la cristalería debe ser nueva y destinada exclusivamente a este fin. Todo el material de cultivo debe lavarse con extrán y abundante agua destilada.

Para establecer cultivos de dinoflagelados, de la metodología establecida, es importante recalcar que las muestras tomadas deben ser de una profundidad no mayor a cinco metros y superficie.

En algunos dinoflagelados se reduce o se inhibe el crecimiento en los cultivos de laboratorio, debido a la agitación de las cajas una vez aislado el organismo. Lo que algunos autores llaman inhibición por turbulencia (Juhl *et al.*, 2000), por lo que al inicio del cultivo se deben manipular lo menos posible.

La luz del microscopio debe ser baja al aislar las células para evitar la fotoinhibición.

Si se manipulan células de organismos que estén en división estas mueren.

El método más confiable y económico para medir la tasa de crecimiento es el conteo celular que fue el utilizado en este trabajo.

La tasa de crecimiento es un parámetro que nos permite interpretar indirectamente la adaptación de los organismos al medio de cultivo.

El medio L1 (medio para autótrofos) es un medio idóneo para el crecimiento de dinoflagelados marinos.

El medio L1SE (medio para heterótrofos) se propone como buena alternativa en el cultivo de especies de dinoflagelados mixótrofos o heterótrofos.

Se han establecido especies de las que no se tienen reportes de cultivos como *Ceratium falcatum* y *Ceratocorys armata*.

La tasa de crecimiento de reemplazo de la especie *Ceratocorys armata* fue posiblemente un hecho inusual debido a las condiciones de cultivo.

Los posibles factores fisiológicos por lo que algunos organismos no se han establecido como cultivo son el estado que guarda el organismo al ser muestreado, el medio de cultivo adecuado que debe considerar el tipo de nutrición y el requerimiento de elementos traza específicos, por lo que sólo crecen en condiciones naturales, tal es el caso de los Dinophysiales.

La salinidad afecta la tasa de crecimiento de la especie *Prorocentrum rhathymum* prefiriendo salinidades más bajas en donde alcanza un mayor número de células.

Para la fijación del dinoflagelado desnudo *Gyrodinium uncatenum* se recomienda utilizar únicamente tetraóxido de osmio al 1%, durante una hora.

Se lograron los objetivos de la tesis estabilizando cepas de algunas especies de dinoflagelados marinos del Pacífico mexicano. Siendo esto de vital importancia para el proyecto CONACyT: Biología y Filogenia Molecular de Dinoflagelados del Pacífico mexicano (G37560-V).

12. Literatura Citada

Abalde, J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Guerrero. 1995. *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Edición Universidad de Coruña. Servicio de Publicaciones. Universidad de Coruña, España. 210 p.

Alonso, R. R. 1998. Ocurrencia de Mareas Rojas y Calidad del Agua en la Zona Sur de la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM., Mazatlán, Sinaloa. 165 p.

Álvarez, M. J., A. Aguilera, J. M. Franco, S. Fraga y S. G. González 1997. Efecto de diferentes Medios de Cultivo Sobre el Crecimiento de Dinoflagelados. *En: VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Centro Oceanográfico Vigo*. España. 271-280 p.

Álvarez-Arellano, H. G. 1994. *Capítulo IV. Medios de Cultivo. Folleto de ALGAS*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. pp. 29-37.

Andersen, R. A., S. L. Morton y J. P. Sexton. 1997. CCMP-Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. List of strains. *J. Phycol.*, 33 (Suppl.): 1-75.

Anderson, T. F. 1956. Electron microscopy of microorganisms. *Phys. Tech. Biol.*, 3:177-240.

Anderson, D.M., D.W. Coats y M.A. Tyler. 1985a. Encystment of the dinoflagellate *Gyrodinium uncatenum*: temperature and nutrient effects. *J. Phycol.*, 21: 200-206.

Anderson, D. M., A. W. White y D. G. Baden. 1985b. Toxic Dinoflagellates. Elsevier. New York. 561 pp.

Anderson, D.M., D.M. Kulis, B. A. Keafer y E. Berdalet. 1999. Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: Variability in labeling intensity with physiological condition. *J. Phycol.*, 35:870-883.

Arredondo, V. B. O. y C. J. S. Band. 2000. *Aislamiento mantenimiento y cultivo de microalgas nocivas. Manual de curso de cultivos*. CIBNOR. La Paz Baja California. 26 p.

Balech, E. 1988. *Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental*. Publicaciones Especiales Instituto Español de Oceanografía, Madrid 1: 1-219, 88 Láms.

Band-Schmidt, C.J., L. Morquecho-Escamilla, C. H. Lechuga-Devéze y D. M. Anderson. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J. Plankton Res.*, 26(12): 1459-1470.

Becker, E. W. (Ed.) 1994. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, USA. 293 p.

Berges, J.A., D.J. Franklin y P.J. Harrison. 2001. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *J. Phycol.*, 37: 1138-1145.

Blackburn, S.I., G.M. Hallegraeff y C.J. Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.*, 25: 577-590.

Boltovskoy, A. 1995. Técnicas de microscopía electrónica de barrido: aplicación a las microalgas. *En*: K. Alveal, M. E. Ferrario, E.C Oliveira y E. Sar (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile. 119-138 pp.

Campbell, P. H. 1973. *Studies on brackish water phytoplankton*. Department of Botany, University of North Carolina. Sea Grant Publication UNC-SG-73-07. USA.

Carlson, R. D. y D. R. Tindall. 1985. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Island. *En*: D.M. Anderson, A.W. White y D. G. Baden (Eds). *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, New York. 171-176 p.

Carranza-Edwards, A., Márquez-García, S y Morales de la Garza, E. A. 1986. Estudio de sedimentos de la plataforma continental del estado de Guerrero y su importancia dentro de los recursos minerales del mar. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol., U.N.A.M.* 13(3):241-262.

Carreto, J., M. Carignan y N. Montoya. 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 223: 49-60.

Cetta, C. M. y D. M. Anderson. 1990. Cell cycle studies of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein and *Gyrodinium uncatenum* Hulburt during asexual and sexual reproduction. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 135: 69-84.

Coats, D.W., M. A. Tyler y D.M. Anderson. 1984. Sexual processes in the life cycle of *Gyrodinium uncatenum* (Dinophyceae): a morphogenetic overview. *J. Phycol.*, 20: 351-361.

Coats, D.W. 2002. Dinoflagellate life-cycle complexities. *J. Phycol.*, 38: 417-419.

Correa, P. G. 1974. *Geografía del Estado de Michoacán, Geografía Física*. Tomo I, EDDISA (Ed.). Morelia, México. 298 p.

Correa, P. G. 1978. *Atlas Geográfico del Estado de Michoacán*. EDDISA (Ed.). Morelia. México. 58 p.

Cortés-Altamirano, R. 1987. Observaciones de Mareas Rojas en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Rev. Cienc. Mar.*, 13(4): 1-19.

Cortés-Altamirano, R. 1998. *Las mareas Rojas*. AGT Editor, S.A., México. 161 p.

Cortés-Altamirano, R. y R. Alonso. 1997. Mareas Rojas durante 1997 en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Rev. Cienc. Mar.*, 15: 31-37.

Cortés-Altamirano R. y A. Núñez-Pasten. 1992. Doce años (1979-1990) de registros de Mareas Rojas en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Ins. Cienc. Mar y Limnol., UNAM, México*. 19(1): 11-21.

Cortés-Altamirano, R. y A. Núñez-Pasten. 2000. Distribución y abundancia anual de *Ceratium dens* (Peridiniales: Ceratiaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 48(2/3): 305-311.

Cortés-Altamirano, R. y A. P. Sierra-Beltrán. 2003. Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and *Prorocentrum Rhathymum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 39: 221-225.

Daugbjerg, N., G. Hansen, J. Larsen y Ø Moestrup. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinolagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycol.*, 39 (4): 302-317.

Davis, H. C. y R.R.L. Guillard. 1958. Relative value of ten genera of microorganisms as foods for oyster and clam larvae. *U.S.F.W.S. Fish Bull.*, 136(58): 293-304.

de La Cruz, J., P. Ajani, R. Lee, T. Pritchard e I. Suthers. 2002. Temporal abundance patterns of the red tide dinoflagellate *Noctiluca scintillans* along the Southeast Coast of Australia. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 236: 75-88.

De Lara-Isassi, G., M. Rodríguez-Palacio, S. Álvarez-Hernández Y C. Lozano-Ramírez. (2006 en prensa). "Tasas de crecimiento de dinoflagelados del género *Ceratium* Schrank, 1793, en tres medios de cultivo conocidos y uno alternativo. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*

Dodge, J.D. 1975. The Prorocentrales (Dinophyceae). II. Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.*, 71: 103-125.

Dodge, J.D. 1982. *Marine dinoflagellates of the British Isles*. Her Majesty's Stationary Office, London. 303 pp.

Echlin, P., 1978. Coating techniques for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Scan. Electr. Microsc.*, 1: 109-132.

Emery, K.O. 1967. Estuaries and Lagoons in relation to continental shelves. *Woods Hole Oceanographic Institution*. 1493: 9-11.

Faust, M. A. 1990. Morphologic details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island. Twin Cays, Beliza, including two new species. *J. Phycol.*, 26: 548-558.

Faust, M. A. y R. A. Gullledge. 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. *En: Smithsonian Institution, Contribution from the United States National Herbarium*. 42: 1-144. National Museum of Natural History. Washington D. C.

Fensome, R. A., F. J. R. Taylor, G. Norris, W. A. S. Sarjeant, D. I. Wharton y G. L. Williams. 1993. *A classification of fossil and living dinoflagellates*.

Micropaleontology. Micropaleontology Press Special Publication Number 7. Couvering J.V. (Ed.). Sheridan Press. Hanover, Pennsylvania. 351 p.

Fraga, S. y A. Bakun. 1993. Global climate and harmful algal blooms: the example of *Gymnodinium catenatum* on Galician coast. En: Smayda T. J. y Y. Shimizu. (Eds.) *Toxic Phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Science Publishers, New York BV. 59-65 pp.

Garate-Lizárraga, I. y A. Martínez-López. 1997. Primer registro de una marea roja de *Prorocentrum mexicanum* (Prorocentraceae) en el Golfo de California. *Rev. Biol. Trop.*, 45: 1263-1271.

Gárate-Lizárraga, I., Hernández-Orozco M. L., C. Band-Schmidt y G. Serrano-Casillas. 2001. Red tides along the coasts of the Baja California Peninsula, Mexico (1984 to 2001). *Oceánides*. 16: 127-134.

González, M. A., O. O. Parra y A. S. Cifuentes. 1995. Técnicas de Cultivo de Microalgas en Laboratorio. En: K. Alveal; M. E. Ferrario; E.C. Oliveira y E. Stein (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. Chile. pp-219-249.

Graham, H.W. y N. Bronikovsky. 1944. The genus *Ceratium* in the Pacific and North Atlantic Oceans Scient. Results. Cruise VII. *Carnegie, Biol. Ser.* 5:1-209.

Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. Studies on the Marine Planktonic Diatoms. I *Cyclotella nana* Husted and *Detonella cofervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.*, 8: 229-39.

Guillard, R. R. L. 1973. Division rates. In: Stein (Ed.). *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-312.

Guillard, R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *En: W. L. Smith y M. H. Chanley (Eds.). Culture of Marine Invertebrates Animals.* Plenum Publishing. New York. 29-60.

Guillard, R. y P. E. Hargraves 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a Chrysophyte. *Phycol.*, 32, 234-236.

Hallegraeff G. M. 1993. A Review Of Algal Blooms And Their Apparent Global Increase. *Phycol.*, 32(2): 79-99.

Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson y A. D. Cembella (Eds.). 1995. *Manual of Harmful Marine Microalgae.* Intergovernmental Oceanographic Commission. Manuals and Guides No. 33, UNESCO, París. 551 p.

Harrison, P.J., R.E. Waters y F. J. R. Taylor. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.*, 16:28-35.

Hasle, G.R. y E. E. Syvertsen. 1996. Dinoflagellates. *En: Tomas C.R. (Ed.) Identifying marine phytoplankton.* Academic Press, Inc. San Diego, Ca. 453 p.

Heredia, T. A., B. O. Arredondo V., E. Vázquez N. Y J. L. Ochoa 1999. Aislamiento cultivo y caracterización parcial del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge de la isla El Pardito, Baja California Sur, México. X Reunión Nacional de la Sociedad de Planctología, A. C., Mazatlán, Sinaloa, 28-30 abril 1999.

Hernández-Becerril, D.U. 1988. Observaciones de algunos dinoflagelados (Dinophyceae) del Pacífico mexicano con microscopios fotónico y electrónico de barrido. *Inv. Pesq.*, 52: 517-531.

Hernández-Becerril, D.U. 1989. Species of the dinoflagellate genus *Ceratium* Shrank (Dinophyceae) in the Gulf of California and coast of Baja California, Mexico. *Nova Hedw.* 48 (1-2): 33-54.

Hernández-Becerril, D.U., R. Cortéz-Altamirano y R. Alonso. 2000. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coast of the Mexican Pacific. *Hydrobiol.*, 418: 111-121.

Hoek, D. van den, G. Mann y H. M. Jahns, 1997. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press. USA. 244-287 p.

Horstman, D. A. 1981. Reported red water outbreaks and their effects on fauna of the west and south coast of South Africa 1959-1980. *Fish. Bull. S. Afr.*, 15: 71-88.

Hulburt, E.M. y N. Corwin. 1972. A note on the phytoplankton distribution in the offshore water of the eastern and central gulf of Mexico. *Caribbean J. Sci.*, 12(1-2): 29-38.

Jeffrey, S. W. 1979. Cultivating Unicellular Marine Plants. CSIRO. Division of fisheries and oceanography. *Ann. Rep.*, 1977-1979.

Jørgensen, E. 1920. Mediterranean *Ceratia*. Rep. on the Danish Oceanographical Expeditions to the Mediterranean and Adjacent Seas, 1908-1910. (Biology). *Copenhagen.* 2: 1-148(1): 1-110.

Juhl, A., V. Velásquez y M. I. Latz. 2000. Effect of Growth conditions on Flow-Induced inhibition of population growth of a Red-Tide dinoflagellate. *Limnol. and Oceanogr.*, 45(4): 905-915.

Kofoid, C.A. 1910. A revision of the genus *Ceratocorys* based on skeletal morphology. *Univ. Calf. Publ. Zool.*, 4 (2): 387-392.

Keller, D. K., R. C. Selvin, W. Claus y R.R.L. Guillard. 1987. Medium for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton. *J. Phycol.*, 23:633-38.

Krivtsov, V., E. Bellinger y D. Sigee. 2000. Incorporation of the intracellular elemental correlation pattern into simulation models of phytoplankton uptake and population dynamics. *J. Appl. Phycol.*, 12:453-459.

Kulm, L.D., C. Roush, C. Harlett, H. Heudeck, H. Chambers y J. Runge. 1975. Oregon Continental Shelf Sedimentation Interrelationships of Facies Distribution and sedimentary processes. *The J. Geol.*, 83(2): 145-175.

Landsberg, J. 2002. The Effects of Harmful Algae Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.*, 10 (2): 1-412.

Lara, V. M. A., J. L. R. Moreno y E. J. M. Amaro. 1996. *Fitoplancton*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. UAM.México. 227 p.

Larson R. L. y G. Chase. 1970. Relative velocities of the Pacific North America and Cocos Plates in the Middle America Region. *Earth Planet. Sci. Lett.* 7 : 425-428.

Lassus, P. 1988. *Plancton Toxique Et Plankton D'eaux Rouges Sur Les Côtes Européennes*. Institut Francais De Recherche Pour L'exploitation De La Mer, Brest, INREMER, France, 97 P.

Lechuga-Devéze, C.H., M. L. Morquecho-Escamilla, A. Reyes-Salinas y J.R. Hernández-Alonso, 2000. Environmental natural disturbances at Bahía Concepción, Gulf of California. *En: Munawar M., Lawrence S.G., Munawar I.F., D.F. Malley (Eds.). Aquatic ecosystems of Mexico: status and scope ecovision world monograph series*. Backhuys Publis. Leiden, the Netherlands. 245-255 p.

Licea, D., J. L. Moreno, H. Santoyo y G. Figueroa. 1995. *Dinoflageladas del Golfo de California*. UBCS,SEP-FOMEX. México, 165 P.

Llorente, I. M. y I. Cereceda. 2001. *Dinoflagelados. Micropaleontología 2000-2001*. Universidad de Salamanca. USAL (Ed.). España. 12 p.

Loeblich, A. R. III y V. E. Smith, 1968. Chloroplast pigments of the marine dinoflagellates *Gyrodinium resplends*. *Lipids*. 3(1): 5-13.

Loeblich, A. R. III; J.L. Sherley y R. J. Schmidt. 1979. The correct position of flagellar insertion in *Prorocentrum* and description of *Prorocentrum rhathymum* sp. Nov. (Pyrrophyta). *J. Plankton Res.*, 1: 113-120.

López, J., 1966. Variación y Regulación de la forma en el género *Ceratium*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Barcelona. España. *Investigación Pesquera*. 30: 325-427.

Lu, S. e I. J. Hodgkiss. 2004. Harmful algal bloom causative collected from Hong Kong waters. *Hydrobiol.*, 512: 231-238.

Meave del Castillo M. E., M. E. Zamudio, Y. B. Okolodkov y I. H. Salgado. 2003. *Ceratium balechii* sp. Nov. (Dinophyceae: Gonyalacales) from the Mexican Pacific. *Hidrobiológica*. 13(1): 75-91.

Meave, del C.M.E. 2006. Diatomeas (Bacillariophyta), Dinoflagelados (Dinophyta) y Silicoflagelados (Dictyochophyceae Marinos del Pacífico Mexicano, con énfasis e la porción tropical. Informe final del proyecto BA008. CONABIO. Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa. Marzo 2006.

Mee, L. D., M. Espinosa y G. Díaz. 1986. Paralytic Shellfish Poisoning With A *Gymnodinium catenatum* Red Tide On The Pacific Coast Of Mexico. *Mar. Environ. Res.*, 19: 77-92

Mijares, A. J., C. Sevcik, C. A. Barboza y J. A. Saavedra. 1985. Ichthyotoxism By A Paralytic Toxin Produced By Marine Dinoflagellates Of The Genus *Ceratium*: Relationship To Fraction β Isolated From The Sponge *Tedania Ignis*. *Toxicon* 29 (2): 221-233.

Morales, V. V. y A. De Velotti. 1990. Temas de Acuicultura. Fitoplancton. Programa regional de apoyo al desarrollo de la pesca en el Istmo Centroamericano, Pradepesca. Unión Europea, Oldepesca. Convenio ALA 90/9. Cartilla 2. 25 p.

Morquecho-Escamilla, M. L., C. H. Lechuga-Devéze y J. R. Hernández-Alonso 1997. Proliferaciones algales masivas en Bahía Concepción BCS, México (1993-1996) Simposio Sist. Acuáticos de México, Ciudad de México 8-9 marzo abst 062.

Nakajima, I., Y. Oshima y T. Yasumoto. 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1029-1033.

Nordly, E., 1957. Experimental studies on the ecology of *Ceratia*. *Oikos. Act. Occol. Scand.*, 8 (2) :200-265.

Nordly E., 1956. Salinity and temperature as controlling factors for distribution and mass occurrence of *Ceratia. Blyltia*. 11: 16-18.

Okolodkov, Y. B. y I. Garate-Lizárraga. 2006. An annotated checklist of dinoflagellates (Dinophyceae) from the Mexican Pacific. *Acta Botánica Mexicana* 74: 1-154.

Olseng, C., L. Johan Naustvoll y E. Paasche. 2002. Grazing by the heterotrophic dinoflagellate *Protoperidinium steinii* on a *Ceratium* bloom. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 225:161-167.

Orellana-Cepeda, E., A. Morales-Zamorano y N. Castro-Castro. 1993. A conceptual model of coastal red tides of Baja California. *En: VI Conf. Int. Toxic Mar. Phytoplankton. Nantes, France. Octubre 18-22.* 152 p.

Osorio-Tafall, B. F. 1942. Notas sobre algunos dinoflagelados planctónicos marinos de México con descripción de nuevas especies. *An. Esc. Nal. Cienc. Biol.* 2: 435-450.

Paniagua, J. M., L. F. Bucle, C. Granados y D. H. Loya. 1988. *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas.* Segunda Edición. Voltolina, D. L., L. F. Bucle y E. R. Morales (Eds.). CICESE. Acuicultura. Ensenada Baja California, México. 67 p.

Pfiester, L.A. y D. M. Anderson. 1987. Dinoflagellates reproduction, *En: F.J.R. Taylor (Ed.). The Biology of Dinoflagellates. Botanical Monographs, 21.* London, Blackwell. U.K. 611-648.

Pinto, J. S. y E. S. Silva. 1956. The toxicity of *Cardium edule* L. and its possible relation to the dinoflagellate *Prorocentrum micans* Ehr. *Est. Inst. Biol. Mar.*, 12:1-20.

Polat, S., E. Sarihan y T. Koray. 2000. Seasonal Changes in the Phytoplankton of Northeastern Mediterranean (Bay of Iskenderun). *Turk. J. Bot.*, 24: 1-12.

Pringsheim, E.G. 1912. Die Kultur von Algen in Agar. *Beitr. Biol. Pfl.* 11. 305.

Pringsheim, E. G. 1921. Algenkultur. Abderhalterims Hand. *Biol. Arb. Meth.* 11(2): 377.

Provasoli, L. y I. J. Pintner. 1953. Ecological implications of *in vitro* nutritional requeriments of algal dinoflagellates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 56: 681.

Provasoli, L. y J. J. A. McLaughlin, 1955. Auxotrophy in some marine and brackish dinoflagellates. *J. Protozool.* 2 (suppl.): 10.

Provasoli, L., J. J. A. McLaughlin y M. R. Droop. 1957. Development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 25: 392-428.

Provasoli, L., 1963. Organic regulators in phytoplankton fertility. New York *En:* M.N. Hill (Ed.). *The Sea Interscience*, 2: 165-219.

Provasoli, L., 1964. Growing marine seaweeds. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 4: 9-17.

Provasoli, L., 1971. Nutritional relationships in marine organisms. *En:* J. D. Costlow (Ed.) *Fertility of the sea*. Gordon and Breach, Sci. Publ., 2: 369-382.

Rytter, H. G. y E. Nordly. 1951. Form variation in *Ceratium fusus* and *Ceratium tripos*. Populations in culture and from the sea. *Det. Norske Videnskaps-Akad. Oslo Mat. Naturv.*, 4.

Sar, E., M. E. Ferrario y B. Reguera 2002. *Floraciones nocivas en el cono sur americano*. Vigo, España. Instituto Español de Oceanografía 311p.

Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae (Peridineae) Teil *En:* Rabenhorst, L. (ed.) *Kryptogamen-Flora*. Akad. Verlag. Leipzig. 617 p.

Schütt, F. 1895. Die Peridineen der Plankton Expedition. *Ergebn. Plankt. Exped. Humboldt-Stiftung* 4: 1-171.

Smalley, G. W., D. W. Coats y E. J. Adam. 1999. A new method using fluorescent microspheres to determine grazing on ciliates by the mixotrophic dinoflagellate *Ceratium furca*. *Aquat. Microb. Ecol. AME* 17(2):167-179.

Smalley, G. W., D. W. Coats y D. K. Stoecker. 2001. Influence of Nutrient Concentration on Feeding in the Mixotrophic Dinoflagellate *Ceratium furca*. The J. Eukaryot. Microbiol. 9th East Coast Protozoology Conference. USA. June 9-10, 2001.

Sournia, A. 1967. *Le Genre Ceratium (peridinien planctonique) dans le canal de mozanbique. Contribution a une révision mondiale. Vie et Milieu. Ser. A: Biologie Marine*, 18, 2-3A. 375-500.

Spector, D. J. (Ed.) 1984. *Dinoflagellates*. Academic Press, Orlando, 545 p.

STATISTICA for Windows [Computer program manual]. (1988). Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>.

Steemann-Nielsen, E. 1934. *Die ceratien des Indischen Ozeans und der ostasiatischen Gewässer mit einer allgemeinen zusammenfassung über die verbreitung der ceratien in den Weltmeeren. The Carlsberg Foundations Oceanographical expedition rounds the world 1928-30 and previous "Dana"-expeditions*. Copenhagen, London. Dana-Report, 17. 33 p.

Steidinger, K. A., Davis, J. T. y J. Williams. 1967. *A Key to the dinoflagellate genera of the West Coast of Florida*. Technical Series No. 52. Florida Board of Conservation Marine Laboratory, St. Petersburg, Florida, USA.

Steidinger, K. A. y J. Williams. 1970. *Dinoflagellates. Memoirs of the hourglass cruises*. Mar. Res. Lab. Fla. Dept. Nat. Res. St. Petersburg, USA. 2:251 pp.

Steidinger, K. y K. Tangen. 1997. Dinoflagellates. *En: Thomas R.C. (Ed.) Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic Press, Inc., Harcourt B. and Company, San Diego, Ca. USA. pp 387-598.

Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge. USA. 448 p.

Stoecker, D. K. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protist and some ecological and evolutionary implications. *Eur. J. Protistol.*, 34: 281-290.

Stosch, H. A. V. 1973. Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. *Nov. Br. Phycol. J.*, 8:105-34.

Swift, D. J. P. 1978. Continental shelf sedimentation. *En: Burke, C, Drake, C. (Eds.) Continental margins*. New York. 117-135 p.

Tamanaha, M. S., L. A. O. Proença y Jr. C. Resgalla. 2001. Avaliação preliminar da toxicidade do extrato aquoso de *Alexandrium fraterculus* (Dinophyceae), (Balech, 1985) Anais da XVI Semana Nacional de Oceanografia-Oceanografia e Sociedade: um desafio à teoria e à practica. Centro Académico Livre de Oceanología CALO. Río Grande, Brasil. 223p.

Tamayo, L. J. 1970., *Geografía Moderna de México*. Ed. Trillas. México. 390 p.

Tamiya, H. 1966. Synchronous cultures of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 17: 1-27

Taylor, F. J. R.(Ed.). 1976. *Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report on material collected by the R.V. Anton Bruun 1963-1964*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, Germany. 234 p., 46 pl.

Taylor, F. J. R. (Ed.). 1987. *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs, London, Blackwell 21: 1-23

Taylor, F. J. R. y U. Pollinger. 1987. Ecology of Dinoflagellates. In: Taylor, F.J.R. (Ed.) *The Biology of Dinoflagellates. Botanical Monographs (21)*. Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, California, USA. 399-502.

Terlizzi, D. E, M. D. Ferrier, E. A. Armbruster y K. A. Anlauf. 2002. Inhibition of dinoflagellate growth by extracts of barley straw (*Hordeum vulgare*). *J. Appl. Phycol.*, 14:275-280.

Uchida, T. 1977. Excretion of a diatom inhibitory substance by *Prorocentrum micans* Ehrenberg. *Jap. J. Ecol.*, 27: 1-4.

Ustup, G. y R.V. Aranza. 1998. Physiology and bloom dynamics of the tropical dinoflagellate *Pyrodinium bahamense*. En: Anderson D.M., A.D. Cembella y G.M: Hallegraeff (Eds.). *Physiological ecology of harmful algae blooms*. Vol. G41. Berlin: Springer. 81-94.

Vargas, M. M. y E. Freer. 2004. Presencia de los dinoflagelados *Ceratium dens*, *C. fusus* y *C. furca* (Gonyaulacales: Ceratiaceae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 52(1): 127-132.

Wood, E.J.F. 1954. Dinoflagellates in the Australian region. *Australian J. Mar. Freshwat. Res.*, 5:171-351.

Wood, E.J.F. 1968. *Dinoflagellates of the Caribbean Sea and Adjacent Areas*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, USA. 143 p.

Zingone, A. y H. Oksfeldt Enevoldsen. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Oceans Coastal Management*. 43:725-748.

Páginas WEB citadas.

<http://ccmp.bigelow.org> pagina electrónica de Provasoli Guillard National Center, de cultivos de cepas de dinoflagelados

<http://seasquirt.mbio.co.jp/mbic/index.php> MIB, El Instituto de Biotecnología Marina de Japón MBI (Marine Biotechnology Institute)

<http://www.atcc.org> (American Type Culture Collection)

<http://www.botany.ubc.ca/cccm/NEPCC/NEPCC%20isolates/nepccdino.html>

CCCM Centro canadiense de cultivo de microorganismos

<http://www.ccac.uni-koeln.de> La CCAC (Culture Collection of Algae at the University of Cologne

<http://www.cibnor.mx/colecciones/codimar/ecodimar.php> CODIMAR (Colección de Dinoflagelados Marinos).

<http://www.sams.ac.uk>(CCAP), La colección de cultivos de algas y protozoarios que pertenece a la Asociación Scottish para la Ciencia Marina. Dunstaffnage Laboratorio Marino

<http://www.utex.org> Culture Collection of Algae (University of Texas at Austin)

<http://www.vi.ieo.es/general/principal.aspx?web=covigo.aspx> El COV (Centro Oceanográfico Vigo).

LAMINAS FOTOGRÁFICAS

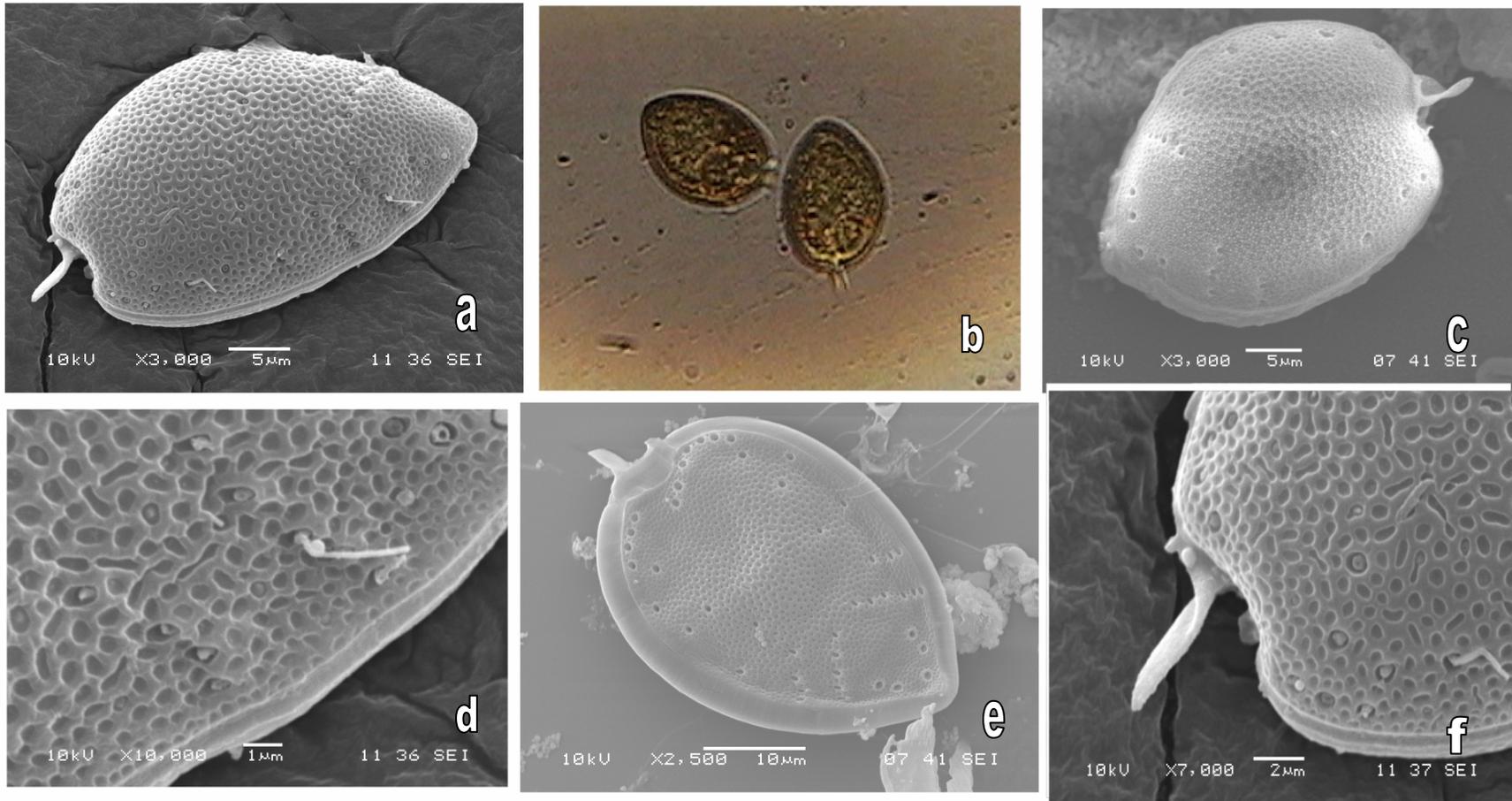


Lámina 1 Fig. a-f. *Prorocentrum micans*. a (cepa 11A) y c (cepa 12A) Células típicas en Microscopio electrónico de barrido; b (cepa 23 A) Fotografía de microscopio óptico de dos células vivas; d (cepa 11A) detalle de los tricocistos; e (cepa 12A) Célula vieja con márgenes mas gruesos y anchos; f (cepa 11A) detalle del diente.

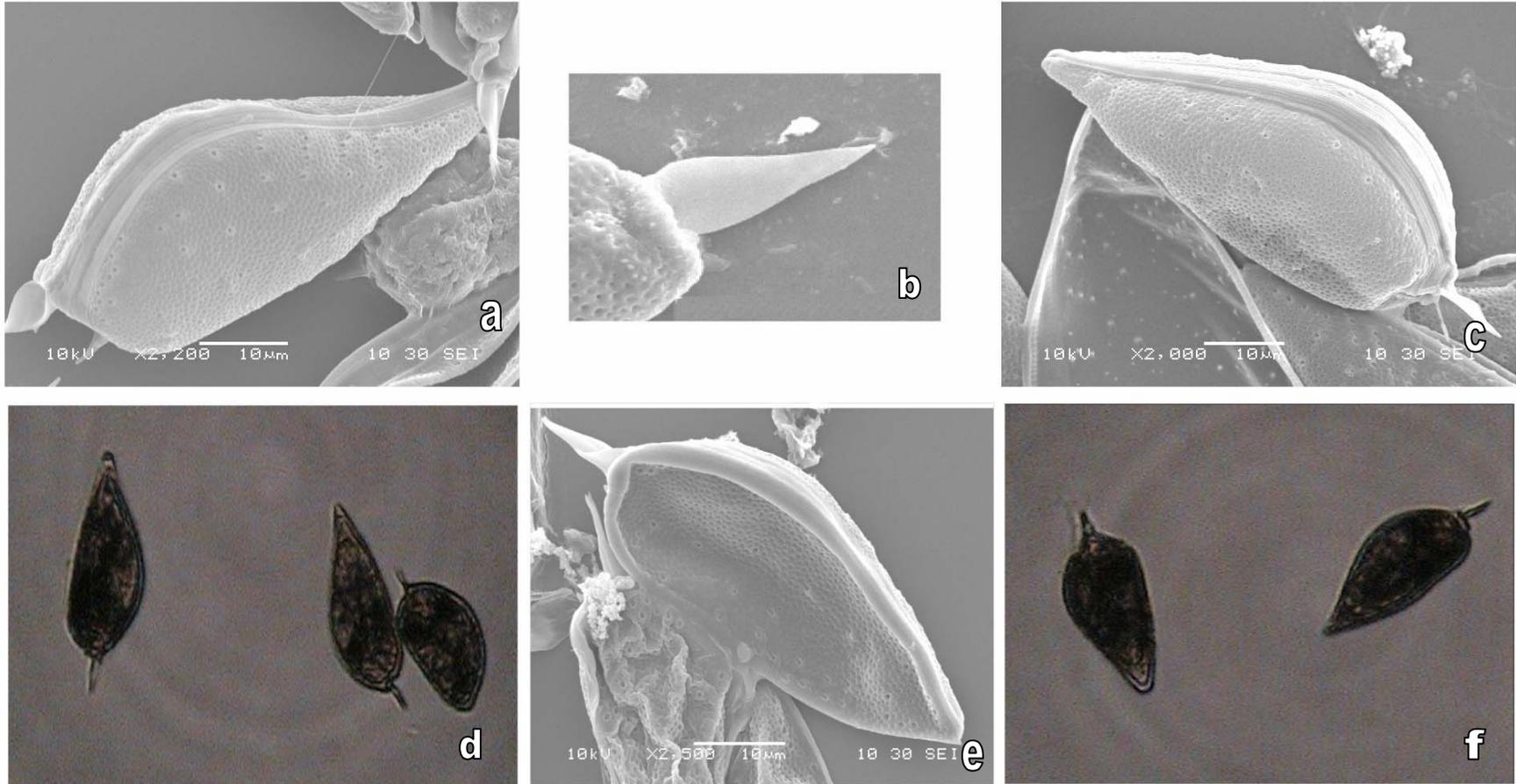


Lámina 2 Fig. a-f. *Prorocentrum gracile*. a,c (cepa 51L) Células típicas en Microscopio electrónico de barrido; b (cepa 13A) detalle del diente; d y f (Cepa 51L) Fotografía digital de células vivas; e (cepa 13A) Célula vieja con márgenes mas gruesos y anchos en MEB.

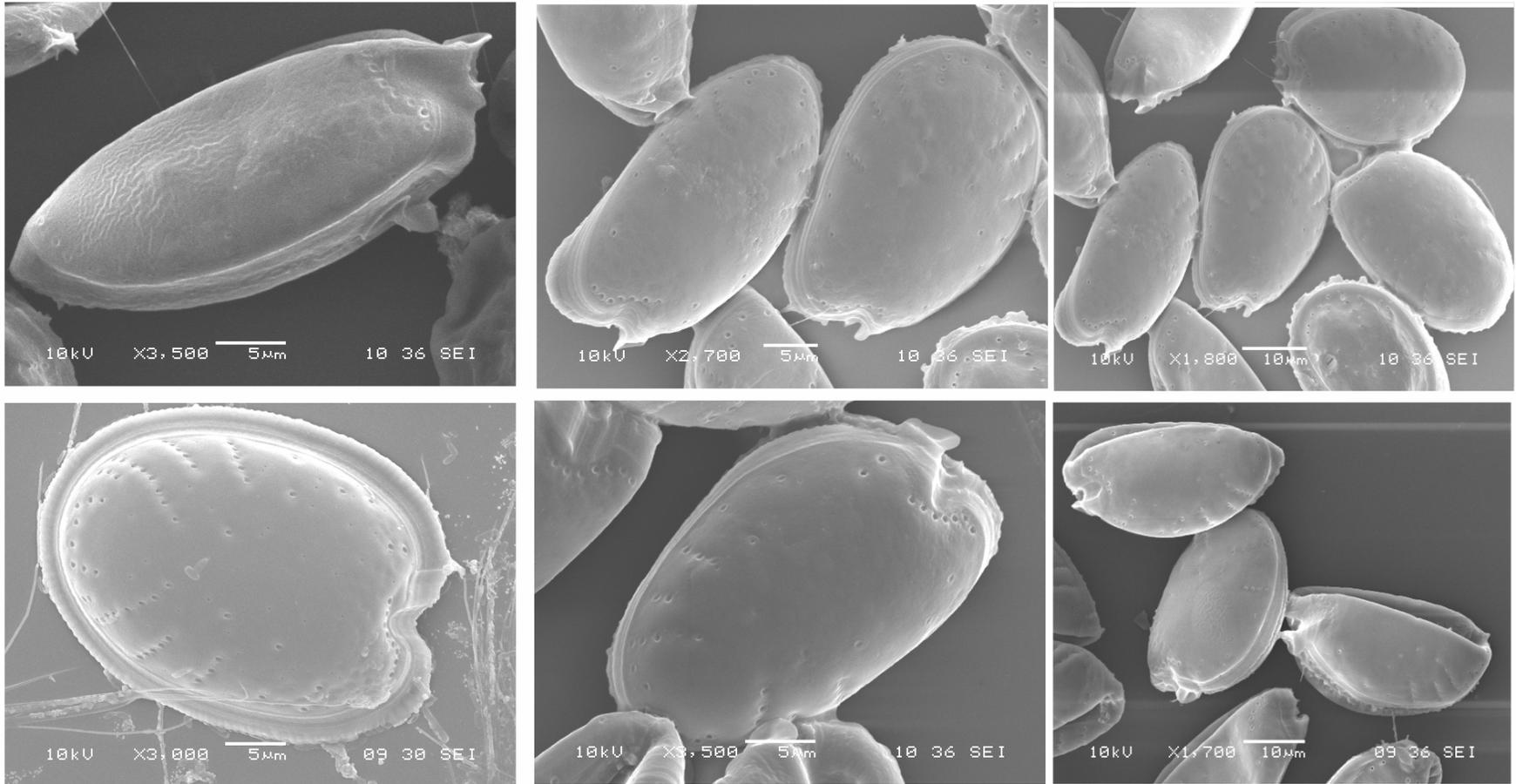


Lámina 3 Fig. a-f. *Prorocentrum rhathymum*. a-f Fotografías en Microscopio electrónico de Barrido. a-c,f (cepa 24A) Se observa el diente corto ubicado a un lado del área periflagelar; d (cepa 31L) Célula vieja con los márgenes en que se unen las dos valvas más gruesos y anchos; e (cepa 91L) Ornamentación mostrando los poros distribuidos de manera radial.

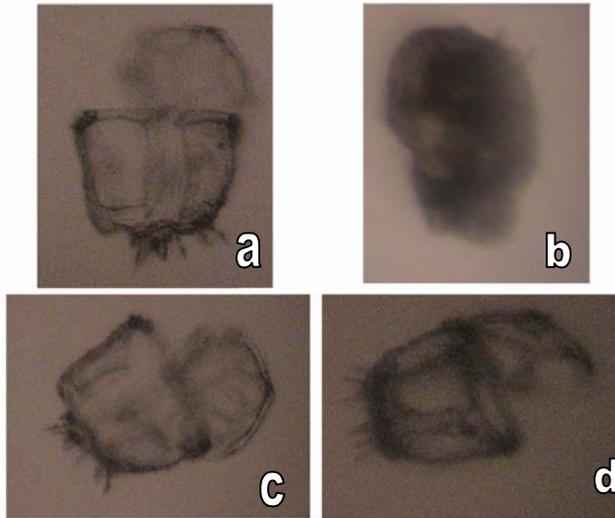


Lámina 4 Fig. a-d. *Ceratocorys armata*. Cepa 81L. Microfotografías de microscopio óptico. a-c-d Tecas vacías, con cuatro a cinco espinas cortas en la región antapical en posición ventral, el largo de la hipoteca excede al de la epiteca; b contenido protoplásmico en división.

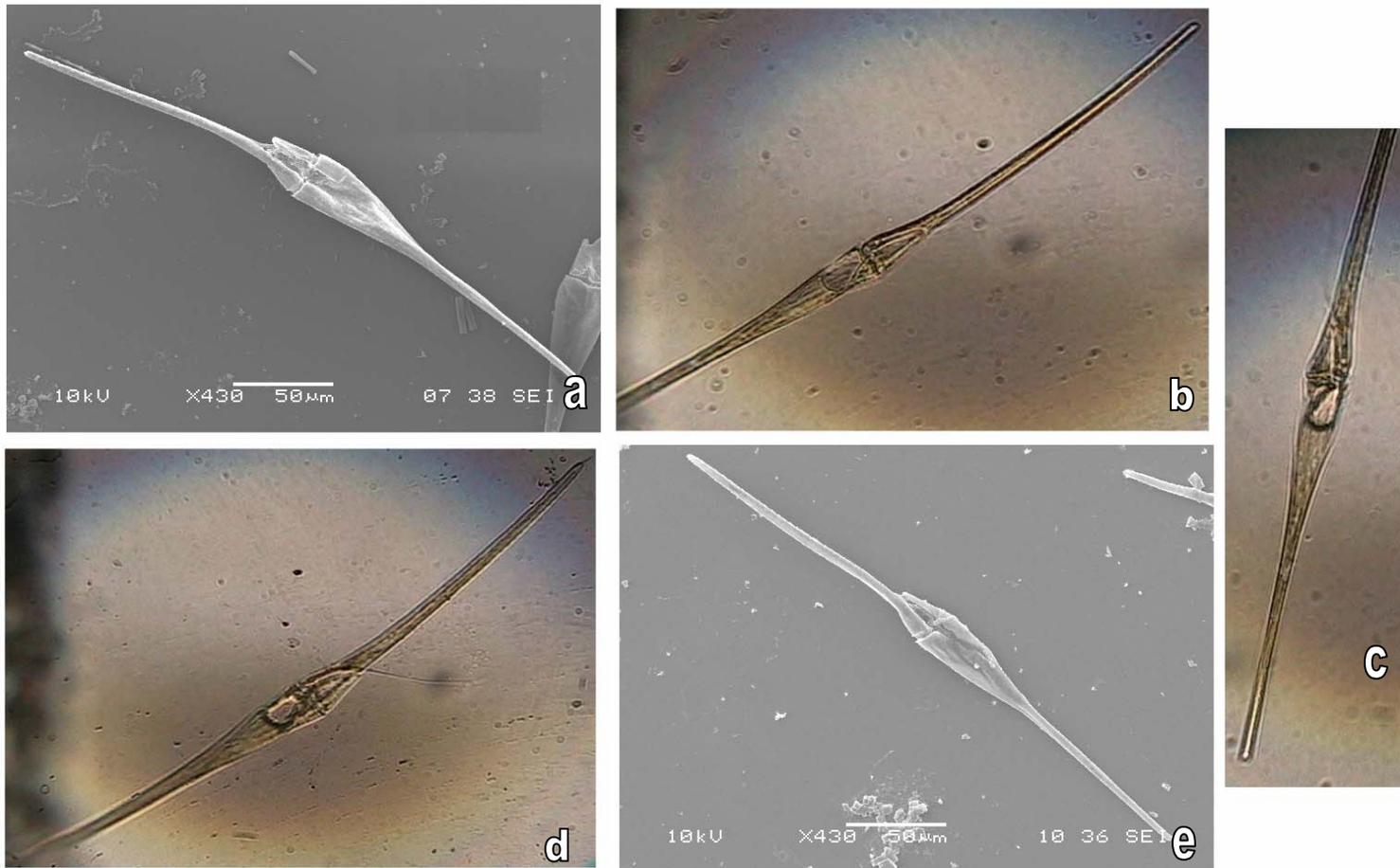


Lámina 5 Fig. a-e. *Ceratium fusus*. cepa 14A. a y e. Fotografías de MEB. Cuerno antapical derecho corto y rudimentario, izquierdo largo y ligeramente curvo; b, c y d. Fotografías de microscopio óptico de células vivas. b. Detalle del *Cingulum*; c y d. Flagelo en movimiento.

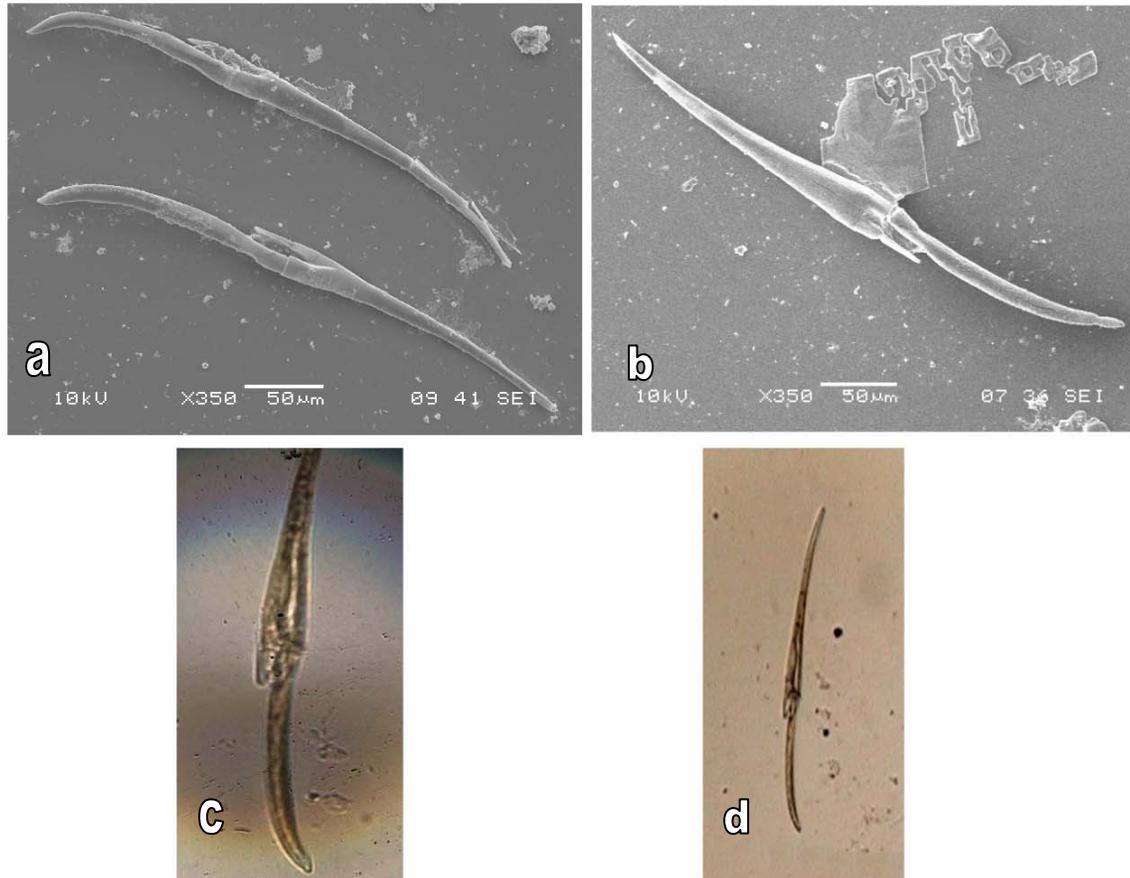


Lámina 6 Fig. a-d. *Ceratium falcatum*. cepa 34A. a y b. Fotografías de MEB. Se observa el cuerno antapical derecho corto y rudimentario y el izquierdo más largo y curvado; c y d Fotografías de microscopio óptico, c. Detalle de la vista ventral; d Célula completa.

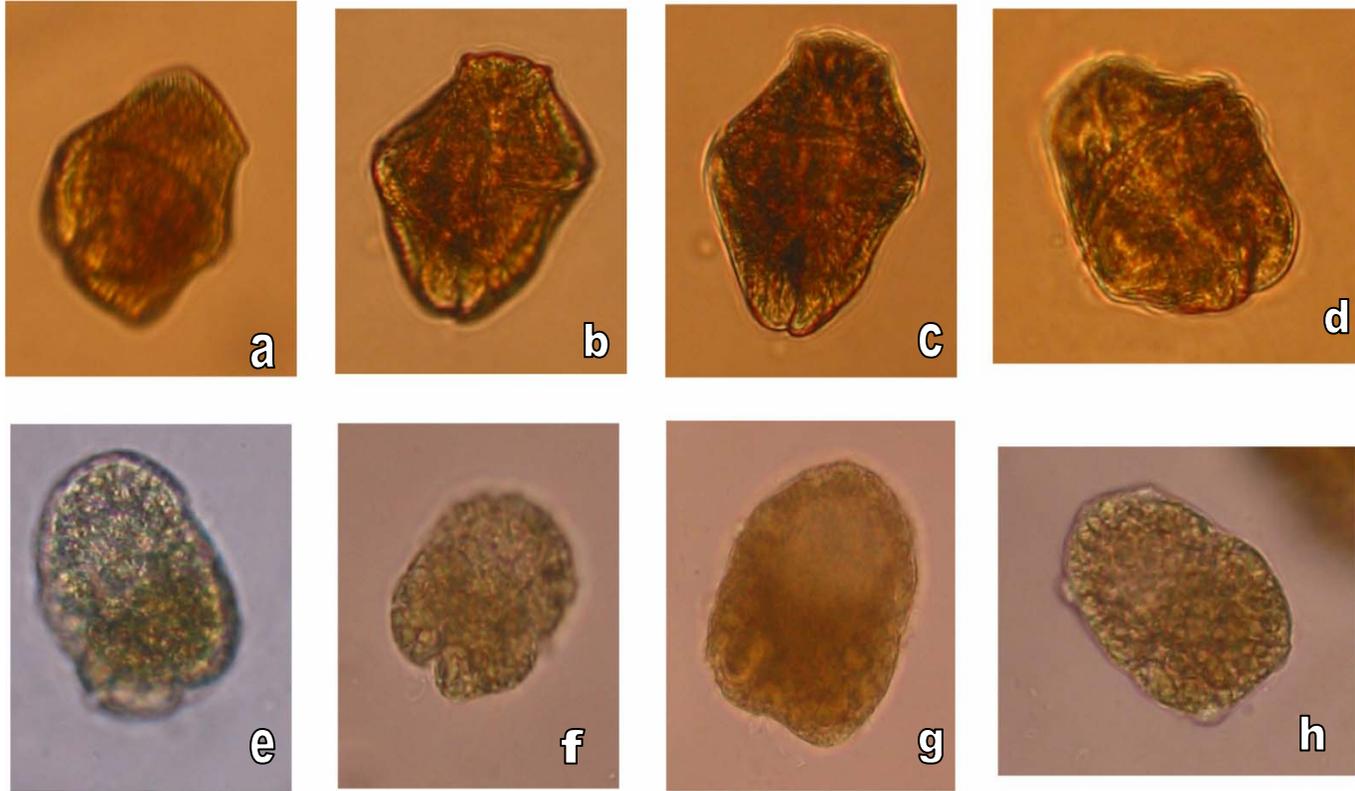


Lámina 7 Fig. a-h. *Gymnodinium* sp. Ceba 22A. Fotografías digitales tomadas en Microscopio Leica DMLB con cámara digital integrada de 4 megapíxeles. a-d Células de la especie fotografiadas vivas; e-h Células de la especie fijas en glutaraldehído, se observa el cambio drástico de forma debido a la fijación.

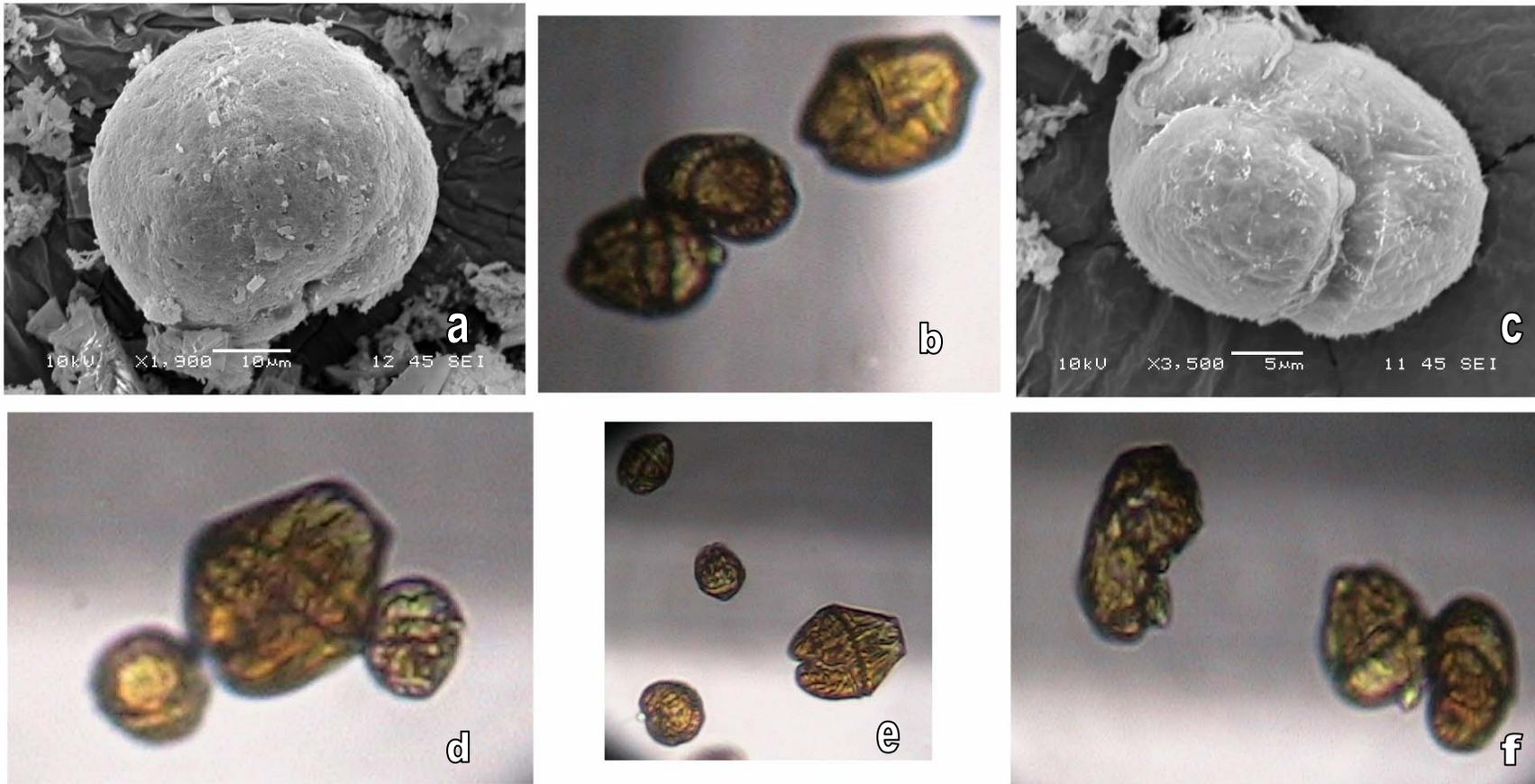


Lámina 8 Fig. a-f. *Gyrodinium uncatenum*. a,c Fotografías de MEB; b,d,e y f microfotografías de microscopio óptico; a (Cepa 71L) Vista apical donde se observa la ausencia de ranura “apical groove”. b-d (cepa 21L) e-f (Cepa 71L) Etapas del ciclo de vida, se aprecian células de diferentes tamaños y en división. C (cepa 71L) Detalle del desplazamiento del *Cingulum*.

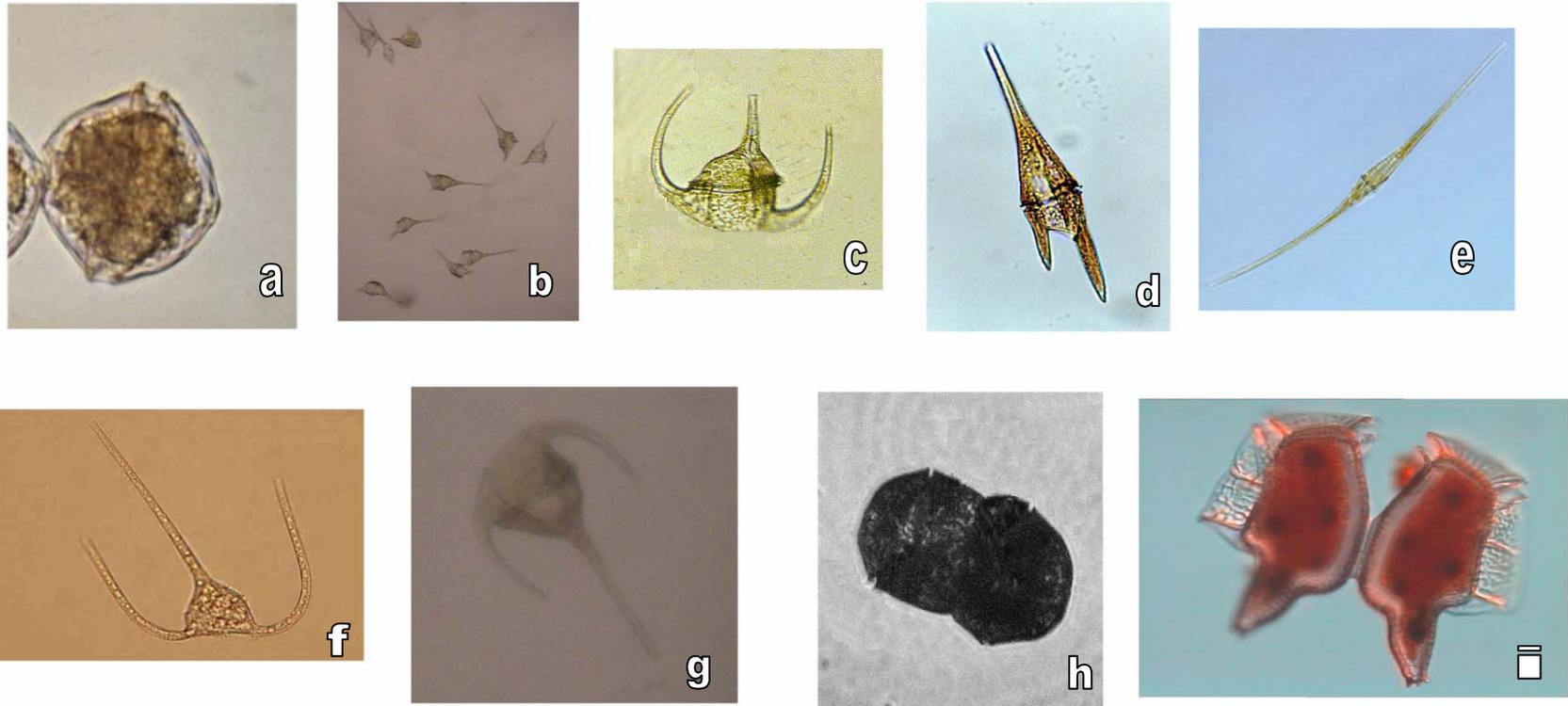


Lámina 9 Fig. a-i. Especies con crecimiento inicial. Estas especies no se lograron estabilizar como cepa. Microfotografías en Microscopio óptico de los organismos en pozos de cajas de cultivo. a. *Alexandrium* Halim; b. *Ceratium balechii* (Meave, Okolodkov et Zamudio); c. *Ceratium breve* (Ostenfeld y Schmidt) Schröder; d. *Ceratium furca* (Ehrenberg) Claparède y Lachmann; e. *Ceratium fusus* (Ehrenberg) Dujardin; f. *Ceratium macroceros* (Ehrenberg) Vanhöffen; g. *Ceratium tripos* (Müller) Nitzsch; h. *Cochlodinium polykrykoides* Margalef; i. *Dinophysis caudata* Saville-Kent .



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00023

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE DINOFAGELADOS DEL PACIFICO MEXICANO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 19 del mes de septiembre del año 2006 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. GRACIELA DE LARA ISASSI
- M. EN B.E. SERGIO HUMBERTO ALVAREZ HERNANDEZ
- DRA. ROSA OLIVIA CAÑIZARES VILLANUEVA
- DR. FELIPE FERNANDO MARTINEZ JERONIMO
- DRA. MARIA ESTHER ANGELICA MEAVE DEL CASTILLO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la idónea Comunicación de Resultados cuya denominación aparece para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA
DE: MONICA CRISTINA RODRIGUEZ PALACIO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

A P R O B A R

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES



Casa abierta al tiempo

Monica Rodriguez Palacio

MONICA CRISTINA RODRIGUEZ PALACIO
FIRMA DE LA ALUMNA

REVISÓ

[Signature]

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DR. JOSE FRANCISCO FLORES
PEBROCHE

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. GRACIELA DE LARA ISASSI

VOCAL

[Signature]
M. EN B.E. SERGIO HUMBERTO
ALVAREZ HERNANDEZ

VOCAL

[Signature]
DRA. ROSA OLIVIA CAÑIZARES
VILLANUEVA

VOCAL

[Signature]
DR. FELIPE FERNANDO MARTINEZ
JERONIMO

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MARIA ESTHER ANGELICA
MEAVE DEL CASTILLO