

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Maestría en Ciencias en Ecología Marina

**Fisiología fotosintética y potencial nocivo de dos especies del
género *Heterocapsa* (Peridiniales, Dinophyceae) de la Bahía de
Todos Santos, Baja California**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Miriam Hueytletl Pérez

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Miriam Hueytletl Pérez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Dra. Laura Gómez Consarnau

Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre



Dr. Jorge Adrián Rosales Casián
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Miriam Hueytletl Pérez © 2021

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Miriam Hueytletl Pérez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ecología Marina.

Fisiología fotosintética y potencial nocivo de dos especies del género *Heterocapsa* (Peridiniales, Dinophyceae) de la Bahía de Todos Santos, Baja California

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de tesis

El género *Heterocapsa* incluye especies de pequeños dinoflagelados de relevancia ecológica por su ubicuidad en la comunidad fitoplanctónica. Asimismo, cuenta con especies que forman florecimientos algales nocivos (FAN), como *H. circularisquama* que ha provocado pérdidas económicas en la maricultura de Japón, asociadas a una toxina (H2-a) cuya actividad depende de la luz. En la bahía de Todos Santos, Baja California, México, se encuentran *H. cf. circularisquama* y *H. horiguchii*, que tienen el potencial de formar FAN bajo las condiciones ambientales propicias. Estas especies pueden presentar potencial nocivo asociado a la producción de metabolitos tóxicos, y su producción puede estar asociada con los procesos de regulación fotosintética. Por lo tanto, se estableció como objetivo de este trabajo el de evaluar sus características de crecimiento poblacional y mecanismos de fotoprotección a diferentes irradiancias, y evaluar su impacto sobre rotíferos (*Brachionus plicatilis*) como indicador de su potencial tóxico. El crecimiento poblacional y la respuesta fotoprotectora se evaluó en dos cepas de *H. horiguchii* (A1-B5 y G8) y un aislado de *H. cf. circularisquama* (D7), mantenidos a 16 °C y aclimatados a 20 (LB), 100 (LM) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LA) (sólo en A1-B5 se evaluó la respuesta en LB). *H. horiguchii* creció en las tres condiciones, pero en LB se presentó la menor tasa de crecimiento ($\mu=0.08 \text{ día}^{-1}$). *H. cf. circularisquama* creció en LM y LA, presentó una mayor abundancia celular en LM y μ más alta en LA. La fotoprotección se evaluó con la inducción de la disipación no fotoquímica del fotosistema II (NPQ, por sus siglas en inglés). El control del NPQ en estas especies difiere a lo documentado en otros dinoflagelados. El componente rápido (qE) de este mecanismo se encuentra presente en estas especies, además de tener un NPQ independiente del ciclo de las xantofilas y de la protonación de la membrana tilacoide. Como proxy de la actividad fotosintética se calculó la tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés) a diferentes irradiancias (curva ETR-E). La ETR máxima (ETRmax) se registró en LA en las dos especies (a excepción de *H. horiguchii*), los parámetros fotosintéticos (α , ETRmax y E_k) fueron similares entre aclimataciones en *H. horiguchii*, mientras que en *H. cf. circularisquama* fueron diferentes en las diferentes irradiancias de aclimatación. El potencial nocivo se evaluó con la exposición de rotíferos a diferentes abundancias celulares, al sobrenadante del cultivo y a la suspensión de células rotas de las microalgas a 16 y 20 °C. Se realizaron en luz u oscuridad para evaluar la posible dependencia de la luz en la toxicidad. Ambas especies tienen un metabolito tóxico que generó una inhibición en la viabilidad de los rotíferos (medida como la presencia de nado activo) en abundancias $\geq 80,000 \text{ cél ml}^{-1}$ de *H. horiguchii* y $\geq 10,000 \text{ cél ml}^{-1}$ de *H. cf. circularisquama* independiente del tratamiento de luz. En ningún tratamiento hubo mortandad total después de 24 h. Se encontró que la suspensión de células rotas de *H. horiguchii* provocó una disminución del número de rotíferos viables. No se pudo comprobar una relación del potencial nocivo de las especies con la regulación fotosintética. La respuesta de fotoaclimatación y el potencial nocivo fue específico para cada especie.

Palabras clave: dinoflagelados, FAN, fotoprotección, irradiancia, NPQ, rotíferos

Abstract of the thesis presented by **Miriam Hueytletl Pérez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

**Photosynthetic physiology and harmful potential of two species of the genus *Heterocapsa*
(Peridinales, Dinophyceae) from Todos Santos Bay, Baja California**

Abstract approved by:

Dr. Ernesto García Mendoza
Thesis Director

The genus *Heterocapsa* includes species of small dinoflagellates of ecological relevance due to their ubiquity in the phytoplankton community. Some *Heterocapsa* species can form harmful algal blooms (HAB). Particularly, *H. circularisquama* has caused economic losses to mariculture industry in Japan, associated with the production of light-dependent toxin (H2-a). *H. cf. circularisquama* and *H. horiguchii*, have been registered in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. These species have the potential to form HAB under favorable environmental conditions and may can be harmful to other organism associated with the production of toxic metabolites that might be associated with the photosynthetic regulation processes of the microalgae. Therefore, the aim of this work was to evaluate the population growth characteristics and photoprotective mechanisms at different irradiances of both species, and to evaluate its impact on rotifers (*Brachionus plicatilis*) as an indicator of its toxic potential. The population growth and the photoprotective response were evaluated in two strains of *H. horiguchii* (A1-B5 and G8) and one isolate of *H. cf. circularisquama* (D7). They were kept at 16 ° C and acclimatized to 20 (LB), 100 (LM) and 260 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LA) (only in A1-B5 the response in LB was evaluated). *H. horiguchii* grew under all three conditions, but they presented the lowest growth rate in LB ($\mu=0.08 \text{ day}^{-1}$). *H. cf. circularisquama* grew in LM and LA, presented a higher cell abundance in LM and high μ in LA. Photoprotection was evaluated by monitoring de induction of the non-photochemical quenching of photosystem II (NPQ). Control of NPQ in these species differ from the one documented in other dinoflagellates. The fast component (qE) of this mechanism is present in these species. Also, NPQ was independent of the xanthophyll cycle and the protonation of the thylakoid membrane. As a proxy for the photosynthetic activity, the electron transport rate (ETR) was calculated at different irradiances (ETR-E curve). Maximum ETR (ETRmax) was found in LA in the two species (exception *H. horiguchii*). The photosynthetic parameters (α , ETRmax and E_k) were similar between irradiance acclimatization conditions in *H. horiguchii*, and it was different in *H. cf. circularisquama*. The harmful potential was evaluated with the exposure of rotifers to different cell abundances, to the supernatant of the cultures and to the suspension of broken cells of the microalgae at 16 and 20 °C. The experiments were performed in light or in darkness to evaluate the possible dependence of the toxicity to light. Both species have a toxic metabolite that affected the rotifers viability (measured as the presence of active swimming) at abundances $\geq 80,000 \text{ cells ml}^{-1}$ of *H. horiguchii* and $\geq 10,000 \text{ cells ml}^{-1}$ of *H. cf. circularisquama* independent of the light treatment. Mortality was not detected after 24 h for all treatments. The suspension of broken cells of *H. horiguchii* caused a decrease in the number of viable rotifers. However, it was not possible to related the harmful potential of the species with their photosynthetic regulation. The photo-acclimatization response and harmful potential were species-specific.

Keywords: dinoflagellates, HAB, irradiance, NPQ, photoprotection, rotifers

Dedicatoria

*A mi mamá y a mi hermano,
por su apoyo incondicional a cada paso que doy.*

*A mi papá,
por sus enseñanzas que siguen siendo parte de mi.*

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado dentro de su programa de Maestría en Ecología Marina.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo brindado con la beca para realizar mis estudios de posgrado, con número de becario 907392.

A mi director de tesis, el **Dr. Ernesto García Mendoza**, por aceptarme en su grupo de trabajo y siempre estar dispuesto a escuchar mis dudas. Por escucharme cuando llegué a tener alguna inquietud personal. Agradezco mucho su apoyo en todo este proceso.

A los miembros de mi comité de tesis, el **Dr. Jorge A. Cáceres Martínez**, la **Dra. Laura Gómez Consarnau**, y a la **Dra. Mary Carmen Ruiz de la Torre**, por su tiempo y comentarios que enriquecieron este trabajo. También quiero agradecerles su flexibilidad y comprensión de los contratiempos que llegué a tener.

De manera especial quiero agradecer a la **Dra. Mary Carmen**, por brindarme su apoyo y permitirme utilizar sus instalaciones y su equipo, y por facilitarme agua de mar.

Al **Dr. Conan**, por facilitar los rotíferos para los bioensayos. Quiero agradecer con mucho énfasis a su técnico **Ariyair**, por la disponibilidad que tuvo al apoyarme con los rotíferos.

Al **Dr. Helmut**, por permitirme utilizar equipo de su laboratorio, en especial la autoclave. Al **Dr. Ricardo**, y **César**, así como a **Esperanza**, **Ernesto** y **Omar**, por su disponibilidad para ayudarme con la esterilización de mi material.

A todos los técnicos y doctores que me brindaron su ayuda de alguna manera para que pudiera completar este trabajo. A **Memo**, por su disposición a ayudarme sin conocerme. Al **Dr. Rafael Cabral** por facilitarme un estereoscopio en mis primeras fases experimentales, y al **Dr. Luis Calderón** por su disposición a la hora de pedirle material prestado. A la **Dra. Pilar**, por facilitarme agua de mar para mis experimentos. A **Ceres** por los tips y consejos. A la técnico **Ivonne**. ¡Muchas gracias a todos, fueron de mucha ayuda!

A todos mis compañer@s de laboratorio de **Biología Algal**: Ángeles, Cano, Grecia, Marylin, Melissa, Michelle Fimbres, Michelle Ramírez, Paty, Rigel, Valeria y Yessica. Y a todas las almas que han pasado por el laboratorio que de una u otra manera ayudaron a la realización de este trabajo. ¡Gracias por su apoyo!

A mis **amigos de generación**, y a mis amigas del “**Poder reductor**” y del “**Club de...**” jiji. Gracias por los momentos amenos que pasamos, por su apoyo cuando lo llegué a necesitar, y por su amistad.

A **Aramis**, por enseñarme cómo quiero ser de “grande”. Sin el apoyo que me diste en la licenciatura, probablemente yo no estaría aquí.

A mi **familia por elección**, por seguir estando presentes en mi vida aún a kilómetros de distancia.

A mi **familia**: Viry, tía Nene, Diego, a Vanessita y Ángela. Y al ser vivo más puro que conozco, a **Hadi**.

A **Tamayo**, por todo el apoyo en este camino, y echarme una mano cuando ya tenía las manos al full.

A mi **mamá** y a mi **hermano**, que siguen echándome porras y alentándome. A mi **papá**.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.2.1 Género <i>Heterocapsa</i>	2
1.2.2 Fisiología fotosintética	3
1.2.2.1 Fotosíntesis	3
1.2.2.2 Mecanismos de fotoprotección	4
1.2.2.3 Fotoprotección en dinoflagelados	6
1.2.3 Potencial nocivo del género <i>Heterocapsa</i>	7
1.3 Justificación	9
1.4 Hipótesis.....	10
1.5 Objetivos	10
1.5.1 General.....	10
1.5.2 Particulares.....	10
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	12
2.1 Cepas y mantenimiento de los cultivos.....	12
2.2 Crecimiento a diferentes irradiancias	12
2.3 Fisiología fotosintética	13
2.3.1 Medición de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (FSII)	13
2.3.2 Tasa de transporte de electrones (ETR)	14
2.4 Bioensayos de toxicidad	15
2.5 Análisis estadísticos.....	16

Capítulo 3. Resultados	17
3.1 Características de crecimiento poblacional a diferentes irradiancias.....	17
3.2 Mecanismos de fotoprotección: Procesos de disipación no fotoquímica del FSII (NPQ)	20
3.2.1 Cinética de inducción y disipación del NPQ	20
3.2.2 Recuperación de la eficiencia cuántica máxima del FSII (Fv/Fm) en oscuridad	22
3.2.3 Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores.....	25
3.2.3.1 Inducción y disipación del NPQ en células incubadas con DTT y NH ₄ Cl.....	25
3.2.3.2 Inducción y disipación del NPQ en células expuestas a NH ₄ Cl.....	26
3.2.3.3 Inducción y disipación del NPQ en células expuestas a DTT y NH ₄ Cl.....	28
3.2.4 Actividad fotosintética (ETR-E).....	30
3.3 Efecto de <i>Heterocapsa horiguchii</i> y <i>Heterocapsa cf. circularisquama</i> sobre <i>Brachionus plicatilis</i>	32
3.3.1 <i>Heterocapsa horiguchii</i>	33
3.3.2 <i>Heterocapsa cf. circularisquama</i>	36
 Capítulo 4. Discusión	 40
4.1 Cinética de crecimiento a diferentes irradiancias.....	40
4.2 Fisiología fotosintética y mecanismos de fotoprotección.....	41
4.2.1 Cinética de inducción y disipación del NPQ	41
4.2.2 Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores.....	44
4.2.3 Actividad fotosintética (ETR-E) en <i>H. horiguchii</i> y <i>H. cf. circularisquama</i>	45
4.3 Potencial nocivo de <i>H. horiguchii</i> y <i>H. cf. circularisquama</i>	46
4.3.1 <i>Heterocapsa horiguchii</i>	46
4.3.2 <i>Heterocapsa cf. circularisquama</i>	47
 Capítulo 5. Conclusiones	 51
 Literatura citada	 52

Lista de figuras

Figura	Página
1. Dibujos esquemáticos de algunas especies del género <i>Heterocapsa</i> . Se muestra la forma de la célula, la posición del núcleo (N) y pirenoide (Py). Tomado de Iwataki (2008).	2
2. Posibles maneras de que el exceso de energía de una molécula de clorofila se libere. Tomada y modificada de Müller et al. (2001)	4
3. Curvas de crecimiento de <i>H. horiguchii</i> , cepa A1-B5, cultivada a 16 °C y aclimatada a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	17
4. Curvas de crecimiento de <i>H. horiguchii</i> , cepa G8, cultivada a 16 °C y aclimatada a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	18
5. Curvas de crecimiento de <i>H. cf. circularisquama</i> , aislado D7, cultivada a 16 °C y aclimatada a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	19
6. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de <i>H. horiguchii</i> , cepa A1-B5, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	21
7. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de <i>H. horiguchii</i> , cepa G8, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	21
8. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de <i>H. cf. circularisquama</i> , aislado D7, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	22
9. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) del FSII en oscuridad de células de <i>H. horiguchii</i> , cepa A1-B5, después de ser expuestas a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	23
10. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) del FSII en oscuridad de células de <i>H. horiguchii</i> , cepa G8, después de ser expuestas a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	24
11. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) del FSII en oscuridad de células de <i>H. cf. circularisquama</i> , aislado D7, después de ser expuestas a luz saturante (1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).	24

- 12.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y G8 (B) incubadas con NH₄Cl (300 mM; 10 min) (◆) y DTT (1 mM; 20 min) (■) antes de la exposición a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹; 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). Como control se muestra la respuesta de las células sin inhibidores (▲). Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 25
- 13.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, incubadas con NH₄Cl (300 mM; 10 min) (◆) y DTT (1 mM; 20 min) (■) antes de la exposición a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹; 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). Como control se muestra la respuesta de las células sin inhibidores (▲). Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 26
- 14.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y G8 (B). Se expusieron a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹, 40 min), y posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en que se agregó el NH₄Cl (300 mM). Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 27
- 15.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7. Se expusieron a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹, 40 min), y posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en que se agregó el NH₄Cl (300 mM). Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 28
- 16.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y cepa G8 (B), incubadas con DTT (1mM; 20 min) antes de la exposición a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹, 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en el que se agregó el NH₄Cl (300 mM). Como control (□) se muestra la respuesta de las células incubadas con DTT sin la adición del NH₄Cl a los 20 min. Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 29
- 17.** Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, incubadas con DTT (1mM; 20 min) antes de la exposición a luz saturante (1,400 μmol fotones m⁻² s⁻¹, 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en el que se agregó el NH₄Cl (300 mM). Como control (□) se muestra la respuesta de las células incubadas con DTT sin la adición del NH₄Cl a los 20 min. Las células se cultivaron a 16 °C y estaban aclimatadas a 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 29
- 18.** Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 20 (■), 100 (●) y 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (▲). Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 31
- 19.** Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. horiguchii*, cepa G8. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (▲). Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 31
- 20.** Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (▲). Se presenta el promedio ± DE (n = 3)..... 32

21. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 16 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 100,000 (■) y 116,000 cél ml⁻¹ (■) de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y *Nannochloropsis oculata* (2 x 10⁶ cél ml⁻¹) (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento. 34
22. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 20 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 80,000 (■) y 86,000 cél ml⁻¹ (■) de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y *Nannochloropsis oculata* (2 x 10⁶ cél ml⁻¹) (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento. 34
23. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos a 16 °C (A y B) y 20 °C (C y D), en luz (A y C) y oscuridad (B y D) expuestos al sobrenadante (■) y a la suspensión de células rotas (■) de cultivos de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento..... 36
24. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 16 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■) y 25,000 cél ml⁻¹ (■) de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y *Nannochloropsis oculata* (2 x 10⁶ cél ml⁻¹) (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n=3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento. 37
25. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 20 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 25,000 cél ml⁻¹ (■) y 30,000 cél ml⁻¹ (■) de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y *Nannochloropsis oculata* (2 x 10⁶ cél ml⁻¹) (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n=3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento. 38
26. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos a 16 °C (A y B) y 20 °C (C y D), en luz (A y C) y oscuridad (B y D) expuestos al sobrenadante (■) y a la suspensión de células rotas (■) de cultivos de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) como control. Se presenta el promedio ± DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento. . 39

Lista de tablas

Tabla	Página
<p>1. Abundancias usadas como tratamientos para los bioensayos de exposición directa de <i>B. plicatilis</i> con dos especies de <i>Heterocapsa</i>. T: tratamiento; Cond. Exp: condición experimental; L: luz; O: oscuridad.15</p>	15
<p>2. Máxima abundancia, tasa de crecimiento (μ) y duración de la fase exponencial (FE) de <i>H. horiguchii</i> y <i>H. cf. circularisquama</i> cultivadas a 16 °C y aclimatadas a una irradiancia (E) de 20, 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre irradiancias en la misma cepa, y las mayúsculas indican diferencias significativas entre cepas de <i>H. horiguchii</i> aclimatadas a la misma irradiancia.19</p>	19
<p>3. Parámetros fotosintéticos de células de <i>H. horiguchii</i> y <i>H. cf. circularisquama</i> cultivadas a 16 °C y aclimatadas a una irradiancia (E) de 20, 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. α: ; ETRmax: ; Ek: Irradiancia de saturación. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en una misma cepa.32</p>	32

Lista de abreviaturas

α' = Absortancia

α = Eficiencia fotosintética o pendiente inicial

Chl a = Clorofila "a"

CR = Centros de Reacción

CX = Ciclo de las Xantofilas

Ddx = Diadinoxantina

Dtx = Diatoxantina

DTT = Ditiotreitól, inhibidor de la enzima desepoxidasa

ΔpH = Gradiente de protones formado a través de la membrana del tilacoide

E_k = Irradiancia de saturación

ETR = Tasa de Transporte de Electrones

ETR_{max} = Tasa de Transporte de Electrones máxima

FAN = Florecimientos Algales Nocivos

F_0 = Fluorescencia mínima en células adaptadas a oscuridad

F_m = Fluorescencia máxima en células adaptadas a oscuridad

F_m' = Fluorescencia máxima en células expuestas a luz

$\Delta F/F_m'$ = Eficiencia cuántica efectiva del FSII

FSI = Fotosistema I

FSII = Fotosistema II

F_v/F_m = Eficiencia cuántica máxima del FSII

LB = Tratamiento de Luz Baja, cultivos aclimatados a $20 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

LM = Tratamiento de Luz Media, cultivos aclimatados a $100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

LA = Tratamiento de Luz Alta, cultivos aclimatados a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

NH_4Cl = Cloruro de amonio, inhibe la formación del ΔpH

NPQ = siglas en inglés de "non photochemical quenching", disipación no fotoquímica

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción general

Los dinoflagelados son un componente importante del fitoplancton marino y de agua dulce. Son un grupo diverso y complejo de organismos unicelulares flagelados con aproximadamente 130 géneros y 1200 especies (Jeffrey et al., 1997). *Heterocapsa* es un género de dinoflagelados tecados de tamaño relativamente pequeño (7.4 a 45 μm) (Iwataki, 2008), con importancia ecológica por su representatividad en la comunidad fitoplanctónica en diferentes regiones oceánicas. Además de incluir especies formadoras de florecimientos algales nocivos (FAN), estos eventos asociados a la proliferación de microalgas pueden afectar a la salud pública, la economía y pueden degradar los ecosistemas acuáticos afectando a otros organismos (Reguera et al., 2011).

La acumulación y formación de FAN ocurre cuando se presentan condiciones adecuadas para el crecimiento de las especies fitoplanctónicas. En los organismos fotosintéticos, la irradiancia tiene un papel fundamental al ser la fuente de energía de sus procesos metabólicos. La preferencia de las microalgas por ciertas intensidades de luz se asocia con los ambientes donde se desarrollan, por lo que sus capacidades de fotoaclimatación les confiere ventajas adaptativas (Cooney et al., 2019). Asimismo, los organismos se encuentran expuestos a fluctuaciones en la intensidad de este factor abiótico, y estas variaciones pueden ser moderadas o intensas, cortas o largas, por lo que los organismos han desarrollado mecanismos para optimizar su crecimiento y el proceso de fotosíntesis ante estos cambios (Müller et al., 2001). Sin embargo, se desconocen estos mecanismos fotoprotectores en especies del género *Heterocapsa*, y en general es poca la información disponible sobre la regulación fotosintética ante variaciones de irradiancia en dinoflagelados.

Una de las especies más estudiadas del género *Heterocapsa*, es *H. circularisquama*, causa de grandes pérdidas económicas en la maricultura de Japón desde 1988 (Matsuyama, 2012), asociado a su producción de metabolitos nocivos que actúan sobre diferentes organismos, como moluscos bivalvos (Nagai et al., 1996; Basti et al., 2015) y rotíferos (Kim et al., 2000). Una de las causas de la formación de FAN de especies de *Heterocapsa* es su relativamente alta tasa de crecimiento comparada con otros dinoflagelados. La tasa de crecimiento promedio de los dinoflagelados es de 0.4 día^{-1} (Stolte y Garcés, 2006). Sin embargo, *H. circularisquama* presenta una tasa máxima de crecimiento de 1.3 día^{-1} (Yamaguchi et al., 1997), por lo que está relacionada con una alta acumulación de biomasa de esta especie.

Recientemente se aisló de la Bahía de Todos Santos (BTS) a *H. cf. circularisquama* y a *H. horiguchii*, esta última especie también presenta una tasa de crecimiento relativamente alta de 0.63 día^{-1} (Paredes-Banda, 2020), por lo que tienen el potencial de formar FAN en la BTS bajo las condiciones ambientales adecuadas para su crecimiento. Las dos especies, son recurrentes en la comunidad fitoplanctónica de la BTS, región en donde los cultivos de bivalvos y el cultivo de peces en encierro es una de las actividades económicas más importantes, por lo que el presente trabajo evalúa las características de crecimiento poblacional y mecanismos de fotoprotección en células de *H. cf. circularisquama* y *H. horiguchii* aisladas de la BTS, aclimatadas a diferentes irradiancias, además de evaluar su impacto negativo sobre rotíferos, como indicador de su potencial tóxico.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Género *Heterocapsa*

El género *Heterocapsa* fue descrito por Stein en 1883 e incluye dinoflagelados tecados de tamaño relativamente pequeño, entre $7.4 \mu\text{m}$ (*H. minima*) a $45 \mu\text{m}$ (*H. pacifica*) (Iwataki, 2008). Actualmente se reconocen alrededor de 18 especies dentro del género (Choi y Kim, 2021).

Para la correcta identificación morfológica de las especies es necesario conocer la estructura de las escamas celulares y el patrón de las tecas. No obstante, la forma y tamaño de la célula, así como la posición del núcleo y el pirenoide son diferentes entre especies, por lo que, estas características morfológicas son también útiles para la identificación tentativa de especies. (Iwataki, 2008) (Figura 1).

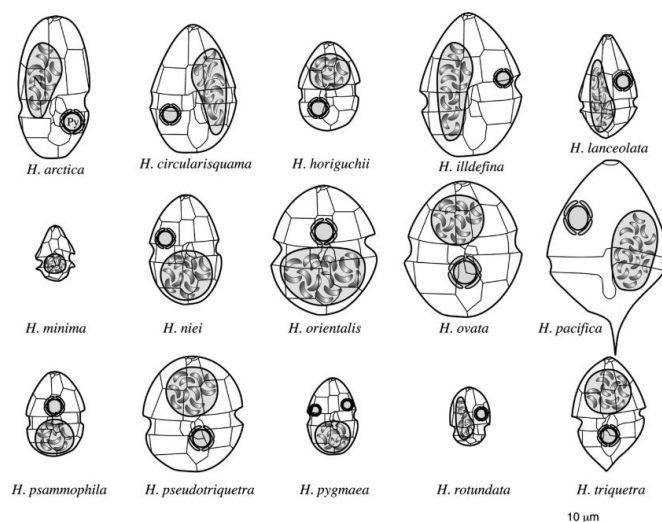


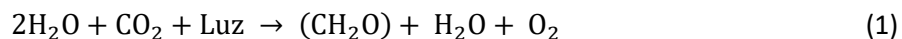
Figura 1. Dibujos esquemáticos de algunas especies del género *Heterocapsa*. Se muestra la forma de la célula, la posición del núcleo (N) y pirenoide (Py). Tomado de Iwataki (2008).

Este género incluye especies cosmopolitas como *H. rotundata* y *H. triquetra*, posiblemente debido a su capacidad de crecer en amplios intervalos de temperaturas (Iwataki, 2008). Por ejemplo, *H. circularisquama* puede crecer entre los 10 a 30 °C, y *H. triquetra* entre los 5 a 25 °C, esta última especie es además eurihalina (Yamaguchi et al., 1997). Asimismo, pueden crecer a diferentes intensidades de luz, desde muy bajas como *H. rotundata* que puede ser cultivada a 12 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cooney et al., 2019), o *H. circularisquama* que puede crecer a irradiancias de 30, 200 o incluso 700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kim et al., 2000; Leong et al., 2006; Nishiguchi et al., 2016). Algunas de las tasas de crecimiento (μ) reportadas para las especies del género son de 0.5 día⁻¹ (*H. rotundata*) (Millette et al., 2015), 0.63 día⁻¹ (*H. horiguchii*) (Paredes-Banda, 2020), 0.95 día⁻¹ (*H. triquetra*) y 1.3 día⁻¹ (*H. circularisquama*) (Yamaguchi et al., 1997).

1.2.2 Fisiología fotosintética

1.2.2.1 Fotosíntesis

La luz es energía electromagnética que tiene naturaleza de ondas y partículas. Cuando la energía de la luz es capturada y almacenada por los organismos se da el proceso de fotosíntesis, que a través de reacciones químicas convierten esta energía lumínica en energía bioquímica. La región del espectro en la que los organismos pueden realizar este proceso va de los 400 a 700 nm, y se conoce como región fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés) (revisado por Blankenship, 2002). La reacción que la describe es la siguiente (Falkowski y Raven, 2007):



En células eucariotas el proceso de fotosíntesis ocurre en los cloroplastos, donde la absorción de la luz y las reacciones primarias se llevan a cabo en las membranas de los tilacoides (Blankenship, 2002). Los fotones son absorbidos en los complejos antena (LHCs, por sus siglas en inglés) que se encuentran asociados con los centros de reacción (CR) (Müller et al., 2001), donde se llevan a cabo las reacciones primarias fotoquímicas que dan inicio a la conversión en energía fotosintética (Krause y Weis, 1991).

1.2.2.2 Mecanismos de fotoprotección

Cuando la molécula de clorofila (Chl) absorbe la luz, esta se excita y pasa a un estado singulete ($^1\text{Chl}^*$), el cual puede regresar a su estado basal a través de distintas vías (Figura 2): 1) La energía puede ser reemitida como fluorescencia; 2) la energía de excitación es transferida a los CR y es utilizada para los procesos fotoquímicos; 3) la energía es liberada en forma de calor, lo que se conoce como de disipación no fotoquímica (NPQ, por sus siglas en inglés); 4) la energía de excitación puede decaer vía el estado triplete de la clorofila ($^3\text{Chl}^*$), que puede transferir energía al estado basal de oxígeno ($^1\text{O}_2^*$), que es una especie reactiva de oxígeno extremadamente dañina (Müller et al., 2001)

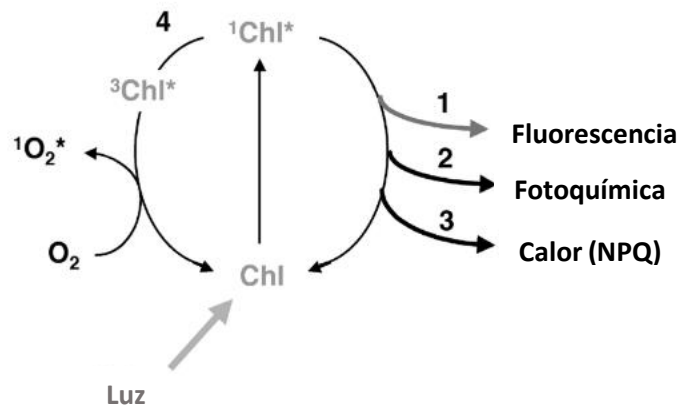


Figura 2. Rutas de desexcitación de una molécula de clorofila a del fotosistema II. Tomada y modificada de Müller et al. (2001)

La fluorescencia es la re-emisión de energía en forma de un fotón (luz) cuando el $^1\text{Chl}^*$ regresa a su estado basal (Cosgrove y Borowitzka, 2010). Debido a que las rutas de desexcitación son competitivas, la fluorescencia es mínima (F_0) cuando los CR se encuentran “abiertos” (Krause y Weis, 1991), es decir, cuando la quinona A (Q_A) que es el aceptor primario de electrones del CR se encuentra oxidada y existe una mayor probabilidad que la energía sea utilizada fotoquímicamente y menor de que sea reemitida como calor o fluorescencia (Cosgrove y Borowitzka, 2010). En contraste, la fluorescencia máxima (F_m) se registra cuando los CR se encuentran “cerrados” o la Q_A completamente reducida, y por lo tanto, la excitación de los CR no puede resultar en una separación de cargas estable (Krause y Weis, 1991).

Las posibles vías de desexcitación de la energía (Figura 2) son complementarias, por lo que se puede estimar el NPQ mediante la medición de la fluorescencia de la Chl si la probabilidad de transferencia de energía a los CR es cero ($qP = 0$), es decir, cuando están cerrados (Müller et al., 2001). Por lo tanto, la medición de la fluorescencia es utilizada como medida indirecta de la activación y disipación de procesos que controlan el NPQ, exponiendo a las células a periodos de oscuridad y luz saturante.

El NPQ permite que las células disipen el exceso de energía de forma segura bajo condiciones de luz en exceso y sobreexcitación de la Chl evitando la formación de $^3\text{Chl}^*$. Este mecanismo de fotoprotección se origina principalmente en los LHCs del fotosistema II (FSII), con la posibilidad de disipar el exceso de energía antes de que llegue a los CR (Ralph et al., 2010). La disipación de calor es un proceso altamente regulado en el que intervienen diversos procesos biofísicos. En el NPQ se han identificado al menos tres componentes con cinéticas diferentes. El componente más rápido (segundos a minutos) es el componente “dependiente de la energía” o qE , y es controlado por la formación del gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide (ΔpH). El componente qT , se asocia a los “estados de transición”, que es el desacople de los complejos antena del FSII lo que conlleva una reducción de la cantidad de energía de excitación del FSII y una reducción de F_m , este proceso ocurre en el orden de decenas de minutos. Por último, el tercer componente es el qI , que está relacionado a la reducción de la emisión del FSII al existir una fotoinhibición de este sistema, es el componente con la cinética de inducción y disipación más lenta (horas) (Müller et al., 2001). La maquinaria que activa los procesos relacionados con el control del NPQ ha sido ampliamente caracterizado en plantas y en diferentes grupos de macroalgas y microalgas, como diatomeas, cianobacterias y proclorofitas (Goss y Lepetit, 2015). Sin embargo, la caracterización del NPQ y los componentes que intervienen han sido poco estudiados en dinoflagelados.

En el control del NPQ interviene el ciclo de las xantofilas (CX) (Müller et al., 2001), que involucra la interconversión de carotenoides como estrategia de fotoprotección. Existen dos tipos de CX, el ciclo de la violaxantina (Vx) está presente en plantas vasculares, algas pardas y algas verdes, y el ciclo de la diadinoxantina (Ddx), presente en bacilariofitas, xantofitas, haptofitas y en los dinoflagelados. Este ciclo consiste en la desepoxidación de la Ddx a diatoxantina (Dtx) en condición de luz alta, y la epoxidación de la Dtx a Ddx en condición de luz baja o en oscuridad (Goss y Jakob, 2010). Ambas reacciones se encuentran catalizadas por dos enzimas diferentes (Demmig-Adams y Adams, 1993), la Ddx desepoxidasa (DDE) y la Dtx epoxidasa (DEP) (Goss y Jakob, 2010).

Para identificar la participación de algún componente específico del NPQ, es común utilizar inhibidores bioquímicos. El ditiotreitól (DTT) es un inhibidor que actúa sobre DDE, por lo que la activación del NPQ

asociado con la presencia de pigmentos desepoxidados, como la zeaxantina y la Dtx no se induce (Demmig-Adams y Adams, 1993). Otro inhibidor comúnmente usado es el cloruro de amonio (NH_4Cl), que es un desacoplador del transporte de electrones, cuyo mecanismo de acción es la interrupción del ΔpH , lo que inhibe la síntesis del ATP (Ralph et al., 2010), el ΔpH es necesario para la activación del componente rápido del NPQ, el qE.

1.2.2.3 Fotoprotección en dinoflagelados

Se han realizado diversos trabajos sobre los mecanismos de fotoprotección tanto en macroalgas (Colombo-Pallotta et al., 2006; García-Mendoza y Colombo-Pallotta, 2007; Schubert, 2008) como en microalgas, donde uno de los grupos más estudiados son las diatomeas (Goss y Lepetit, 2015).

En dinoflagelados la mayoría de los estudios sobre mecanismos de fotoprotección se han enfocado en especies simbiotes del género *Symbiodinium* (Iglesias-Prieto y Trench, 1997; Hoegh-Guldberg y Jones, 1999; Rodríguez-Román y Iglesias-Prieto, 2005; Warner et al., 2006; Lombardo-Cifuentes, 2011). Al día de hoy existen pocos estudios sobre los mecanismos de fotoprotección en dinoflagelados generadores de FAN y en específico sobre la participación de los componentes del NPQ en estos organismos (Murillo-Martínez, 2015; Cui et al., 2017).

El aparato fotosintético de los dinoflagelados incluye las antenas periféricas recolectoras de luz formadas por el complejo peridina-chl α -proteína (PCP) y el complejo chl α -chl c_2 -peridina-proteína (acpPC) unidos a la membrana (Iglesias-Prieto y Trench, 1997). En un estudio comparativo de tres especies de *Symbiodinium*, se encontró que al exponer a las células a una misma irradiancia, cada especie presenta una capacidad de fotoaclimatación diferente, con una distribución única de la clorofila en sus complejos antena y del arreglo del aparato fotosintético (Iglesias-prieto y Trench, 1994, 1997).

Se ha propuesto que los complejos acpPC y PCP pueden desacoplarse del FSII una vez que la capacidad máxima del CX para disipar el exceso de energía se agota (revisado por Goss y Lepetit, 2015). Asimismo, Hill et al. (2012) mencionan que el complejo acpPC en *Symbiodinium* spp. muestra una respuesta similar a los estados de transición en plantas superiores y redistribuyen la energía hacia el FSI con la finalidad de reducir la sobre-excitación del FSII, esta aparente disociación/relocalización fue promovida por la adición de DTT bajo condiciones altas de luz.

Por otro lado, Lombardo-Cifuentes (2011) y Murillo-Martínez (2015) observaron que al exponer células de *Symbiodinium* spp. y de *Gymnodinium catenatum* a luz saturante, la inducción del NPQ es lenta, con un tiempo medio de inducción entre 7 y 11 min, lo que indica que el componente rápido del NPQ asociado con la protonación de la membrana del tilacoide (el componente qE) no se encuentra presente en estos dinoflagelados. También mencionan que el principal mecanismo asociado a la disipación del exceso de energía en estos organismos es el CX, dependiendo de la presencia de pigmentos desepoxidados, como la Dtx. Asimismo, plantean la existencia de un NPQ independiente del CX y del ΔpH que afecta la emisión del FSII, con la propuesta de que la naturaleza de este otro mecanismo es de tipo qT o asociado a la reducción de antena del FSII, probablemente similar a los estados de transición descritos en plantas superiores o algas verdes (Lombardo-Cifuentes, 2011).

En contraste, para *Karlodinium veneficum*, un dinoflagelado generador de FAN y productor de karlotoxinas, Cui et al. (2017) reportan que el componente qE representa uno de los principales componentes del NPQ, con una saturación del NPQ en aproximadamente 2 min. De manera interesante, en este dinoflagelado se registró la presencia de la proteína fototropina-2 (PHOT2), por lo que estos autores plantean que *K. veneficum* puede llevar a cabo movimiento de los cloroplastos para reducir la absorción de fotones por estos organelos.

1.2.3 Potencial nocivo del género *Heterocapsa*

El género *Heterocapsa* incluye especies generadoras de FAN. Estos eventos pueden estar asociados a la acumulación de biomasa, lo que ocasiona la degradación de las condiciones ambientales debido a la acumulación de materia orgánica (García-Mendoza et al., 2016), reducción de los niveles de oxígeno, aumento del pH y atenuación de la luz (Tas, 2015). *H. triquetra* y *H. rotundata* tienen el potencial de generar este tipo de FAN. En México únicamente se ha reportado el florecimiento de esta última especie en Veracruz en el 2013 (abundancias máximas de 110,740 cél ml⁻¹) (Aké-Castillo et al., 2016). Asimismo, se han registrado FAN de *H. triquetra* (2,850 cél ml⁻¹) y *H. niei* (2,522 cél ml⁻¹) en estanques de cultivo de peces y camarones del CIBNOR (Gárate-Lizarraga et al., 2006).

Por otro lado, existen los FAN formados por microalgas productoras de metabolitos nocivos (toxinas) que pueden tener un efecto dañino sobre otros organismos. *H. circularisquama* y *H. bohaisensis* son especies productoras de toxinas de tipo hemolítico (Oda et al., 2001; Zhang et al., 2019), con un mecanismo de

acción diferente en cada especie. *H. circularisquama* ha sido ampliamente estudiada por las grandes pérdidas económicas derivadas de los FAN de esta especie. Desde 1988, estos fenómenos han provocado mortandades de diferentes moluscos bivalvos cultivados en las costas de Japón (Matsuyama, 2012). Se ha encontrado que la especie tiene un efecto tóxico sobre rotíferos (Kim et al., 2000) y tintínidos (Kamiyama y Arima, 1997). En particular, Kim et al. (2000) mencionan que el efecto tóxico sobre los rotíferos al ser expuestos a células vivas depende de la abundancia y el tiempo de exposición, observando una mortandad del 100 % de estos organismos al ser expuestos a 10^5 cél ml⁻¹ por 5 h.

Se ha propuesto que para que exista un efecto nocivo de *H. circularisquama* es necesario el contacto directo y que las células estén vivas, ya que el metabolito tóxico probablemente se encuentre en la superficie de las células (Nagai et al., 1996; Matsuyama et al., 1997; Kim et al., 2000). Por otro lado, diversos autores han encontrado que no existe un efecto tóxico del sobrenadante o de la suspensión de células rotas de cultivos de *H. circularisquama* sobre diferentes organismos, incluidos los rotíferos (Nagai et al., 1996; Kamiyama y Arima, 1997; Matsuyama et al., 1997; Kim et al., 2000). Sin embargo, Nishiguchi et al. (2016) encontró actividad hemolítica dependiente de la luz en la suspensión de células rotas sobre eritrocitos de conejo.

Se ha considerado la posibilidad de que el compuesto tóxico sea inestable y fácilmente desactivado una vez liberado de la superficie celular (Matsuyama et al., 1997; Daekyung Kim et al., 2000). En consecuencia, Oda et al. (2001) observaron que el compuesto tóxico era más estable al realizar un extracto celular con etanol (libre de células). Este extracto presenta actividad hemolítica dependiente de la concentración y del tiempo de exposición sobre eritrocitos de conejo y células HeLa (Oda et al., 2001; Sato et al., 2002). Además, esta actividad hemolítica es dependiente de la presencia de luz (Sato et al., 2002). Asimismo, Nishiguchi et al. (2016) encontró un efecto citotóxico del extracto de etanol sobre otras especies fitoplanctónicas formadoras de FAN, como *Chattonella marina* y *Karenia mikimotoi*, incluso sobre células de *H. circularisquama*, provocando cambios morfológicos de la célula.

Al purificar el extracto de etanol obtenido de cultivos de *H. circularisquama*, Miyazaki et al. (2005) encontraron un compuesto que nombraron H2-a. En su estructura química tiene un anillo de pirrol, lo que sugiere que este compuesto fotosensibilizador puede ser un derivado de la porfirina. Nishiguchi et al. (2016) mencionan que *H. circularisquama* contiene al menos dos compuestos hemolíticos con una dependencia diferente a la luz: 1) Actividad hemolítica independiente de la luz asociada con las células intactas; 2) Actividad hemolítica dependiente de la luz asociada con sustancias liberadas al romperse las

células. Sin embargo, esta actividad dependiente de la luz, no se observó en rotíferos, solo sobre eritrocitos de conejo.

Por otro lado, se ha documentado que *H. bohaisensis* tiene un efecto tóxico sobre larvas de langostino y cangrejo (Xiao et al., 2018), así como sobre rotíferos (*Brachionus plicatilis*), con actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo (Zhang et al., 2019). En este caso, el efecto letal es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, que ocasiona la muerte de rotíferos a las 24 h de ser expuestos a 10^5 cél ml⁻¹ y pueden sobrevivir con abundancias $\leq 1,000$ cél ml⁻¹. Contrario a *H. circularisquama*, se observó un efecto letal de la suspensión de células rotas sobre el rotífero *B. plicatilis*. Sin embargo, no se encontró una dependencia del efecto tóxico (por exposición directa) ni de la actividad hemolítica (sobre *B. plicatilis* o eritrocitos de conejo) de la especie *H. bohaisensis* respecto a la luz (Zhang et al., 2019). Al día de hoy no se ha caracterizado el componente activo de la toxina de esta especie.

1.3 Justificación

Heterocapsa es un género habitual de la comunidad fitoplanctónica en la Bahía de Todos Santos (BTS) (Fimbres-Martínez, 2019). En esta región se ha registrado la presencia de *H. cf. circularisquama*, *H. cf. horiguchii*, *H. cf. minima* y *H. cf. pseudotriquetra* (Almazán-Becerril et al., 2016). Recientemente se aisló a *H. horiguchii* (Paredes-Banda, 2020) y *H. cf. circularisquama*, ambas especies presentan una tasa de crecimiento alta (Yamaguchi et al., 1997; Paredes-Banda, 2020). Asociado a esta característica de crecimiento, existe la posibilidad de que estos dos dinoflagelados puedan dominar la comunidad fitoplanctónica de la BTS y formar florecimientos algales con potencial nocivo. *H. circularisquama* es productora de toxinas hemolíticas y presenta dos compuestos con diferente dependencia a la luz, uno de estos es el H2-a, un compuesto fotosensibilizador derivado probablemente de la porfirina ya que incluye un anillo de pirrol en su estructura química (Miyazaki et al., 2005; Nishiguchi et al., 2016). Esta especie ha generado FAN en otras regiones del mundo ocasionando grandes pérdidas económicas (Matsuyama, 2012). En México no se han reportado FAN asociados a este dinoflagelado, por lo que es importante evaluar el potencial nocivo de estas dos especies aisladas de la BTS.

Los FAN se producen bajo las condiciones óptimas de crecimiento de las especies fitoplanctónicas, la irradiancia juega un papel fundamental en los organismos fotosintéticos, y estos se encuentran sujetos a grandes variaciones de este recurso, por lo que han desarrollado mecanismos para optimizar su

crecimiento y procesos fotosintéticos (Müller et al., 2001). La información sobre estos mecanismos es escasa en dinoflagelados y particularmente, en el género *Heterocapsa*, por lo que es importante evaluar la respuesta fisiológica (crecimiento, fotoaclimatación y mecanismos de fotoprotección) de *H. cf. circularisquama* y *H. horiguchii* a diferentes irradiancias.

1.4 Hipótesis

Heterocapsa horiguchii y *Heterocapsa cf. circularisquama* aisladas de la Bahía de Todos Santos producen metabolitos tóxicos, y su potencial nocivo se encuentra influenciado por los procesos de regulación fotosintética.

1.5 Objetivos

1.5.1 General

Evaluar las características fotosintéticas de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* aisladas de la Bahía de Todos Santos en diferentes condiciones de cultivo, y su potencial nocivo sobre rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*.

1.5.2 Particulares

Caracterizar la tasa de crecimiento poblacional de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* a diferentes irradiancias.

Evaluar los mecanismos de fotoprotección de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* a diferentes irradiancias.

Evaluar el posible efecto tóxico de la exposición directa de diferentes abundancias de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* sobre el rotífero *Brachionus plicatilis*.

Evaluar el posible efecto tóxico del contenido intracelular y extracelular de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* sobre rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Cepas y mantenimiento de los cultivos

Se utilizaron dos cepas de *Heterocapsa horiguchii* aisladas de muestras de agua de la Bahía de Todos Santos colectadas en el 2016 (G8 de Salsipuedes y A1-B5 de Punta Banda; Paredes-Banda, 2020) y el aislado de *Heterocapsa cf. circularisquama* (D7), obtenido en el 2019 de muestras de agua de la BTS. Las cepas fueron mantenidas en medio L1 (Guillard y Hargraves, 1993) a 16 y 20 °C con una irradiancia de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente y un fotoperiodo de 12:12 h luz:oscuridad.

2.2 Crecimiento a diferentes irradiancias

Se evaluó el crecimiento poblacional y la fisiología fotosintética de *H. horiguchii* (G8 y A1-B5) y *H. cf. circularisquama* (D7) aclimatadas a dos irradiancias (100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se utilizaron tres irradiancias (20, 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sólo para A1-B5. De acuerdo a Paredes-Banda (2020) se consideró 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como luz media (LM), por lo que se asigna al tratamiento de 20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como luz baja (LB) y al de 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como luz alta (LA). La aclimatación de las cepas a las diferentes condiciones experimentales se realizó con transferencias semanales de los cultivos en fase exponencial por al menos tres semanas en cada condición.

Las abundancias se determinaron por conteo celular fijando 1 ml del cultivo con Lugol al 5 % aproximadamente de concentración final (acorde con Andersen (2005), 1 gota de lugol a 5 ml de muestra es 1 % de concentración final). Los conteos se realizaron con un hematocitómetro o cámara de Neubauer (Hausser Scientific) con una profundidad de 0.1 mm, usando un microscopio invertido (Leica modelo DMIL) a un objetivo de 20x. Los conteos se realizaron por triplicado cada dos días. Se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) con la fórmula propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad (2)$$

donde “ N_t ” es la abundancia final (cél ml⁻¹), “ N_0 ” la abundancia inicial (cél ml⁻¹), y “ Δt ” es el periodo de tiempo. El cambio en la abundancia celular se ajustó al modelo de crecimiento de Gompertz, se utilizó el programa SigmaPlot v10.0.

2.3 Fisiología fotosintética

2.3.1 Medición de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (FSII)

La emisión de la fluorescencia de la clorofila a (Chl-*a*) del FSII se midió con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (Diving PAM, Walz, Alemania) con una luz de medición de 428 nm (LED azul). La nomenclatura y parámetros utilizados fueron los descritos por Van Kooten y Snel (1990).

Para el cálculo de la eficiencia cuántica máxima del FSII (F_v/F_m) y la disipación no fotoquímica del FSII (NPQ, por sus siglas en inglés), se utilizaron cultivos en fase exponencial. Las células se mantuvieron en oscuridad por 20 min antes de realizar las mediciones de fluorescencia correspondientes. La fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$) es la diferencia entre la fluorescencia máxima (F_m) al exponer a las células a un pulso de luz saturante (3,000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 0.8 s) y la fluorescencia basal (F_0) se mide al exponer las células únicamente a la luz de medición.

La cinética de F_v/F_m y del NPQ se monitorearon durante la exposición de los cultivos a luz saturante de aproximadamente 1,400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 30 min, se utilizó como fuente de luz un simulador solar (Solar Sun 2000, ABET Technologies). Concluido este tiempo, se apagó la luz con la finalidad de evaluar la disipación del NPQ y la recuperación de F_v/F_m en oscuridad por 30 min. Las mediciones de fluorescencia se realizaron cada minuto. El NPQ se calculó como $(F_m - F_m')/F_m'$, donde F_m' es la fluorescencia máxima obtenida durante la exposición a la luz saturante (30 min) y en el periodo de oscuridad (30 min).

Asimismo, se evaluó la cinética del NPQ en células incubadas con cloruro de amonio (NH_4Cl), que inhibe la formación del gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, y el ditiotreitól (DTT) que inhibe a la enzima diadinoxantina-desepoxidasa. El procedimiento de medición de la fluorescencia fue similar a lo descrito anteriormente, sólo que, en este caso, los cultivos se incubaron con DTT (1 mM) por 20 min o con NH_4Cl (300 mM) por 10 min, o en su defecto se agregó a las células a los 20 min de exposición

a la luz saturante (Detalles en sección 3.2.3: Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores).

2.3.2 Tasa de transporte de electrones (ETR)

La actividad fotosintética estimada como tasa de transporte de electrones a través del FSII (ETR, por sus siglas en inglés), se calculó de acuerdo a Rodríguez-Román y Iglesias-Prieto (2005):

$$\text{ETR} = \Delta F/\text{Fm}' * E * \alpha'/2 \quad (3)$$

donde las mediciones de la eficiencia cuántica efectiva del FSII ($\Delta F/\text{Fm}'$) se registraron con el Diving PAM cada minuto de exposición de las células a nueve irradiancias consecutivas dentro del intervalo de 10 a 2,100 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las células se mantuvieron en oscuridad por 20 min previo a las mediciones correspondientes; se expusieron 5 min a cada intensidad, de los cuales los primeros 2 min se contaron como transición, para el cálculo del ETR se utilizó el promedio de $\Delta F/\text{Fm}'$ de los últimos 3 min en cada irradiancia (E). La absortancia (α') que se refiere a la cantidad de luz relativa absorbida por las células, calculada acorde a Rodríguez-Román y Iglesias-Prieto (2005) como:

$$\alpha' = 1 - (L_1/L_2) \quad (4)$$

donde L_1 es la cantidad de luz medida con un espectroradiómetro con un sensor 2π (ILT900-W) después de pasar a través de la suspensión de células de *H. horiguchii* (A1 y G8) o *H. cf. circularisquama* (D7), y L_2 es la cantidad de luz medida en las mismas condiciones, pero pasando sólo a través del medio L1, sin células. Las mediciones de absortancia se realizaron 3 veces, y se utilizó el valor promedio para los cálculos de ETR.

Se realizó un ajuste de los datos a una función tangente hiperbólica de Jassby y Platt (1976), usando el software SigmaPlot v.10.0. Los parámetros fotosintéticos calculados a partir del ajuste fueron la tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax), la pendiente inicial o la eficiencia fotosintética (α), y la irradiancia de saturación (E_k) que es igual a la ETRmax dividida entre la eficiencia fotosintética.

2.4 Bioensayos de toxicidad

Se evaluó el potencial nocivo de *H. horiguchii* (G8) y *H. cf. circularisquama* (D7) aisladas de la BTS sobre rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*. Se utilizaron células en fase exponencial tardía de crecimiento previamente aclimatadas a las dos temperaturas experimentales (16 y 20 °C) y a 100 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los rotíferos fueron donados por el Dr. Conan David True (UABC). Los organismos se concentraron con un tamiz con luz de malla de 62 μm para resuspenderlos en aproximadamente 500 ml de agua de mar estéril con aireación a temperatura ambiente y siguiendo lo descrito por Zhang et al. (2019), los organismos se mantuvieron sin alimento por 12 h previo a los experimentos.

De acuerdo a Miyazaki et al. (2005), los bioensayos se realizaron en microplacas de 96 pozos, se colocaron 10 rotíferos por pozo, cada tratamiento se realizó por triplicado. Se contabilizó el número de rotíferos viables a las 6, 12 y 24 h del experimento con un estereoscopio (Zeiss, Stemi 5). Se tomó como criterio de afectación (no viables) la ausencia de nado activo de los organismos. Se evaluó el efecto de la luz sobre la probable toxicidad de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*, manteniendo las microplacas en luz u oscuridad durante el experimento. Se realizaron tres tipos de bioensayos siguiendo lo descrito por Kim et al. (2000) y Zhang et al. (2019):

Exposición directa: Con la finalidad de evaluar el efecto de las células vivas sobre los rotíferos, estos se expusieron a diferentes abundancias de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* (detalles en la Tabla 1). Las concentraciones se obtuvieron a partir de diluciones de la abundancia máxima alcanzada en los cultivos. Los tratamientos control fueron la exposición de los rotíferos a *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 cél ml^{-1}) y manteniéndolos sin microalgas, sólo en medio L1.

Tabla 1. Abundancias de dos especies de *Heterocapsa* usadas en los tratamientos de los bioensayos de exposición directa de *B. plicatilis*. T: tratamiento; Cond. Exp: condición experimental; L: luz; O: oscuridad.

T/ Con. Exp.	<i>H. horiguchii</i>		<i>H. cf. circularisquama</i>	
	16 °C (L/O)	20 °C (L/O)	16 °C (L/O)	20 °C (L/O)
	Abundancia (cél ml^{-1})		Abundancia (cél ml^{-1})	
1	116,000	86,000	na	30,000
2	100,000	80,000	25,000	25,000
3	10,000	10,000	10,000	10,000
4	1,000	1,000	1,000	1,000
5	100	100	100	100

na: no aplica (la abundancia máxima alcanzada en esta condición experimental fue de aprox. 25,000 cél ml^{-1})

Exposición al sobrenadante del cultivo: Se centrifugaron (3,000 rpm, 20 min) 15 ml de cultivo con la máxima abundancia obtenida en cada condición experimental (Tabla 1). Se comprobó al microscopio la integridad de las células. El sobrenadante se mantuvo en refrigeración hasta realizar el experimento (no más de 12 h) y se utilizó para el tratamiento de exposición con los rotíferos. El tratamiento control fue la exposición de los rotíferos a medio L1.

Exposición a suspensión de células rotas: Se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivos con la máxima abundancia obtenida en cada condición experimental (Tabla 1). Las células de *H. horiguchii* (G8) y *H. cf. circularisquama* (D7) se rompieron de manera mecánica con un mini Bead-beater (Biospec Inc.) y se confirmó al microscopio la ruptura de las mismas. La suspensión resultante se mantuvo en refrigeración hasta realizar el experimento (no más de 12 h) y se utilizó para el tratamiento de exposición con los rotíferos. El tratamiento control fue la exposición de los rotíferos a medio L1.

2.5 Análisis estadísticos

Con la finalidad de evaluar posibles diferencias significativas entre tratamientos en los diferentes experimentos, se realizaron los análisis estadísticos t-student o ANOVAs dependiendo el caso. En el caso de que los datos no cumplieran con supuesto de homocedasticidad (Bartlett) se realizaron los análisis de Mann-Whitney o Kruskal Wallis. Se utilizó el programa Statistica v.7.1.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Características de crecimiento poblacional a diferentes irradiancias

Se evaluó el crecimiento de *H. horiguchii* (A1-B5 y G8) y de *H. cf. circularisquama* (D7) mantenidas a 16 °C y aclimatadas a luz media (LM: 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y alta (LA: 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No fue posible evaluar el crecimiento de *H. horiguchii*, cepa G8, y *H. cf. circularisquama* a luz baja (LB: 20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

La cepa A1-B5 de *H. horiguchii*, presentó la mayor abundancia ($133,333 \pm 36,122 \text{ cél ml}^{-1}$) en los cultivos aclimatados a LM. En LA y LB, los cultivos alcanzaron una abundancia aproximada de 85,000 cél ml^{-1} (Figura 3). No se encontraron diferencias significativas de la máxima abundancia ($p > 0.05$) entre las tres aclimataciones de luz. La cinética de crecimiento de los cultivos acondicionados a LA y LM fue similar, con una fase de acondicionamiento corta, comenzando la fase exponencial (FE) en el primer día de cultivo. La FE duró en promedio seis días. En contraste, en los cultivos aclimatados a LB, el crecimiento fue notablemente más lento, con una FE larga de aproximadamente 36 días (Figura 3). Respecto a las tasas de crecimiento (μ), las más altas se presentaron en los cultivos aclimatados a LM ($0.53 \pm 0.04 \text{ día}^{-1}$) y LA ($0.46 \pm 0.02 \text{ día}^{-1}$), ambas significativamente mayores ($p < 0.001$) que la registrada en LB ($0.08 \pm 0.02 \text{ día}^{-1}$) (Tabla 2).

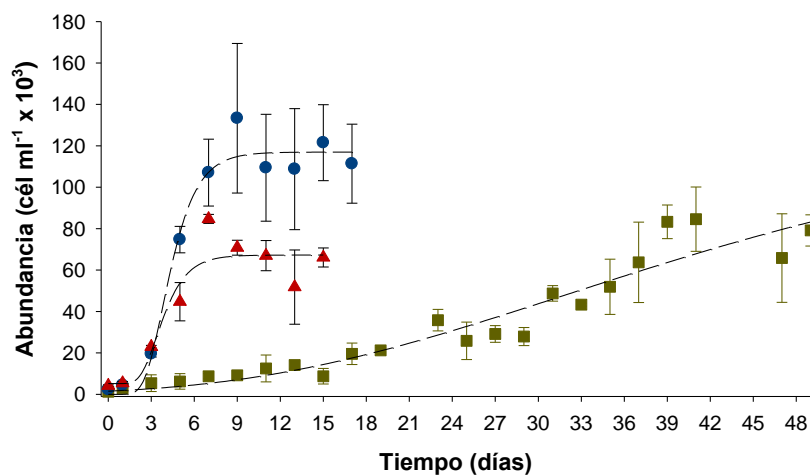


Figura 3. Curvas de crecimiento de *H. horiguchii*, cepa A1-B5, cultivada a 16 °C y aclimatada a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

En la cepa G8 de *H. horiguchii*, la mayor abundancia se registró en LA ($101,851 \pm 12,878$ cél ml⁻¹), sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con la máxima abundancia alcanzada en LM ($88,888 \pm 15\,277$ cél ml⁻¹) (Figura 4). En ambas irradiancias, la FE duró aproximadamente cuatro días. La tasa de crecimiento en LA fue de 0.83 ± 0.14 día⁻¹, significativamente mayor ($p < 0.05$) que en LM, con un valor de 0.57 ± 0.03 día⁻¹ (Tabla 2).

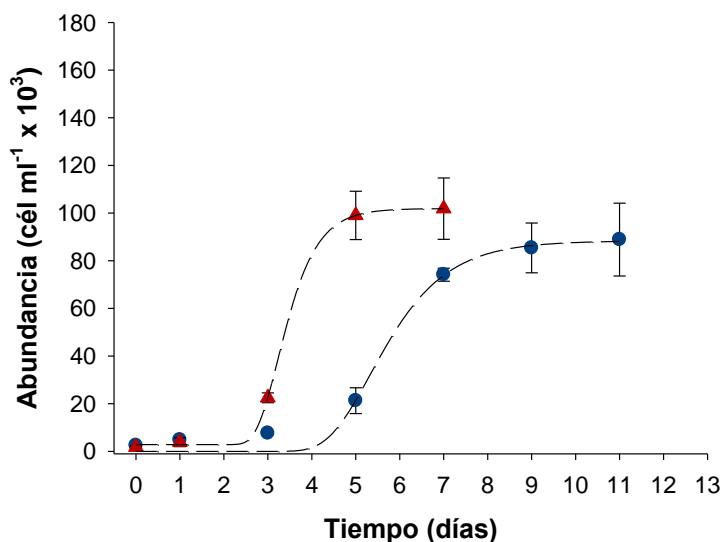


Figura 4. Curvas de crecimiento de *H. horiguchii*, cepa G8, cultivada a 16 °C y aclimatada a 100 (●) y 260 μmol fotones m⁻² s⁻¹ (▲). Se presenta el promedio ± DE (n = 3).

En el caso de *H. cf. circularisquama* (D7), la abundancia registrada en los cultivos aclimatados a LM ($41,388 \pm 1,969$ cél ml⁻¹) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en LA ($27,500 \pm 6,222$ cél ml⁻¹) (Figura 5). En ambas condiciones de luz, los cultivos presentaron una FE de aproximadamente seis días, con una tasa de crecimiento de 1.00 ± 0.22 día⁻¹ en LA que fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que la registraba en LM, de 0.36 ± 0.11 día⁻¹ (Tabla 2).

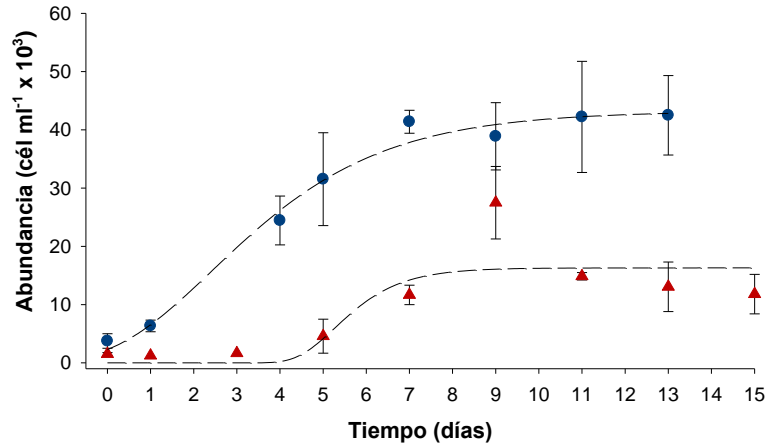


Figura 5. Curvas de crecimiento de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, cultivada a 16 °C y aclimatada a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

Comparando las cepas de *H. horiguchii* a una misma irradiancia de crecimiento, sólo la μ de la cepa G8 cultivada a 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.83 ± 0.14) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que en la cepa A1-B5 cultivada a la misma irradiancia (0.46 ± 0.02). La duración de la FE de la cepa A1-B5 de *H. horiguchii* (a excepción de LB) fue similar a la registrada en *H. cf. circularisquama*, con una duración aproximada de seis días. La FE de la cepa G8 de *H. horiguchii* en LM y LA fue de aproximadamente 4 días (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia máxima, tasa de crecimiento (μ) y duración de la fase exponencial (FE) de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* cultivadas a 16 °C y aclimatadas a una irradiancia (E) de 20, 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre irradiancias en la misma cepa, y las mayúsculas indican diferencias significativas entre cepas de *H. horiguchii* aclimatadas a la misma irradiancia.

Especie	Cepa	E	Abundancia máxima (día que alcanzó la fase estacionaria) (cél ml ⁻¹)	μ (día ⁻¹)	FE
<i>H. horiguchii</i>	A1	20	84,583 \pm 15,528 (Día 41) ^a	0.08 \pm 0.02 ^b	Día 3 al 39
		100	133,333 \pm 36,122 (Día 9) ^{aA}	0.53 \pm 0.04 ^{aA}	Día 1 al 7
		260	84,722 \pm 2,169 (Día 7) ^{aA}	0.46 \pm 0.02 ^{aB}	Día 1 al 7
	G8	100	88,888 \pm 15,277 (Día 11) ^{aA}	0.57 \pm 0.03 ^{bA}	Día 3 al 7
		260	101,851 \pm 12,878 (Día 7) ^{aA}	0.83 \pm 0.14 ^{aA}	Día 1 al 5
<i>H. cf. circularisquama</i>	D7	100	41,388 \pm 1,969 (Día 7) ^a	0.36 \pm 0.11 ^b	Día 1 al 7
		260	27,500 \pm 6,222 (Día 9) ^b	1.00 \pm 0.22 ^a	Día 3 al 9

3.2 Mecanismos de fotoprotección: Procesos de disipación no fotoquímica del FSII (NPQ)

3.2.1 Cinética de inducción y disipación del NPQ

Similar a la caracterización del crecimiento, se evaluó la respuesta de fotoprotección en células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 aclimatadas a tres condiciones de irradiancia (LB, LM y LA). En la cepa G8 y en el aislado de *H. cf. circularisquama*, se evaluó sólo en LM y LA.

En la cepa A1-B5 de *H. horiguchii*, la mayor inducción del NPQ se detectó en las células aclimatadas a LB (2.52 ± 0.27), seguido de LA (2.26 ± 0.08) y por último en LM (2.00 ± 0.21) (Figura 6). Únicamente se encontraron diferencias significativas del NPQ máximo entre LB y LM ($p < 0.05$). En las tres aclimataciones al primer minuto de exposición de las células a luz saturante, se presentó una inducción del NPQ significativa. La activación del NPQ fue relativamente más rápida en LM y LA, con un tiempo medio de inducción aproximado de 3 min, y una inducción inicial del 37 y 39 % del NPQ máximo. En comparación, las células aclimatadas a LB presentaron un $t_{1/2}$ de aproximadamente 5 min, con un NPQ al minuto de luz saturante del 19 % del valor final.

La cinética de disipación en oscuridad del NPQ formado en luz, fue similar en las tres condiciones. Se observó una disminución significativa del NPQ (26 – 34 %) en el primer minuto de oscuridad, seguido de una disminución de la velocidad de disipación de este parámetro y después de 10 min disminuyó aún más la tasa de disipación del NPQ. En ninguna de las condiciones se presentó una disipación completa del NPQ después de 30 min en oscuridad (Figura 6), con un NPQ remanente del máximo detectado del 30 % en LB, 27 % en LM y 18 % en LA.

La cinética de inducción y disipación del NPQ fue similar en la cepa A1-B5 y G8 de *H. horiguchii*. En esta última, el NPQ máximo en LM fue de 2.13 ± 0.13 , con un $t_{1/2}$ aproximado de 3 min y una activación inicial en el primer minuto del 25 % del valor máximo. En LA el NPQ máximo fue de 1.83 ± 0.09 , con un $t_{1/2}$ aproximado de 1 min y una activación al minuto del 52 % de este (Figura 7). No se encontraron diferencias significativas del NPQ máximo entre aclimataciones ($p > 0.05$). En la cepa G8, la disminución inicial del NPQ en oscuridad fue del 23 % en LM y LA, con un NPQ remanente a los 30 min del 29 % en LM y del 19 % en LA.

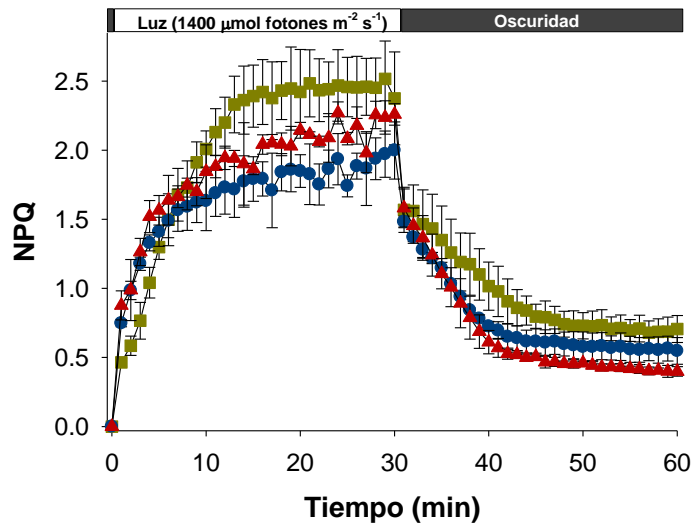


Figura 6. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

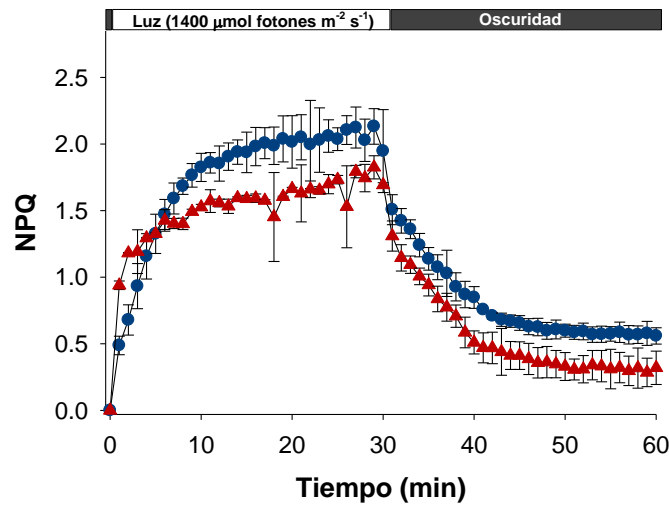


Figura 7. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa G8, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

La cinética de inducción y disipación del NPQ en *H. cf. circularisquama* fue diferente a la observada en *H. horiguchii*. Los valores máximos fueron de 1.80 ± 0.08 en LM y de 2.03 ± 0.27 en LA (Figura 8). No hubo diferencias significativas del NPQ máximo alcanzado entre aclimataciones ($p > 0.05$). La velocidad de inducción fue más lenta que en *H. horiguchii*, con un $t_{1/2}$ aproximado de 7 min en LM y 5 min en LA. Esta

inducción más lenta se ve reflejada en una activación inicial del NPQ mucho menor en esta especie en comparación con *H. horiguchii*. En *H. cf. circularisquama*, se detectó sólo un 4 y 8 % de activación inicial respecto al NPQ final en LM y LA, respectivamente.

La disipación del NPQ en *H. cf. circularisquama*, al igual que en *H. horiguchii*, presentó una disminución significativa al primer minuto de entrar en oscuridad (26 % en LM y 42 % en LA), sin embargo, en este aislado la tasa de disipación después de este tiempo fue constante, hasta alcanzar un NPQ remanente de 28 % en LM y de 9 % en LA.

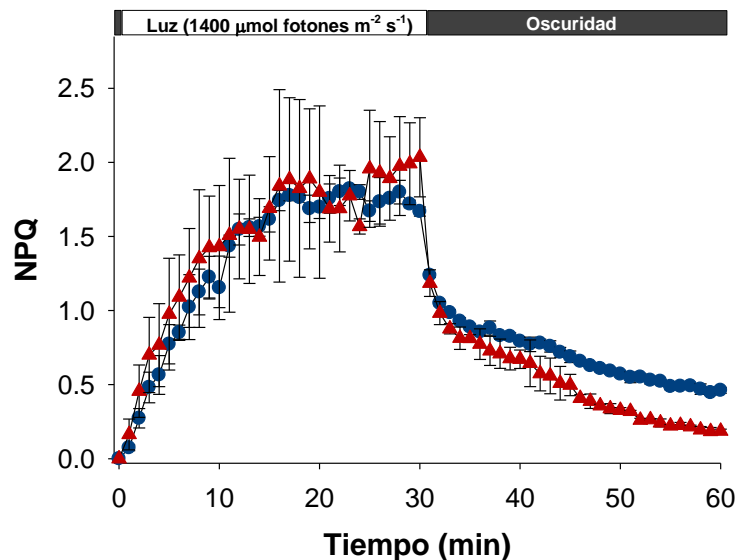


Figura 8. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, cultivadas a 16 °C y aclimatadas a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Las células se expusieron a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad por 30 min. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

3.2.2 Recuperación de la eficiencia cuántica máxima del FSII (Fv/Fm) en oscuridad

La eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) es comúnmente utilizada como referente del estado fisiológico del aparato fotosintético (Krause y Weis, 1991), por lo que se evaluó la recuperación en oscuridad de este parámetro fotosintético después de exponer a las células a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La susceptibilidad al daño del FSII en células de la cepa A1-B5 de *H. horiguchii* expuestas a luz saturante, fue diferente de manera significativa ($p < 0.05$) sólo entre las células aclimatadas a LB (58 % de

recuperación) y LA (68 %). La recuperación final de Fv/Fm en las tres aclimataciones fue del 58 – 68 % del máximo valor de Fv/Fm detectado antes de la exposición a luz saturante, con un $t_{1/2}$ de recuperación entre 6 y 7 min (Figura 9).

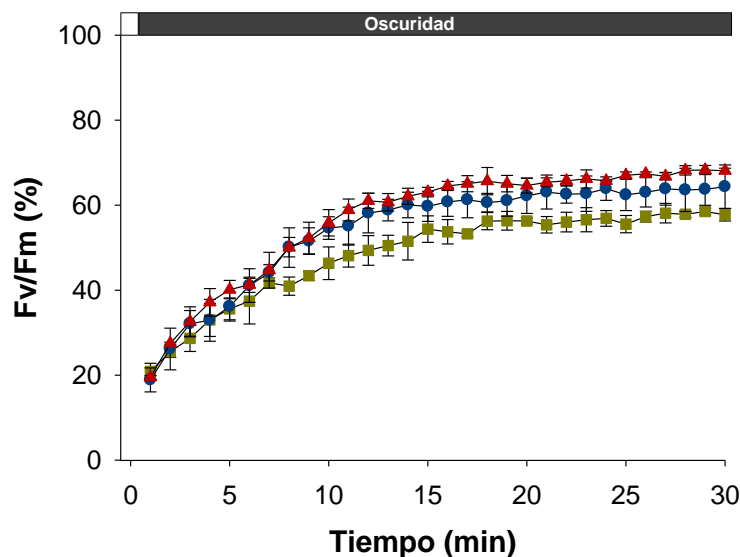


Figura 9. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) del FSII en oscuridad de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5, después de ser expuestas a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16°C y se aclimataron a 20 (■), 100 (●) y $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

La cinética de recuperación de la cepa G8 de *H. horiguchii*, fue similar a la cepa A1-B5, con una recuperación en oscuridad del Fv/Fm del 77 % en LA, y del 66 % en LM (Figura 10), con un $t_{1/2}$ de recuperación de 6 min en LA y 7 min LM. No se encontraron diferencias significativas de la capacidad de recuperación de las células después de exponerse a luz saturante entre aclimataciones ($p > 0.05$).

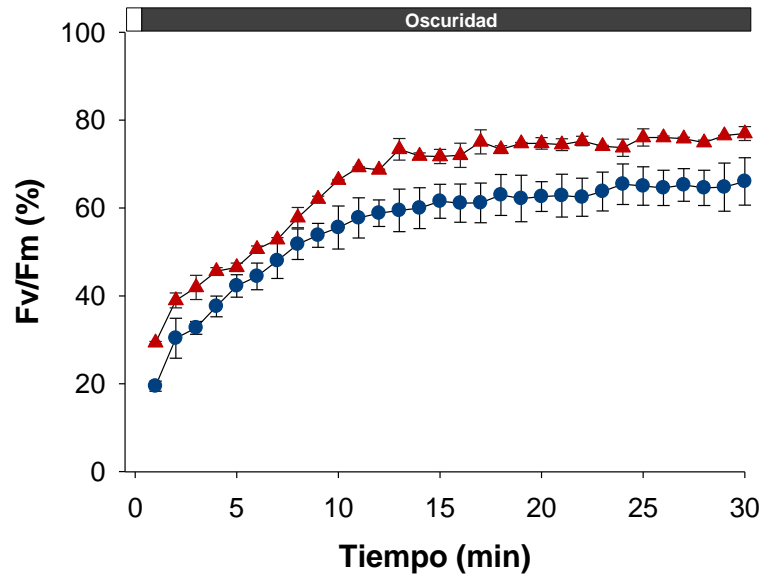


Figura 10. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) del FSII en oscuridad de células de *H. horiguchii*, cepa G8, después de ser expuestas a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16°C y se aclimataron 100 (●) y $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

En contraste con *H. horiguchii*, la susceptibilidad al daño del FSII en células de *H. cf. circularisquama* fue diferente entre aclimataciones, con una recuperación significativamente mayor ($p < 0.01$) en LA (73 %) que en LM (52 %) a los 30 min de oscuridad (Figura 11). El $t_{1/2}$ de recuperación fue de aproximadamente 6 min en LM y 7 min en LA.

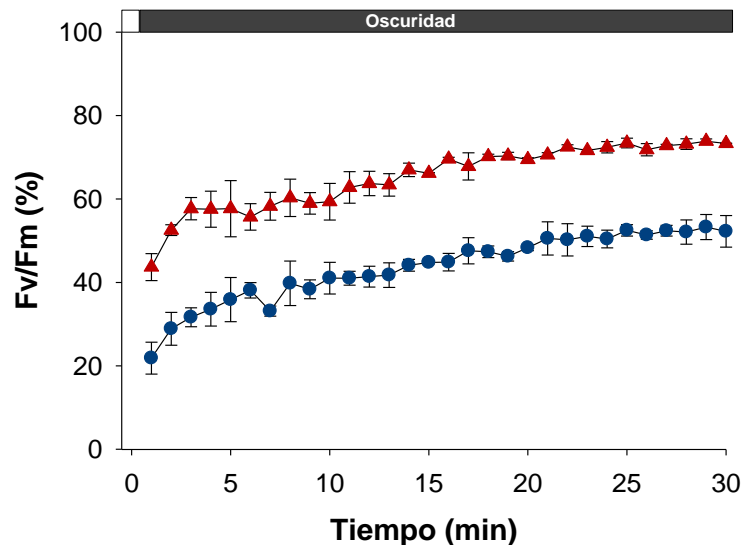


Figura 11. Recuperación de la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) del FSII en oscuridad de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, después de ser expuestas a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 30 min. Las células se cultivaron a 16°C y se aclimataron a 100 (●) y $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

3.2.3 Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores

Para evaluar la importancia de los diferentes componentes del NPQ se probaron inhibidores que bloquean procesos específicos que intervienen en este mecanismo. Se evaluó la respuesta del NPQ ante la disrupción del ΔpH con la adición de cloruro de amonio (NH_4Cl), y de la inhibición de la diadinoxantina desepoxidasa (DDE) con el ditiotreitol (DTT) únicamente en las células aclimatadas a LA.

3.2.3.1 Inducción y disipación del NPQ en células incubadas con DTT y NH_4Cl

La respuesta del NPQ en células incubadas con DTT y NH_4Cl antes de la exposición a luz saturante, fue diferente entre *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*.

En *H. horiguchii*, la cinética de inducción del NPQ en células incubadas con NH_4Cl antes de la exposición a luz saturante fue similar al control, y el efecto de la disrupción del ΔpH fue la reducción del NPQ máximo en aproximadamente un 33 % (A1-B5) y 43 % (G8) (Figura 12a, b). La fase de disipación rápida del NPQ en oscuridad no se registró en presencia de este ionóforo. En el caso de las células incubadas con DTT, estas presentaron una inhibición del 67 % (A1-B5) y del 56 % (G8) del NPQ detectado en el control (Figura 12a, b). La amplitud del NPQ alcanzado en células incubadas con DTT es aproximadamente la mitad del NPQ formado al primer minuto de exposición a luz saturante sin inhibidores.

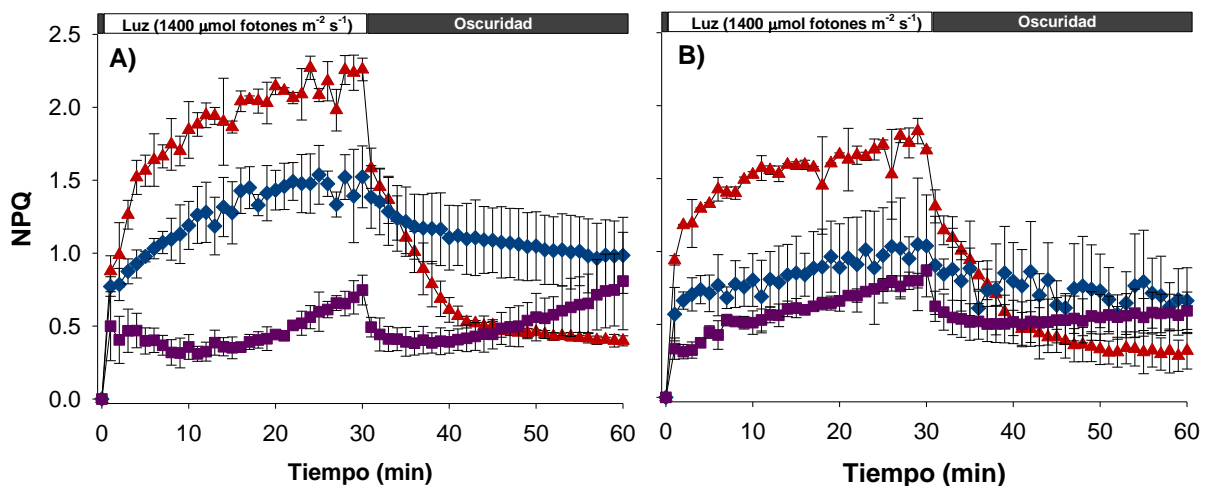


Figura 12. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y G8 (B) incubadas con NH_4Cl (300 mM; 10 min) (\blacklozenge) y DTT (1 mM; 20 min) (\blacksquare) antes de la exposición a luz saturante ($1,400 \mu mol \text{ fotones } m^{-2} s^{-1}$; 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). Como control se muestra la respuesta de las células sin inhibidores (\blacktriangle). Las células se cultivaron a $16^\circ C$ y estaban aclimatadas a $260 \mu mol \text{ fotones } m^{-2} s^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

El efecto de los inhibidores en la inducción y disipación del NPQ en *H. cf. circularisquama*, fue diferente a lo detectado en *H. horiguchii*. En las células incubadas con NH_4Cl , no hubo una inhibición del NPQ ya que se presentó un incremento inicial en el primer minuto de exposición a luz saturante del 55 % del NPQ máximo alcanzado con ese inhibidor (2.34 ± 0.23). El NPQ máximo en este tratamiento fue similar al NPQ detectado sin inhibidores después de la exposición a luz saturante por 30 min (Figura 13). En cambio, las células incubadas con DTT presentaron una activación del NPQ más lenta que el control, con una inducción del 8 % al primer minuto de luz saturante y un NPQ máximo de 0.91 ± 0.15 , lo que significa una reducción del 55 % respecto al control. Las células de *H. cf. circularisquama* incubadas con NH_4Cl y DTT, no presentaron una disipación del NPQ en oscuridad. Se observó un aumento ligero y constante, con un incremento del 12 % (NH_4Cl) y 15 % (DTT) al final de los 30 min (Figura 13).

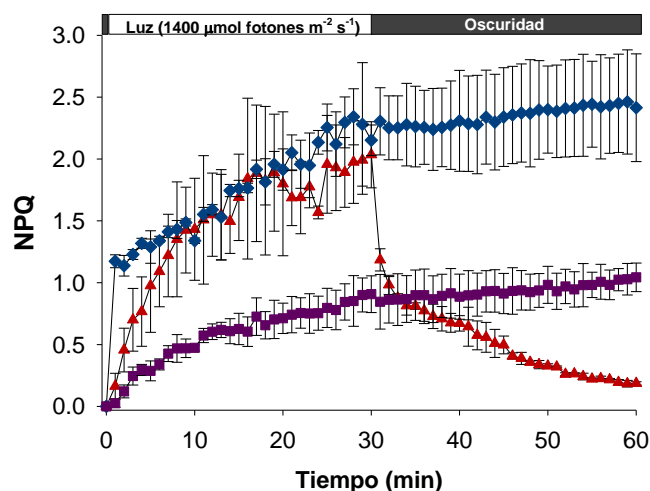


Figura 13. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, incubadas con NH_4Cl (300 mM; 10 min) (◆) y DTT (1 mM; 20 min) (■) antes de la exposición a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). Como control se muestra la respuesta de las células sin inhibidores (▲). Las células se cultivaron a 16°C y estaban aclimatadas a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

3.2.3.2 Inducción y disipación del NPQ en células expuestas a NH_4Cl

El efecto de la disrupción del ΔpH sobre el NPQ se evaluó con la adición de NH_4Cl (300 mM) a las células a los 20 min de exposición a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y se registró el NPQ por 20 min en luz y posteriormente en oscuridad por 30 min.

En *H. horiguchii* (cepa A1-B5 y G8), al aplicar el NH_4Cl a las células, se registró una disminución inmediata del 27 % del NPQ detectado antes de agregar el inhibidor. La disrupción del ΔpH no dispó por completo el NPQ ya que el nivel que se detecta después de la adición del ionóforo es comparable al nivel de NPQ alcanzado en el primer minuto de exposición a luz saturante. Posterior a esto, el NPQ disminuye lentamente aún en condición de luz y durante el periodo de oscuridad (Figura 14a, b). La disminución del NPQ después de 20 min de exposición con NH_4Cl fue del 43 - 48 % antes de aplicar el inhibidor.

En contraste, en *H. cf. circularisquama* (aislado D7), el NH_4Cl tuvo un efecto totalmente diferente al registrado en *H. horiguchii*. Al momento de exponer a las células al ionóforo no se presentó una disminución marcada, sino leve y momentánea (disminución del 14 % en alrededor 3 min), posteriormente el NPQ aumentó hasta llegar a un valor máximo de 2.12 ± 0.35 (Figura 15), valor similar al del control (2.03 ± 0.27) (Figura 8). En oscuridad, no hubo disipación del NPQ, se mantuvo constante (Figura 15).

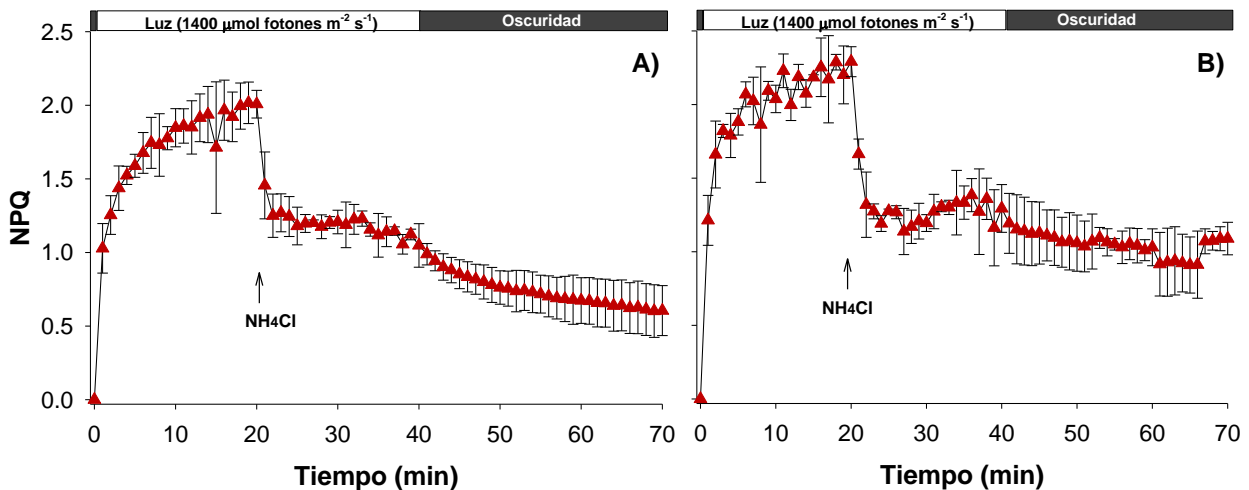


Figura 14. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y G8 (B). Se expusieron a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 40 min), y posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en que se agregó el NH_4Cl (300 mM). Las células se cultivaron a 16°C y estaban aclimatadas a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

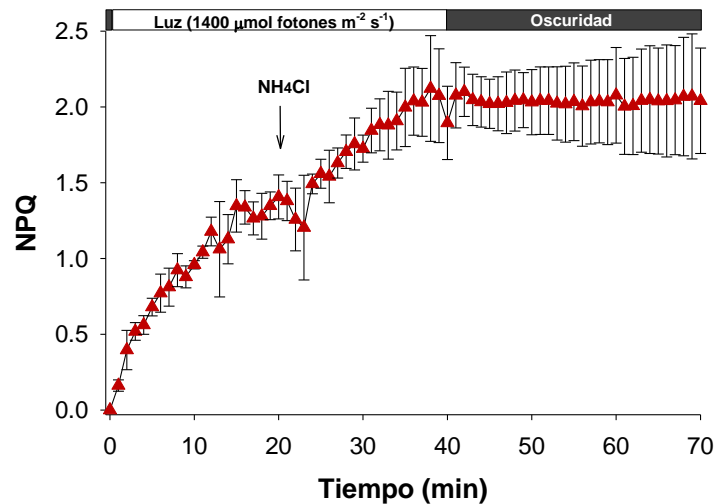


Figura 15. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7. Se expusieron a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 40 min), y posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en que se agregó el NH_4Cl (300 mM). Las células se cultivaron a 16°C y estaban aclimatadas a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

3.2.3.3 Inducción y disipación del NPQ en células expuestas a DTT y NH_4Cl

En otro tipo de experimento, se incubaron células con DTT y se les agregó NH_4Cl a los 20 min de luz. De manera interesante, en lugar de presentarse una disminución del NPQ, en todas las cepas hubo un incremento de este (Figura 16 y Figura 17).

En *H. horiguchii* (ambas cepas) a partir del minuto de adición del NH_4Cl , se presentó un incremento gradual del NPQ (Figura 16 a, b), con un valor máximo de 0.77 ± 0.13 (A1-B5) y 0.87 ± 0.04 (G8). En cambio, en *H. cf. circularisquama* al aplicar el amonio, el incremento inicial del NPQ fue mayor que en *H. horiguchii*, y el valor se mantuvo relativamente estable por los 10 min de luz restantes (Figura 17), con un valor máximo de 1.34 ± 0.33 .

La disipación en oscuridad del NPQ fue similar en las dos especies, con un decaimiento lento, sin alcanzar la disipación completa del NPQ a los 30 min de oscuridad (Figura 16 y Figura 17).

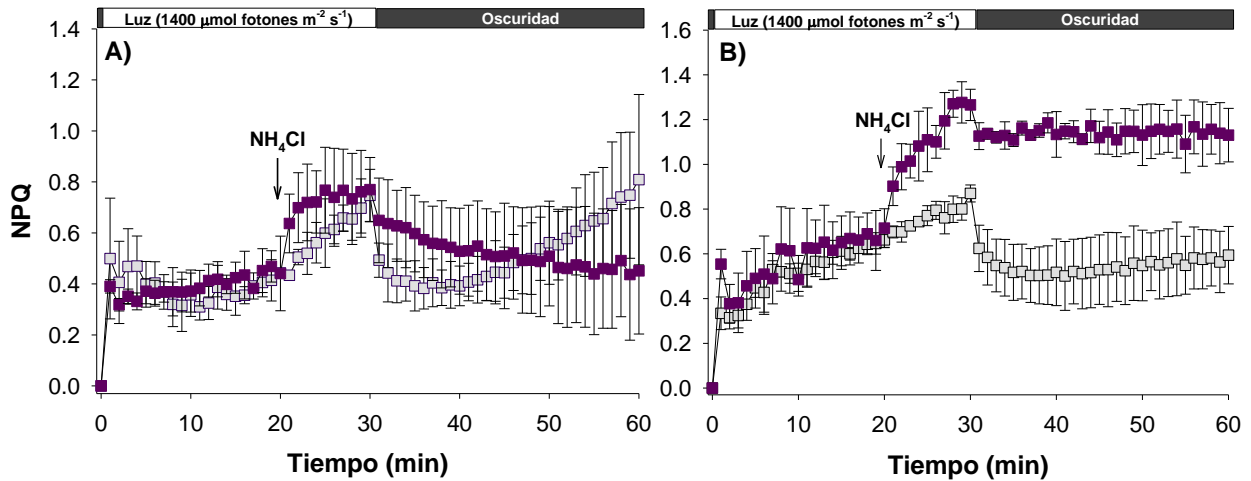


Figura 16. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5 (A) y cepa G8 (B), incubadas con DTT (1mM; 20 min) antes de la exposición a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en el que se agregó el NH_4Cl (300 mM). Como control (\square) se muestra la respuesta de las células incubadas con DTT sin la adición del NH_4Cl a los 20 min. Las células se cultivaron a 16°C y estaban aclimatadas a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

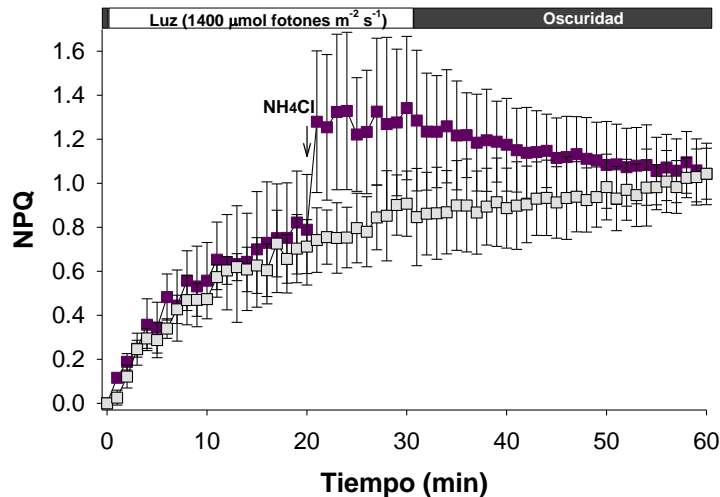


Figura 17. Inducción en luz y disipación en oscuridad del NPQ de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7, incubadas con DTT (1mM; 20 min) antes de la exposición a luz saturante ($1,400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 min), posteriormente se mantuvieron en oscuridad (30 min). La flecha indica el momento en el que se agregó el NH_4Cl (300 mM). Como control (\square) se muestra la respuesta de las células incubadas con DTT sin la adición del NH_4Cl a los 20 min. Las células se cultivaron a 16°C y estaban aclimatadas a $260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

3.2.4 Actividad fotosintética (ETR-E)

Como proxy de la actividad fotosintética a diferentes irradiancias se calculó la tasa de transporte de electrones (ETR, por sus siglas en inglés) vs irradiancia (curva ETR-E), que es similar a la relación de fotosíntesis-irradiancia evaluada mediante la evolución de oxígeno o incorporación de C.

No se observó una fotoinhibición (reducción de ETR) en las dos especies, incluso a una irradiancia de 2,100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 18, Figura 19 y Figura 20). En *H. horiguchii*, en la cepa A1-B5 la ETRmax fue visiblemente diferente entre aclimataciones (Figura 18), con el mayor valor en las células aclimatadas a LB (1.77 ± 0.29), en LA la ETRmax fue de 1.13 ± 0.07 y en LM de 0.68 ± 0.31 . En cambio, en la cepa G8, la ETRmax entre aclimataciones fue muy similar (Figura 19) con un valor ligeramente menor en LM (1.88 ± 0.48) que en LA (2.04 ± 0.08). En ninguna cepa hubo diferencias significativas de la ETRmax entre aclimataciones ($p > 0.05$). En *H. cf. circularisquama*, la ETRmax fue mayor que en *H. horiguchii*, con un valor de 2.96 ± 0.97 en LM y 5.50 ± 1.67 en LA (Figura 20), sin diferencias significativas de la ETRmax entre aclimataciones ($p > 0.05$).

Para las dos especies, los valores más altos de ETRmax se encontraron en los cultivos aclimatados a LA, con la excepción de la cepa A1-B5, LB. La eficiencia fotosintética (α) no varió de manera significativa ($p > 0.05$) entre las irradiancias de crecimiento en ninguna especie (Tabla 3); sin embargo, en *H. cf. circularisquama* (0.023 – 0.025) la α fue mayor que en *H. horiguchii* (0.006 – 0.014). Respecto a la irradiancia de saturación (E_k), este parámetro fue similar entre aclimataciones para *H. horiguchii* (incluyendo el tratamiento de LB). E_k fue de 142.81 a 195.66 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con la excepción de LM que, contrario a lo esperado, la E_k fue de 68.92 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cambio, en *H. cf. circularisquama* la E_k fue diferente entre aclimataciones, con un valor de 241.04 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en LA, que fue casi el doble que en LM, de 116.68 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 3).

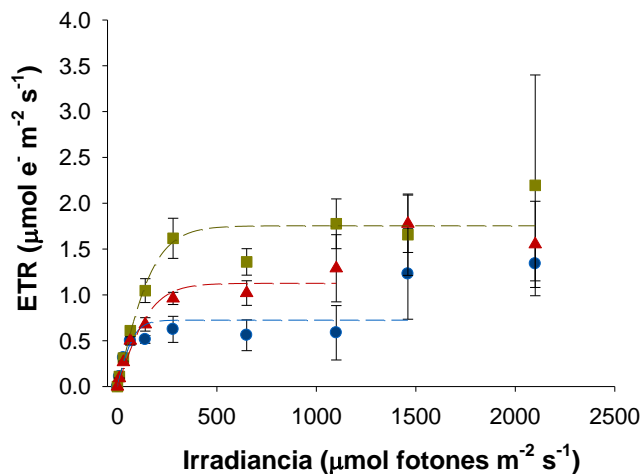


Figura 18. Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. horiguchii*, cepa A1-B5. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 20 (■), 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

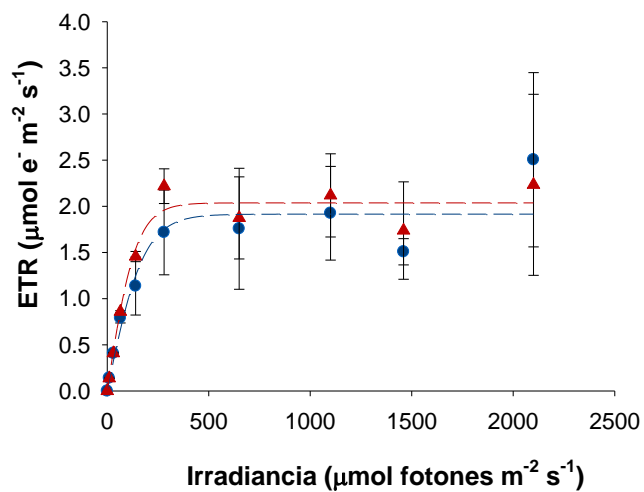


Figura 19. Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. horiguchii*, cepa G8. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE (n = 3).

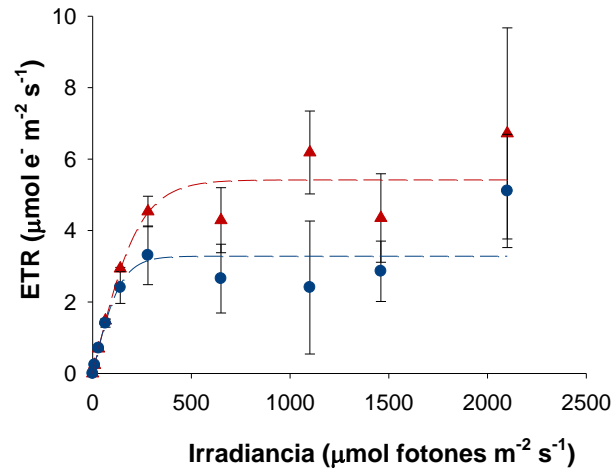


Figura 20. Tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes irradiancias de células de *H. cf. circularisquama*, aislado D7. Las células se cultivaron a 16 °C y se aclimataron a 100 (●) y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (▲). Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$).

Tabla 3. Parámetros fotosintéticos de células de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* cultivadas a 16 °C y aclimatadas a una irradiancia (E) de 20, 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se presenta la tasa de transporte de electrones máxima (ETRmax, $\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la eficiencia fotosintética (α) y la irradiancia de saturación (E_k , $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en una misma cepa.

Especie	Cepa	E	α	ETRmax	E_k
<i>H. horiguchii</i>	A1-B5	20	0.009 ± 0.002^a	1.77 ± 0.29^a	195.66
		100	0.010 ± 0.004^a	0.68 ± 0.31^b	68.92
		260	0.006 ± 0.001^a	1.13 ± 0.07^{ab}	187.72
	G8	100	0.011 ± 0.002^a	1.88 ± 0.48^a	172.70
		260	0.014 ± 0.002^a	2.04 ± 0.08^a	142.81
<i>H. cf. circularisquama</i>	D7	100	0.025 ± 0.003^a	2.96 ± 0.97^a	116.68
		260	0.023 ± 0.003^a	5.50 ± 1.67^a	241.04

3.3 Efecto de *Heterocapsa horiguchii* y *Heterocapsa cf. circularisquama* sobre *Brachionus plicatilis*

El potencial nocivo de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* aislados de la BTS fue evaluado al exponer rotíferos a diferentes abundancias de estas microalgas (Tabla 1) cultivadas a 16 y 20 °C. Los bioensayos de exposición se realizaron en luz y oscuridad.

3.3.1 *Heterocapsa horiguchii*

Al exponer a los rotíferos a diferentes abundancias de *H. horiguchii* (cepa G8) independientemente del tratamiento de luz, se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) de los rotíferos viables (RV) y se observó una disminución de la velocidad del nado únicamente en las máximas abundancias probadas (100,000 y 116,000 cél ml⁻¹ en 16 °C y, 80,000 y 86,000 cél ml⁻¹ en 20 °C).

En los experimentos a 16 °C, el porcentaje de RV expuestos a $\geq 100,000$ cél ml⁻¹ (33 - 50 %) fue significativamente menor ($p < 0.05$) a las 6 h en comparación a los tratamientos donde se expusieron a $\leq 10,000$ cél ml⁻¹ (77 - 90 %). Esto se observó en los tratamientos incubados con luz y en oscuridad. A las 12 y 24 h de exposición se observó la misma tendencia y no disminuyeron más los RV. Por lo tanto, existió una diferencia significativa en el número de RV expuestos a $\geq 100,000$ cél ml⁻¹ con los expuestos a $\leq 10,000$ cél ml⁻¹ después de las 6 h del experimento (Figura 21).

Al igual que en 16 °C, a 20 °C independiente de la presencia de la luz, la mayor disminución de los RV se registró en las abundancias más altas de *H. horiguchii* (80,000 y 86,000 cél ml⁻¹) (Figura 22). Sin embargo, el efecto fue menor que a 16 °C. A las 6 h de exposición sólo se registró una disminución al 40 y 50 % de RV expuestos a 86,000 cél ml⁻¹ y del 67 al 70 % de RV en 80,000 cél ml⁻¹. Aunque a las 12 y 24 h se observó un ligero aumento de los RV en estas abundancias de *H. horiguchii* (recuperación de los individuos), este parámetro fue significativamente menor ($p < 0.05$) que en el resto de los tratamientos (87 a 100 % de RV en abundancias menores a 80,000 cél ml⁻¹).

Es importante señalar que, a 16 °C, indistintamente del tratamiento de luz, se observó una disminución progresiva con el tiempo de los RV en los tratamientos control. Se presentó una reducción del 23 % (luz) y 47 % (oscuridad) de RV a las 24 h en el tratamiento de incubación de los rotíferos sólo en medio L1. Por otro lado, la reducción de RV expuestos a *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 cél ml⁻¹) a las 24 h fue de 14 % (oscuridad) y 28 % (luz). En contraste, a 20 °C la disminución de RV fue de 0 a 7 % durante la duración del experimento. Esto indica que la temperatura de 16 °C tuvo un efecto adverso sobre la viabilidad de los rotíferos independientemente de la exposición a *H. horiguchii*.

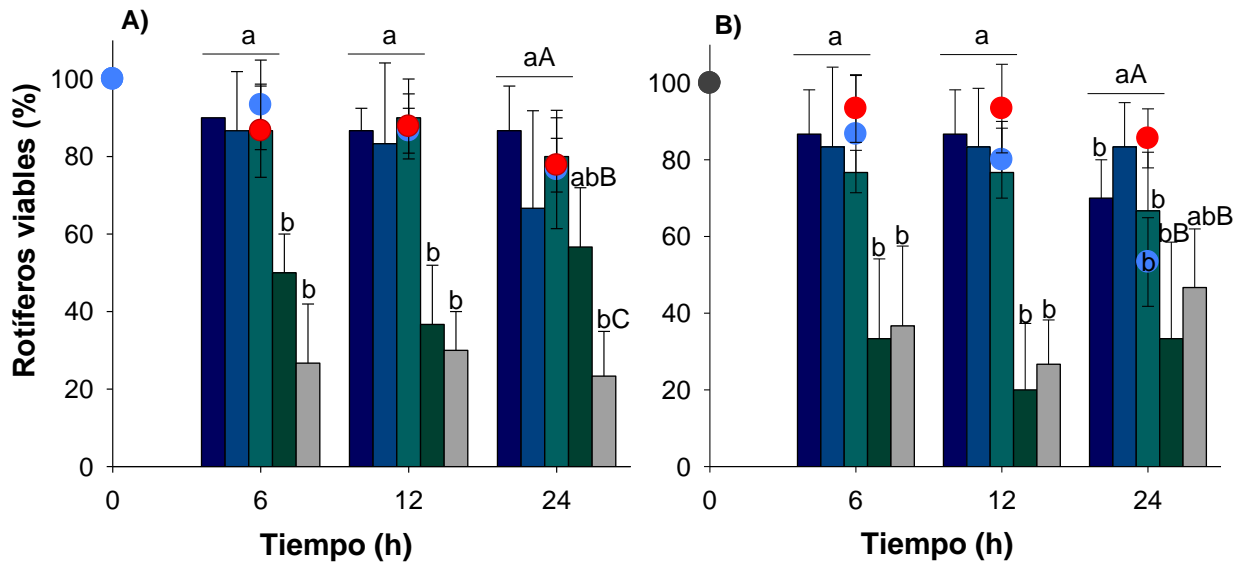


Figura 21. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 16 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 100,000 (■) y 116,000 células ml^{-1} de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y con *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 células ml^{-1}) (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

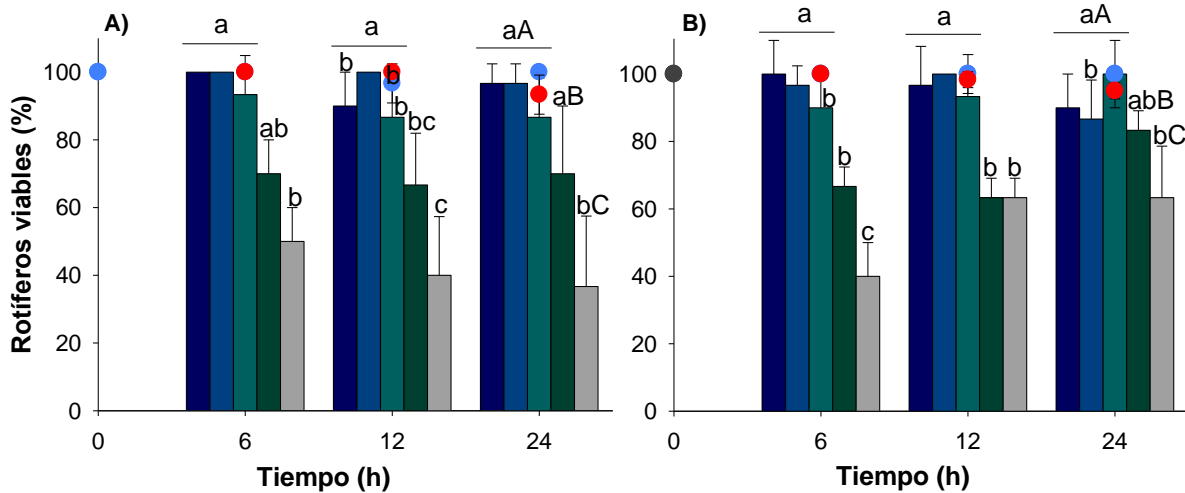


Figura 22. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 20 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 80,000 (■) y 86,000 células ml^{-1} de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y con *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 células ml^{-1}) (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE ($n = 3$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

Con la finalidad de evaluar la posible presencia de metabolitos tóxicos intra o extracelulares, se evaluó el efecto del sobrenadante y de la suspensión de células rotas de *H. horiguchii* sobre los rotíferos. En las dos temperaturas experimentales independientemente del tratamiento de luz, se encontró únicamente un efecto negativo sobre los rotíferos incubados con la suspensión de células rotas.

En el experimento a 16 °C, hubo una reducción progresiva de los RV en los diferentes tratamientos, incluido el control (expuestos a medio L1). Sin embargo, la mayor reducción de RV se presentó en los organismos expuestos a la suspensión de células rotas. La disminución de RV expuestos al medio L1 o al sobrenadante a las 6 h fue de entre 7 al 20 %, y en el tratamiento de suspensión de células rotas la reducción fue del 30 % de RV (luz y oscuridad). No obstante, a las 24 h, los RV expuestos a la suspensión de células rotas (20 %) fueron significativamente menos ($p < 0.05$) que en los tratamientos expuestos al sobrenadante (70 – 90 %) o al medio L1 (53 – 77 %) (Figura 23).

En los experimentos a 20 °C, sólo se observó una disminución progresiva de los RV expuestos a la suspensión de células rotas. El grado de afectación de los rotíferos fue mayor respecto a la respuesta en 16 °C. Se detectó una reducción del 50 % (luz) y 63 % (oscuridad) a las 6 h. No obstante, los RV a las 24 h de exposición fue similar (27 %) que en los experimentos a 16 °C (20 %). En los diferentes periodos, el porcentaje de RV en el tratamiento de exposición a la suspensión de células rotas a 20 °C fue significativamente menor ($p < 0.001$) respecto a los rotíferos expuestos al sobrenadante y al medio L1 (Figura 23).

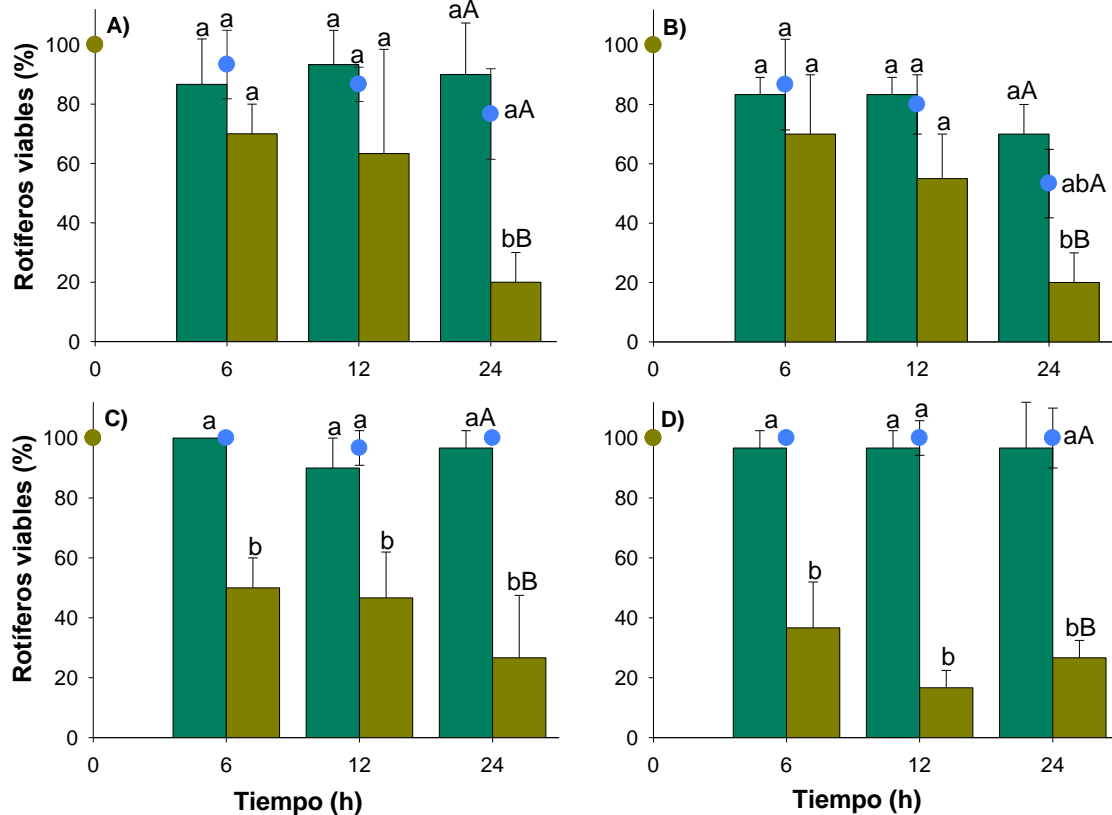


Figura 23. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos a 16 °C (A y B) y 20 °C (C y D), en luz (A y C) y oscuridad (B y D) expuestos al sobrenadante (■) y a la suspensión de células rotas (■) de cultivos de *H. horiguchii* (cepa G8). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

3.3.2 *Heterocapsa cf. circularisquama*

Al exponer a los rotíferos a diferentes abundancias de *H. cf. circularisquama*, se encontró un efecto nocivo dependiente de la concentración celular y del tiempo, independientemente del tratamiento de luz.

En 16 °C, en presencia de luz, se detectó una disminución al 7 % de RV a las 6 h de ser expuestos a 25,000 cél ml⁻¹, y también se observó una disminución de la velocidad del nado de estos. Se observó el mismo porcentaje de RV a las 12 y 24 h de exposición. Con diferencias significativas de los RV expuestos a esta abundancia respecto a los organismos expuestos a $\leq 10,000$ cél ml⁻¹ ($p < 0.05$). En cambio, cuando los rotíferos se incubaron a $\leq 10,000$ cél ml⁻¹, se mantuvo entre 70 al 100 % de RV (Figura 24a). En oscuridad,

a las 6 h de exposición, sólo se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de los RV incubados en 25,000 cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama* (13 % de RV). A partir de las 12 h de exposición, en la presencia de 10,000 cél ml⁻¹ también se presentó una disminución significativa de los RV ($p < 0.05$) (20 % de RV). A las 24 h, los organismos viables en los tratamientos de $\geq 10,000$ cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama* (23 – 37 %) fueron significativamente menos ($p < 0.05$) que en el resto de los tratamientos (≥ 87 %) (Figura 24b).

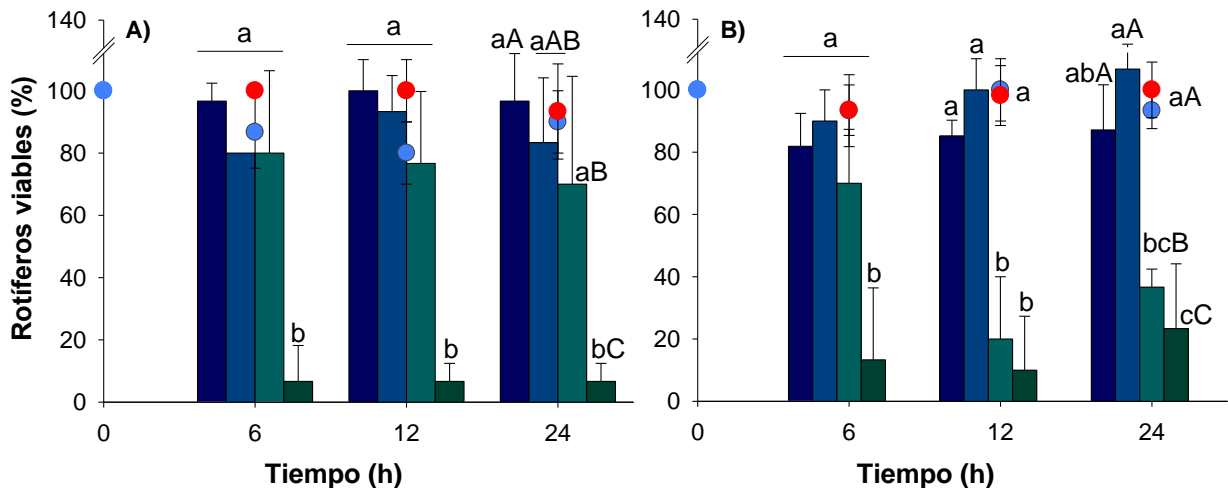


Figura 24. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 16 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■) y 25,000 cél ml⁻¹ (■) de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y con *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 cél ml⁻¹) (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE (n=3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

En 20 °C se tuvo la posibilidad de evaluar el efecto de la exposición de 30,000 cél ml⁻¹ sobre los rotíferos. De manera general, se encontró un efecto nocivo en luz y oscuridad, dependiente de la abundancia y el tiempo (Figura 25a y b). Los rotíferos expuestos a $\geq 10,000$ cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama* presentaron una ralentización del nado, con un porcentaje de RV significativamente menor ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos control a las 24 h de exposición.

En presencia de luz, al exponer a los organismos a abundancias aproximadas de 30,000 cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama* por 6 h, se observó una disminución del 80 % de RV. El grado de afectación aumentó con el tiempo. A las 24 h el porcentaje de RV fue de entre 7 a 47 % en abundancias $\geq 10,000$ cél ml⁻¹. Existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) de los RV expuestos a $\geq 10,000$ cél ml⁻¹ respecto a los RV en abundancias $\leq 1,000$ cél ml⁻¹ y en los controles. En oscuridad, la tendencia fue similar a la condición de luz. En

abundancias $\geq 10,000$ cél ml^{-1} se observó entre 10 al 17 % de RV a las 24 h, con diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al resto de los tratamientos. Cuando los organismos fueron incubados en 1,000 y 100 cél ml^{-1} de *H. cf. circularisquama*, se observó una disminución del 37 y 10 % de RV a las 24 h, respectivamente; sin embargo, no se encontró una diferencia significativa de los RV en estas abundancias comparado con el número de organismos viables en los controles ($p > 0.05$).

Por otro lado, no se observó un efecto negativo del sobrenadante o de la suspensión de células rotas de cultivos de *H. cf. circularisquama* (Figura 26). En los diferentes periodos de exposición, los RV se mantuvieron entre 70 y 97 % a 16 °C (luz y oscuridad) y de 70 al 94 % a 20 °C (luz y oscuridad), con la excepción del extracto a las 24 h (45 %). No se encontraron diferencias significativas de los RV entre ningún tratamiento ($p > 0.05$).

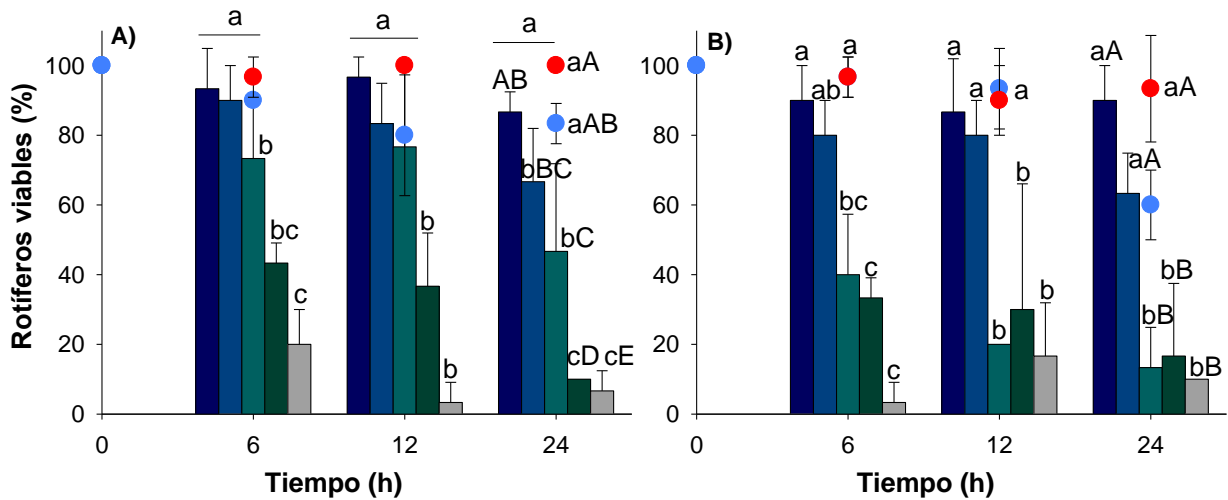


Figura 25. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos en luz (A) y oscuridad (B) a 20 °C, expuestos a 100 (■), 1,000 (■), 10,000 (■), 25,000 cél ml^{-1} (■) y 30,000 cél ml^{-1} (■) de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) y con *Nannochloropsis oculata* (2×10^6 cél ml^{-1}) (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE ($n=3$). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

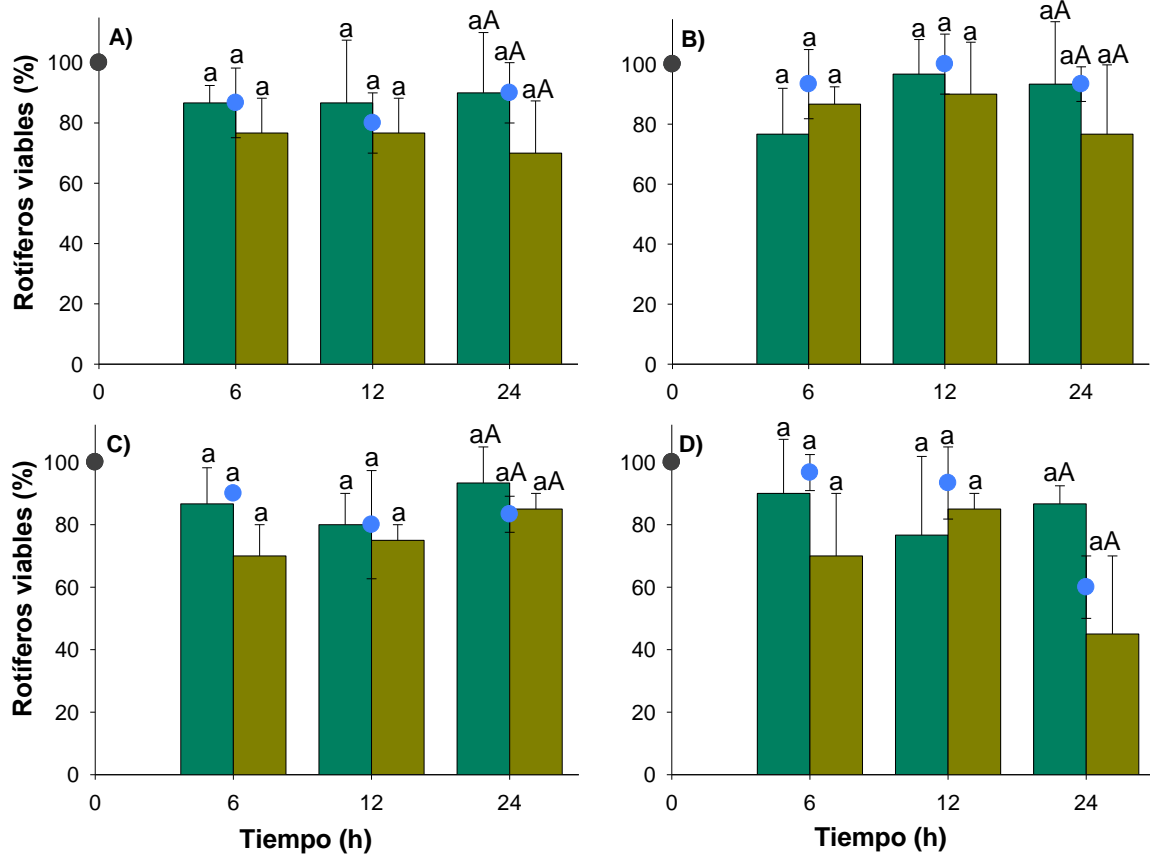


Figura 26. Viabilidad de *B. plicatilis* mantenidos a 16 °C (A y B) y 20 °C (C y D), en luz (A y C) y oscuridad (B y D) expuestos al sobrenadante (■) y a la suspensión de células rotas (■) de cultivos de *H. cf. circularisquama* (aislado D7). Los rotíferos se mantuvieron en medio L1 (●) como control. Se presenta el promedio \pm DE (n = 3). Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo y las letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos al final del experimento.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Cinética de crecimiento a diferentes irradiancias

H. horiguchii y *H. cf. circularisquama* tienen la capacidad de crecer en diferentes irradiancias y a temperaturas entre 16 y 20 °C. Estas condiciones se presentan en la BTS en las diferentes épocas del año y en la columna de agua a diferentes profundidades, por lo que estas especies y el género *Heterocapsa* son un componente habitual de la comunidad fitoplanctónica en la región.

En las condiciones de luz utilizadas en los distintos experimentos, la irradiancia influyó en la tasa de crecimiento (μ), pero no en la abundancia máxima de *H. horiguchii*. Esta especie creció bajo las diferentes irradiancias probadas, alcanzó una abundancia máxima similar (arriba de 80,000 cél ml⁻¹) entre 20 a 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, la tasa de crecimiento de las células expuestas a 20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue baja ($0.08 \pm 0.02 \text{ día}^{-1}$). La disminución de μ va ligada a la exposición de estos organismos a una mayor limitación de algún recurso o a condiciones de estrés (Cembella y John, 2006). La baja tasa de crecimiento de *H. horiguchii* en LB no estuvo asociada a una limitación de nutrientes ya que se utilizó el mismo medio de cultivo en todos los tratamientos, por lo que una irradiancia de 20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fue el componente limitante para el crecimiento de esta especie.

En contraste, en *H. cf. circularisquama* la abundancia máxima y la tasa de crecimiento en las dos condiciones de luz probadas fue significativamente diferente. Esta especie creció a irradiancias entre 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, presentó una mayor tasa de crecimiento a intensidades altas (260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y una abundancia mayor en intensidades medias (100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No se evaluaron las características de crecimiento poblacional de este dinoflagelado a bajas irradiancias (20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no obstante, se ha reportado que *H. circularisquama* puede crecer a 30 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Kim et al., 2000).

Las tasas de crecimiento de *H. horiguchii* en LM y LA ($0.43 - 0.83 \text{ día}^{-1}$) y *H. cf. circularisquama* en LA (1 día^{-1}), son similares a las reportadas previamente por Paredes-Banda (2020) (*H. horiguchii*: 0.63 día^{-1}) y Yamaguchi et al. (1997) (*H. circularisquama*: 1.3 día^{-1}), al igual que con otras especies del género, como *H. triquetra* (0.95 día^{-1}) (Yamaguchi et al., 1997) y *H. rotundata* (0.5 día^{-1}) (Millette et al., 2015). La variabilidad de μ se asocia a factores extrínsecos, como son las diferentes condiciones de crecimiento de cada estudio (intensidad lumínica, temperatura, salinidad y medios de cultivos). Asimismo, la máxima μ de cada cepa o

especie se encuentra regulada por factores intrínsecos, como la síntesis y activación de metabolitos energéticos (ATP, NADPH), ácidos nucleicos y reguladores del ciclo celular (Cembella y John, 2006).

En comparación con otros dinoflagelados formadores de FAN, las tasas de crecimiento fueron mayores que en *Cochlodinium polykrikoides* ($0.35 \pm 0.06 \text{ día}^{-1}$) (Kim et al., 2004) y *Gymnodinium catenatum* ($0.14 \pm 0.01 \text{ día}^{-1}$) (Murillo-Martínez, 2015); esto se ha relacionado al tamaño de las células, *C. polykrikoides* y *G. catenatum* son más grandes que las células de *Heterocapsa*, y entre más pequeño sea el volumen de las células, mayor es la tasa de crecimiento (Steidinger y Garccés, 2006).

Por otro lado, las máximas abundancias de *H. horiguchii* (superiores a $84,000 \text{ cél m}^{-1}$) fueron un poco más del doble del máximo valor de *H. cf. circularisquama* ($41,388 \text{ cél ml}^{-1}$). Esto se puede asociar a la temperatura, *H. circularisquama* tiene preferencia por temperaturas $\geq 20 \text{ °C}$ (Yamaguchi et al., 1997). En este trabajo los cultivos se mantuvieron a 16 °C , por lo que el crecimiento de esta especie probablemente estuvo limitado.

4.2 Fisiología fotosintética y mecanismos de fotoprotección

4.2.1 Cinética de inducción y disipación del NPQ

No existen reportes previos de NPQ para especies de *Heterocapsa*. Los valores de NPQ en *H. horiguchii* (ambas cepas) y *H. cf. circularisquama* fueron entre 1.80 ± 0.09 a 2.52 ± 0.27 . Estos valores fueron similares a *Symbiodinium* spp. expuestos a $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (2.5 ± 0.03) (Lombardo-Cifuentes, 2011) y a *K. veneficum* (NPQ aproximado de 1.5 y 3.5) (Cui et al., 2017).

En *H. horiguchii* la capacidad de fotoprotección (medida como la amplitud del NPQ y representada en la recuperación del Fv/Fm en oscuridad) fue similar entre células aclimatadas a LM y LA. En cambio, *H. cf. circularisquama* presentó una respuesta típica de fotoaclimatación. El NPQ y la facultad de reparación del daño generado al FSII por la exposición a altas irradiancias fue mayor en las células aclimatadas a LA en comparación a las aclimatadas a LM. Ninguna de las dos especies presentó una recuperación completa del Fv/Fm en oscuridad en alguna aclimatación, lo que implica cierto grado de daño en el FSII.

La mayor inducción del NPQ (2.52 ± 0.27) se encontró en las células de *H. horiguchii* aclimatadas a LB. No obstante, en esta condición las células presentaron la menor recuperación del Fv/Fm en oscuridad (58 %), esto indica que existió un mayor daño al FSII que en las células aclimatadas a LM y LA. Esta respuesta se ha reportado en células de *Chattonella* sp., y se asocia a que el daño al FSII también provoca una reducción de la Fm, por lo que en células aclimatadas a condiciones de baja luz, una gran parte del NPQ se puede asociar al daño del aparato fotosintético (Ahumada-Fierro et al., 2021).

La evolución de los dinoflagelados es compleja. Originalmente, todos los dinoflagelados obtuvieron sus cloroplastos “rojos” en un evento de endosimbiosis secundaria; algunos linajes adquirieron su cloroplasto final de un alga verde en un evento secundario posterior, mientras otros recibieron su cloroplasto de una haptofita o una diatomea en una endosimbiosis terciaria (Keeling, 2013, citado en Goss y Lepetit, 2015). Por lo tanto, los dinoflagelados tienen una composición pigmentaria variada, debido a su recorrido evolutivo. Con base al perfil pigmentario de cada especie se han reconocido seis tipos de dinoflagelados (Zapata et al., 2012). En consecuencia, los arreglos del aparato fotosintético son diferentes entre los linajes, y en consecuencia su respuesta fotoprotectora reflejada en la cinética del NPQ de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*, es diferente a lo reportado previamente para otros dinoflagelados.

H. horiguchii presentó una mayor activación inicial en el primer minuto de exposición a la luz (25 – 39 % en LM y LA, exceptuando en LB con un 19 %), con una velocidad de inducción del NPQ ligeramente más rápida ($t_{1/2}$ aproximado de 1 y 3 min, excepción en LB de 5 min) que en *H. cf. circularisquama*, cuya inducción fue más lenta ($t_{1/2}$ aproximado de 5 - 7 min), con una activación inicial mínima (4 – 8 % del NPQ final). No obstante, la disipación en esta especie fue rápida, similar a *H. horiguchii*. Lo anterior indica que la participación de los componentes del NPQ es diferente en *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*. Se plantea que en ambas especies el componente qE se encuentra presente, sin embargo, la participación de este componente rápido es diferente en cada especie.

En *Karlodinium veneficum* se ha reportado la participación del qE como un componente principal del NPQ, y en este dinoflagelado productor de karlotoxinas, este proceso alcanza una saturación en aproximadamente 2 min (Cui et al., 2017). Es en la única especie de dinoflagelado donde se ha reportado que el NPQ depende de qE principalmente. La diferencia en la velocidad de activación entre dinoflagelados está relacionada con los pigmentos accesorios que presenta cada especie derivado de su origen evolutivo. *K. veneficum* es un dinoflagelado tipo 3 de acuerdo a su perfil de pigmentos, y *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* son tipo 1 (Zapata et al., 2012). *K. veneficum* al igual que las diatomeas presenta fucoxantina, ya que el origen de su cloroplasto está relacionado con un evento endosimbiótico terciario

con un alga haptophyta (Patron et al., 2006; Hansen, 2011). Por lo tanto, el arreglo de su aparato fotosintético es similar a las diatomeas, por lo que tienen una respuesta fotoprotectora semejante. Las diatomeas al igual que *K. veneficum* presentan una inducción rápida asociada al componente qE. Por ejemplo, la diatomea céntrica *Thalassiosira weissflogii* alcanza la saturación del NPQ en tan sólo 30 s (Derks, 2014).

H. horiguchii y *H. cf. circularisquama* pertenecen a la misma clasificación pigmentaria que *G. catenatum* y *Symbiodinium* spp. El perfil pigmentario de estas especies se diferencia de otros dinoflagelados principalmente por la presencia de los carotenoides peridina y dinoxantina (dinoflagelados tipo 1). Sin embargo, la respuesta de inducción y disipación del NPQ es diferente entre estas especies. La inducción de *H. horiguchii* ($t_{1/2}$ de 1 a 3 min en LM y LA, y de 5 min en LB) fue notablemente más rápida que en *G. catenatum* (Murillo-Martínez, 2015) y *Symbiodinium* spp. (Lombardo-Cifuentes, 2011) con un $t_{1/2}$ aproximado de 7 a 11 min. En cambio, *H. cf. circularisquama* presentó un $t_{1/2}$ de inducción de 5 a 7 min aproximadamente. El aparato fotosintético de los dinoflagelados incluye a los complejos antena acpPC y PCP (Iglesias-Prieto y Trench, 1997), los cuales son exclusivos de este grupo de organismos fitoplanctónicos. Las diferentes respuestas del control del NPQ entre estas especies, puede estar posiblemente relacionado a una diferente composición de estos complejos proteico-pigmentarios en cada especie, lo que conllevaría a una diferente participación del componente qT. Este se encuentra asociado al desacople y movimiento de estos complejos entre fotosistemas, con la finalidad de reducir el exceso de energía del FSII hacia el FSI (Müller et al., 2001), y se ha documentado que en presencia de DTT se activa este componente (Hill et al., 2012). Lo anterior se apoya con la particular respuesta del NPQ de cada especie de dinoflagelados ante la presencia de DTT (ver sección 4.2.2 Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores.).

Por otra parte, no se observó una disipación total del NPQ después de 30 min de oscuridad en ninguna de las aclimataciones de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*. Esto es consistente con lo reportado para *Symbiodinium* spp. (Lombardo-Cifuentes, 2011), *G. catenatum* (Murillo-Martínez, 2015) y *K. veneficum* (Cui et al., 2017). La ausencia de una disipación total indica la existencia de un componente del NPQ que necesita más tiempo para disiparse (Cui et al., 2017), como qT cuyo mecanismo está regulado por cambios en el estado redox del pool de la plastoquinona, ocasionando una fosforilación reversible (Krause y Weis, 1991), involucrada en la disociación de los complejos antena del FSII (Hill et al., 2004); o qI, cuyo proceso de recuperación (reflejado en la disipación de este componente) involucra la reparación del FSII con la degradación de la proteína D1 dañada y síntesis de la misma (Krause y Weis, 1991).

4.2.2 Cinética de inducción y disipación del NPQ en presencia de inhibidores

La respuesta del NPQ de células de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* ante la presencia de inhibidores del CX y del ΔpH fue diferente. En *H. horiguchii* (ambas cepas), la adición del DTT y NH_4Cl afectó la formación parcial del NPQ, lo que indica la presencia de un NPQ dependiente del ΔpH y del CX. Por otro lado, en células incubadas con estos inhibidores, persistió la activación rápida en los primeros minutos del NPQ al exponerlas a luz saturante. Esta activación inicial rápida del NPQ en *H. horiguchii* es independiente del CX y del ΔpH , y podría probablemente estar relacionada al movimiento de los complejos antenas. Este mecanismo ocurre cuando la capacidad de fotoprotección por parte del CX ha sido sobrepasado (revisado por Goss y Lepetit, 2015).

En contraste, en las células de *H. cf. circularisquama* incubadas con NH_4Cl previo a la exposición a luz saturante, la inhibición del ΔpH en la membrana tilacoidal no provocó una desactivación de la inducción del NPQ, al contrario, se presentó una mayor activación del NPQ al primer minuto en luz saturante (55 %) que en células sin el inhibidor (8 %), con un valor de NPQ máximo similar en ambas condiciones. Esto indica que una proporción importante del NPQ está relacionada probablemente al movimiento de los complejos antena que no depende directamente del ΔpH . Por otro lado, la inhibición de la DDE en células de *H. cf. circularisquama* indica que también el CX contribuye al NPQ, aunque sólo se presentó una reducción parcial de este proceso (50 %). Esto indica que el NPQ en esta especie no depende por completo del CX. La rapidez de la activación inicial fue similar que en las células sin inhibidor, por lo que se infiere que el NPQ independiente del CX es de lenta inducción.

La respuesta del NPQ de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* ante la presencia de inhibidores, difiere de lo reportado en *Symbiodinium* spp. y *G. catenatum*. En estos dinoflagelados, la adición de DTT y NH_4Cl provocó una mayor desactivación del NPQ (Lombardo-Cifuentes, 2011; Murillo-Martínez, 2015). Esto como se mencionó anteriormente, puede estar asociado a una contribución diferente de los procesos que controlan el NPQ, donde para algunas especies el CX es más importante y en otras (*Heterocapsa horiguchii* y *H. cf. circularisquama*) el movimiento de los complejos antena juega un papel fundamental en la inducción de este proceso.

En conclusión, la respuesta fotoprotectora (amplitud del NPQ, recuperación del Fv/Fm en oscuridad, y participación de diferentes componentes del NPQ) entre *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* fue

diferente y a su vez, también diferente a otras especies de dinoflagelados. El NPQ se genera en los complejos antena principalmente, por lo que la variabilidad interespecífica respecto a la capacidad de fotoaclimatación y fotoprotección, puede estar asociada a las características particulares de los complejos proteicos-pigmentarios de cada especie. Una composición específica de pigmentos en los complejos antena y arreglos específicos del aparato fotosintético en cada especie, como se documentó en el género *Symbiodinium* (Iglesias-Prieto y Trench, 1997) tendrá una influencia importante en el control de los mecanismos de fotoprotección. Se enfatiza la importancia del análisis de pigmentos, para poder evaluar el grado de interconversión de los pigmentos asociados al CX, así como la evaluación de las unidades fotosintéticas (PSU).

4.2.3 Actividad fotosintética (ETR-E) en *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*

En estas dos especies de *Heterocapsa* no se presentó una fotoinhibición ya que no existió una disminución del ETR incluso en las irradiancias más altas ($2,100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esto es contrario a lo observado en *H. rotundata*, que exhibió una disminución de la tasa fotosintética a partir de una irradiancia aproximada de $400 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cooney et al., 2019).

En *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*, se encontró la respuesta típica de una mayor capacidad fotosintética en células aclimatadas a una irradiancia alta (Geider y Osborne, 1992). La excepción a esto fueron las células aclimatadas a LB de *H. horiguchii* que presentaron la ETR más alta de todos los tratamientos. Probablemente, esta especie presentó un mayor contenido de Chl-*a* en esta aclimatación comparado con LM y LA, y esto se vio reflejado en una mayor eficiencia para realizar el proceso fotosintético como se documentó en *Chattonella* spp. (Ahumada-Fierro, 2020).

La eficiencia fotosintética (α) generalmente tiene poca variación respecto a la irradiancia de crecimiento de las células (Geider y Osborne, 1992). Esto es consistente con lo encontrado en el presente trabajo, ya que no se encontró una dependencia de α y la irradiancia de aclimatación en ninguna especie. De manera semejante, *H. rotundata* (Cooney et al., 2019) y *Symbiodinium* spp. (Iglesias-Prieto y Trench, 1994) presentaron un α similar bajo diferentes regímenes de irradiancia.

La E_k indica la irradiancia en que la fotosíntesis (en este caso medida como ETR) se satura alcanzando su máximo (ETRmax o Pmax) (Suggett et al., 2010). En *H. horiguchii*, este parámetro no se encontró asociado

con la irradiancia de aclimatación, con un E_k entre 142.81 – 195.66 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (excepción cepa A1-B5, en LM). Esto es semejante a *H. rotundata* con una E_k promedio de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en células aclimatadas a diferentes irradiancias (27, 64 y 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Cooney et al., 2019). En cambio, *H. cf. circularisquama* presentó una E_k diferente entre condiciones, con un valor aproximadamente el doble en LA que la E_k en LM.

Las características fotosintéticas (α , fotosíntesis máxima y E_k) de *H. horiguchii* fueron similares independientemente de la condición de luz, de forma semejante a lo observado en *H. rotundata* (Cooney et al., 2019). En el caso de *H. cf. circularisquama*, se observa una clara diferenciación de los parámetros fotosintéticos entre aclimataciones, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas entre estos.

4.3 Potencial nocivo de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*

4.3.1 *Heterocapsa horiguchii*

El efecto nocivo de las células de *H. horiguchii* sobre los rotíferos se observó únicamente en las mayores abundancias probadas ($\geq 100,000$ cél ml^{-1} a 16 °C; $\geq 80,000$ cél ml^{-1} a 20 °C), con una disminución de los rotíferos viables y una ralentización del nado de estos. El nivel de toxicidad y tiempo de acción de esta especie, fue menor que en *H. circularisquama* (cepa de Japón) y *H. bohaiensis*, que ocasionan una mortandad total de los rotíferos después de 5 y 24 h de exposición a 100,000 cél ml^{-1} , respectivamente (Kim et al., 2000; Zhang et al., 2019). Asimismo, *H. horiguchii*, tuvo un efecto menor sobre los rotíferos que el aislado de *H. cf. circularisquama* de la BTS. En esta última especie, se observó una afectación de la viabilidad de los rotíferos a partir de 10,000 cél ml^{-1} (sección 4.3.2 *Heterocapsa cf. circularisquama*).

Otro aspecto a destacar es que los rotíferos fueron afectados por la suspensión de células rotas y no por el sobrenadante de los cultivos. Esto ya se había documentado para *H. bohaiensis* (Zhang et al., 2019), lo que indica que el metabolito que provoca el efecto inhibitorio sobre los rotíferos se encuentra probablemente en la pared celular o dentro de la célula y no es excretado. Por lo tanto, se plantea que de manera similar a *H. bohaiensis* y *H. circularisquama*, el efecto tóxico de *H. horiguchii* se genera por el contacto directo de las células con los rotíferos, o cuando las células son consumidas y existe una ruptura de las mismas. En el presente trabajo no se evaluó si estas especies fueron consumidas por los rotíferos;

sin embargo, éstas pudieron ser ingeridas ya que el tamaño celular de *H. horiguchii* es 14.1 a 19.6 μm (Paredes-Banda, 2020), y Zhang et al. (2019) mencionan que los rotíferos ingirieron células de *H. bohaisensis*, con una longitud promedio similar de $14.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$. Aunado a esto, los rotíferos pueden retener presas de hasta 20 - 25 μm de diámetro (revisado por Lin et al., 2016). El consumo (o preferencia de consumo) de estas especies de dinoflagelados por los rotíferos necesita ser evaluado.

Con respecto al potencial nocivo de *H. horiguchii*, no se encontró una diferencia en condiciones de luz y oscuridad, lo que indica que la acción de la toxina es independiente de la presencia de luz. Esta respuesta es similar a lo observado en *H. bohaisensis* y *H. circularisquama* sobre rotíferos (Nishiguchi et al., 2016; Zhang et al., 2019). En el presente estudio no fue posible evaluar el efecto del extracto en etanol (metabolito hidrofílico) de este dinoflagelado ni la actividad hemolítica sobre células HeLa y eritrocitos de conejo, donde previamente se ha reportado una toxicidad dependiente de la luz (Sato et al., 2002; Nishiguchi et al., 2016).

Por último, en el tratamiento a 16 °C, se encontró una mayor disminución de los rotíferos viables respecto al tratamiento de 20 °C. Sin embargo, el control indica que los rotíferos se vieron afectados por la temperatura, ya que la temperatura óptima para su crecimiento es de 20 °C (Yin y Zhao 2008).

4.3.2 *Heterocapsa cf. circularisquama*

H. cf. circularisquama afectó la viabilidad de *B. plicatilis*, cuyo grado de afectación fue dependiente de la abundancia celular y el tiempo de exposición. Los rotíferos expuestos a abundancias $\geq 10,000 \text{ cél ml}^{-1}$ presentaron una disminución de la velocidad de nado, así como movimientos erráticos. Este comportamiento también lo reportan Kamiyama y Arima (1997) para el tintínido *F. taraikaensis*, cuyo patrón de nado se vio afectado al exponerse a abundancias de $28,600 \text{ cél ml}^{-1}$ de *H. circularisquama*, además presentó cambios morfológicos como hinchamiento. Asimismo, la tendencia de afectación dependiente del tiempo y la abundancia celular es similar a lo reportado por Kim et al. (2000) para una cepa de *H. circularisquama* aislada de las costas de Japón. Con esta especie, el 100 % de los rotíferos murieron a las 5 h de exposición a $100,000 \text{ cél ml}^{-1}$. En el presente trabajo sólo se pudo evaluar el efecto nocivo con $30,000 \text{ cél ml}^{-1}$, pero es posible que el potencial nocivo del aislado de *H. cf. circularisquama* de la BTS sea menor a la cepa de Japón. El potencial nocivo es diferente en cepas de diferentes localidades en Japón (Kim et al., 2002).

En abundancias $\leq 1,000$ cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama*, la viabilidad de los rotíferos no es afectada. Esto es consistente con lo observado en *F. taraikaensis*, que al exponerse a 1,300 cél ml⁻¹ de *H. circularisquama* hubo un aumento poblacional de tintínidos (Kamiyama y Arima, 1997). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto nocivo es por contacto directo, al haber una menor abundancia de la microalga, la probabilidad de interacción es menor (Kamiyama y Arima, 1997). Sin embargo, existe la posibilidad de que por su tamaño (16 – 27 μm (Xiao et al., 2018)) haya ocurrido la ingesta de células de *H. cf. circularisquama*.

Respecto a la presencia de los metabolitos potencialmente tóxicos, no se observó un efecto negativo del sobrenadante o de la suspensión de células rotas de cultivos de *H. cf. circularisquama* en rotíferos. Esto coincide con estudios previos (Nagai et al., 1996; Matsuyama et al., 1997; Kim et al., 2000; Kamiyama y Arima, 1997; Nishiguchi et al., 2016), y al igual que observaron Nishiguchi et al. (2016), no se encontró una dependencia con la luz del efecto nocivo de *H. cf. circularisquama* sobre los rotíferos. Al igual que con *H. horiguchii*, en el presente trabajo no se evaluó la actividad hemolítica del extracto de etanol (fracción donde se ha documentado una relación del efecto tóxico con la luz) o de la suspensión de células rotas de *H. cf. circularisquama* sobre eritrocitos de conejo, donde se ha documentado previamente la dependencia de la luz de la toxina.

Presencia de compuestos potencialmente nocivos en *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* aisladas de la BTS

Las células de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* aisladas de la BTS presentan un metabolito secundario tóxico con efecto nocivo sobre los rotíferos (*B. plicatilis*). Es muy probable que la naturaleza del metabolito tóxico de cada especie sea diferente. El efecto nocivo se presentó a diferentes abundancias celulares en cada especie; se observó a $\geq 10,000$ cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama* y en $\geq 80,000$ cél ml⁻¹ de *H. horiguchii*.

Se documentó un efecto nocivo de la suspensión de células rotas de *H. horiguchii*. En *H. circularisquama* se ha documentado que el sobrenadante o la suspensión de células rotas no afectan a los rotíferos, y se ha planteado que el compuesto tóxico es lábil en el medio acuoso (Matsuyama et al., 1997; Kim et al., 2000; Oda et al., 2001), por lo tanto, se sugiere que el compuesto activo en *H. horiguchii* debe ser de naturaleza hidrofílica y/o estable en agua. Se requiere realizar más ensayos y caracterizar este o estos compuestos activos.

Kim et al. (2000) mencionan que *H. circularisquama* tiene un mecanismo tóxico específico hacia los rotíferos y los moluscos bivalvos, asociado a características comunes entre estos organismos, como la alimentación de microalgas o ciertas rutas metabólicas que los hacen sensibles a la toxicidad de esta especie. El efecto tóxico de las dos especies aisladas de la BTS se probó sólo en rotíferos, pero es necesario probar en otros modelos animales, incluyendo a los moluscos bivalvos ya que los estadios tempranos de estos organismos suelen ser sensibles a condiciones de estrés o son afectados por metabolitos de microalgas (Matsuyama et al., 2001; Tang y Gobler, 2009; Ahumada-Fierro, 2017).

Los rotíferos (*B. plicatilis*) como modelo animal de prueba son un indicador sensible para evaluar el efecto nocivo de las especies de *Heterocapsa* (Kim et al., 2000). Sin embargo, puede existir un sesgo en el bioensayo al considerar la viabilidad de los rotíferos con base en la presencia/ausencia de un nado activo. En este trabajo se usó esta variable para poder comparar el efecto nocivo *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* con otros trabajos, pero es claro que el resultado depende del observador y de que con este tipo de ensayo no se puede conocer si los rotíferos son afectados de otra manera que no se ve reflejada en la motricidad del organismo. Por lo tanto, es necesario implementar otro tipo de bioensayos para poder detectar la naturaleza de los compuestos activos como los bioensayos de actividad hemolítica.

Resumiendo los resultados del presente trabajo, se encontró que la respuesta del crecimiento, actividad fotosintética y de fotoprotección ante la exposición a diferentes irradiancia fue diferente entre *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama*. En *H. horiguchii* la respuesta fue similar entre aclimataciones. Esto indica que la especie tiene una menor plasticidad en comparación con *H. cf. circularisquama*, que presentó respuestas diferentes entre condiciones de cultivo, que significa una respuesta de aclimatación ante variaciones de irradiancia. Las respuestas de fotoaclimatación incluyen una expresión diferencial de componentes asociados con la recolección de luz, fotoprotección, separación de cargas, el transporte de electrones y los procesos de fijación de carbono (Iglesias-Prieto y Trench, 1997). En esta especie, la regulación de estos procesos puede verse reflejada en una mayor plasticidad. Por otro lado, existe una alta variabilidad intraespecífica en muchos dinoflagelados nocivos (Burkholder et al., 2006), por lo que es fundamental evaluar la respuesta de diferentes cepas, ya que cada una de estas puede desarrollar características fotoadaptativas específicas de acuerdo al ambiente donde se desarrollan (Cooney et al., 2019). En *H. horiguchii* se encontró una diferente respuesta del crecimiento y en la amplitud del NPQ, no obstante, el resto de las características fotosintéticas y de fotoprotección fueron semejantes. En cambio, en *H. cf. circularisquama*, sólo se pudo evaluar un aislado, por lo que es importante continuar con el monitoreo y aislamiento de esta especie, para determinar la variación de su fisiología fotosintética y su nivel de toxicidad entre aislados de la BTS.

Finalmente, no fue posible determinar si el potencial tóxico de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* estaba asociado a su capacidad fotosintética. Por cuestiones logísticas, no se pudieron realizar los bioensayos con rotíferos con células aclimatadas a diferentes irradiancias. Ambas especies tienen la posibilidad de formar FAN en la BTS, asociado a su tasa de crecimiento relativamente alta y su capacidad de crecer en diferentes irradiancias y temperaturas. Se propone el potencial nocivo de *H. horiguchii* se encuentra principalmente relacionado a la capacidad de generar altas abundancias en poco tiempo, y que el potencial de *H. cf. circularisquama* se relaciona a su toxicidad. Se enfatiza la importancia del monitoreo continuo de la comunidad fitoplanctónica en la BTS, ya que hasta el momento, se reconoce al género como presente a lo largo de todo el año (Fimbres-Martínez, 2019).

Capítulo 5. Conclusiones

H. horiguchii presentó una tasa de crecimiento mayor (0.46 ± 0.02 a 0.83 ± 0.14 día⁻¹) en 100 y 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ que a 20 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, donde se registró el valor más bajo (0.08 ± 0.02 día⁻¹). En la mayoría de las condiciones de cultivo las abundancias máximas fueron similares (arriba de 80,000 cél ml⁻¹)

H. cf. circularisquama presentó la tasa de crecimiento mayor (1 ± 0.22 día⁻¹) en 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La mayor abundancia se registró en 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En *H. cf. circularisquama* la irradiancia influyó en la abundancia y la tasa de crecimiento. Esta especie tiene la capacidad de crecer entre 100 a 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Alcanza una mayor abundancia en 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no obstante, su máxima μ es en 260 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El control del NPQ de *H. horiguchii* y de *H. cf. circularisquama* es diferente a lo reportado en otros dinoflagelados con perfil pigmentario tipo 1. El qE es importante para el control del NPQ en estas dos especies, lo cual no se había reportado en dinoflagelados tipo 1.

H. horiguchii y *H. cf. circularisquama* presentan un componente del NPQ independiente del CX y de la protonación de la membrana tilacoide, que puede estar relacionado al movimiento (disociación) de los complejos antena acpPC y/o PCP.

H. horiguchii y *H. cf. circularisquama* presentan diferentes características de fotoaclimatación, reflejadas en diferentes amplitudes del NPQ, recuperación de la eficiencia cuántica máxima (Fv/Fm) en oscuridad, y participación de los componentes del NPQ.

Las células de *H. horiguchii* y *H. cf. circularisquama* aisladas de la Bahía de Todos Santos presentan un metabolito secundario tóxico, de naturaleza diferente entre ellas, que tiene un efecto nocivo sobre los rotíferos (*B. plicatilis*) en abundancias $\geq 80,000$ cél ml⁻¹ de *H. horiguchii* y $\geq 10,000$ cél ml⁻¹ de *H. cf. circularisquama*.

Literatura citada

- Ahumada-Fierro, N.V. 2017. Caracterización de aislados de *Chattonella* spp. de la Bahía de Todos Santos, y evaluación de su efecto sobre estadios tempranos del ostión *Crassostrea gigas*. Tesis de Licenciatura en Oceanología. UABC.
- Ahumada-Fierro, N.V. 2020. Fisiología fotosintética y potencial tóxico de especies de *Chattonella* aisladas del Pacífico mexicano y el Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.
- Ahumada-Fierro, N. V., García-Mendoza, E., Sandoval-Gil, J. M., Band-Schmidt, C. J. 2021. Photosynthesis and photoprotection characteristics related to ROS production in three *Chattonella* (Raphidophyceae) species. *Journal of Phycology*, 1–14. doi:10.1111/jpy.13138
- Aké-Castillo, J. A., Rodríguez-Gómez, C. F., Peralez-Valdivia, H., Sanay-González, R. 2016. Florecimiento de *Heterocapsa rotundata* (Dinophyta) en el estuario río Jamapa, Veracruz. En E. García-Mendoza, S. I. Quijano-Scheggia, A. Olivos-Ortiz, & E. J. Núñez-Vázquez (Eds.), *Florecimientos Algaes Nocivos en México* (pp. 322–333). CICESE.
- Almazán-Becerril, A., Aké-Castillo, J. A., García-Mendoza, E., Sánchez-Bravo, Y., Escobar-Morales, S., Valadez-Cruz, F. 2016. Catálogo de microalgas de Bahía de Todos Santos, Baja California. CICESE, Ensenada.
- Andersen, R. A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier. doi:10.1192/bjp.111.479.1009-a
- Basti, L., Endo, M., Segawa, S., Shumway, S. E., Tanaka, Y., Nagai, S. 2015. Prevalence and intensity of pathologies induced by the toxic dinoflagellate, *Heterocapsa circularisquama*, in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 163, 37–50. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.012
- Blankenship, R. E. 2002. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Blackwell Science Ltd.
- Burkholder, J. M., Azanza, R. V., Sako, Y. 2006. The Ecology of Major Harmful Algae Groups. En E. Granéli & J. T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae* (pp. 53–64). Springer.
- Cembella, A., John, U. 2006. Molecular Physiology of Toxin Production and Growth Regulation in Harmful Algae. En E. Granéli & J. T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae* (pp. 215–227). Springer.
- Choi, H., Kim, S. 2021. *Heterocapsa busanensis* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae): A new marine thecate dinoflagellate from Korean coastal waters. *European Journal of Protistology*, 79, 125797. doi:10.1016/j.ejop.2021.125797
- Colombo-Pallotta, M. F., García-Mendoza, E., Ladah, L. B. 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *Journal of Phycology*, 42(6), 1225–1234. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00287.x

- Cooney, E. C., Fredrickson, K. A., Bright, K. J., Strom, S. L. 2019. Contrasting effects of high-intensity photosynthetically active radiation on two bloom-forming dinoflagellates. *Journal of Phycology*. doi:10.1111/jpy.12890
- Cosgrove, J., Borowitzka, M. A. 2010. Chlorophyll Fluorescence Terminology: An Introduction. En D. J. Suggett, O. Prášil, & M. A. Borowitzka (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications* (pp. 1–18). Springer. doi:10.1007/978-90-481-9268-7
- Cui, Y., Zhang, H., Lin, S. 2017. Enhancement of non-photochemical quenching as an adaptive strategy under phosphorus deprivation in the dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–14. doi:10.3389/fmicb.2017.00404
- Demmig-Adams, B., Adams, W. W. 1993. The xanthophyll cycle. En A. J. Young & G. Britton (Eds.), *Carotenoids in Photosynthesis* (pp. 206–250). Chapman & Hall. doi:10.1007/978-94-011-2124-8
- Derks, A. 2014. *The Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: an inquiry into the physiological and physical origins of non- photochemical chlorophyll fluorescence quenching*. Brock University.
- Falkowski, P. G., Raven, J. A. 2007. *Aquatic Photosynthesis*. Aquatic Photosynthesis (2nd ed.). Princeton University Press. doi:10.1515/9781400849727
- Fimbres-Martínez, M. 2019. Distribución y abundancia de microalgas ictiotóxicas en la costa noroeste de Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.
- Gárate-Lizárraga, I., Muñetón-Gómez, M., Maldonado-López, V. 2006. Florecimiento del dinoflagelado *Gonyaulax polygramma* frente a la isla Espíritu Santo, Golfo de California, México. *Revista de Investigaciones Marinas*, 27(1), 31–39.
- García-Mendoza, E., Colombo-Pallotta, M. F. 2007. The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different nonphotochemical quenching control than higher plants. *New Phytologist*, 173(3), 526–536. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01951.x
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A., Núñez-Vázquez, E. J. (Eds.). 2016. *FloreCIMIENTOS Algales Nocivos en México*. Ensenada, México: CICESE.
- Geider, R. J., Osborne, B. A. 1992. *Algal Photosynthesis*. Chapman & Hall.
- Goss, R., Jakob, T. 2010. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*, 106(1–2), 103–122. doi:10.1007/s11120-010-9536-x
- Goss, R., Lepetit, B. 2015. Biodiversity of NPQ. *Journal of Plant Physiology*, 172, 13–32. doi:10.1016/j.jplph.2014.03.004
- Hansen, P. J. 2011. The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(3), 203–214. doi:10.1111/j.1550-7408.2011.00537.x

- Hill, R., Larkum, A., Frankart, C., Kühl, M., Ralph, P. 2004. Loss of functional Photosystem II reaction centres in zooxanthellae of corals Exposed to Bleaching conditions: using fluorescence rise kinetics. *Photosynthesis Research*, 82: 59–72.
- Hill, R., Larkum, A. W. D., Prášil, O., Kramer, D. M., Szabó, M., Kumar, V., Ralph, P. J. 2012. Light-induced dissociation of antenna complexes in the symbionts of scleractinian corals correlates with sensitivity to coral bleaching. *Coral Reefs*, 31(4), 963–975. doi:10.1007/s00338-012-0914-z
- Hoegh-Guldberg, O., Jones, R. J. 1999. Photoinhibition and photoprotection in symbiotic dinoflagellates from reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 183, 73–86. doi:10.3354/meps183073
- Iglesias-Prieto, R., Trench, R. K. 1994. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Marine Ecology Progress Series*, 113, 163–175.
- Iglesias-Prieto, R., Trench, R. K. 1997. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *Marine Biology*, 130(1), 23–33. doi:10.1007/s002270050221
- Iwataki, M. 2008. Taxonomy and identification of the armored dinoflagellate genus *Heterocapsa* (Peridiniales, Dinophyceae). *Plankton and Benthos Research*, 3(3), 135–142. doi:10.3800/pbr.3.135
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. (Eds.). 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO Publishing, Paris.
- Kamiyama, T., Arima, S. 1997. Lethal effect of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* upon the tintinnid ciliate *Favella taraikaensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 160, 27–33. doi:10.3354/meps160027
- Kim, D.-I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.-H., Oshima, Y., Imada, N., Honjo, T. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *Journal of Plankton Research*, 26(1), 61–66. doi:10.1093/plankt/fbh001
- Kim, D., Sato, Y., Miyazaki, Y., Oda, T., Muramatsu, T., Matsuyama, Y., Honjo, T. 2002. Comparison of hemolytic activities among strains of *Heterocapsa circularisquama* isolated in various localities in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(2), 453–457. doi:10.1271/bbb.66.453
- Kim, D., Sato, Y., Oda, T., Muramatsu, T., Matsuyama, Y., Honjo, T. 2000. Specific toxic effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. doi:10.1271/bbb.64.2719
- Krause, G. H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313–349. doi:10.1002/9780470122563.ch3
- Leong, S. C. Y., Nakazawa, M., Taguchi, S. 2006. Physiological and optical responses of the harmful

- dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to a range of salinity. *Hydrobiologia*, 559(1), 149–159. doi:10.1007/s10750-005-0982-y
- Lin, J., Yan, T., Zhang, Q., Zhou, M. 2016. Impact of several harmful algal bloom (HAB) causing species, on life history characteristics of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 34(4), 642–653. doi:10.1007/s00343-016-5065-6
- Lombardo-Cifuentes, L. 2011. Mecanismos de Disipación no fotoquímica en dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima*. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.
- Matsuyama, Y. 2012. Impacts of the harmful dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* bloom on shellfish aquaculture in Japan and some experimental studies on invertebrates. *Harmful Algae*, 14, 144–155. doi:10.1016/j.hal.2011.10.019
- Matsuyama, Y., Uchida, T., Honjo, T. 1997. Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on clearance rate of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 146(1–3), 73–80. doi:10.3354/meps146073
- Matsuyama, Y., Usuki, H., Uchida, T., Kotani, Y. 2001. Effects of harmful algae on the early planktonic larvae of the oyster *Crassostrea gigas*. In G. M. Hallegraeff, S. I. Blackburn, C. J. Bolch, & R. J. Lewis (Eds.), *Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms* (pp. 411–414). Hobart, Australia: UNESCO.
- Millette, N. C., King, G. E., Pierson, J. J. 2015. A note on the survival and feeding of copepod nauplii (*Eurytemora carolleeae*) on the dinoflagellate *Heterocapsa rotundata*. *Journal of Plankton Research*, 37(6), 1095–1099. doi:10.1093/plankt/fbv090
- Miyazaki, Y., Nakashima, T., Iwashita, T., Fujita, T., Yamaguchi, K., Oda, T. 2005. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Toxicology*, 73(4), 382–393. doi:10.1016/j.aquatox.2005.04.005
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K. K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558–1566. doi:10.1104/pp.125.4.1558
- Murillo-Martínez, R. 2015. Efecto de la intensidad de la luz sobre los mecanismos de disipación no fotoquímica y producción de toxinas paralizantes en cepas de *Gymnodinium catenatum*. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE.
- Nagai, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Yamaguchi, M., Ishimura, M., Nishimura, A., Akamatsy, S., Honjo, T. 1996. Toxicity and LD50 levels of the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on juvenile pearl oysters. *Aquaculture*, 144(1–3), 149–154. doi:10.1016/S0044-8486(96)01307-5
- Nishiguchi, T., Cho, K., Yasutomi, M., Ueno, M., Yamaguchi, K., Basti, L., Yamasaki, Y., Takeshita, S., Kim, D., Oda, T. 2016. Intracellular haemolytic agents of *Heterocapsa circularisquama* exhibit toxic effects on *H. circularisquama* cells themselves and suppress both cell-mediated haemolytic activity and toxicity

to rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquatic Toxicology*, 179, 95–102. doi:10.1016/j.aquatox.2016.08.019

Oda, T., Sato, Y., Kim, D., Muramatsu, T., Matsuyama, Y., Honjo, T. 2001. Hemolytic activity of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its possible involvement in shellfish toxicity. *Journal of Phycology*, 37(4), 509–516. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.037004509.x

Paredes-Banda, P. E. 2020. Identification and characterization of potentially harmful dinoflagellates in Todos Santos Bay. PhD Thesis. CICESE.

Patron, N. J., Waller, R. F., Keeling, P. J. 2006. A tertiary plastid uses genes from two endosymbionts. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1373–1382. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.084

Ralph, P. J., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K., Kranz, S. A. 2010. Fluorescence as a Tool to Understand Changes in Photosynthetic Electron Flow Regulation. En D. J. Suggett, O. Prášil, & M. A. Borowitzka (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications* (pp. 75–90). Springer.

Rodríguez-Román, A., Iglesias-Prieto, R. 2005. Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Marine Biology*, 146(6), 1063–1073. doi:10.1007/s00227-004-1529-x

Sato, Y., Oda, T., Muramatsu, T., Matsuyama, Y., Honjo, T. 2002. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. *Aquatic Toxicology*, 56(3), 191–196. doi:10.1016/S0166-445X(01)00191-6

Schubert, N. 2008. Photoprotective mechanism in red algae. PhD Thesis. CICESE.

Steidinger, K. A., Garcés, E. 2006. Importance of Life Cycles in the Ecology of Harmful Microalgae. En E. Granéli & J. T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae* (pp. 37–49). Springer.

Stolte, W., Garcés, E. 2006. Ecological aspects of harmful algal in situ population growth rates. En E. Granéli & J. T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae* (pp. 139–149). Springer.

Suggett, D. J., Moore, M., Geider, R. J. 2010. Estimating Aquatic Productivity from Active Fluorescence Measurements. In D. J. Suggett, O. Prášil, & M. A. Borowitzka (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications* (pp. 103–128). Springer.

Tang, Y. Z., Gobler, C. J. 2009. *Cochlodinium polykrikoides* blooms and clonal isolates from the northwest Atlantic coast cause rapid mortality in larvae of multiple bivalve species. *Marine Biology*, 156(12), 2601–2611. doi:10.1007/s00227-009-1285-z

Tas, S. 2015. A prolonged red tide of *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) F. Stein (Dinophyceae) and phytoplankton succession in a eutrophic estuary in Turkey. *Mediterranean Marine Science*, 16(3), 621–627.

- Warner, M. E., LaJeunesse, T. C., Robison, J. D., Thur, R. M. 2006. The ecological distribution and comparative photobiology of symbiotic dinoflagellates from reef corals in Belize: Potential implications for coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 51(4), 1887–1897. doi:10.4319/lo.2006.51.4.1887
- Xiao, J., Sun, N., Zhang, Y., Sun, P., Li, Y., Pang, M., Li, R. 2018. *Heterocapsa bohaisensis* sp. nov. (Peridinales: Dinophyceae): a novel marine dinoflagellate from the Liaodong Bay of Bohai Sea, China. *Acta Oceanologica Sinica*, 37(10), 18–27. doi:10.1007/s13131-018-1296-z
- Yamaguchi, M., Itakura, S., Nagasaki, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Imai, I. 1997. Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). *Journal of Plankton Research*, 19(8), 1167–1174. doi:10.1093/plankt/19.8.1167
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., Garrido, J. L. 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, 465(3), 33–52. doi:10.3354/meps09879
- Zhang, Y., Feng, T., Qu, J., Sun, N., Liu, L. 2019. Toxicity and haemolytic activity of a newly described dinoflagellate, *Heterocapsa bohainensis* to the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae*, 84(March), 112–118. doi:10.1016/j.hal.2019.03.007