



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALGUCIDA DE LA
BACTERIA MARINA *Ruegeria atlantica* SOBRE MICROALGAS
MARINAS**

Carolina del Pilar Pizarro Ñanco

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: ANA MARÍA AMARO SEPÚLVEDA

SANTIAGO, CHILE
2005

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile por permitir la realización de esta tesis. A la profesora Ana María Amaro por su paciencia y dedicación; al doctor Benjamín Suárez por sus sabios consejos; a Juan Inostroza por su gran ayuda y disposición; a Loreto por convertirse en una gran amiga; a Gabriel, Marcos, Ignacio, Juanito, Lidia, Consuelo, Ariana, Nuria y Cristina por hacer la estadía en el laboratorio un grato momento para compartir.

Mi gratitud a la Dra. Maria Luisa Sánchez por ser una excelente profesora y consejera. A la Dra. Borie por su valiosa contribución en la revisión de esta tesis.

A todos los amigos con los que he podido compartir los buenos y malos momentos de mi vida, en especial a Daniel por su alegría y enorme paciencia.

A Jesse, por su gran cariño y compañía, y por su ayuda en el *summary*.

A mis hermanas Patty, Claudia y Sandra, que más que hermanas son mis mejores amigas; a mis sobrinas preciosas que iluminan la vida.

A mi Padre, por ser el pilar de mi familia, por su sabiduría, por su infinito apoyo.

Por último, gracias a mi Madre, por su fortaleza a toda prueba, por su eterno amor y por enseñarme que incluso en los más duros momentos de la vida siempre se puede sonreír.

I. RESUMEN.

En los últimos treinta años se ha visto un aumento a nivel global del fenómeno de Floración de algas nocivas (FAN), más conocido como marea roja. Esto implica, entre otras cosas, problemas de salud pública y una gran pérdida económica para los productores de moluscos bivalvos. Es por esto que se ha generado un gran interés para entender el por qué de estos fenómenos naturales y si existe la posibilidad de crear métodos que permitan: predecir, mitigar o controlar estas floraciones una vez que se producen. Por esta razón, es importante investigar acerca de los factores involucrados en el fenómeno, entre los cuales se encuentran las bacterias que normalmente crecen asociadas a las microalgas causantes de las FAN.

En Chile las FAN se producen fundamentalmente por el crecimiento explosivo de los dinoflagelados *Alexandrium catenella* y *Dynophysis acuta*, productores de toxinas paralizante y diarreaica respectivamente. En el laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile se mantiene en cultivo una cepa de *Alexandrium catenella* denominada ACCO1 la cual fue aislada el año 1994 en la XI región de Aysén. A partir de estos cultivos, en el año 2002 se aislaron, caracterizaron e identificaron tres bacterias asociadas a esta microalga, correspondientes a: *Citophaga sp.* AMA-01, *Pseudoalteromonas sp.* cepa AMA- 02, y *Ruegeria atlántica* cepa AMA- 03.

Ruegeria atlántica cepa AMA-03 es una bacteria que crece en forma saprofita asociada a *A. catenella* cepa ACCO1, pero al crecerla separada de la microalga en un medio de cultivo enriquecido con nutrientes orgánicos, libera al medio un producto, el cual es capaz de producir la lisis de *A. catenella* en cultivo. Cuando la misma bacteria, libre de materia orgánica (lavadas) es devuelta al cultivo de origen, esta recupera su carácter simbiote ya que no se observa muerte, ni lisis celular de las microalgas.

El efecto lítico de este factor liberado al medio, es menor cuando se pone en contacto con *Heterocapsa sp.* y *A. catenella* cepa ACCO2, sugiriendo algún grado de especificidad de este fenómeno .

Al aislar, purificar parcialmente y caracterizar este producto, logramos concluir que se trata de un compuesto de características parcialmente hidrofóbicas, de un tamaño menor de 1 KDa con capacidad de inmovilizar y producir la muerte de las microalgas, las que

luego son degradadas probablemente por las enzimas liberadas al medio por las bacterias asociadas al cultivo del dinoflagelado.

II. SUMMARY

In the last thirty years there has been a global increase in the phenomenon of Harmful Algal Blooms (HAB), or better known as red tide. That implies, among other things, public health problems and significant economic losses for the bivalve mollusk industry. Thus, it has generated a great deal of concern to understand the reasons behind the natural phenomenon and if there is a possibility to create methods that allow to predict, to alleviate, or to control these blooms when they occur. For that reason, it is important to investigate the factors that are involved in the phenomenon, and which factors are associated to the microalgas that cause the HAB, in which the bacterias normally exist.

In Chile, HAB are fundamentally produced through the explosive growth of the dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *Dynophysis acuta*, which respectively are producers of paralytic and diarrhetic toxins. The Marine Toxins Laboratory at the University of Chile has maintain a cultivated strain of *Alexandrium catenella* named ACC01, such as the strain that was isolated in 1994 from Aysen in the eleventh Region of Chile. From those cultures, in 2002 its been isolated, characterized and identified three additional bacteria associated with this micro alga, corresponding to: *Citophaga sp.* AMA 01, *Pseudoalteromonas sp.* strain AMA 02, and *Ruegeria atlantica* strain AMA 03.

The *Ruegeria atlantica* strain AMA 03 is a bacterium that grew in saprophyte form associated to *A. Catenella* strain ACC01, but to grow it apart from the micro alga in an enriched medium with organic nutrients, release a product to the environment, that which is capable to produce the lysis of *A. catenella* in cultivation. However, if the cells of this bacteria, free of organic material (washed), are added back directly to a culture of the same micro alga, it unable of producing lysis.

The lytic result of this natural environment factor is minor when it is put in contact with *Heterocapsa sp.* and *A. catenella* strain ACC02, fact that suggest some degree of specificity of this phenomenon.

By isolating, purifying partially, and characterizing this product, and we seek to convince by reasoning that a composite of hydrophobic characteristics of a minor size of one KDa with the ability to immobilize the micro alga, which are probably degraded through the natural environment enzymes by bacteria associated to the culture of dinoflagellates.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	11
V. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1. MATERIAL	
5.1.1. Cultivo y mantención de microalgas	12
5.1.2. Condiciones de cultivo	13
5.1.3. Cultivo y mantención bacteriana	13
5.1.4. Curva de crecimiento bacteriano	14
5.1.5. Relación absorbancia / número de bacterias	14
5.1.6. Obtención de sobrenadante y pellet bacteriano	14
5.2. MÉTODOS	
5.2.1. Determinación del efecto alguicida	15
5.2.1.1. Efecto alguicida directo	15
5.2.1.2. Efecto alguicida indirecto	16
5.2.1.3. Especificidad del efecto alguicida	17
5.2.1.4. Análisis estadístico	17
5.2.2. Caracterización de la sustancia alguicida de <i>Ruegeria atlantica</i>	18
5.2.2.1. Detección de las actividades enzimáticas de <i>Ruegeria atlantica</i> .	18
5.2.2.2. Fraccionamiento por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	20
5.2.2.3. Medición de la actividad alguicida de las fracciones de HIC contra <i>A. catenella</i> cepa ACC01	21
5.2.2.4. Ultrafiltración de las fracciones hidrofóbicas con actividad lítica	23
5.2.2.5. Medición de la actividad alguicida de las fracciones ultrafiltradas	24
5.2.2.6. Especificidad de la actividad alguicida de las fracciones ultrafiltradas	25
VI. RESULTADOS	
6.1. Curva de crecimiento bacteriano	26
6.2. Determinación del efecto alguicida	27
6.2.1. Determinación del efecto alguicida directo	27

6.2.2. Análisis estadístico efecto alguicida directo	28
6.2.3. Efecto alguicida indirecto	28
6.2.4. Análisis estadístico efecto alguicida indirecto	29
6.2.5. Determinación especificidad	
6.2.5.1 Efecto alguicida indirecto sobre <i>Heterocapsa sp.</i> cepa SGM 01	29
6.2.5.2 Análisis estadístico efecto alguicida indirecto sobre <i>Heterocapsa sp.</i>	30
6.2.5.3. Efecto alguicida indirecto sobre <i>A. catenella</i> cepa ACC02	30
6.2.5.4. Análisis estadístico efecto alguicida indirecto de <i>R. atlantica</i> sobre <i>A. catenella</i> cepa ACC02.	31
6.3. Caracterización de la sustancia alguicida de <i>R. atlantica</i>	
6.3.1. Pruebas enzimáticas	31
6.3.2. Fraccionamiento por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) del SFD de <i>Ruegeria atlantica</i> cepa AMA 03	33
6.3.3. Determinación de la actividad lítica de las fracciones de HIC frente a <i>A. catenella</i> cepa ACC01	33
6.3.4. Ultra filtración por peso molecular del SFD de <i>R. atlantica</i>	34
6.3.5. Determinación de la actividad alguicida de las fracciones ultrafiltradas contra <i>A. catenella</i> cepa ACC01	35
6.3.6. Medición de la especificidad de la actividad alguicida de las fracciones ultrafiltradas	35
VII. DISCUSIÓN	36
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. BIBLIOGRAFÍA	41
X. ANEXO	47

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son la base del ecosistema marino porque al ser organismos fotosintéticos proveen el oxígeno al medio acuático y son los principales productores de biomasa y compuestos orgánicos de los océanos. Constituyen una fuente de alimento muy importante para muchos moluscos bivalvos filtradores (almejas, ostras, etc.) entre otras especies de importancia comercial.

La marea roja es un fenómeno natural que consiste en la floración explosiva de microalgas, algunas de las cuales, son capaces de dar coloración a los mares, color que varía según las especies predominantes. Es un fenómeno natural, sin embargo, menos del 9% de las microalgas descritas son capaces de producir toxinas, por esto, hoy se les denomina más correctamente Floración de Algas Nocivas (FAN), a aquellas que pudieran ser dañinas para el ecosistema y la salud humana.

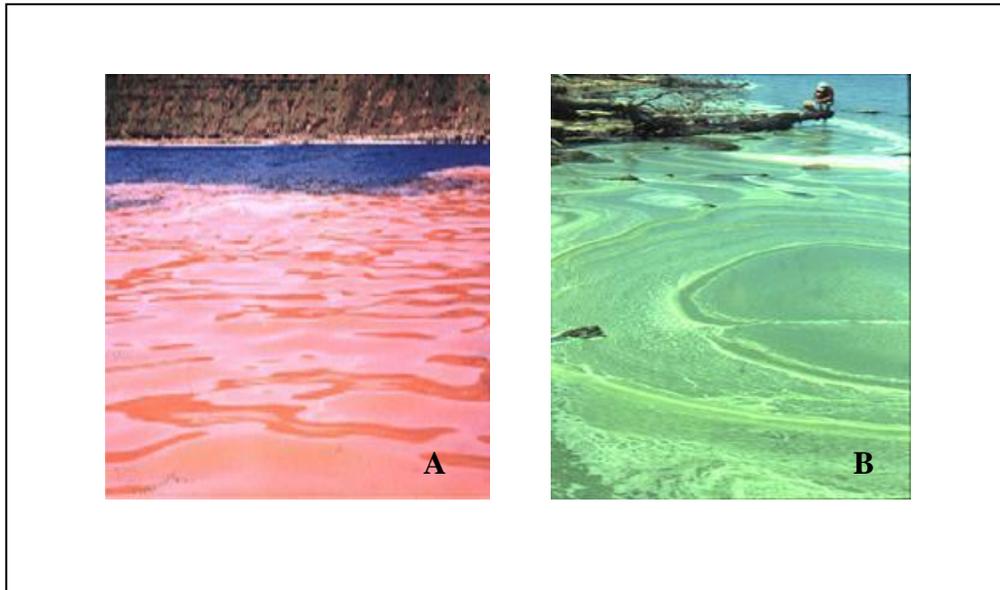
Se han descrito cinco tipos de toxinas asociadas a microalgas: la diarreica (VDM), la paralizante (VPM), la amnésica (VAM), el veneno Neurotóxico de Moluscos (VNM) y Ciguatera. En Chile se han registrado intoxicaciones humanas de tipo paralizante, causadas por el dinoflagelado *Alexandrium catenella* y de tipo diarreico, provocada por *Dinophysis acuta*.

Diversos estudios han demostrado que estas microalgas tóxicas normalmente se encuentran asociadas con bacterias; estas últimas podrían estar involucradas en el crecimiento y toxicidad de las algas. No está claro aún el rol de estas bacterias en la dinámica de las FAN, aún cuando existe evidencia de que algunas de ellas poseen actividad alguicida, lo cual podría estar relacionado con el término de las FAN.

En Chile, el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile aisló tres bacterias asociadas al dinoflagelado *A. catenella*, una de ellas es *Ruegeria atlantica*, que ejerce un efecto alguicida sobre cultivos de la microalga citada. Sin embargo, a la fecha no se conoce el mecanismo de ataque de la bacteria, ni tampoco si es un efecto especie-específico, siendo estos los objetivos de este estudio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La marea roja es un fenómeno ampliamente expandido en el mundo, la cual ha tenido efectos nocivos en la salud pública, en las actividades pesqueras y en la ecología marina, entre otros. Es por esa razón, que su estudio cobra cada día más relevancia (Hallegraeff *et al.*, 1995). Son floraciones de algas que ocurren en forma natural. En un ambiente favorable de nutrientes, salinidad, luz y temperatura se favorece su reproducción. Otros factores, como vientos suaves o ausentes, lluvias y estratificaciones de columnas de agua, podrían determinar que estos organismos se “agrupen”. Sin embargo, las razones específicas de un crecimiento explosivo aún no están bien determinadas (Suárez y Guzmán, 1999).



Fotografía 1: **A:** Marea roja en New South Wales, Australia, tomada por Ricky Shang, de la Universidad de New South Wales. **B:** FAN en lago Gippsland, Australia, tomada por J.D. Kinnon.

A este fenómeno hoy se le denomina más correctamente como Floración de Algas Nocivas (FAN), ya que de 5.000 especies de microalgas descritas (Sournia *et al.*, 1991) son aproximadamente 300 (Smayda, 1997) las que pueden ser nocivas tanto para la salud humana como para otros organismos marinos (Suárez y Guzmán, 1999). De estas 300 especies, solamente alrededor de 40 (principalmente dinoflagelados) tienen la potencialidad

de producir toxinas (Steidinger, 1993; Arnott, 1998) las que son concentradas por los moluscos que se alimentan de las microalgas (Vergara *et al.*, 1995).

También se consideran como parte de la FAN, a las especies fitoplanctónicas no tóxicas, que al estar en gran número, pueden disminuir el contenido de oxígeno disuelto en el agua o dañar mecánicamente las branquias de peces confinados, especialmente en los centros de cultivo de salmones (Suárez y Guzmán, 1999).

Anualmente en el mundo se reportan aproximadamente 2.000 casos de intoxicaciones en humanos por consumo de peces y moluscos contaminados con alguna especie de toxina (Hallegraeff *et al.*, 1995). Sin embargo, estas intoxicaciones no se limitan solo a la especie humana, sino que además, especies de mamíferos marinos, aves, peces, moluscos y crustáceos, han recibido las toxinas a través de la cadena trófica vía zooplancton o peces (Frangópulus, 2002). Es decir, las toxinas producidas por microalgas pueden alterar la estructura y función de los ecosistemas marinos (Anderson, 1997).

A pesar de que estas FAN se han reportado desde hace mucho a través de la historia del hombre, en los últimos treinta años se ha evidenciado un aumento en la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de estas proliferaciones (Anderson, 1989; Smayda, 1990; Hallegraeff, 1992). Esto podría tener relación con el aumento mundial del uso de aguas costeras para actividades acuícolas, la intervención humana de las aguas (eutroficación), el cambio de las condiciones climáticas mundiales, el transporte de microalgas a través de las aguas de lastre de los grandes barcos cargueros desde un lugar contaminado a otro, o por un aumento del interés científico en estudiar estos eventos (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Un ejemplo de esta expansión es lo que se ha producido con las microalgas productoras de veneno paralizante (VPM) del género *Alexandrium*, las cuales hacia el año 1970 se podían localizar sólo en aguas templadas de Europa, América del Norte y Japón. En 1990 estas toxinas se habían extendido por el hemisferio sur en Sudáfrica, Australia, India Tailandia, Nueva Guinea, Filipinas, Argentina y Chile, entre otros países (Hallegraeff, 1993) (Fig. 1).

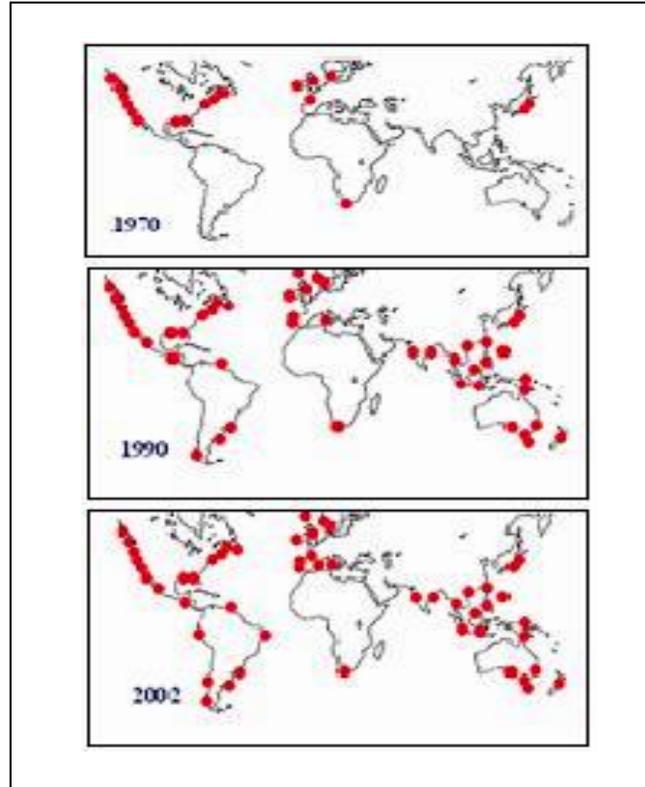


Figura 1: Distribución Geográfica del Veneno Paralizante de Moluscos (VPM), modificado de Hallegraeff, 1993.

En Chile el fenómeno de marea roja se ha observado desde el siglo XIX, siendo registrada por primera vez por el naturalista alemán Poepping que en 1827 observó una intensa decoloración del agua frente a las costas de Valdivia (Uribe, 1992). Además, Charles Darwin se refiere varias veces a estos fenómenos en su libro *Los viajes de un naturalista* citado en Suárez y Guzmán (1999).

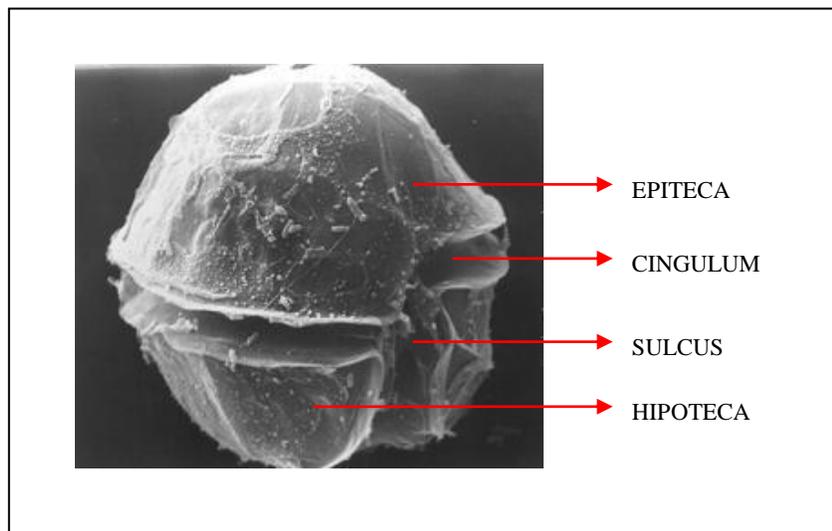
En las costas chilenas, se ha descrito la presencia de las microalgas productoras del veneno o toxina diarreaica (VDM) denominada *Dinophysis acuta* y del veneno paralizante (VPM) llamada *Alexandrium catenella*. También, están presentes en nuestras costas, diatomeas del Género *Pseudo-nitzschia* las que producen veneno amnésico (VAM); sin embargo, sólo se han reportado intoxicaciones humanas producidas por las toxinas diarreaica y paralizante (Suárez y Guzmán, 1999).

Además, en Chile se han producido floraciones nocivas no tóxicas, un ejemplo es lo que ocurrió en 1988 en el área de Puerto Montt y Chiloé, donde un aumento de

Heterosigma akashiwo produjo una mortandad masiva de salmones de cultivo (Suárez y Guzmán, 1999). Este episodio ocasionó una pérdida de varios millones de dólares en la industria salmonera (Clément y Lembeye, 1993).

La última FAN tóxica producida en el sur de Chile se registró a principios del año 2002 en el archipiélago de Chiloé, donde un brote de VPM causado por el dinoflagelado *Alexandrium catenella*, provocó la intoxicación de 70 personas con dos casos fatales. Las veda de extracción de mariscos, que se extendió por 80 días en promedio, ocasionó un fuerte impacto económico en la industria de mariscos, con perdidas estimadas en mas de seis millones de dólares (Arriagada *et al*, 2004).

La microalga causante de este último brote fue *Alexandrium catenella*. Esta microalga es un dinoflagelado, perteneciente al género *Alexandrium* (Balech, 1985; Steidinger, 1993). Se caracteriza por tener una pared celular denominada teca la que está constituida por placas celulósicas. La célula esta dividida en una parte superior o epiteca y una inferior o hipoteca por un cinturón central o *cingulum* hasta la parte posterior o final de la célula. Posee dos flagelos, utilizados para nadar, uno alrededor de la célula en el *cingulum* y otro a lo largo del *sulcus* (Fotografía 2). Generalmente son de forma oval y en tamaño varían de entre los 20-50 μm de diámetro. Como su nombre lo dice puede estar en forma individual o formando cadenas (Frangópulus, 2002)



Fotografía 2: Fotografía Electrónica de Barrido de *Alexandrium catenella* y su estructura (Amaro *et al*, 2005)

Se reproducen asexualmente por medio de divisiones vegetativas, pero cuando las condiciones son desfavorables para su desarrollo, este proceso puede cambiar a una reproducción sexual, mediante la formación de gametos que se fusionan para producir un cigoto de tamaño mayor y con capacidad natatoria. Esta célula diploide se transforma en un quiste de resistencia, el cual, una vez que las condiciones lo permiten, germina liberando una célula capaz de dividirse y de producir células hijas que son haploides y con la capacidad de realizar mitosis, con lo cual se da inicio a un nuevo ciclo (Anderson *et al.*, 1984).

El metabolismo de *Alexandrium* produce toxinas paralizantes, las más conocidas son las *Saxitoxinas*, las que en humanos bloquean los canales de sodio, y a través de este mecanismo se bloquea el impulso nervioso, causando parálisis y posteriormente muerte, si los intoxicados no son tratados a tiempo (Alcayaga *et al.*, 1998).

Las razones del por qué el fitoplancton produce toxinas, no están del todo explicadas. Como no existe una evidencia clara de su función en el metabolismo primario e intermedio de los dinoflagelados, las toxinas paralizantes han sido consideradas como metabolitos secundarios. Sin embargo, no siguen el patrón clásico de metabolitos secundarios observados en otros organismos, los cuales generalmente se inducen bajo condiciones de estrés o durante una fase determinada del ciclo de vida (Frangópulus, 2002).

Tampoco existe una evidencia clara que explique la función ecológica de estos compuestos, ni las razones por las que evolutivamente han aparecido estas especies de dinoflagelados productores de toxinas.

Existe la hipótesis de una simbiosis con bacterias, que sería consistente con el probable origen poli filético de los genes que sintetizan las toxinas (Doucette *et al.*, 1998). Esto se complementaría con la teoría de que las microalgas no serían la única fuente de toxinas paralizantes en el ambiente marino, ya que existen algunas evidencias de que el VPM es producido en muy bajas concentraciones por bacterias aisladas desde cultivos de dinoflagelados (Shimizu *et al.*, 1996; Franca *et al.*, 1996).

En el océano, el flujo de la materia orgánica hacia las bacterias es enorme, y desde allí sus componentes son reciclados a otros organismos y a la atmósfera (Azam, 1998). Por lo tanto la interacción entre algas y bacterias es un importante factor que influye en la ecología del fitoplancton marino. Esta relación podría interpretarse como mutualismo, ya

que las microalgas podrían integrar las bacterias a sus organelos, donde ellas pueden vivir normalmente; sin embargo, en condiciones extremas pueden ser utilizadas como fuente de materia orgánica (Kodama *et al.*, 1996).

Existen estudios que describen que algunas bacterias podrían estimular el crecimiento de las microalgas con las que se relacionan. Un ejemplo, es lo que pasa con el dinoflagelado tipo-*Pfiesteria* cepa CCMP1828, cuyos cultivos requieren de bacterias del género *Ruegeria* para su crecimiento en cultivo (Alavi *et al.*, 2001).

Por otro lado también se podría describir como comensalismo, ya que bajo condiciones de stress de nutrientes ambos microorganismos compiten por materia orgánica y eventualmente algunas bacterias terminan matando y lisando las microalgas con las que convivían (Mayali y Azam, 2004). Esto se ve complementado con un estudio que indica que las bacterias acelerarían la desintegración de las microalgas una vez que estas alcanzan la fase estacionaria de crecimiento (Uribe y Espejo, 2003).

Holmström y Kjelleberg (1999), describieron que un grupo de bacterias marinas del Genero *Pseudoalteromonas*, que se encuentran asociadas con algunas microalgas entre otros hospederos eucariotas, eran capaces de sintetizar compuestos extracelulares activos con propiedades antibacterianas, bacteriolíticas, agarolíticas y alguicidas.

Este efecto de las bacterias sobre microalgas nocivas es considerado “alguicida” y se postula que podría efectuarse a través de dos mecanismos de ataque, uno “directo” el cual requiere contacto físico entre el alga y las bacterias (Lovejoy *et al.*, 1998) y otro indirecto, donde la bacteria liberaría un compuesto lítico al medio que rodea al alga (Doucette *et al.*, 1998).

En algunos géneros de bacterias marinas se ha descrito el mecanismo indirecto de ataque. Un ejemplo es el de *Pseudoalteromonas sp.* cepa A28, la que produce una serín-proteasa extracelular de un tamaño de 50 KDa responsable de lisar a la diatomea *Skeletonema costatum* (Lee *et al.*, 2000).

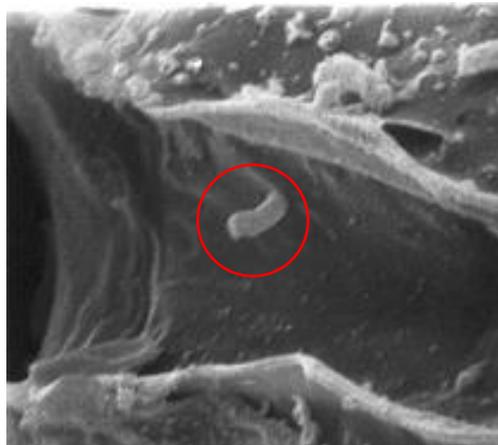
En estudios realizados por Mitsutani *et al* (2001), con la bacteria marina *Pseudoalteromonas sp.* cepa A25, la actividad alguicida contra *Skeletonema costatum* se presentaría sólo en la fase estacionaria de la bacteria, etapa en la que se evidencia además una gran actividad proteasa. Este hecho se complementarían con la teoría de que las

bacterias deben alcanzar cierta densidad antes de que el factor alguicida se exprese, lo que se denomina “*quórum sensing*” (Schauder *et al.*, 2001).

En el caso de que fueran proteasas las involucradas en la lisis de las microalgas, se postula que la cubierta de polisacáridos de estos organismos jugarían un rol defensivo contra los ataques proteolíticos bacterianos (Mayali y Azam, 2004).

Sin embargo, Skerratt *et al* (2002) postulan que el mecanismo alguicida de las bacterias no es enzimático, ya que al someter un sobrenadante bacteriano a temperaturas de hasta 120° C no perdió la capacidad de lisis. Otro punto importante en discusión es si esta interacción entre microalgas y bacterias es especie–específica, ya que estas bacterias podrían jugar un rol importante en la dinámica de la población fitoplanctónica, especialmente en el término de las FAN (Fukami *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998; Yoshinaga *et al.*, 1998). Se ha demostrado que estas bacterias conviven en gran cercanía física con la membrana externa de las células de dinoflagelados (Brinkmayer *et al.* 2000, Amaro *et al* 2005).

El Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile logró aislar, desde un cultivo de laboratorio de *Alexandrium catenella* cepa ACC01, a tres bacterias fuertemente asociadas, identificadas como: *Citophaga* sp. AMA-01, *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 y *Ruegeria atlantica* AMA-03 (Amaro *et al.*, 2005) (Fotografía 3).



Fotografía 3. Microfotografía de *A. catenella* cepa ACC01, el círculo muestra una bacteria en el *cingulum* de la microalga; Microscopio Electrónico de Barrido (10.000x) (Amaro *et al.*, 2005)

Ruegeria atlantica, hace unos años se clasificaba dentro del Género *Agrobacterium* (Rueger y Hoefle, 1992) por sus características que las relacionaba a un grupo de bacterias marinas originarias del mar Báltico, pero el análisis del fragmento 16S del DNA concluyó que se trataba de un nuevo Género. El Género *Ruegeria* se caracteriza por ser un grupo de bacterias Gram negativas, de un tamaño aproximado de 2 µm de largo, forman colonias pequeñas, blancas y redondeadas, y pertenecen al grupo de las *α-proteobacterias*. (Uchino *et al.*, 1998) (Fotografía 4).



Fotografía 4. Microfotografía de *Ruegeria atlantica*. AMA-03, Microscopio Electrónico de Barrido (10.000x) (Amaro *et al.*, 2005)

Bacterias del grupo *Roseobacter*, al que pertenece *R. atlantica*, se han encontrado asociadas a otros dinoflagelados tóxicos, como *Prorocentrum lima* (Lafay *et al.*, 1995); *Alexandrium lusitanicum*, *A. tamarense* y *A. affine* (Gallacher *et al.*, 1997; Hold *et al.*, 2001). En Chile, se describieron dos bacterias del grupo *Roseobacter*, asociadas a cultivos de *A. catenella* pertenecientes al Género *Psychrobacter* y *Sulfitobacter* (Vásquez *et al.*, 2001).

Recientemente se ha observado que *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03 posee la capacidad de lisar a *Alexandrium catenella* (Amaro *et al.*, 2005). Es la primera vez que se describe este efecto en este grupo de bacterias, sin embargo, el mecanismo de qué y cómo provoca la destrucción de su hospedero aún no está bien definido.

III. HIPOTESIS

Ruegeria atlantica, bacteria marina aislada desde un cultivo del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* cepa ACC01, al crecer en un medio rico separada de la microalga es capaz de producir sustancias alguicidas que producen la lisis de su hospedero habitual.

IV. OBJETIVOS

General.

Determinar y caracterizar la actividad alguicida de la bacteria *Ruegeria atlantica* asociada a cultivos del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella*.

Específicos

1. Determinar el tipo de efecto alguicida (directo y / o indirecto) que, la bacteria *Ruegeria atlantica*, ejerce sobre cultivos de *Alexandrium catenella* cepa ACC01.
2. Determinar en que fase de la curva de crecimiento de *R. atlantica* se expresa la actividad alguicida.
3. Caracterizar las actividades enzimáticas, tanto endo como exoenzimas, presentes en las diferentes fases del crecimiento de *R. atlantica*.
4. Estudiar la especificidad del efecto alguicida de *Ruegeria atlantica* frente a una cepa de microalga tóxica y una no tóxica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

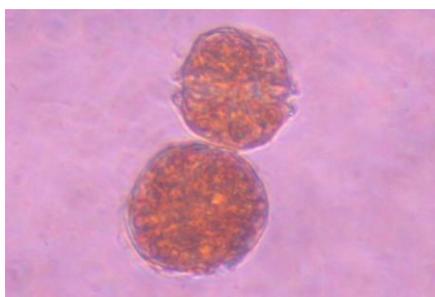
Todos los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile.

5.1. MATERIAL

5.1.1. Cultivo y Mantención de Microalgas

Cepas de microalgas utilizadas:

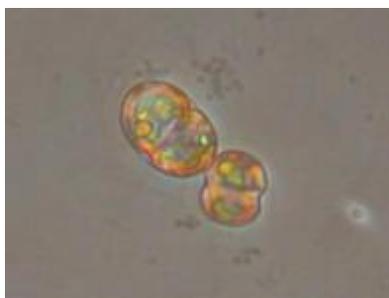
a.-*Alexandrium catenella*, cepa ACC01 (Fotografía. 5), aislada y donada por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Puerto Montt, Chile. Esta cepa fue colectada en Abril de 1994 desde aguas costeras de la región de Aysén, Chile (Canal Costa, 45°32'S, 73°34'W).



Fotografía 5. Microfotografía de *Alexandrium catenella* cepa ACC01, Microscopio de Luz Invertido (40x) (Laboratorio de Toxinas Marinas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2004)

b.-*Alexandrium catenella*, cepa ACC02, aislada y donada por el laboratorio del Centro “J-Mar” del Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente de la Universidad de los Lagos, sede Puerto Montt.

c.- *Heterocapsa* sp. cepa SGM01 (Fotografía 6), microalga no tóxica aislada y donada por el Centro de producción de Abalón “AWABI” de la Universidad Católica del Norte.



Fotografía 6. Microfotografía de *Heterocapsa sp.* cepa SGM01, Microscopio de Luz (40x) Invertido (Laboratorio de Toxinas Marinas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2004)

5.1.2. Condiciones de Cultivo:

Las tres microalgas dinoflageladas se desarrollaron en matraces estériles en medio de cultivo F/2-Si (Guillard, 1975) (anexo 1), con un ciclo de luz: oscuridad de 16: 8, a una intensidad lumínica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones, a una temperatura de 12°C , en cámaras de cultivo celular (Trilab ®).

El material utilizado se esterilizó por vapor a presión durante 15 minutos a 124°C y $1,3 \text{ Kg./cm}^2$ de presión (Electric Pressure Steam Sterilizer Model NO.25X, All American®).

El manejo estéril de los cultivos de microalgas se realizó en una Cámara de flujo laminar.

5.1.3. Cultivo y Mantenimiento Bacteriana:

Se utilizó la especie bacteriana *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03, aislada en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la U. de Chile, desde un cultivo de *A. catenella* cepa ACC01. Su identificación se realizó a través de la amplificación por PCR del 16S rDNA (Amaro *et al.*, 2005). La mantención de la cepa se realizó a -20°C . en Caldo Marino (Difco ®) suplementado con 50% de Glicerol.

El cultivo en medio sólido se realizó en Agar Marino (Difco ®) a 25°C . por 48 horas en una cámara de cultivo (Compact CO₂ series 5000 Thermolyne®).

Para cultivar en medio líquido, se utilizó F/2-Si (Guillard, 1975), enriquecido con 0,25% de bactopectona, a una temperatura de 25°C con agitación orbital de 120 r.p.m (Incubador Termorregulado Environ Shaker Orbit), hasta alcanzar la fase de crecimiento deseada.

5.1.4. Curva de crecimiento bacteriano:

El crecimiento de *Ruegeria atlantica* en medio líquido, se midió cada una hora por el incremento de la absorbancia del cultivo a 620 nm. (espectrofotómetro modelo 4049 LKB *Blochroom Novaspec*). Los datos se registraron en un gráfico tiempo / absorbancia que originó una curva de crecimiento característica para la bacteria, pudiendo identificar claramente tres fases de crecimiento: latencia, exponencial y estacionaria.

5.1.5. Relación absorbancia / número de bacterias

Para hacer una relación entre absorbancia y concentración bacteriana, en cada etapa de crecimiento se determinó las unidades formadoras de colonia (UFC). Esto se realizó haciendo diluciones 1:10 de cada fase de crecimiento con medio F/2-Si estéril, hasta obtener la menor turbidez posible mediante el uso de un nefelómetro de Mc Farland. De las dos últimas diluciones de cada fase, se tomaron 50 µl que se sembraron en superficie y en duplicado en placas de agar marino; las que se incubaron a 30°C por 48 horas (Thermolyne Compact CO₂ Series 5000 Modelo 153320-26). Para determinar el número de colonias de cada etapa se aplicó la siguiente fórmula (Gerhardt *et al*, 1981):

$$\text{UFC/mm}^3 = \text{N}^\circ \text{ colonias} \times \text{dilución} / \text{volumen muestra.}$$

5.1.6. Obtención de sobrenadante y pellet bacteriano

Luego de cultivar *Ruegeria atlántica* en medio líquido, se tomaron 100 ml de cada etapa de crecimiento y se centrifugaron a 12.100 x g. (Sorvall® RCSB Refrigerated Superspeed Centrifuge) a una temperatura de entre 0 a 10° C. por 20 minutos. Con este procedimiento se obtuvo una fase acuosa correspondiente al sobrenadante del cultivo bacteriano y una fase sólida correspondiente a las células bacterianas precipitadas.

El sobrenadante se pasó a través de filtros de nitrocelulosa de 0.2 µm con presión negativa, para dejarlo libre de células. Posteriormente para eliminar la bactopectona del medio, una alícuota de 50 ml del sobrenadante fue dializada contra F/2, utilizando una membrana de diálisis Snake skin® con poros de 10 KDa, a una temperatura de 4° C. y en agitación constante, con tres cambios del medio cada dos horas, contra un volumen final de

2 litros. El sobrenadante filtrado y dializado (SFD) se conservó a -20° C. hasta su utilización.

Para eliminar la bactopectona que pudo haber quedado asociada al pellet bacteriano, éste se resuspendió dos veces en agua de mar estéril y se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante de estas centrifugaciones (lavados) se desechó y el pellet que contenía las bacterias lavadas se resuspendió en F/2-Si estéril hasta una concentración bacteriana de $1,6 \times 10^8$ / ml, la que se utilizó para determinar el efecto alguicida directo. Esta concentración bacteriana fue determinada según se describe en el punto 7.1.5.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA:

5.2.1.1. Efecto alguicida directo

Se utilizó un cultivo de *Alexandrium catenella* en fase exponencial, con una concentración de 14.000 cel/mL, el cual fue enfrentado directamente a las células de *Ruegeria atlantica* de la fase estacionaria, obtenidas como se describió en el punto 7.1.6. La concentración final del cultivo de microalgas luego de agregar las células bacterianas resuspendidas fue de 10.000 cel/mL aproximadamente.

Se realizó un experimento control con la misma cantidad de cultivo de microalga, pero en lugar de la suspensión bacteriana se agregó un volumen igual de F/2-Si. Estos matraces se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo de *Alexandrium catenella* señalados en el punto 7.1.2.. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado (Fig.2).

El matraz control contiene los 25 ml de cultivo de *A. catenella*, pero en vez de SFD se le colocó 25 ml de F/2-Si.

El efecto alguicida directo y el indirecto, se controló por conteo de las células de microalgas que sobrevivieron a los tiempos 0, 24 y 48 horas de incubación, en una cámara de conteo celular Sedgewick Rafter S50 (Graticules Ltd., Inglaterra) con un objetivo de 40X en un Microscopio Invertido (Olympus CKX41).

5.2.1.3. Especificidad del efecto alguicida

Se determinó la actividad alguicida presente en el SFD proveniente de cada etapa de crecimiento de *Ruegeria atlántica* sobre cultivos de *A. catenella cepa ACC02* y cultivos de *Heterocapsa sp. cepa SGM 01* en las mismas condiciones descritas anteriormente para el punto 7.2.1.2.

5.2.1.4. Análisis Estadístico

Para analizar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se realizó el análisis estadístico Split-Plot o de Parcelas Divididas (Gill, 1978)., que tiene el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + D_{(i)j} + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + E_{(ijk)}.$$

Donde $i = 1, 2, \dots, a$; $j = 1, 2, \dots, r$ por i ; $k = 1, 2, \dots, b$; y $n = arb$.

μ , es la media.

α_i , es el efecto de los tratamientos. Para el efecto alguicida directo sería el efecto de las células de *Ruegeria atlantica* sobre los cultivos de *Alexandrium catenella*, y para el efecto alguicida indirecto sería el efecto de los SFD bacterianos, de cada etapa, sobre las microalgas.

$D_{(ij)}$, es el efecto dentro de cada tratamiento.

β_k , son los efectos del tiempo (0, 24 y 48 horas).

$(\alpha\beta)_{ik}$, es la interacción entre los tratamientos y el tiempo.

$E_{(ijk)}$, es el error residual.

A través de este análisis se puede saber si existen o no diferencias significativas en los resultados. Para saber donde se producen las diferencias se compararon las medias utilizando el Método de Tukey (Taucher, 1997).

5.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA SUSTANCIA ALGUICIDA DE *Ruegeria atlántica*

5.2.2.1. Detección de las actividades enzimáticas presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano y asociadas a las células de *Ruegeria Atlantica*.

Las actividades enzimáticas endo y exocelulares presentes en cultivos de *R. atlantica*, se analizaron utilizando un sistema semicuantitativo de detección de actividades enzimáticas, llamado Api ZYM (bioMérieux®), que permite la detección de 19 enzimas diferentes.(tabla 1)

Para este análisis se utilizó una suspensión de células bacterianas obtenidas por centrifugación para detectar las enzimas celulares. Por recomendación del fabricante, la suspensión correspondió al tubo Patrón N° 5 de Mc Farland lo que es equivalente a 15×10^8 células/mL. Para la detección de las exoenzimas de *Ruegeria atlantica*, se utilizó una alícuota del SFD de cada una de las fases de crecimiento bacteriano.

El kit consiste en 20 pocillos cuyo fondo esta constituido por un soporte que contiene un sustrato enzimático con su tampón, a los que se le agrega 65 µl de muestra y se incuba por un mínimo de 4 horas a 25° C. Luego de este tiempo la reacción se revela con dos soluciones: Zym A que posee un agente tenso activo que permite facilitar la solubilización del reactivo Zym B, que es lo que da la reacción colorimétrica. Luego de cinco minutos se enfrenta por 10 segundos a una luz de 1.000 watts de potencia a 10 cms de distancia con el fin de eliminar el fondo amarillo debido al exceso del colorante que no ha reaccionado.

Tabla 1: Actividades enzimáticas detectadas por kit ApiZym (Biomerieux®).

Enzima	Reacción (+)
Control	Incoloro
Fosfatasa alcalina	Violeta
Esterasa	Violeta
Esterasa lipasa	Violeta
Lipasa	Violeta
Leucina arilamidasa	Naranja
Valina arilamidasa	Naranja
Cistina arilamidasa	Naranja
Tripsina	Naranja
α -quimo tripsina	Naranja
Fosfatasa ácida	Violeta
Naftol AS-BI- fosfohidrolasa	Azul
α -galactosidasa	Violeta
β - galactosidasa	Violeta
β - glucuronidasa	Azul
α -glucosidasa	Violeta
β - glucosidasa	Violeta
N- acetil - β - glucuronidasa	Marrón
α - manosidasa	Violeta
α - frucosidasa	Violeta

5.2.2.2. Fraccionamiento por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) del SFD de *Ruegeria atlántica*

Con el fin de aislar el componente algaicida presente en el SFD, se realizó un fraccionamiento por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) utilizando una columna de Phenylsepharose CL 4B (Pharmacia®) la cual tiene la propiedad de generar enlaces reversibles con proteínas en presencia de una sal neutra.

Para esto se utilizó 200 ml de sobrenadante del cultivo bacteriano proveniente de la fase estacionaria de crecimiento de *Ruegeria atlantica*, obtenido en las condiciones descritas en el punto 7.1.6.. Antes de pasar por la columna de Phenylsepharose CL 4B (Pharmacia®), la muestra se ajustó a una concentración final de 3M NaCl.

La columna de Phenylsepharose, según instrucciones del fabricante, tiene la capacidad de retener entre 5–8 mg de proteína /ml de resina, por lo que se realizó una determinación de las proteínas presentes en el SFD utilizando el Método del Ácido Bicinconinico (anexo). Según esta determinación el SFD de fase estacionaria posee una concentración de proteínas de 0,8 mg. / mL, por lo que se colocó un volumen de 20 ml de resina en un tubo. Antes de agregar la muestra de SFD, se hizo pasar a través de la columna siete fracciones de 2 mL de buffer Tris-EDTA 3 M NaCl (anexo 2), con el fin de equiparar la molaridad del SFD y de la resina.

Posteriormente el sobrenadante bacteriano se pasó por la columna por goteo, a una velocidad aproximada de 1 mL/minuto. El volumen de exclusión o Fracción no hidrofóbica, se recolectó en una sola fracción y contiene lo que la columna no retuvo. Luego las fracciones retenidas por la columna se obtuvieron por elusión con dos alícuotas de dos mL cada una de los buffers Tris – EDTA con diferentes concentraciones de NaCl (0,7; 0,5; 0,3; 0,15; 0,075 y 0 molar), descritos en el anexo 2. Cada una de estas fracciones hidrofóbicas fueron recolectadas en tubos en volúmenes de 4 mL / tubo y guardadas a –80° C. hasta su posterior utilización.

5.2.2.3. Medición de la actividad alguicida de las fracciones obtenidas por la columna de HIC, contra *A. catenella* cepa ACC01

Para determinar si el efecto alguicida se encontraba en la Fracción no hidrofóbica del SFD o en las Fracciones Hidrofóbicas procedentes de la columna de HIC, se enfrentó un cultivo de *A. catenella* cepa ACC01 con aproximadamente 15.000 cel/mL, con cada una de estas fracciones. Esta determinación se realizó en celdas de cultivo de 24 pocillos (Costar® 3524) en condiciones estériles.

Se realizó un control negativo con un cultivo de *A. catenella* al que se le agregó F/2-Si, en vez de las fracciones de la columna. Además, para probar la inocuidad de los buffers usados en las eluciones, se realizaron controles que contenían, en lugar de las fracciones de la columna, un volumen igual de Buffer Tris – EDTA 3 M NaCl. También se realizó un control enfrentando a la microalga con el SFD de *Ruegeria atlántica* sin fraccionar (Fig. 4). Todos los experimentos se hicieron en duplicado.

Estas celdas de cultivo se mantuvieron en la mismas condiciones que los cultivos de microalgas descritos en el punto 7.1.2. y se observaron en un microscopio invertido (Olympus CKX41) con objetivo 40x a los tiempos 0, 0,5, 24 y 48 horas, para hacer una observación cualitativa de las muestras y ver si existían diferencias entre los controles y las muestras.

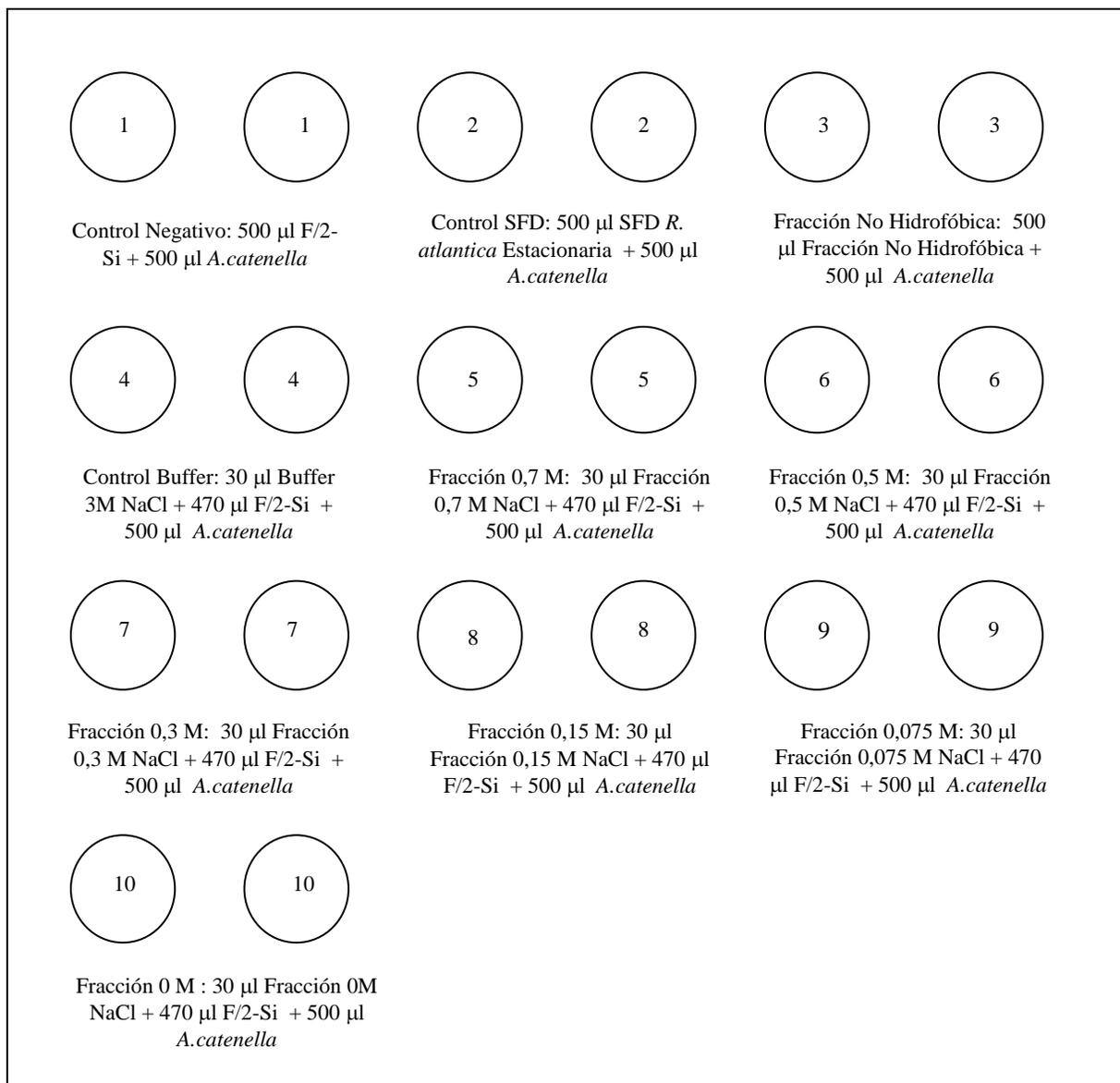


Figura 4: Estudio del Efecto Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas y No Hidrofóbicas del Sobrenadante Filtrado Dializado (SFD) de *Ruegeria atlántica*. **1.** Control Negativo, *A. Catenella* más F/2-Si; **2.** *A. Catenella* más SFD de *R. atlantica* sin fraccionar; **3.** *A. Catenella* más Fracción No Hidrofóbica; **4.** Control Buffer, *A. Catenella* más F/2-Si más buffer 3 M NaCl; **5.** *A. Catenella* más F/2-Si más Fracción 0.7M; **6.** *A. Catenella* más F/2-Si más Fracción 0.5M; **7.** *A. Catenella* más F/2 más Fracción 0.3M; **8.** *A. Catenella* más F/2-Si más Fracción 0.15M; **9.** *A. Catenella* más F/2-Si más Fracción 0.075M; **10.** Control *A. Catenella* más F/2-Si más Fracción 0 M.

5.2.2.4. Ultra filtración de las fracciones hidrofóbicas con actividad lítica

Las fracciones hidrofóbicas obtenidas por HIC que mantenían su efecto lítico contra *A. catenella*, se mezclaron y se sometieron a fraccionamiento por tamaño, utilizando una membrana de 10 KDa en una cámara de ultrafiltración AMICON®. El proceso se realizó con una presión positiva de 50 p.s.i. de Nitrógeno gaseoso y agitación constante. La Fracción Hidrofóbica que retuvo la membrana se lavó y resuspendió en F/2-Si estéril y de esta manera se colectó una fracción denominada como Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) > 10 KDa. La fracción que traspasó la membrana se denominó Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) < 10 KDa.

Esta FHU < 10 KDa se pasó a través de una segunda membrana de un tamaño de poro de 1 KDa, y de la misma manera que la anterior, se colecto una FHU < 1 KDa que fue la que traspasó el filtro y a través del lavado de la membrana con. F/2-Si estéril se obtuvo una FHU > 1 KDa y < 10 KDa (Fig. 5).

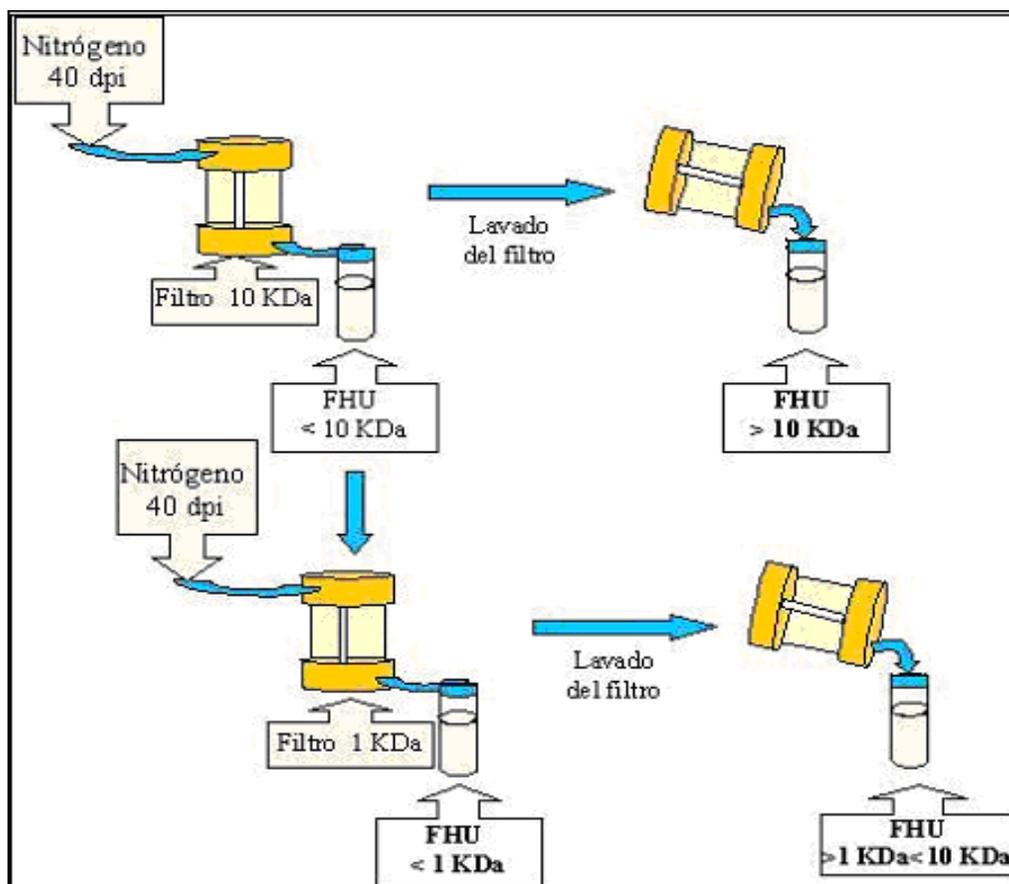


Figura 5: Esquema de Ultrafiltración de las Fracciones Hidrofóbicas.

5.2.2.5. Medición de la actividad alguicida de las fracciones hidrofóbicas obtenidas por ultrafiltración

Luego de obtener estas tres fracciones de diferente tamaño molecular a partir del sobrenadante de *Ruegeria atlantica*, éstas se enfrentaron con cultivos de *A. catenella* cepa ACC01 de la misma manera descrita en el punto 7.2.2.3..

En cámaras de cultivo celular se colocaron 30 µl de cada FHU y se enfrentó cada una, a 500 µl de *A. catenella* cepa ACC01 y se completó a un volumen de 1 mL con 470 µl de F/2-Si. Estas celdas de cultivo se mantuvieron en las mismas condiciones que los cultivos de microalgas descritos en el punto 7.1.2. y se observaron en un microscopio invertido (Olympus CKX41) con objetivo 40x a las 30 minutos, 24 y 48 horas, para hacer una observación cualitativa de las muestras y ver si existían diferencias entre los controles y las muestras (Fig.6).

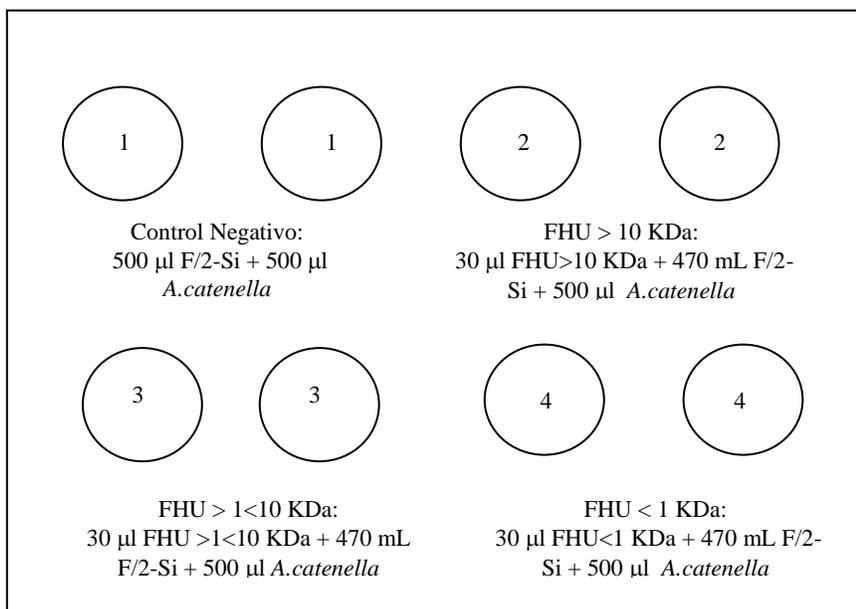


Figura 6 : Efecto Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas obtenidas por Ultrafiltración (FHU) **1.** Control Negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si; **2.** *A. catenella* más FHU > 10 KDa; **3.** *A. catenella* más FHU > 1 KDa < 10 KDa; **4.** *A. catenella* más FHU < 1 KDa.

5.2.2.6. Especificidad de la actividad alguicida de la fracción hidrofóbica obtenida por ultrafiltración

Para probar la especificidad de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) que mantenía efecto alguicida contra *A. Catenella* según el punto 7.2.2.5., se enfrentó contra un cultivo de *Heterocapsa sp.* con 20.000 cel/mL concentración final, usando el mismo modelo experimental, tal como se muestra en la figura 7.

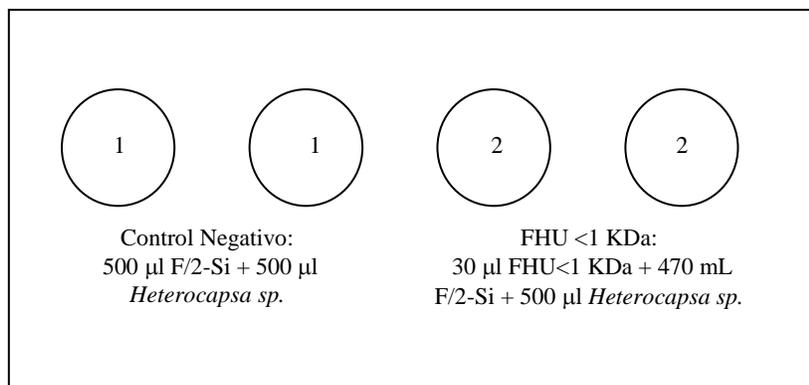


Figura 7: Especificidad del Efecto Alguicida de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) **1.** Control Negativo, *Heterocapsa sp.* más F/2-Si; **2.** *Heterocapsa sp.* más FHU < 1 KDa.

VI. RESULTADOS

6.1. Curva de crecimiento bacteriano

El cultivo bacteriano de *Ruegeria atlantica* dio origen a la siguiente curva de crecimiento:

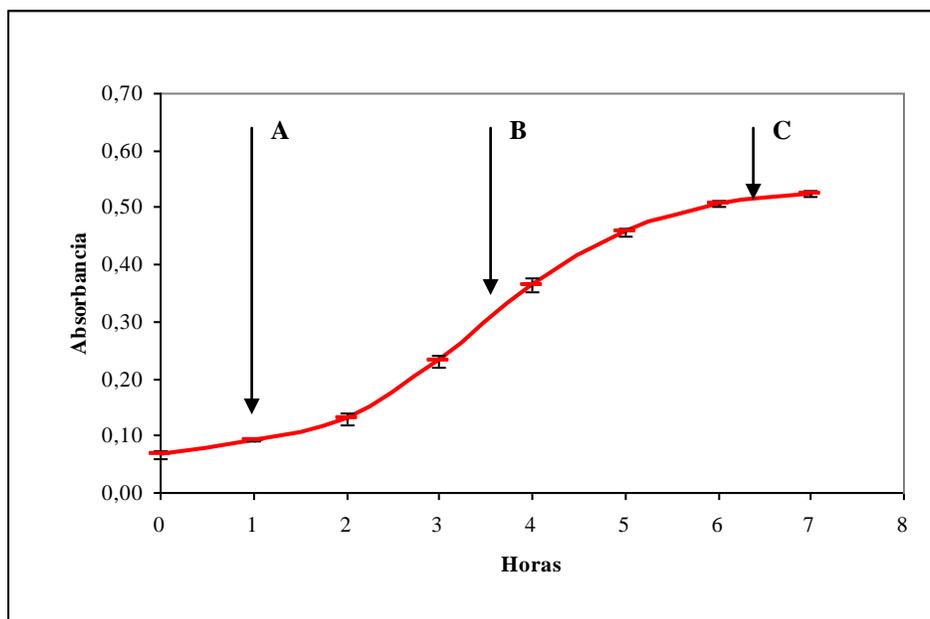


Gráfico 1: Curva de Crecimiento de *Ruegeria atlantica* AMA-03. A: Fase Latencia; B: Fase Exponencial; C: Fase Estacionaria.

En la gráfica se aprecia que en la curva de crecimiento de *Ruegeria atlantica* se identifican tres etapas de crecimiento: La fase de Latencia, cuya absorbancia fluctúa entre 0,05 y 0,1, se produce durante las primeras dos horas de cultivo; La fase de crecimiento Exponencial, se registra dentro de las dos y cuatro horas de cultivo con una absorbancia que fluctúa entre 0,1 y 0,35; y una fase Estacionaria que se identifica con una absorbancia que fluctúa entre 0,5 y 0,52 y que se alcanza a las seis horas de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2: Relación absorbancia y número de células de cada etapa de cultivo de *Ruegeria atlantica* cepa AMA 03

Etapa	Horas de Cultivo	Absorbancia	UFC
Latencia	1 Hora	0.1	$1,6 \times 10^8 \text{ cel/mL}^{-1}$
Exponencial	4 Horas	0.35	$1,05 \times 10^{11} \text{ cel/mL}^{-1}$
Estacionaria	6 Horas	0.52	$1,42 \times 10^{13} \text{ cel/mL}^{-1}$

6.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA

6.2.1. Determinación del efecto alguicida directo

El grafico 2 muestra el número de células de *A. catenella* cepa ACC01 que sobreviven cuando son enfrentadas a las células de *R. atlantica* AMA-03.

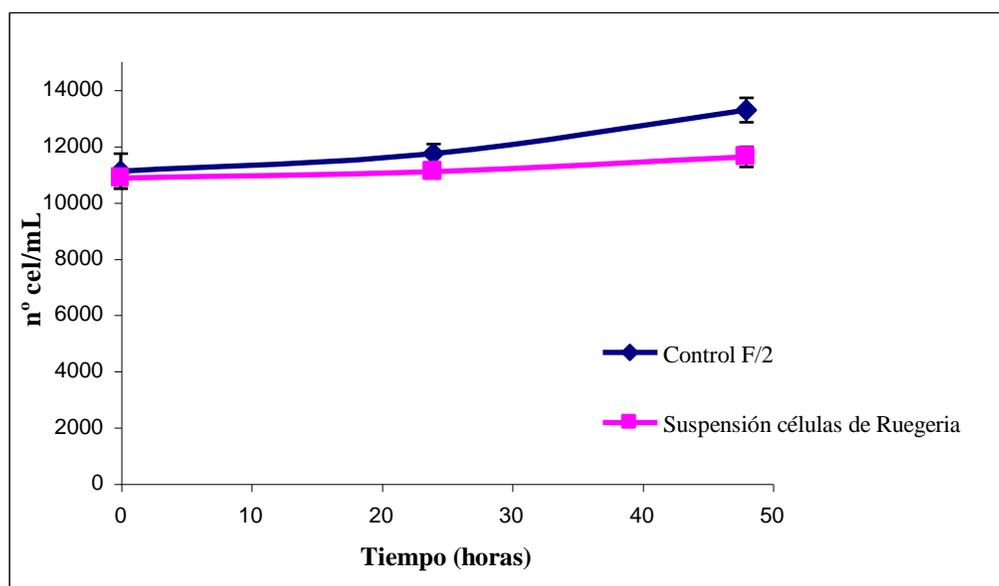


Grafico 2: Medición del Efecto Alguicida Directo de *Ruegeria atlántica* AMA-03 sobre *Alexandrium catenella* ACC01

Como se puede observar en el gráfico, hasta las 48 horas de observación no se evidenció mortalidad ni lisis de las células de *A. catenella* cepa ACC01 enfrentadas directamente a las bacterias. Es importante destacar que tampoco se registró un crecimiento

del cultivo de la microalga durante el tiempo de experimentación, sino que el número de ellas se mantuvo constante en comparación con el experimento control que sí presentó crecimiento.

6.2.2. Análisis estadístico efecto alguicida directo

El análisis estadístico split-plot de los datos obtenidos en este experimento indicaron que existen diferencias significativas entre las muestras y el control respecto al crecimiento algal. El análisis de Tukey arrojó que la diferencia se generó entre el control y el tratamiento a las 48 horas ($p < 0,01$).

6.2.3. Efecto alguicida indirecto

En el gráfico n° 3 se muestra el número de células de *A. catenella* ACC01 que sobreviven frente al SFD obtenido de las tres etapas de crecimiento de *Ruegeria atlántica*.

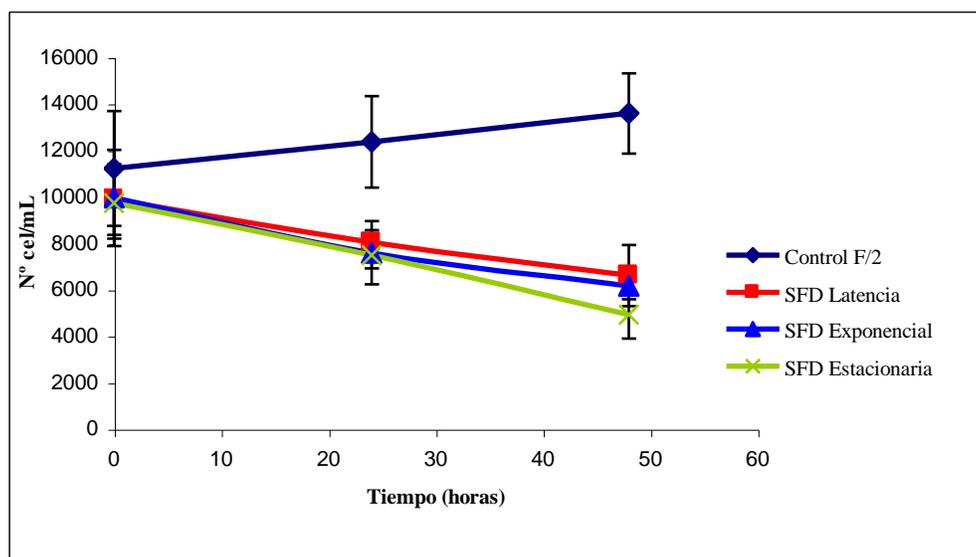


Gráfico 3: Efecto Alguicida de los SFD de *Ruegeria atlantica* AMA-03 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01.

Como se observa en el gráfico 3 existe una gran diferencia entre los cultivos tratados con SFD de *R. atlántica* y el control negativo. Mientras el cultivo control crece, las células de microalgas tratadas con SFD disminuyen progresivamente, alcanzando un 50 % de mortalidad y lisis a las 48 horas de tratamiento

6.2.4. Análisis estadístico del efecto alguicida indirecto

El análisis estadístico split-plot de los datos obtenidos en el experimento anterior indicaron que existen diferencias significativas entre las muestras y el control.

El análisis de Tukey realizado evidenció que las diferencias significativas se generaron entre el control y los tratamientos de las tres fases de crecimiento a las 24 y 48 horas de cultivo ($p < 0,01$).

6.2.5. DETERMINACIÓN ESPECIFICIDAD

6.2.5.1 Efecto alguicida indirecto sobre *Heterocapsa sp.* cepa SGM 01

El gráfico 4 muestra el comportamiento de *Heterocapsa sp.* frente al SFD de *R. atlántica*.

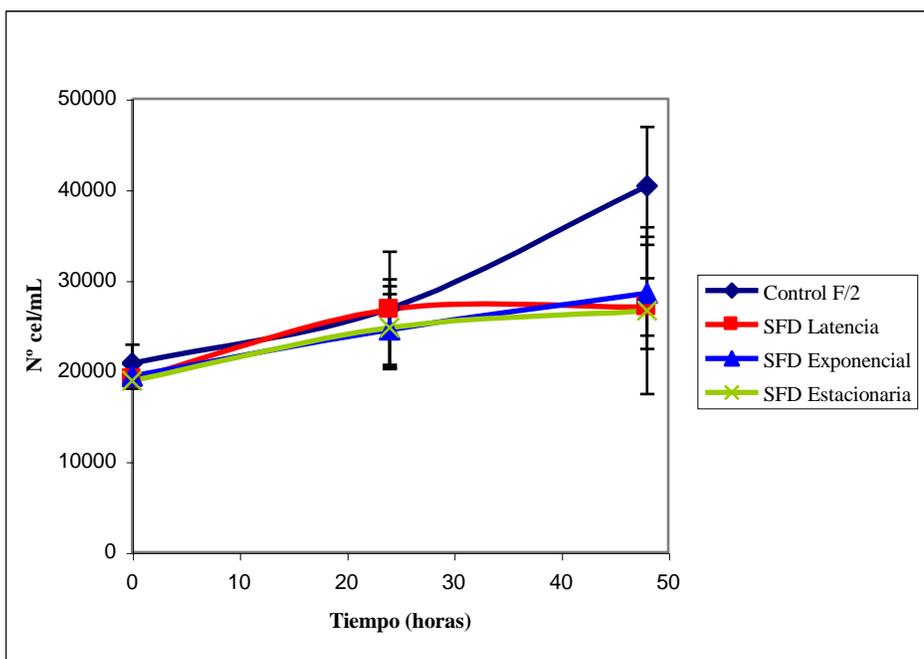


Gráfico 4: Efecto Alguicida Indirecto de *Ruegeria atlantica* AMA-03 sobre *Heterocapsa sp.* SGM-01.

En el gráfico 3 se puede observar que a pesar que los cultivos tratados de *Heterocapsa sp.* no disminuyen en el número de células, si existe una diferencia en el crecimiento del cultivo con respecto al control, ya que hasta las 48 horas de observación el

control presenta crecimiento y los cultivos tratados con SFD mantienen el número de células constantes.

6.2.5.2. Análisis estadístico efecto alguicida indirecto sobre *Heterocapsa sp.* SGM 01

Al análisis estadístico split-plot muestra diferencias significativas respecto al crecimiento del cultivo entre el control y los tratamientos. Según el análisis de Tukey las diferencias se produjeron entre el control y el tratamiento con SFD de la fase estacionaria a las 48 horas de cultivo ($p < 0,01$). Sin embargo no se observa muerte ni lisis celular.

6.2.5.3. Efecto alguicida indirecto sobre *A. catenella* ACC02

Del mismo modo que con las dos especies anteriores, se enfrentó el sobrenadante de las tres etapas de crecimiento bacteriano, a cultivos de *A. catenella* ACC02. Los resultados se presentan en el gráfico 5.

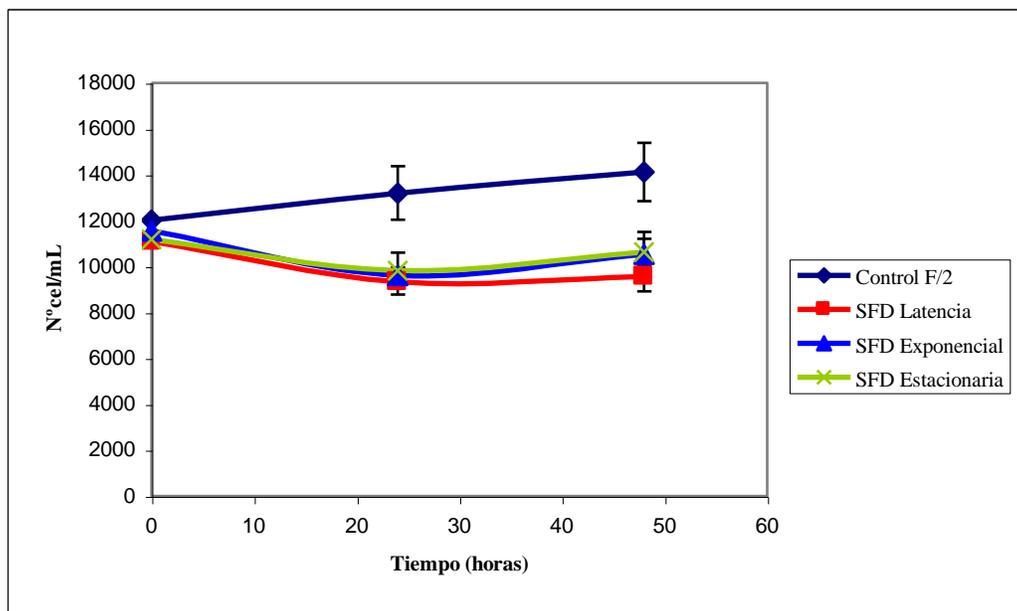


Gráfico 5: Efecto Alguicida Indirecto de *Ruegeria atlantica* AMA-03 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC02

La gráfica 5 muestra. que a las 24 horas los cultivos de *A. catenella* cepa ACC02 tratadas con SFD de las tres etapas de crecimiento bacteriano, presentaron una leve mortalidad y lisis de las células de microalgas. A las 48 horas no se registró mayor mortalidad.

6.2.5.4. Análisis estadístico del efecto de *R. atlantica* sobre *A. catenella* cepa ACC02.

Al análisis estadístico split-plot mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos. El análisis de Tukey arrojó que las diferencias se generaron entre el control y los tratamientos con SFD de las tres fases de crecimiento a las 48 horas de observación ($p < 0,01$).

6.3. CARACTERIZACION DE LA SUSTANCIA ALGUICIDA DE *R. atlantica*

6.3.1. Pruebas enzimáticas

Como se muestra en la tabla 3, se puede apreciar que asociadas a las células, se encuentran las actividades de: Fosfatasa Alcalina, Esterasa, Esterasa Lipasa, Lipasa, Naftol-AS-BI- Fosfohidrolasa, Leucina arilamidasa y Fosfatasa ácida. De éstas las enzimas, Esterasa Lipasa y Naftol -AS -BI- Fosfohidrolasa, también se encuentran presentes en el medio de cultivo bacteriano (SFD) procedente de las tres fases de crecimiento (exoenzimas). Las actividades, Fosfatasa Alcalina, Esterasa, y Lipasa se empiezan a detectar en el medio de cultivo bacteriano a partir de la fase exponencial.

Tabla 3: Actividades enzimáticas asociadas a células de *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03 y a las distintas etapas de crecimiento bacteriano.

Actividad Enzimática	Exoenzimas (*)			Endoenzimas (**)
	SFD Latencia	SFD Exponencial	SFD Estacionaria	
Control	0	0	0	0
Fosfatasa Alcalina	0	0	3	4
Esterasa	0	0	2	3
Esterasa Lipasa	1	4	4	3
Lipasa	0	4	3	1
Leucina Arilamidasa	0	0	0	2
Valina Arilamidasa	0	0	0	0
Cistina Arilamidasa	0	0	0	0
Tripsina	0	0	0	0
Alfa Quimiotripsina	0	0	0	0
Fosfatasa Ácida	0	0	0	2
Naftol-AS-BI- fosfohidrolasa	3	3	3	2
Alfa Galactosidasa	0	0	0	0
Beta Galactosidasa	0	0	0	0
Beta Glucuronidasa	0	0	0	0
Alfa Glucosidasa	0	0	0	0
Beta Glucosidasa	0	0	0	0
N-Acetil-Beta-Glucosaminidasa	0	0	0	0
Alfa-Manosidasa	0	0	0	0
Alfa-Fucosidasa	0	0	0	0

Los valores colorimétricos 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a: 5, 10, 20, 30 y 40 nmol de sustrato hidrolizado, respectivamente.

(*) SFD de *R. atlantica*.

(**) Suspensión de células de *R. atlantica*.

6.3.2. Fraccionamiento por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) del SFD de *Ruegeria atlántica* cepa AMA- 03

Luego de pasar el SFD de la fase estacionaria de crecimiento de *R. Atlantica* por HIC, se obtuvo 200 ml de una fracción no hidrofóbica y seis fracciones hidrofóbicas de 4 ml cada una, que son los que contienen las proteínas y componentes hidrofóbicos retenidos por la resina. Estas eluciones se hicieron con los buffer 0,7 M; 0,5 M; 0,3 M; 0,15 M; 0,075 M y 0 M NaCl y cada fracción se denominó según la concentración de NaCl empleada para eluirla.

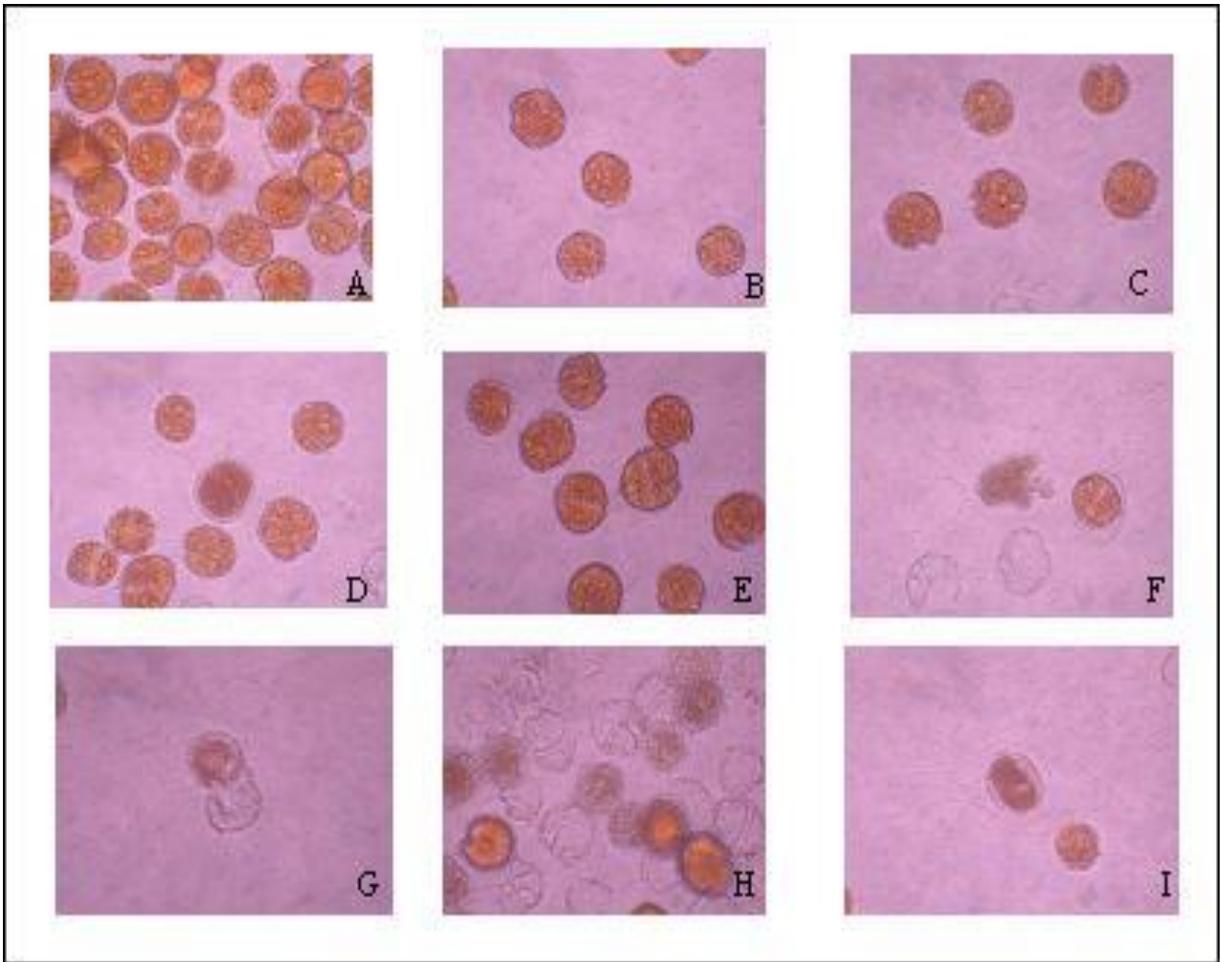
6.3.3. Determinación de la actividad lítica en las fracciones obtenidas por HIC frente a *A. catenella* cepa ACC01.

A los treinta minutos de tratamiento, las fracciones eluidas de la columna denominadas 0,7; 0,5 y 0,3 M NaCl produjeron una precipitación en el fondo de la celda de alrededor de un 75% de las microalgas. A diferencia de esto, el experimento control, presentaba a las células de *A. catenella* con la motilidad característica de estas microalgas. Las fracciones 0,15M; 0,075M y 0M, no presentaron ningún efecto, observándose que las microalgas tenían un comportamiento similar al control.

A las 24 horas de tratamiento, con las fracciones 0,7; 0,5 y 0,3 M se observó el 100% de las células de *A. catenella* precipitadas igual que a los 30 minutos, sin embargo estas células presentaban ya características de lisis celular: las tecas estaban desprendidas y se observó un gran número de bacterias alrededor de la membrana celular. En los experimentos controles y en los tratados con las otras fracciones eluidas de la columna, las células de microalgas mantuvieron sus características normales.

A las 48 horas de tratamiento se mantuvo el mismo patrón que a las 24 horas; lo mas destacado fue el gran aumento de bacterias alrededor de cada célula de microalga y el gran numero de tecas sueltas encontradas en las células tratadas con las fracciones 0,7 ; 0,5 y 0,3 M NaCl

La fotografía 7 muestra el efecto de las fracciones eluidas de la columna de HIC sobre cultivos de *Alexandrium catenella* a las 48 horas de tratamiento.



Fotografía 7: Efecto Alguicida de las Fracciones del SFD provenientes de la columna de HIC, frente a *A. catenella* ACC01. **A:** Control Negativo *A. catenella* + F/2-Si, **B:** Control *A. catenella* + Buffer Tris 3M NaCl; **C:** *A. catenella* + Fracción 0M NaCl ; **D:** *A. catenella* +Fracción 0,075 M NaCl; **E:** *A. catenella* + Fracción 0,15 M NaCl; **F:** *A. catenella* + Fracción 0,3 M NaCl; **G:** *A. catenella* + Fracción 0,5 M NaCl; **H:** *A. catenella* + Fracción 0,7M NaCl; **I:** *A. catenella* + SFD *R atlantica*.

6.3.4. Ultra filtración por peso molecular del SFD de *R. atlantica* pasado por HIC

Luego de observar que las fracciones 0,7 M; 0,5 M y 0,3 M obtenidas por HIC presentaban actividad lítica contra *A. catenella* ACC01, estas se mezclaron y se ultra filtraron a través de filtros de diferente tamaño de poro obteniéndose tres fracciones de distinto tamaño:

- FHU >10 KDa.
- FHU >1KDa <10 KDa.
- FHU <1 KDa.

6.3.5. Determinación de la actividad alguicida presente en las fracciones de HIC ultra filtradas

Las diferentes fracciones obtenidas en la sección 8.3.4. mostraron que solamente la FHU <1 KDa producía una precipitación de 100% de las células de *A. catenella* en cultivo a los treinta minutos de tratamiento, sin evidenciar lisis. A las 24 horas de tratamiento, esta fracción mostraba la lisis de las microalgas precipitadas el día anterior y a las 48 horas era evidente observar una gran colonización bacteriana y la lisis total de las células de *A. catenella*. Se observaron una gran cantidad de tecas sueltas y mucho detritus en el fondo.

Tanto el control como las otras dos fracciones de mayor tamaño no presentaron mortalidad de *A. Catenella*, ni tampoco un aumento de bacterias en el medio en ninguno de los tres tiempos controlados

6.3.6. Medición de la especificidad de la actividad alguicida de las FHU < 1 KDa

Las células de *Heterocapsa sp.* tratadas con las FHU fueron precipitadas en un 40% a los treinta minutos de tratamiento. A las 24 y 48 horas, se pudo observar que se mantenía la proporción de células precipitadas, sin embargo no se encontraron signos de lisis celular, ni tampoco un aumento evidente de la flora bacteriana acompañante.

Los controles presentaron a las microalgas intactas en los tres tiempos analizados.

VII. DISCUSIÓN

La marea roja, o más correctamente la FAN, es un fenómeno que cobra cada día mas relevancia, por la expansión mundial que ha experimentado en los últimos años y por los problemas de salud pública y económicos que conllevan. El crear métodos que sean capaces de predecir la ocurrencia de este fenómeno, o entender de mejor manera los cambios que llevan a que las microalgas florezcan explosivamente, podría ayudar a evitar un gran número de intoxicaciones.

Sin embargo, el evitar que estas FAN se produzcan es muy poco probable. Por esto, es importante entender bien cual es el rol que juegan las bacterias capaces de lisar estas microalgas, ya que podríamos estar frente a la posibilidad de obtener un método de control biológico efectivo y, probablemente específico. Una actividad alguicida específica podría permitir disminuir las vedas y las enormes pérdidas económicas de la industria de los mariscos.

La relación microalgas-bacterias ha sido muy estudiada durante los últimos años. Son diversos los tipos de relación que se pueden generar entre estos microorganismos, algunos autores lo describen como simbiosis, otros como comensalismo. A pesar de las diferencias entre los investigadores, lo cierto es que esta relación no es al azar y es necesario entender su naturaleza para poder aplicarlo como mecanismo de control.

El Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile participa activamente de estas investigaciones. Fue así como en el año 2002 se pudo comprobar que *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03, aislada e identificada en el mismo laboratorio, bajo ciertas circunstancias es capaz de lisar cultivos de *Alexandrium catenella*, microalga desde la cual fue aislada y a la que normalmente se encuentra fuertemente asociada (Amaro *et al.*, 2005). Esta microalga es responsable de la última FAN producida en el sur de Chile (Arriagada *et al.*, 2004).

R. atlantica en asociación con *A. catenella* en forma natural no produce la lisis de la microalga, al menos hasta las etapas de crecimiento exponencial de la microalga, sin embargo, no se sabe con certeza si esta bacteria es una de las responsables del término del cultivo algal en condiciones de laboratorio (etapa de término).

En este estudio, para lograr hacer crecer *R. atlantica* cepa AMA- 03 separada de la microalga, se hizo necesario agregar bactopectona al medio de cultivo F/2-Si como fuente de materia orgánica. Esto es porque en el medio en que crece la microalga (F/2-Si) la bacteria es incapaz de crecer sola, lo que sugiere que *R. atlantica* probablemente utiliza la materia orgánica aportada por *A. catenella* para su crecimiento, lo que podría considerarse como relación simbiótica.

Sin embargo, como lo demuestra un estudio realizado en Chile por Uribe y Espejo (2003), una vez que la microalga alcanza la fase estacionaria de crecimiento los cultivos no axénicos decaen rápidamente, a diferencia de cultivos axénicos en los que el decaimiento es mucho más lento. Esto puede interpretarse como comensalismo, ya que una vez que la materia orgánica comienza a escasear las bacterias son capaces de lisar las microalgas y así obtener el sustento para sobrevivir (Mayali y Azam, 2004). Además hay que tener en cuenta la asociación de distintos géneros bacterianos que coexisten en una misma microalga en cultivo (Bertin, 2005), ya que podría existir una combinación de las distintas actividades enzimáticas ejercidas por el consorcio bacteriano, de modo que la lisis podría ser el resultado de una acción concertada por parte de las bacterias sobre la microalga.

Los experimentos de efecto alguicida directo realizados con *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03, nos demostraron que las células bacterianas no estarían ejerciendo un efecto alguicida directo sobre *A. catenella* cepa ACC01. Es importante destacar que, a pesar de que no evidenciamos mortalidad en este experimento, sí hubo una diferencia estadística en el crecimiento entre el control y el tratamiento a las 48 horas de observación, debido a que el cultivo tratado no presentó aumento del número de microalgas (Gráfico 2). Esto podría interpretarse como un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento de *A. catenella* cepa ACC01 por parte de las células bacterianas.

Distinto es lo que se observó en el efecto alguicida indirecto, ya que a las 24 horas se evidenció la mortalidad de aproximadamente un 25% de las células de *A. catenella* cepa ACC01, llegando al 50% a las 48 horas, en las tres etapas de crecimiento bacteriano (Gráfico 3). Este efecto indirecto también lo observó Doucette *et al* (1999), en un estudio donde identificó dos bacterias capaces de producir la muerte del dinoflagelado *Gymnodinium breve*, a través de un producto excretado por la bacteria que difundió a través de una membrana de diálisis de 300.000 MWCO.

En cuanto a la especificidad del efecto alguicida indirecto los resultados obtenidos frente a *Heterocapsa sp.* no evidenciaron mortalidad de las células frente al sobrenadante bacteriano después de 48 horas de tratamiento, sin embargo, sí se pudo observar una disminución de la tasa de crecimiento en comparación con el control (Gráfico 4), diferencia que fue estadísticamente significativa a las 48 horas de tratamiento. Este hecho sugiere que el SFD de *R. atlantica* cepa AMA- 03 no presenta la misma especificidad ante este género de microalgas.

No pasó lo mismo con *Alexandrium catenella* cepa ACC02, donde sí se pudo evidenciar mortalidad y lisis de la microalga, pero en un grado notablemente menor que con *A. catenella* cepa ACC01 (Gráfico 5). Con estos resultados podríamos concluir que existe un cierto grado de especificidad entre cepas de una misma especie.

Estos experimentos con *A. catenella* cepa ACC02 y *Heterocapsa sp.* cepa SGM-01 se complementan con el estudio realizado por Lovejoy *et al.* (1998), donde se demostró que existía lisis de los dinoflagelados *Gymnodinium catenatum* y *Gymnodinium sanguineum*, cuando se enfrentaron a dos cepas de la bacteria marina *Pseudoalteromonas*; mientras que al enfrentar dos dinoflagelados tecados del género *Alexandrium* a las mismas cepas bacterianas, presentaron un efecto transitorio con una leve mortalidad en las primeras horas de tratamiento, recuperándose a las 48 horas.

En la caracterización tanto de las exoenzimas como endoenzimas asociadas a *R. atlantica*, se observó la presencia de enzimas como Fosfatasa Alcalina, Esterasa, Esterasa Lipasa, Lipasa y Naftol –AS –BI- Fosfohidrolasa. Estas enzimas podrían aportar a la bacteria la capacidad de degradar sustratos del medio y con esto conseguir la materia orgánica requerida para su supervivencia. Este mismo mecanismo podría ser usado en la degradación de las membranas celulares de *A. catenella*.

El fraccionamiento del SFD de *R. atlantica* realizado a través de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), permitió concentrar la sustancia alguicida de un volumen de 200 mL. a tres fracciones de 4 mL cada una, que conservaron la capacidad de producir la mortalidad de cultivos de *A. catenella* cepa ACC01, pero al estar concentrado el factor alguicida actuó en menor tiempo, es por esto que observamos la precipitación de las microalgas a los treinta minutos de tratamiento.

Al ultra filtrar estas fracciones alguicidas concentradas, se concluyó que el compuesto lítico presenta características parcialmente hidrofóbicas y es de un tamaño molecular inferior o igual a 1 KDa. Respecto al mecanismo de acción de este factor podemos concluir que produce la inmovilización y posterior muerte de las células en cultivo ya que estas células al ser reinsertadas en un medio fresco (F/2) no fueron viables.

La lisis posterior de las células de *A. catenella* cepa ACC01, podría ser causado por la actividad de las bacterias asociadas al cultivo de microalgas, entre las cuales, *Ruegeria atlantica*, estudiada en esta tesis, presenta actividades enzimáticas capaces de degradar diferentes sustratos poliméricos que están presentes en la pared celular de diversas microalgas.

Al enfrentar a *Heterocapsa sp.* cepa SGM 01 a la fracción hidrofóbica menor de 1 KDa, se evidenció una mortalidad que no sobrepasó el 40%, sin embargo, a diferencia de lo obtenido con *A. catenella* cepa ACC01, no se produjo lisis celular al menos durante las 48 horas de tratamiento. Estos resultados nos inducen a pensar que la lisis de las células de *Heterocapsa sp.* requiere de otros factores no presentes en la fracción < 1 KDa.

Este es el primer estudio en que se logra caracterizar en forma parcial un factor alguicida de la bacteria *Ruegeria atlantica*, sin embargo, aún falta mucho para poder definir la naturaleza exacta de este producto y entender bien la dinámica natural de la relación de esta bacteria con *Alexandrium catenella* y otros microorganismos marinos.

IX. CONCLUSIONES

- La bacteria marina *Ruegeria atlantica* cepa AMA-03 presenta actividad alguicida de tipo indirecto sobre el dinoflagelado *Alexandrium catenella* cepa ACC01.
- La actividad alguicida sobre el dinoflagelado se encuentra presente en las tres etapas de crecimiento de la bacteria.
- La actividad alguicida de *R. atlantica* cepa AMA-03 no se observa sobre cultivos del dinoflagelado no tóxico *Heterocapsa sp.* cepa SGM-01.
- Tanto la célula como los sobrenadantes de las tres etapas de crecimiento de *Ruegeria atlántica* cepa AMA 03 presentan actividades enzimáticas capaces de degradar estructuras asociadas a *A. catenella*.
- El factor bacteriano capaz de producir la muerte de *A. catenella* cepa ACC01 es un compuesto parcialmente hidrofóbico, de un peso molecular igual o menor a 1 KDa.
- Bajo las condiciones de nuestros experimentos, el efecto de este compuesto consistiría en una primera instancia en inmovilizar las células de *A. catenella* cepa ACC01 y producir su muerte, para luego permitir la lisis de la microalga.

X. BIBLIOGRAFÍA

- ALAVI, M.; MILLER, T.; ERLARDSON, K.; SCHNEIDER, R.; BELAS, R.** 2001. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate culture. *Environmental Microbiology*. 3: 380-396.
- ALCAYAGA, C.; SEGUEL, M.; SUÁREZ-ISLA, B.** 1998. Electrophysiological characterization of ion channels of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* incorporated in planar lipid bilayers. *In*: Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández, & T. Wyatt. (eds.) Harmful algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESO. Grafisant, Spain. pp. 598-601.
- AMARO, A. M.; FUENTES, S.; OGALDE, S.; VENEGAS, J.; SUÁREZ-ISLA, B.** 2005. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate alexandrium catenella. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 52(3) 191-200.
- ANDERSON, D.; KULIS, D.; BINDER, B.** 1984. "Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* - cyst yield in batch cultures." *Journal of Phycology* 20: 418.
- ANDERSON, D.M.** 1989. Red tides : biology, environmental science, and toxicology. *In*: International symposium on red tides. Takamatsu, Japan. 10-14 october, 1987.
- ANDERSON, D.M.** 1997. Turning back the harmful red tide. *Nature*. 388: 513-514.
- ARNOTT, G. H.** 1998. Toxic marine microalgae: a worldwide problem with major implications for seafood safety. *Advancing Food Safety* 1: 24-34.
- ARRIAGADA, G.; CORDOBA, M.; SUAREZ-ISLA, B.A.; AGUILERA, A.; FUENTES, C.; CLEMENT, A.; URCELAY, S.** 2004. Dinámica de un brote de Veneno Paralizante de los Mariscos (VPM) en el sur del Archipiélago de Chiloé, Xª región, Chile. . *In*: 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE), November 17-21, 2003, Viña del Mar, Chile.
- AZAM, F.** 1998. Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The Plot Thickens. *Science*. 280: 694-696.

- BALECH, E.** 1985. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group, p. 33-38. *In:* D.M. Anderson, A.W. White y D. G. Baden (eds). Toxic Dinoflagellates. Elsevier. New York.
- BERTIN, A.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias cultivables asociadas a cultivos de *Alexandrium catenella* (DINOPHYCEAE). Seminario de título. Universidad de Concepción, Chile. 34 p.
- BRINKMEYER, R.; RAPPÉ, M.; GALLACHER, S.; MIDLIN, L.** 2000. Development of clade (*Roseobacter* and *Alteromonas*) and taxon-specific oligonucleotide probes to study interactions between toxic dinoflagellates and their associated bacteria. *European Journal of Phycology*, 35: 315-329.
- CLÉMENT, A.; LEMBEYE, G.** 1993. Phytoplankton Monitoring program in the fish Farming region of south Chile. *In:* Toxic phytoplankton bloom in the sea. Proceedings of the Fifth International Conference On Toxic Marine Phytoplankton. T. Smayda and Y. Shimizu (eds.). Elsevier Science Publishers B. V. 223-218.
- DOUCETTE, G.; KODAMA, M.; FRANCA, S.; GALLAGHER, S.** 1998. Bacterial interactions with Harmful Algal Bloom Species: Bloom Ecology, Toxigenesis, and Cytology. *In:* Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. D.M. Anderson, A.D. Cembella, G.M. Hallegraeff, eds. New York: Springer- Verlag. pp. 649-652.
- DOUCETTE, G.; MCGOVERN, E.; BABINCHAK, J.** 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *Journal of Phycology* 35: 1447-1454.
- FRANCA, S.; PINTO, I.; ALVITO, P.; SOUSA, I.; VASCONCELOS, V.; DOUCETTE, G.** 1996. Studies on prokaryotes associated with PSP producing dinoflagellates. *In:* Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y. & Fukuyo, Y. (Eds.). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. pp. 347-350.
- FRANGÓPULUS, M. J.** 2002. Significado ecológico de la producción de toxinas PSP en dinoflagelados. Tesis Doctoral, Universidad de Vigo, 162 p.
- FUKAMI, K.; SAKAGUCHI, K.; KANOU, M.; NISHIJIMA, T.** 1996 Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from

Skeletonema costatum to *Heterosigma akashiwo*. En: Yasumoto T, Y Oshima & Y Fukuyo (eds) Harmful and toxic algal blooms: 335-338. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France.

GALLACHER, S.; FLYNN, K.; FRANCO, J.; BRUEGGEMANN, E.; HINES, G. 1997. Evidence for the production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture. Applied of Environmental Microbiology, 63:239--245.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.; COSTILOW, R.; NESTER E.; WOOD, W.; KRIEG, N.; PHILLIPS, G.; 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC, USA.

GILL, J. 1978. Design and analysis of experiments in the animal and medical science. Iowa State University Press, Iowa. pp.203-214.

GUILLARD R. 1975 Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates *In:* Culture of Marine Invertebrate Animals. Smith, W.L and M. H. Chanley, eds. Plenum Press, New York. pp.29-60.

HALLEGRAEF, G.M. 1992. Harmful algal blooms in the Australian region. Marine Pollution Bulletin. 25(5-8) :186-190.

HALLEGRAEF, G. M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia. 32(2): 79-99.

HALLEGRAEF, G.M., ANDERSON, D.M., CEMBELLA, A.D. 1995. Manual and Guides N°33. Eds. International Oceanographic Commission (IOC).

HOLD, G.; SMITH, E.; RAPPÉ, M.; MAAS, E.; MOORE, E.; STROEMPL, C.; STEPHEN, J.; PROSSER, J.; BIRBECK, T.; GALLACHER, S. 2001. Characterization of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. FEMS Microbiology Ecology, 37:161--173.

HOLMSTRÖM, C; KJELLEBERG, S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organism and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiology Ecology. 30: 285-293.

IMAI, I.; SUNAHARA, T.; NISHIKAWA, T.; HORI, Y.; KONDO, R.; HIROSHI, S. 2001. Fluctuations of the red tide flagellates *Chatonella* spp. (Raphidophyceae) and

- the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. *In*: Seto Inland Sea, Japan. *Marine Biology*. 138: 1043-1049.
- KIM, M.; YOSHINAGA, I.; IMAI, I.; NAGASAKI, K.; ITAKURA, S.; ISHIDA, Y.** 1998. A close relationship between algicidal bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay. *Jpn. Marine Ecology Program Series*. 170, 25-32.
- KODAMA, M.; SAKAMOTO, S.; KOIKE, K.** 1996. Symbiosis of bacteria in *Alexandrium tamarensis*. *In*: Harmful and toxic algal blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y. y Fukuyo, Y., eds. IOC, UNESCO: 351-354.
- LAFAY, B.; RUIMY, R.; DE TRAUBENBERG, C. R.; BREITTMAYER, V.; GAUTIER, M. J.; CHRISTEN, R.** 1995. *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45:290--296.
- LEE, S.; KATO, J.; TAKIGUCHI, N.; KURODA, A.; IKEDA, T.; MITSUTANI, A.; OHTAKE, H.** 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(10): 4334-4339.
- LOVEJOY, C.; BOWMAN, J.; HALLEGRAEFF, G.** 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, Gamma subdivision) on Harmful Algal Bloom Species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodium* and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8): 2806-2812.
- MAYALI, X.; AZAM, F.** 2004. Algicidal bacteria in the sea their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51(2): 139-144.
- MITSUTANI, A.; YAMAZAKI, I.; KITAGUCHI, H.; KATO, J.; UENO, S.; ISHIDA, Y.** 2001. Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A25 by two dimensional electrophoresis. *Phycologia* 40 (3): 286-291.
- RUEGER, H.J., HOEFLE, M.G.** 1992. Marine star-shaped aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum*, new species; *Agrobacterium meteori*, new species; *Agrobacterium gelatinopvorum*, new species, and *Agrobacterium stellulatum*, new species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 133-143.

- SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M.G.; BASSLER, B.L.** 2001 The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*. 41(2) :463-476.
- SHIMIZU, Y.; GIORGIO, C.; KOERTING-WALKER, C.; OGATA, T.** 1996. Non conformity of bacterial production of paralytic shellfish poisons-neosaxitoxin production by a bacterium strain from *Alexandrium tamarense* Ipswich strain and its significance. *In: Harmful and Toxic Algal Blooms*. Yasumoto , T. Oshima , Y. Fukuyo, Y.(eds) IOC of UNESCO, Sendai, Japan, pp 359-362.
- SKERRAT, J. H.; BOWMAN, J. P.; HALLEGRAEFF, G. M.; JAMES, S.; NICHOLS, P. D.** 2002. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology Program Series*. 244: 1-5.
- SMAYDA, T. J.** 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic, p. 29-40. *In: E. Granéli, B. Sundström, L. Edler and D.M. Anderson [eds.] Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, NY.
- SMAYDA, T. J.** 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplakton bloom. *Journal of Limnology and Oceanography*. 42: 1137-1153.
- SOURNIA, A.; CHRETIENNOT, D.; RICARD, M.** 1991. Marine Phytoplankton: how many species in the world ocean?. *Journal of Plankton Research*. 13: 1093-1099.
- SUÁREZ, B.A.; GUZMÁN, L.** 1999. Mareas rojas y toxinas marinas. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 77 p.
- STEIDINGER, K.A.** 1993. Some taxonomic and biological aspects of dinoflagellate. *In: Falconer, I.R. (ed): Algal toxins in seafood and drinking water*. Chapter 1, Academic Press. London and New York. Pp. 1-28.
- UCHINO, Y.; HIRATA, A.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J.** 1998. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. Nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *Journal of General and Applied Microbiology* 44: 201-210.

- URIBE, J. C.** 1992. Marea roja: perspectiva histórica. *Revista de sanidad de la defensa nacional (Chile)*. 9:100-104.
- URIBE, P.; ESPEJO, R.** 2003. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 659-662.
- TAUCHER, E.** 1997. *Bioestadística*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. pp. 161-186.
- VÁZQUEZ, M.; GRUTTNER, C.; GALLACHER, S.; MOORE, E.** 2001. Detection and characterization of toxigenic bacteria associated with *Alexandrium catenella* and *Aulacomya ater* contaminated with PSP. *Journal of Shellfish Research*, 20:1245—1249
- VERGARA, L.; FERNANDEZ, R.; ROA, A.; VILLAROEL, O.; MONREAL, J.; CORNEJO, J.** 1995. Programa de vigilancia y control de las intoxicaciones por marea roja. Dpto. de programas sobre el ambiente. pp. 2-58
- YOSHINAGA, I.; KIM, I.; UCHIDA, A.; ISHIDA, I.** 1998. Population structure of algicidal marine bacteria targeting the red tide-forming alga *Heterosigma akashiwo* (raphidophyceae) determined by restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16 S ribosomal RNA genes. *Marine ecology program series*, 170: 33-44.

X. ANEXO

ANEXO 1

COMPOSICIÓN F/2 - Si (Guillard 1975)

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
1 ml	NaNO ₃	75 g/L H ₂ O destilada
1 ml	NaH ₂ PO ₄	5 g/L H ₂ O destilada
1 ml	Metales Traza para F/2	(*)
1 ml	Vitaminas para F/2	(**)

Completar a 1 Litro volumen final (V/F) con agua de mar, ajustar a pH 7,4 y luego filtrar.

(*) Metales Traza para F/2

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
3,15 g	FeCl ₃ · 6H ₂ O	-
4,36 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	-
1 ml	CuSO ₄ · 5H ₂ O	9,8 g/L H ₂ O destilada
1 ml	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6,3 g/L H ₂ O destilada
1 ml	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22,0 g/L H ₂ O destilada
1 ml	CoCl ₂ · 6H ₂ O	10,0 g/L H ₂ O destilada
1 ml	MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0 g/L H ₂ O destilada

Completar a 1 Litro V/F con agua destilada, luego filtrar y guardar en frío.

(**) Vitaminas para F/2.

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
1 ml	Vitamina B ₁₂ (Cianocobalamina)	1,0 g/L H ₂ O destilada
10 ml	Biotina	0,1 g/L H ₂ O destilada
200 mg	Tiamina · HCl	-

Completar a 1 Litro V/F con agua destilada, luego filtrar y guardar en frío.

ANEXO 2

BUFFER HIC

Buffer 3 M	Concentración final en el medio
Tris 2M pH 8,0	20 mM
EDTA 0,1 M	0,2 mM
Na Cl	3 M

Buffer 1 M	Concentración final en el medio
Tris 2M pH 8,0	20 mM
EDTA 0,1 M	0,2 mM
Na Cl	1 M

Buffer 0 M	Concentración final en el medio
Tris 2M pH 8,0	20 mM
EDTA 0,1 M	0,2 mM

ANEXO 3

MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO

Solución A: Ácido Bicinconínico

Solución B: Sulfato cúprico

Estándar de proteína: Albúmina Sérica Bovina (BSA): 0,1 Mg. / mL.

Este método de detección de proteínas mide entre 0 a 10 µg/mL de proteína en cada muestra, y se basa en la reacción colorimétrica generada al mezclar las soluciones A con la B en una relación 49:1 como reactivo base.

Para poder hacer la medición de proteínas en cada muestra se realiza una curva estándar como se indica en la tabla 4, obteniendo como volumen final de cada muestra 1 mL.

Tanto la muestra como las concentraciones correspondientes a los puntos de la curva estándar, se calentaron en baño termoregulado a 50° C por 30 minutos y se leyeron las respectivas absorbancias en un espectrofotómetro a 562 nm, de modo que, se relacionó

la absorbancia de la curva estándar con la concentración de proteínas conocidas y, sobre la base de esto, se obtuvo la concentración proteica de la muestra.

Tabla 4

Tubo	µg de proteína	BSA (µL)	Agua desionizada (µL)	Solución A +B (µL)
Blanco	0	0	100	900
1	1	10	90	900
1'	1	10	90	900
2	2	20	80	900
2'	2	20	80	900
3	5	50	50	900
3'	5	50	50	900
4	8	80	20	900
4'	8	80	20	900
5	10	100	0	900
5'	10	100	0	900

Curva de Calibración:

