



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



**CARACTERIZACIÓN Y ESPECIFICIDAD DEL
EFECTO ALGUCIDA DE LA BACTERIA MARINA**
Pseudoalteromonas sp. AMA-02 **SOBRE**
MICROALGAS MARINAS.

DANIEL ALEJANDRO CARRASCO PALMA

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

PROFESOR GUÍA: ANA MARÍA AMARO SEPÚLVEDA, Mg. Sc

SANTIAGO, CHILE
2005

INDICE

I. RESUMEN.....	4
II. SUMMARY.....	5
III. INTRODUCCIÓN.....	6
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
V. OBJETIVO GENERAL.....	16
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
7.1. MATERIAL.....	17
7.1.1. Cultivo y Mantenición de Microalgas.....	17
a) <i>Alexandrium catenella</i> cepa ACC01.....	17
b) <i>Alexandrium catenella</i> cepa ACC02.....	18
c) <i>Heterocapsa</i> sp. cepa SGM01.....	18
7.1.2. Condiciones de Cultivo.....	18
7.1.3. Cultivo y Mantenición Bacteriana.....	19
7.1.4. Curva de Crecimiento Bacteriano.....	20
7.2. MÉTODOS.....	21
7.2.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.....	21
7.2.1.1. Efecto Alguicida Directo.....	21
7.2.1.2 Efecto Alguicida Indirecto.....	22
7.2.1.3. Determinación del Efecto Alguicida, a Distintas Diluciones, del SFD.....	24
7.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.....	25

7.2.2.1. Detección de las Actividades Enzimáticas Presentes en Cultivos de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AMA-02	25
7.2.2.2. Fraccionamiento Hidrofóbico del SFD de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AMA-02. ...	26
7.2.2.3. Medición de la Actividad Alguicida Presente en las Fracciones Hidrofóbicas Obtenidas por HIC.	28
7.2.2.4. Ultrafiltración de las Fracciones Hidrofóbicas con Actividad Lítica.....	30
7.2.2.5. Medición de la Actividad Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas Ultrafiltradas (FHU).....	32
7.2.2.6. Determinación de la Concentración de Proteínas de las Distintas fracciones Obtenidas del SFD con Actividad Lítica.....	33
7.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ALGUICIDA.	35
7.2.3.1. Especificidad del Efecto Alguicida.	35
7.2.3.2. Especificidad de la Actividad Alguicida de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU).	36
7.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	37
VIII. RESULTADOS.....	38
8.1. Curva de Crecimiento Bacteriano.....	38
8.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.....	39
8.2.1. Efecto Alguicida Directo.	39
8.2.2. Efecto Alguicida Indirecto.	41
8.2.3. Determinación del Efecto Alguicida, a Distintas Diluciones, del SFD.	44
8.3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.	48

8.3.1. Detección de las Actividades Enzimáticas Presentes en Cultivos de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AMA-02.	48
8.3.2. Fraccionamiento Hidrofóbico del SFD de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. AMA-02.	50
8.3.3. Medición de la Actividad Alguicida Presente en las Fracciones Obtenidas por HIC.	50
8.3.4. Ultrafiltración de las Fracciones Hidrofóbicas con Actividad Lítica.	51
8.3.5. Medición de la Actividad Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas Ultrafiltradas (FHU)	51
8.3.6. Determinación de la Concentración de Proteínas de las Distintas fracciones del SFD con Actividad Lítica.	52
8.4. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ALGUICIDA. ..	53
8.4.1. Efecto Alguicida del SFD sobre cultivos de <i>Alexandrium catenella</i> cepa ACC02	53
8.4.2. Efecto Alguicida del SFD sobre cultivos de <i>Heterocapsa</i> sp. cepa SGM01:	57
8.4.3. Medición de la Especificidad de la Actividad Alguicida de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltradas (FHU).	60
IX. DISCUSION.	61
X. CONCLUSIONES.	69
XI. BIBLIOGRAFÍA.	71
XII. ANEXO.	76
12.1 Composición F/2-Si (Guillar, 1975)	76
12.2. Soluciones Stock de Buffer Empleados en HIC.	77

I. RESUMEN.

Las Floraciones de Algas Nocivas (FAN) en el mar, son fenómenos de gran impacto económico, productivo, sanitario y social. El dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* cepa ACC01, fue aislado desde la XI^a Región de Aysen, Chile (45° 32' S, 73° 34'O), un área que fue afectada previamente por Floraciones de Algas Nocivas del tipo paralizante y diarreico. Este dinoflagelado ha sido cultivado y mantenido en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. A partir de estos cultivos, en el año 2002, se aisló la bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. cepa AMA-02. Esta bacteria, que normalmente crece en forma saprófita asociada a *Alexandrium catenella*, al crecerla separada de ella, en un medio de cultivo con nutrientes orgánicos, es capaz de liberar al medio de cultivo sustancias líticas para la microalga de la cual fue aislada. Sin embargo, la actividad lítica no se observa cuando la bacteria, libre de nutrientes orgánicos, es reinsertada en el cultivo de *A. catenella* ACC01. El efecto lítico observado, es aparentemente específico para las cepas ACC01 y ACC02 de *A. catenella*, pero no para la microalga no tóxica *Heterocapsa* sp. cepa SGM01. Las sustancias líticas liberadas al medio de cultivo son capaces de inmovilizar inicialmente al dinoflagelado y promover, posteriormente la lisis celular a través de enzimas hidrolíticas liberadas al medio por la bacteria *Pseudoalteromonas* sp. cepa AMA-02, normalmente asociadas a la microalga. La caracterización preliminar y purificación de el o los factores liberados al medio de cultivo, responsables de la actividad lítica, demostró que corresponde a un compuesto de características hidrofóbicas, de un peso molecular menor a 1 KDa.

II. SUMMARY.

Harmful Algal Blooms (HAB) at sea, are phenomena with severe economic, productive, sanitary and social impacts. The toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* strain ACC01 was isolated from the Aysen Region, Chile (45° 32' S, 73° 34'O), an area previously affected by harmful algal blooms of paralytic and diarrhetic type. This dinoflagellate has been cultured and maintained at the Laboratory of Marine Toxins of the Faculty of Medicine of the University of Chile. In year 2002 the marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. strain AMA-02 was isolated from these cultures. This saprofitic bacteria that normally grows in association with *A. catenella*, is able to release to the culture medium substances that are lytic for the dinoflagellate only when grown separately in a culture medium enriched with organic nutrients. However, the lytic activity is not observed when the bacteria, free of organic nutrients, are reintroduced in the *A. catenella* ACC01 culture. The lytic effect seemed to be specific for *A. catenella* strain ACC01 and ACC02, but not for the non toxic *Heterocapsa* sp. strain SGM01. The lytic substances to release to the culture medium are able to initially immobilize the dinoflagellate and to promote later the cellular lysis through hydrolytic enzymes which are also released by the bacteria *Pseudoalteromonas* sp. strain AMA-02 normally associated with *A. catenella*. The preliminary characterization and purification of the responsible factor(s) of the lytic activity released to the culture medium, demonstrated that the compound(s) have hydrophobic properties with a molecular mass of less than 1 KDa.

III. INTRODUCCIÓN.

En el mar, el fitoplancton, constituido principalmente por microalgas, es responsable de más del 90% de la producción de materia orgánica ya que éstas, por medio de fotosíntesis, generan oxígeno a partir de compuestos inorgánicos como CO₂ y H₂O, constituyendo la base alimentaria de la cadena trófica marina.

Algunas microalgas son consideradas nocivas y bajo ciertas condiciones de temperatura, salinidad, luminosidad y disponibilidad de nutrientes, proliferan en forma explosiva, provocando un fenómeno que se conoce con el nombre de *Floraciones de Algas Nocivas* (FAN). Este es un fenómeno natural, que se presenta en determinadas zonas o localidades, alterando la vida marina y la economía de las áreas afectadas; dicho evento, es comúnmente conocido con el nombre de Marea Roja por su asociación, en algunos casos, al cambio de coloración del agua (Fotografía 1).



Fotografía 1. Tomada por Joe Hlebica, del Scripps Institution of Oceanography.

En Chile el fenómeno FAN, se produce por la proliferación masiva de microalgas como los dinoflagelados tóxicos *Alexandrium catenella* y *Dinophysis acuta* y, por otro lado, algunas diatomeas del Género *Pseudo-nitzschia*; estas algas, en su metabolismo generan sustancias altamente tóxicas, conocidas con el nombre de *toxinas marinas*, tales como: Veneno Paralizante de Mariscos o VPM, Veneno Diarreico de Mariscos o VDM y Veneno Amnésico de Mariscos o VAM, respectivamente. Los casos de intoxicación humana que se han detectado en nuestro país, se han asociado a las toxinas de acción paralizante y diarreica, principalmente en las regiones de Aysen y Magallanes; sin embargo a principios del año 2002, este fenómeno se expande hacia la X^a Región en el archipiélago de Chiloé, donde fue detectado, un brote de *Alexandrium catenella* que dejó 70 intoxicados y dos casos fatales. (Arriagada *et al.*, 2004)

Otra gran consecuencia de este fenómeno, es el gran impacto económico que se produce durante un evento tóxico; por ejemplo en Chiloé en el año 2002, considerando que esta zona aporta el 62% de la producción de mariscos, las pérdidas se estimaron en unos US\$ 6.640.000 (Arriagada *et al.*, 2004), las cuales se asocian principalmente a la disminución en la extracción, consumo y exportación de mariscos.

En los últimos años, se ha descrito que los dinoflagelados tóxicos se encuentran, en la naturaleza, asociados a bacterias, y algunos autores señalan que éstas podrían estar involucradas en el crecimiento y toxicidad de las microalgas a las cuales se encuentran asociadas (Kao *et al.*, 1993; Shimizu *et al.*, 1996).

El rol que las bacterias tienen en la dinámica de las FAN no ha sido claramente establecido; sin embargo, se ha descrito que algunas de estas bacterias asociadas ejercen un

efecto alguicida a través del contacto directo con la microalga (Imai *et al.*, 1993), el cual estaría relacionado con el término de las FAN. Otros estudios han entregado evidencias suficientes para postular que el efecto alguicida ejercido por estas bacterias sería de tipo indirecto (Doucette *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998), a través de la excreción de sustancias capaces de destruir y desintegrar a la microalga.

Alexandrium catenella cepa ACC01, es una de las microalgas generadoras de FAN, que en condiciones de cultivo de laboratorio se encuentra asociada, entre otras, a la bacteria marina *Pseudoalteromonas sp.* AMA-02; esta bacteria es un bacilo Gram negativo, del grupo de las γ -*Proteobacterias* que crece entre 10° a 30°C, formando colonias blancas, grandes y circulares (Amaro *et al.*, 2005), y su rol en la interacción con la microalga no está aún claramente establecido.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Las microalgas constituyen, dentro de la ecología marina, la base alimentaria de la cadena trófica marina, suministrando el oxígeno necesario para la vida acuática.

De las cerca de 4000 especies de microalgas, sólo algunas son nocivas, y hoy en realidad se discute si son la única fuente de toxinas en el ambiente marino, ya que las bacterias asociadas podrían estar ejerciendo un aporte importante en la toxicidad de estas microalgas (Kao, 1993).

En Chile, se han descrito tres tipos de toxinas asociadas a las FAN, toxinas diarreicas (VDM), toxinas paralizantes (VPM), y toxinas amnésicas (VAM) o ácido domoico. Algunos autores postulan que VPM es también producida en forma autónoma y en muy bajas concentraciones, por bacterias aisladas desde cultivos de dinoflagelados (Shimizu *et al.*, 1996).

Los dinoflagelados son organismos unicelulares, uninucleados, fitoplanctónicos, móviles, que poseen dos flagelos desiguales, viven en la superficie de aguas salobres y dulces y, corresponden a un grupo importante dentro de las microalgas responsables de las FAN.

Entre todas las interacciones que experimentan los seres vivos en la naturaleza, ya sea mutualismo, comensalismo, antagonismo o parasitismo, las bacterias presentan una alta afinidad hacia células eucariontes de cualquier jerarquía organizacional, principalmente con hospederos invertebrados (Goebel y Gross, 2001). Especies de la bacteria marina *Pseudoalteromonas* se encuentran frecuentemente asociadas a hospederos eucariontes en el

entorno marino (Holmström y Kjelleberg, 1999).

De acuerdo con esto, algunos autores proponen que las bacterias pueden incorporarse al interior de los organelos de las microalgas y cumplir allí un rol como fuente de materia orgánica, lo que podría ser considerado como mutualismo (Kodama *et al.*, 1996).

Dentro de la relación alga-bacteria, algunos autores (Doucette *et al.*, 1998; Mayali y Azam, 2004) describen en las bacterias un efecto alguicida sobre dinoflagelados nocivos, lo que podría constituir un método de control biológico de las FAN.

Mayali y Azam (2004), definen como “bacterias alguicidas”, a aquellas bacterias marinas heterotróficas con potencial bioquímico para matar microalgas.

La interacción que existe entre bacterias y microalgas dañinas y/o tóxicas, es de gran importancia, debido a que afecta tanto a la dinámica poblacional, como a la toxicidad de estas microalgas (Doucette *et al.*, 1999).

Doucette *et al.*, (1999), plantean un modelo de interacción alga-bacteria en el medio marino, basados en estudios realizados con el dinoflagelado *Gymnodinium breve*. En dicho trabajo los autores definen cuatro etapas para el desarrollo de una FAN: Inicio, Desarrollo, Mantenimiento y Término (Figura 1).

Inicio: En ausencia o bajo número bacteriano, existe un componente microbiano específico de la bacteria que hace que ésta se reúna entorno al dinoflagelado blanco. Esto coincide con el inicio de una FAN, donde el número total de bacterias comienza a incrementarse, en respuesta al aumento de nutrientes derivados de las microalgas.

Desarrollo: Durante el desarrollo de la FAN, el número de microalgas blanco

aumenta; ésto hace que en términos relativos y absolutos la cantidad de bacterias alguicidas también aumenten, iniciándose un feedback por el cual mueren microalgas, liberándose compuestos orgánicos que son aprovechados por la comunidad bacteriana.

Mantención: Es la continuación del feedback en el tiempo.

Término: La FAN comienza a declinar, acompañado de la disminución de los niveles de compuestos orgánicos derivados de microalgas. Como las bacterias alguicidas son altamente dependientes de los compuestos orgánicos, el número de bacterias retrocede a niveles iniciales.

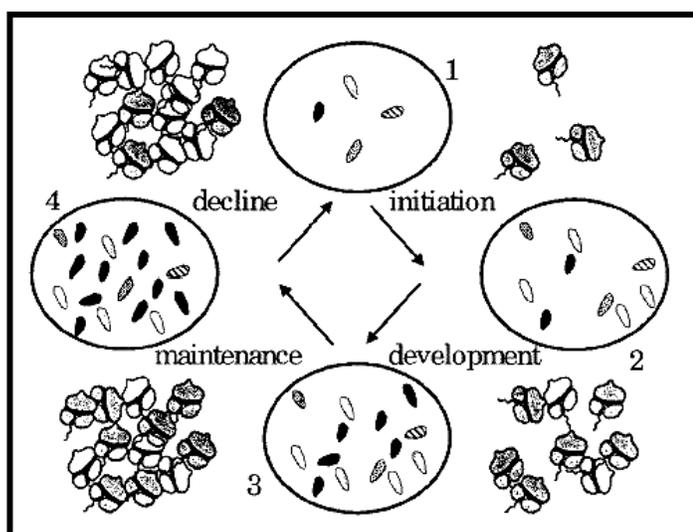


FIGURA 1: Modelo de Interacción Alga-Bacteria, postulado por Doucette *et al.*, 1999. **1.** Initiation: Fase de Inicio; **2.** Development: Fase de Desarrollo; **3.** Maintenance: Fase de Mantención; **4.** Decline: Fase de Término.

 = Bacterias Asociadas
  = Microalgas vivas
  = Microalgas muertas

El término o fase final de una FAN, según Mayali y Azam (2004) puede ser inducido por causas como limitación de nutrientes, lisis viral, patógenos eucariontes, o una combinación de todos ellos.

Otros estudios, de laboratorio, demuestran que a medida que el cultivo de microalgas llega a una fase estacionaria, se observa un aumento en el conteo y ataque de bacterias sobre el dinoflagelado; no obstante, se desconoce el mecanismo que gatilla el ataque (Simon *et al.*, 2002). Estos autores explican que el crecimiento inicial de las bacterias es sostenido por la materia orgánica presente en el agua de mar, y no por la materia derivada de las microalgas; sin embargo después de un tiempo, el crecimiento es fuertemente dependiente de la presencia de células algales. Al respecto, algunos autores postulan que las bacterias deben alcanzar cierta densidad numérica, en relación a la microalga, antes de que el factor alguicida se exprese. A este fenómeno se le ha denominado “*quorum sensing*”, (Schauder *et al.*, 2001)

Independiente de cómo se realice dicha interacción, se piensa que existen dos formas de cómo las bacterias atacarían a las microalgas, una directa, en la cual es necesario un contacto físico (Imai *et al.*, 1993), y la otra indirecta, donde la bacteria exudaría un compuesto lítico al medio que rodea a la microalga (Doucette *et al.*, 1998; Lovejoy *et al.*, 1998), siendo esta última la más aceptada. Estudios basados en una bacteria marina que es capaz de matar a *G. breve*, realizados por Doucette *et al.* (1999) demostraron que al enfrentar bacterias a un cultivo de microalgas separadas por una membrana de diálisis, la bacteria producía actividad alguicida, lo cual sería mediada por un compuesto no identificado excretado al medio.

Es así como Lee *et al.* (2000) postulan que la bacteria *Pseudoalteromonas sp.* cepa A28, produciría una serina–proteasa extracelular llamada Proteinasa I, de peso molecular 50 KDa. Esta proteína sería la responsable de la actividad alguicida que afecta a *Skeletonema costatum*, una microalga de la Clase Diatomea que produce FAN y que al proliferar en espacios reducidos, daña las branquias de los peces de cultivos causándoles hemorragias, infecciones y eventualmente la muerte (Suárez y Guzmán 1999).

Posteriormente, en 2002, Lee *et al.* clonaron un gen de la bacteria *Pseudoalteromonas sp.* cepa A28, que codifica para una zinc metaloproteasa llamada *empI*, de peso molecular 38 KDa. Esta enzima es distinta a la proteinasa I aislada previamente y, se libera al medio extracelular de la bacteria, ejerciendo una potente actividad alguicida sobre la microalga *Skeletonema costatum*.

Otros autores describen actividades enzimáticas como proteinasa, tirosinasa, lipasa, amilasa, quitinasa, agarasa, laminirasa, celulasa, β -glucosidasa, α y β -galactosidasa, β -n acetilglucosaminidasa, β -glucosaminidasa, α -manosidasa, entre otras, que evidencian la diversificación ecofisiológica de *Pseudoalteromonas* y su capacidad de degradar un amplio rango de sustratos orgánicos (Ivanova *et al.*, 2003). Hoffman y Decho (2000), describen que cultivos de *Pseudoalteromonas atlantica* producen y liberan proteasas que podrían hidrolizar moléculas con fines nutritivos y energéticos. Tal como ocurre en bacterias, en microalgas se describe la presencia de proteasas en la superficie celular, las cuales jugarían un rol en la nutrición y asimilación de aminoácidos por parte de los dinoflagelados (Stoecker y Gustafson, 2003).

No solo actividades enzimáticas son detectadas en estas bacterias alguicidas,

Holmström y Kjelleberg (1999) describen que muchas especies de *Pseudoalteromonas* producen metabolitos biológicamente activos, cuyo blanco son variados organismos. La producción de agarasa, toxinas, sustancias bacteriolíticas y otras enzimas por parte de *Pseudoalteromonas*, podrían ayudar a las bacterias en la competencia por nutrientes frente a otros microorganismos fitoplanctónicos.

La actividad alguicida que presentan algunas bacterias marinas sobre microalgas productoras de FAN, fue observada por Lovejoy *et al.* en 1998. Ellos describen que inicialmente las cadenas de dinoflagelados se separan, luego las células adquieren una forma redondeada y posteriormente se hinchan para finalmente lisarse.

Por otro lado, el grado de especificidad de la actividad alguicida es un tema en discusión; si bien Doucette *et al.* (1999) postulan que la acción alguicida es específica para una determinada especie de microalga, Mayali y Azam (2004) sugieren que mientras algunas bacterias lisan una especie de microalgas, otras lo hacen contra múltiples especies dentro de la misma taxonomía e incluso otras son capaces de lisar células de diferentes especies. Es posible que sólo una especie de microalga muera a causa de una bacteria alguicida, debido a una repuesta de la interacción física de la bacteria y el alga, la cual es regulada por la vía de los compuestos orgánicos disueltos que produce la microalga blanco (Doucette *et al.*, 1999).

Otro estudio con respecto a la especificidad de la interacción alga-bacteria, es descrito por Kato *et al.* (1998), que demuestran que *Alteromonas* sp. son capaces de lisar a las diatomeas *Thalassiosira* sp. y *Eucampia zodiaks* y a la rafidofita *Chattonella antiqua*; en tanto que no tienen efectos alguicidas contra la diatomea *Ditylum brightwelli* y el

dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi*. Por otro lado Lovejoy *et al.* (1998) realizaron un estudio que demuestra que *Pseudoalteromonas peptidysin* causó una rápida lisis y muerte celular de *Gymnodinium catenatum* (Gymnodiniales), *Chatonella marina* y *Heterosigma akashiwo* (Rafidofitas), mientras que en dinoflagelados como *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum* y *Prorocentrum mexicanum*, produjo pérdida de la teca o ecdisis; sin embargo, estos cultivos se recuperaron después de 24 horas.

En Chile, se han identificado tres bacterias asociadas a cultivos del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* cepa ACC01; *Cytophaga* sp. AMA-01, *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 y *Ruegeria atlantica* AMA-03. Si bien se ha demostrado que estas bacterias mantienen un efecto potencialmente alguicida sobre *A. catenella* (Amaro *et al.*, 2005), aún se desconoce las características de el o los factores involucrados y el mecanismo por el cual la bacteria ejerce este efecto lítico sobre el dinoflagelado.

V. OBJETIVO GENERAL:

Determinar y caracterizar la actividad alguicida específica de la bacteria *Pseudoalteromonas sp.* AMA-02 en cultivos de microalgas marinas.

VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar si la actividad alguicida de *Pseudoalteromonas sp.* AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01, es de tipo directo o indirecto.
2. Determinar en qué fase de la curva de crecimiento de *Pseudoalteromonas sp.* AMA-02 se expresa la actividad alguicida.
3. Detectar las actividades enzimáticas presentes en las diferentes fases del crecimiento bacteriano.
4. Determinar si la actividad alguicida está relacionada con las actividades enzimáticas encontradas.
5. Determinar la especificidad del efecto alguicida utilizando otros clones de microalgas aislados como los dinoflagelados *Alexandrium catenella* cepa ACC02 y *Heterocapsa sp.* cepa SGM01.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

El proyecto se ejecutó en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

7.1. MATERIAL

7.1 1. Cultivo y Mantención de las Microalgas.

Cepas de microalgas utilizadas:

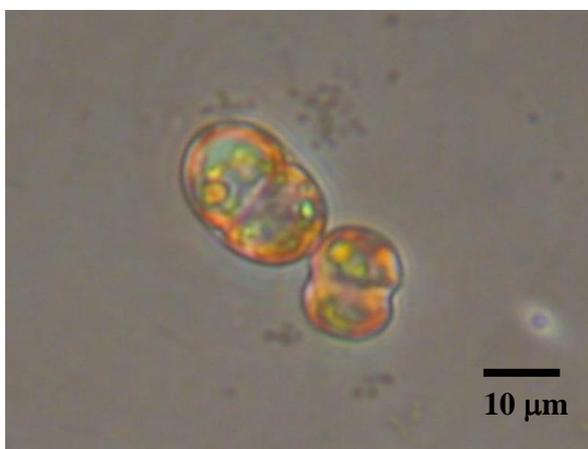
a) *Alexandrium catenella* cepa ACC01, aislada por la Sra. Miriam Seguel del Laboratorio del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Puerto Montt, Chile. Proveniente de una muestra colectada en abril de 1994 desde los mares de la Región de Aysen, Chile (45° 32' S, 73° 34' O).



Fotografía 2. 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. Donada por el Dr. Daniel Varela del Centro "I-Mar" del Departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente de la Universidad de los Lagos, Puerto Montt, X^a Región de Los Lagos, Chile.

c) *Heterocapsa* sp. cepa SGM01, obtenida desde los estanques del Centro de Cultivo de Abalón AWABI de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo, IV^a Región, Chile.



Fotografía 3. Microfotografía de *Heterocapsa* sp. cepa SGM01, Microscopio de Luz (40x) Invertido (Laboratorio de Toxinas Marinas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2004)

7.1.2. Condiciones de Cultivo.

Las microalgas fueron cultivadas en matraces estériles, con medio F/2-Si (Guillard, 1975), descrito en el Anexo 12.1, el cual consiste en agua de mar previamente filtrada a través de membranas de nitrocelulosa (Advantec MFS, Inc.) de 0,45 μm , enriquecida con nutrientes, estandarizada a pH 7,4 y esterilizada por filtración en membranas de nitrocelulosa (Advantec MFS, Inc.) de 0,22 μm . Para el cultivo de las microalgas, se utilizó

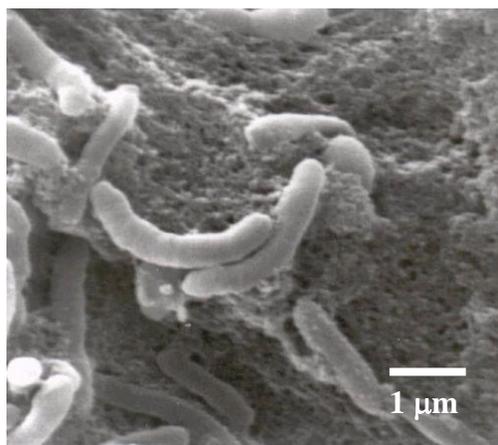
un incubador TRILAB a una temperatura de 12°C, con una intensidad lumínica de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones, con fotoperiodos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Todo el material de cultivo fue esterilizado por vapor a presión, durante 15 minutos a 255°F y 1,3 Kg/cm^2 de presión (Electric Pressure Steam Sterilizer Model NO.25X, All American®).

Tanto la manipulación de cultivos de microalgas como los experimentos que así lo requirieron, se realizaron bajo una cámara de flujo laminar.

7.1.3. Cultivo y Mantención Bacteriana.

Se utilizó la cepa *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, bacteria aislada en el Laboratorio de Toxinas Marinas desde un cultivo de la microalga *Alexandrium catenella* cepa ACC01 (Amaro *et al.*, 2005).



Fotografía 4. Microfotografía de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, Microscopio Electrónico de Barrido (10000x) (Amaro *et al.*, 2005)

Para su cultivo en medio sólido se empleó Agar Marino (Difco®), mientras que para su cultivo en medio líquido, se utilizó F/2-Si suplementado con 0,25% de Bactopectona (Difco®). La cepa se mantuvo a -20°C en Caldo Marino (Difco®) con 50% glicerol. Los cultivos se incubaron a 25°C con agitación a 120 r.p.m. (Incubador Termoregulado, Environ Shaker Orbit).

7.1.4. Curva de Crecimiento Bacteriano.

Se determinaron las fases de latencia, exponencial y estacionaria de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 crecida en medio líquido, midiendo la densidad celular por aumento en la absorbancia a 620 nm de las muestras del cultivo tomadas cada 1 hora desde su siembra (Espectrofotómetro 4049 LKB *Blochroom Novaspec*). El número de células en cada etapa de crecimiento, se determinó por medición de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas de Agar Marino según la Formula UFC (Gerhardt *et al.*, 1981). Esto se realizó tomando 1 mL de cultivo bacteriano en medio líquido de cada una de las fases de crecimiento bacteriano, el cual se suspendió sucesivamente en 9 mL de F/2-Si estéril (dilución 1:10). Se realizaron seis, diez y once diluciones sucesivas para las fases de latencia, exponencial y estacionaria, respectivamente. 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, incubándose a 30°C por 48 horas (Thermolyne Compact CO₂ Series 5000 Modelo 153320-26). El número de colonias en cada fase se calculó según la formula:

$$\text{UFC/mm}^3 = \frac{\text{N}^\circ \text{ Colonias} * \text{Dilución}}{\text{Volumen Muestra}}$$

7.2. MÉTODOS.

7.2.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.

7.2.1.1. Efecto Alguicida Directo.

Las bacterias utilizadas para medir el efecto directo se obtuvieron a partir de un cultivo de *Pseudoalteromonas* sp AMA-02 crecida en F/2-Si más 0,25% de bactopectona, incubada hasta el inicio de la fase estacionaria. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 12.100 x g por 20 minutos entre 0 y 10°C (Sorvall® RC-SB Refrigerated Superspeed Centrifuge). El pellet bacteriano obtenido, fue lavado en forma estéril dos veces con F/2-Si y centrifugado a 12.100 x g por 10 minutos, finalmente se resuspendió en el mismo medio, a una concentración celular de 1 a 2 x 10¹⁰ células/mL. Esta suspensión bacteriana fue utilizada para medir el efecto alguicida directo sobre cultivos de *Alexandrium catenella* en crecimiento exponencial, a una concentración de 13.000 células/mL.

La viabilidad de la suspensión bacteriana se comprobó por siembra e incubación de una alícuota en agar marino a 30 °C.

El efecto alguicida directo se realizó en matraces Erlenmeyer de 100 mL (Figura 2) y los cultivos se efectuaron bajo condiciones normales de incubación de microalgas.

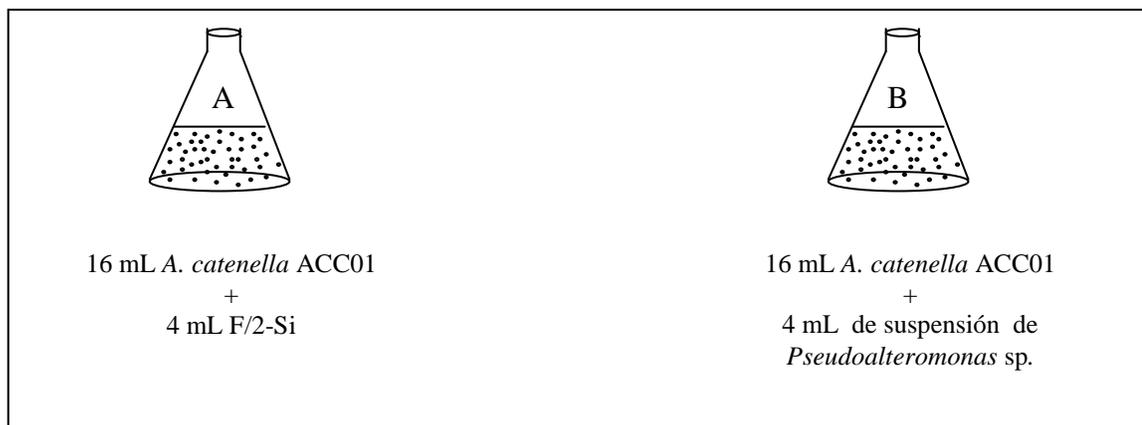


FIGURA 2: Efecto Alguicida Directo. **A:** Control Negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si y

B: *Alexandrium catenella* más suspensión bacteriana.

7.2.1.2 Efecto Alguicida Indirecto.

Para eliminar la bactopectona del medio de cultivo, el sobrenadante libre de células, de cada fase de crecimiento bacteriano obtenido por centrifugación, fue dializado en una membrana semipermeable SnakeSkin® de 10 KDa, contra F/2-Si, en una relación de volumen 1:10 (volumen sobrenadante/volumen F/2-Si) con tres cambios de F/2-Si, durante 24 horas, en frío y con agitación. El sobrenadante dializado se esterilizó por filtración en membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Advantec MFS, Inc.). A este sobrenadante se le llamó Sobrenadante Filtrado Dializado (SFD)

La actividad alguicida se midió enfrentando el SFD, de cada una de las distintas etapas de crecimiento bacteriano, a cultivos de *Alexandrium catenella* ACC01 en crecimiento exponencial (20.000 células/mL), bajo condiciones normales de incubación de microalgas y en una relación de volumen 1:1 (volumen SFD/volumen cultivo de *A. catenella*).

La determinación del efecto alguicida del sobrenadante del cultivo bacteriano se realizó en matraces Erlenmeyer estériles de 100 mL, tal como se describe en la Figura 3.

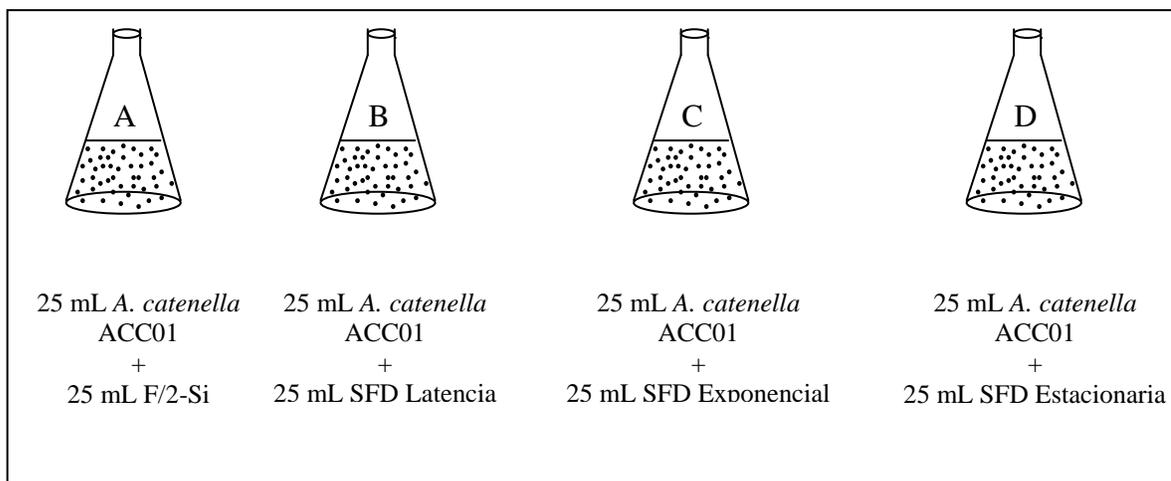


FIGURA 3: Efecto Alguicida Indirecto **A.** Control Negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si; **B.** *Alexandrium catenella* más SFD, Fase Latencia; **C.** *Alexandrium catenella* más SFD, Fase Exponencial y **D.** *Alexandrium catenella* más SFD, Fase Estacionaria.

Tanto el efecto directo como el indirecto fueron monitoreados por conteos de las células de microalgas que sobrevivieron, a las 24 y 48 horas de cultivo. Se utilizó una cámara de conteo celular Sedgewick Rafter S50 (Graticules Ltd., Inglaterra) y se observó con objetivo 40x en un Microscopio Invertido (Olympus CKX41).

7.2.1.3. Determinación del Efecto Alguicida, a Distintas Diluciones, del SFD.

Para determinar la variación en el efecto alguicida, que ejercen distintas concentraciones del SFD sobre cultivos de *A. catenella*, se utilizó el SFD de la fase estacionaria en una relación de volumen respecto al cultivo de microalga de 1:5 (Dilución 1:10) y 1:2,5 (Dilución 1:5), volumen SFD/volumen cultivo de *A. catenella*. Se tomó como control positivo un cultivo de *A. catenella* enfrentado al SFD en fase estacionaria en relación de volumen 1:1 (Dilución 1:2), volumen SFD /volumen cultivo de *A. catenella* y como control negativo un cultivo de *A. catenella* enfrentado a un volumen igual de F/2-Si.

La cuantificación del efecto alguicida se realizó bajo las mismas condiciones y metodología experimental descritos en la determinación del efecto alguicida indirecto (Figura 4).

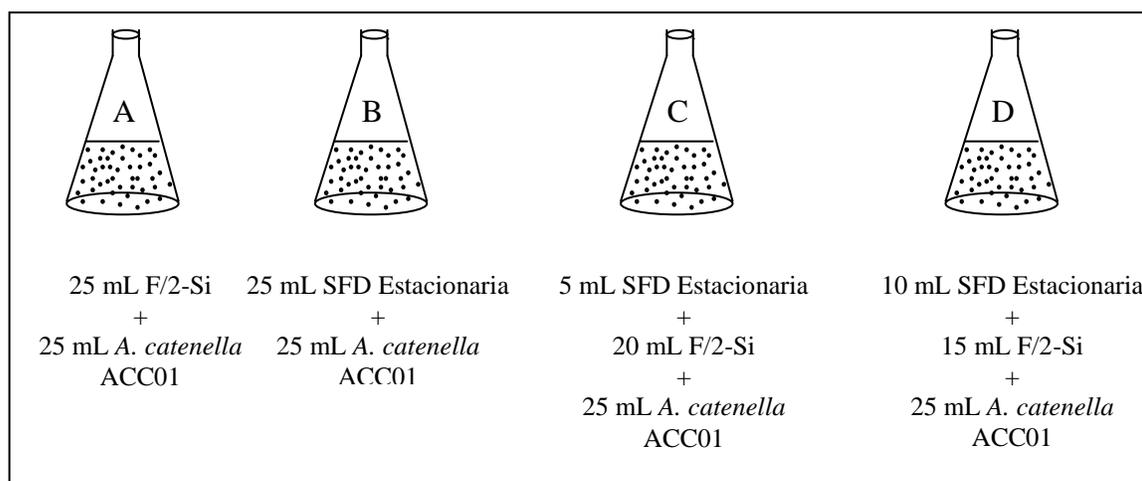


FIGURA 4: Efecto Alguicida a Distintas Diluciones. **A.** Control negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si; **B.** Control positivo, *Alexandrium catenella* más SFD Fase Estacionaria, Relación V/V 1:1, (Dilución del SFD 1:2); **C.** *Alexandrium catenella* más SFD Fase Estacionaria, Relación V/V 1:5 (Dilución del SFD 1:10) y **D.** *Alexandrium catenella* más SFD Fase Estacionaria, Relación V/V 1:2,5 (Dilución del SFD 1:5).

7.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.

7.2.2.1. Detección de las Actividades Enzimáticas Presentes en Cultivos de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02

Se utilizó el kit ApiZym (Biomerieux®) para la detección de las enzimas presentes en la superficie celular de las bacterias y /o en el SFD del cultivo bacteriano. ApiZym es un micrométodo colorimétrico semicuantitativo que permite detectar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas. Para el análisis de las enzimas celulares se utilizó una suspensión de células bacterianas de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, obtenido por centrifugación, tal como fue descrito en el punto 7.2.1.1., la cual contenía aproximadamente 15×10^8 células/mL, correspondiendo a 5 unidades MacFarland. Para la detección de las actividades exo-hidrolíticas presentes en cada una de las fases de crecimiento bacteriano, se usó una alícuota del SFD de *Pseudoalteromonas* sp. obtenido por centrifugación, tal como se describió en el punto 7.2.1.2.

Las detecciones enzimáticas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, para lo cual se inoculó en cámara de flujo laminar, 78 µl de la suspensión bacteriana o del SFD en cada uno de los pocillos del kit, y se incubó a 37°C por 24 horas (Thermolyne Compact CO₂ Series 5000 Modelo 153320-26). Posteriormente cada reacción se reveló añadiendo una gota de reactivo Zym A® y Zym B® por pocillo, más una exposición a la radiación por 10 segundos a una lámpara de 1000 W.

7.2.2.2. Fraccionamiento Hidrofóbico del SFD de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02.

Con el objetivo de aislar el componente alguicida presente en el SFD, se realizó un fraccionamiento hidrofóbico según el método HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) utilizando una columna de resina Phenyl Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech®) con una muestra de 200 mL de SFD de la etapa estacionaria de *Pseudoalteromonas* sp., a la que se le agregó previamente 28,03 gr de NaCl, con el fin que la muestra quedase en una concentración final de 3M NaCl. Por otro lado, se prepararon soluciones stock de Buffer Tris-EDTA, 0M, 1M y 3M NaCl (Anexo 12.2), con los cuales se confeccionaron distintas soluciones salinas para la elusión de la muestra, lográndose los Buffers: 0,7M; 0,5M; 0,3M; 0,15M; 0,075 M y 0M de Na Cl.

Preparación de la columna: se colocó 1 mL de resina en la columna por cada 5-8 mg/ml de proteínas presentes en la muestra y se lavó siete veces con 2 ml cada vez de Buffer Tris-EDTA 3M NaCl, luego se aplicó la muestra a una velocidad de 1 mL/minuto. Una vez pasada toda la muestra, se obtuvo una fracción inicial que contiene lo que la columna no retuvo, denominada Fracción no Hidrofóbica. Las fracciones retenidas por la columna fueron eluidas con dos lavados de 2 mL cada vez, de Buffers Tris-EDTA, con cada una de las diferentes concentraciones salinas (0,7M; 0,5M; 0,3M; 0,15M; 0,075M y 0M, NaCl) y denominadas según el buffer utilizado en su elusión. Cada una de estas seis fracciones hidrofóbicas, fueron concentradas aproximadamente veinte veces en relación al SFD de *Pseudoalteromonas* sp., tal como se describe en la Figura 5.

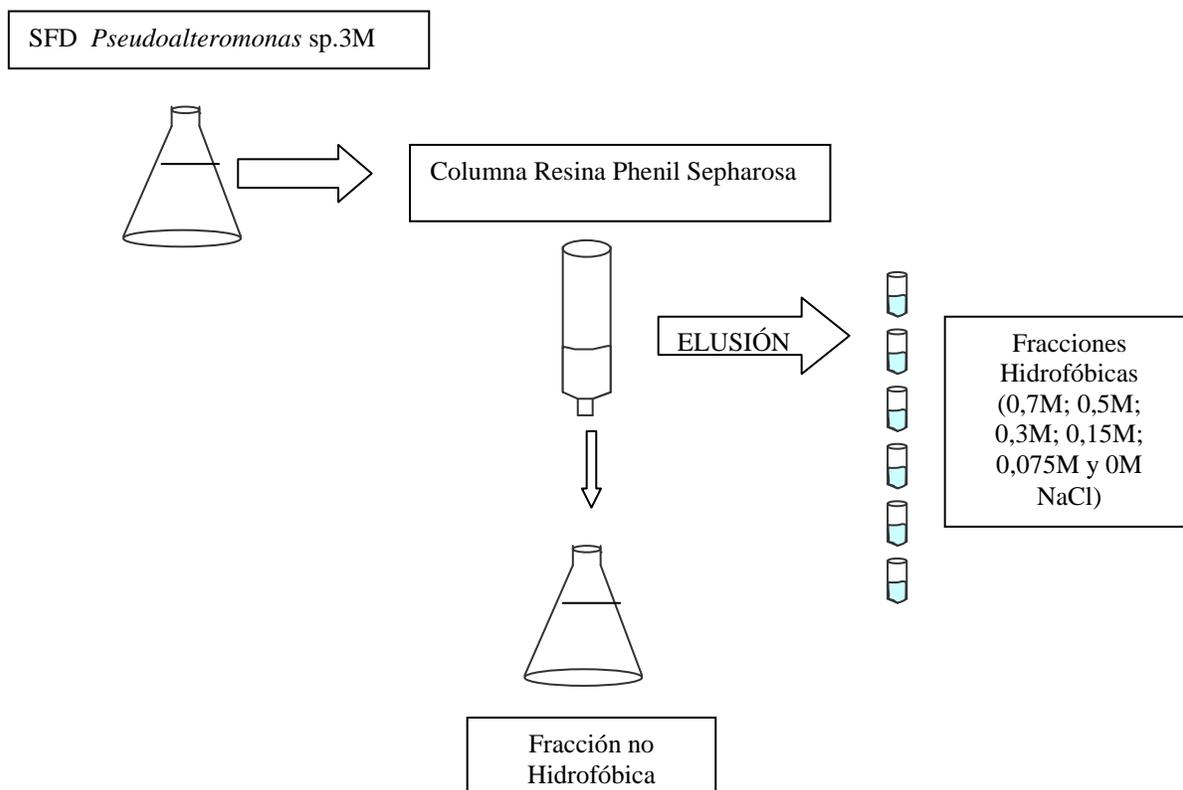


FIGURA 5: Esquema del Fraccionamiento Hidrofóbico del SFD de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, a través de la resina de Phenyl Sepharosa.

7.2.2.3. Medición de la Actividad Alguicida Presente en las Fracciones Hidrofóbicas Obtenidas por HIC.

Para poder determinar si el efecto alguicida está presente en las fracciones hidrofóbicas o en la fracción no hidrofóbica del SFD de *Pseudoalteromonas* sp., se enfrentaron cultivos de *A. catenella* cepa ACC01, a una concentración de 15.000 células/ml, con muestras de cada una de las seis fracciones hidrofóbicas obtenidas por HIC, en una cámara de 24 pocillos Cell Culture Cluster (Costar® 3524), en condiciones estériles.

Como control negativo se utilizó un cultivo de *A. catenella* más F/2-Si. Para determinar la existencia o no de interferencia de los Buffer Tris-EDTA 0M y 3M NaCl, en la viabilidad de las microalgas, se emplearon dos controles más, utilizando los buffers mencionados en lugar de las fracciones en estudio.

Las concentraciones usadas en el diseño experimental se describen en la Figura 6.

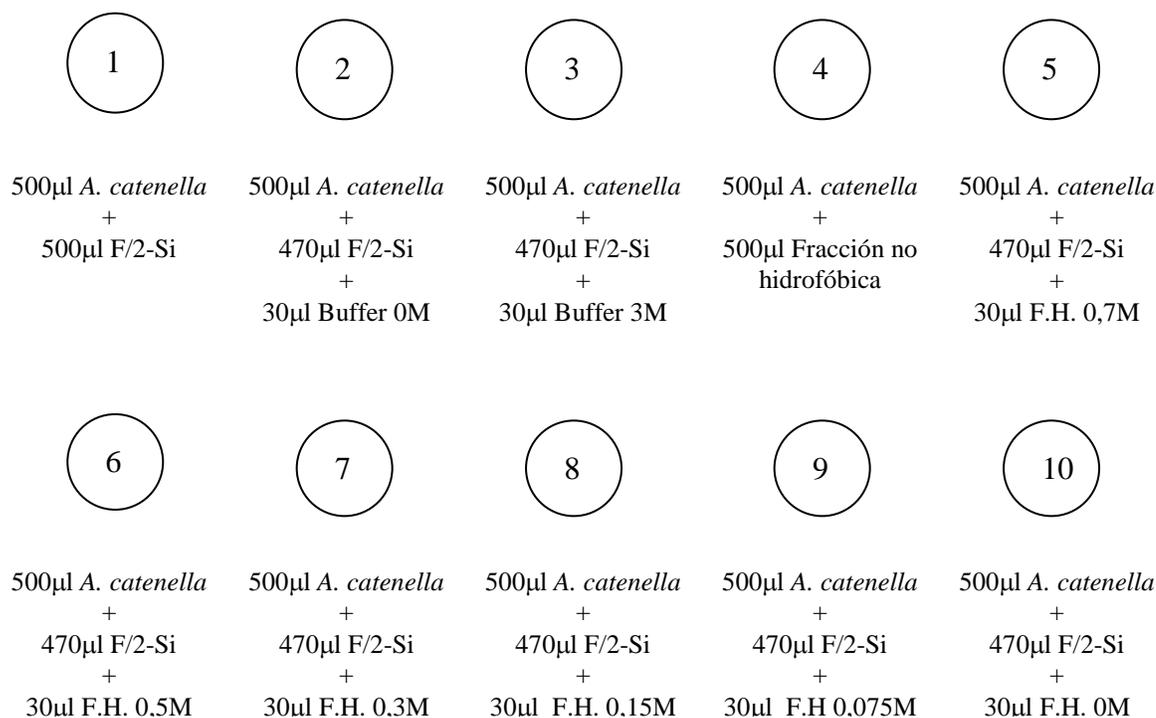


FIGURA 6: Estudio del Efecto Algucida de las Fracciones Hidrofóbicas y no hidrofóbica del SFD **1.** Control Negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si; **2.** Control Buffer TRIS-EDTA 0M NaCl, más *Alexandrium catenella*; **3.** Control Buffer TRIS-EDTA 3M NaCl, más *Alexandrium catenella*; **4.** *Alexandrium catenella* más Fracción no Hidrofóbica; **5.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0,7M; **6.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0,5M; **7.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0,3M; **8.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0,15M; **9.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0,075M y **10.** *Alexandrium catenella* más Fracción Hidrofóbica 0M.

La sobrevivencia de la microalga se determinó por simple observación cualitativa en un Microscopio Invertido (Olympus CKX41) con objetivo 40x. Las lecturas se realizaron a los tiempos 0, 30 minutos, 24 y 48 horas de incubación.

7.2.2.4. Ultrafiltración de las Fracciones Hidrofóbicas con Actividad Lítica.

Con el fin de determinar el tamaño aproximado del o los factores involucrados en la actividad algucida, se colectaron en un tubo de centrifuga estéril cada una de las fracciones hidrofóbicas que causaron efecto algucida y luego fueron filtradas en una cámara de ultrafiltración AMICON®, utilizando una membrana de 10 KDa a 50 p.s.i. de presión positiva con nitrógeno gaseoso y en agitación. La fracción hidrofóbica retenida en el filtro se lavó y resuspendió en F/2-Si, y se denominó Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) > 10 KDa; por otro lado, el ultrafiltrado, que traspasó la membrana de filtración, se denominó Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) < 10 KDa. (Figura 7)

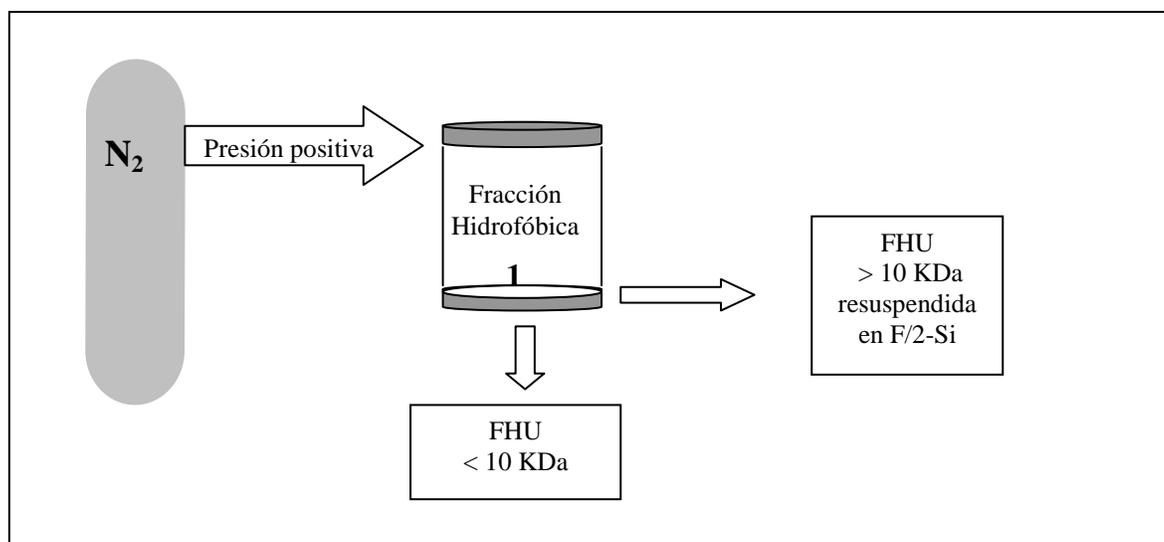


FIGURA 7: Esquema de Ultrafiltración de Fracciones Hidrofóbicas. **1.** Membrana de Filtración de 10 KDa.

La FHU < 10 KDa, obtenida en la primera ultrafiltración, se volvió a ultrafiltrar utilizando una membrana de filtración de 1 KDa. La fracción hidrofóbica retenida por esta membrana, cuyo tamaño va entre 10 y 1 KDa, fue obtenida tras lavar y resuspender la membrana en F/2-Si; por otro lado, el ultrafiltrado, que es la fracción que traspasó la membrana de filtración, se denominó, Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU) < 1 KDa. (Figura 8)

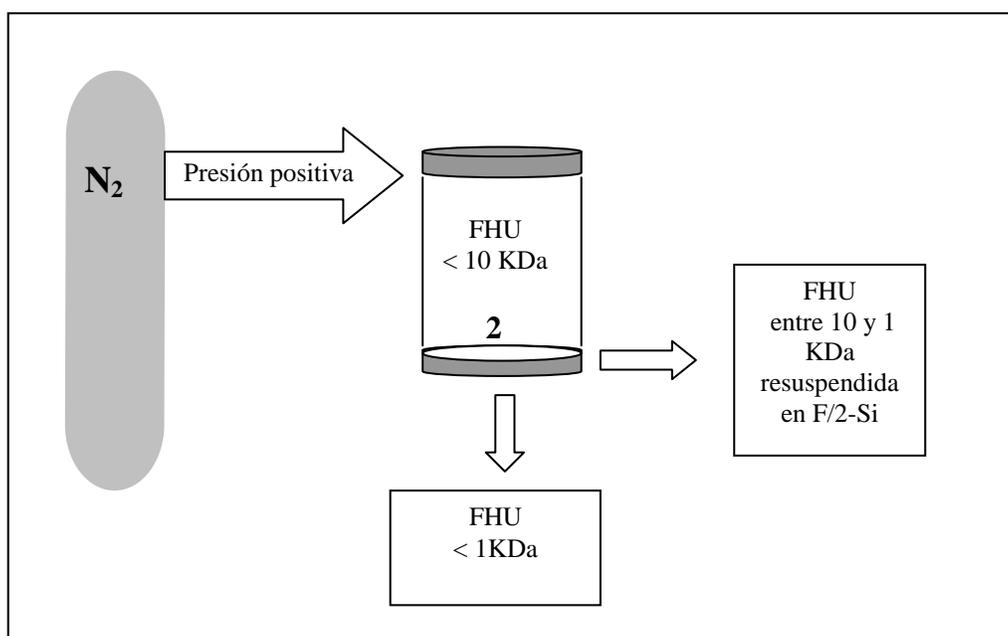


FIGURA 8: Esquema de Ultrafiltración de Fracciones Hidrofóbicas. **2.** Membrana de Filtración de 1 KDa.

7.2.2.5. Medición de la Actividad Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas Ultrafiltradas (FHU).

Las fracciones hidrofóbicas ultrafiltradas (FHU), se ensayaron para medir su efecto alguicida según el método descrito en el punto 7.2.2.3. Se utilizó un cultivo de *A. catenella* cepa ACC01 a una concentración de 15.000 células/ml y fue enfrentado con cada uno de los FHU >10 KDa, entre 10 y 1 KDa y < 1KDa, tal como se describe en el diseño experimental que muestra la Figura 9.

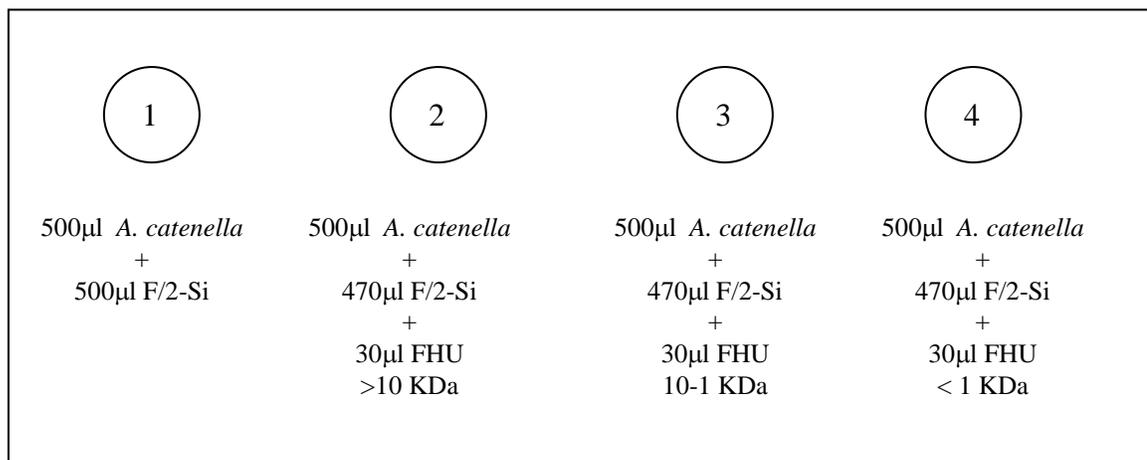


FIGURA 9: Estudio del Efecto Alguicida de Fracciones Hidrofóbicas Ultrafiltradas (FHU) **1.** Control Negativo, *Alexandrium catenella* más F/2-Si; **2.** *Alexandrium catenella* más FHU > 10 KDa; **3.** *Alexandrium catenella* más FHU 10-1 KDa y **4.** *Alexandrium catenella* más FHU < 1 KDa.

7.2.2.6. Determinación de la Concentración de Proteínas de las Distintas fracciones Obtenidas del SFD con Actividad Lítica.

Para la detección y cuantificación de las proteínas presentes en el SFD, se utilizó el Método del Acido Bicinconínico (Smith *et al.*, 1985) que mide concentraciones entre 0 y 10 µg/ml de proteínas en cada muestra; éste consiste en una reacción colorimétrica generada al mezclar Acido Bicinconínico (Solución A) con sulfato cúprico (Solución B) en una relación de volumen 49:1 como reactivo base.

Se usan 900 µl de la solución A+B para cada muestra, más 90 µl de H₂O desionizada, más 10 µl de muestra a determinar proteínas. Para poder medir la concentración de proteínas en cada muestra, se realizó una curva estándar con 900 µl de solución A+B, más concentraciones crecientes de 0 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 80 µl y 100 µl de albúmina sérica bovina (BSA) en concentración de 0,1 mg/ml más cantidades decrecientes de H₂O desionizada de modo de tener 1 ml volumen final por cada punto de la curva.

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 (Figura 10) con la concentración de proteínas conocidas y, sobre la base de esto, se obtuvo la concentración proteica de la muestra según su absorbancia.

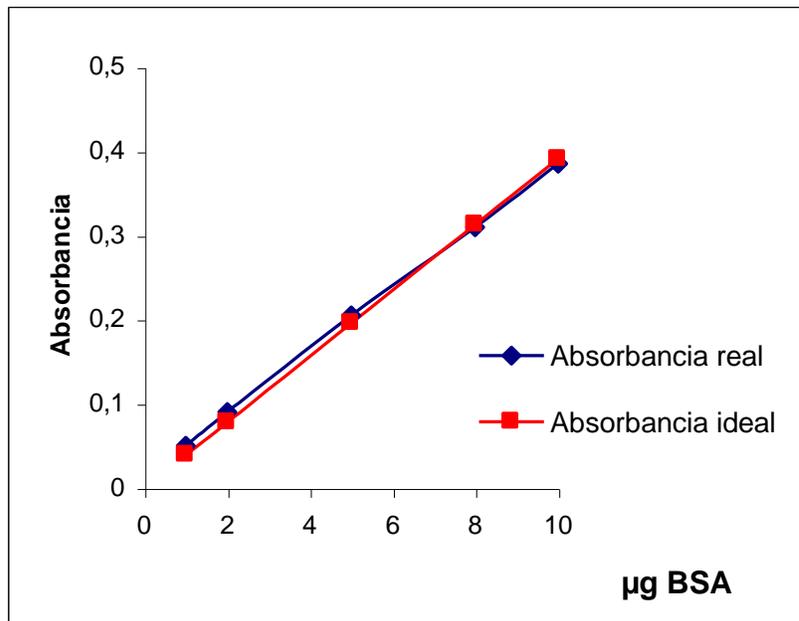


FIGURA 10: Curva Estándar de la Determinación de Proteínas, según Método del Ácido Bicinconínico.

7.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ALGUICIDA.

7.2.3.1. Especificidad del Efecto Alguicida.

Se determinó el efecto alguicida de la misma forma descrita anteriormente (punto 7.2.1.2), reemplazando en cada medición, la cepa *Alexandrium catenella* ACC01 por las cepas *Alexandrium catenella* ACC02 en crecimiento exponencial (20.000 células/mL) y el dinoflagelado no tóxico *Heterocapsa* sp en crecimiento exponencial (40.000 células/mL). (Figura 11).

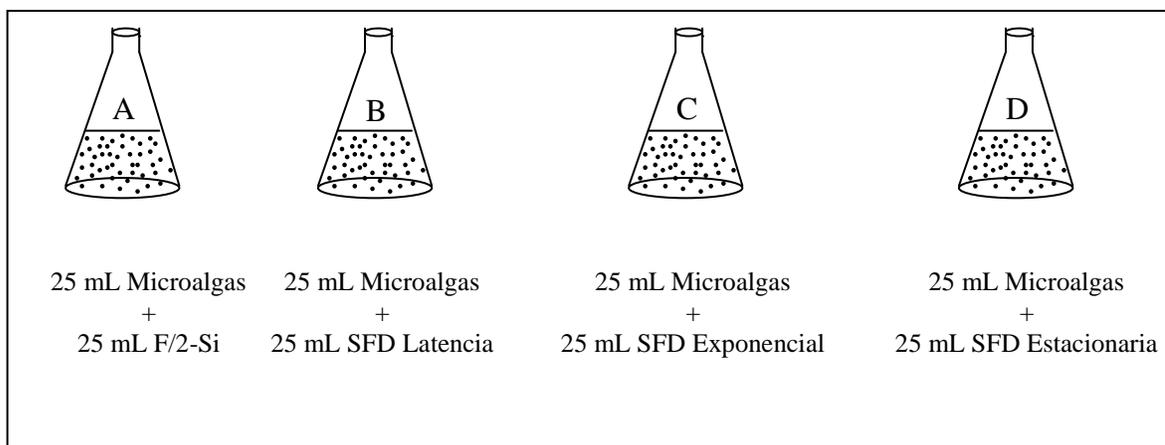


FIGURA 11: Estudio de la Especificidad del Efecto Alguicida **A.** Control Negativo, Microalgas más F/2-Si; **B.** Microalgas más SFD, Fase Latencia; **C.** Microalgas más SFD, Fase Exponencial y **D.** Microalgas más SFD, Fase Estacionaria.

7.2.3.2. Especificidad de la Actividad Alguicida de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU).

La Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU), con actividad alguicida según el punto 7.2.2.5, se enfrentó a un cultivo de *Heterocapsa* sp. (40.000 células/mL) para medir la especificidad del su efecto alguicida, realizándose el mismo método descrito en el punto 7.2.2.3 y con el diseño experimental que muestra la Figura 12.

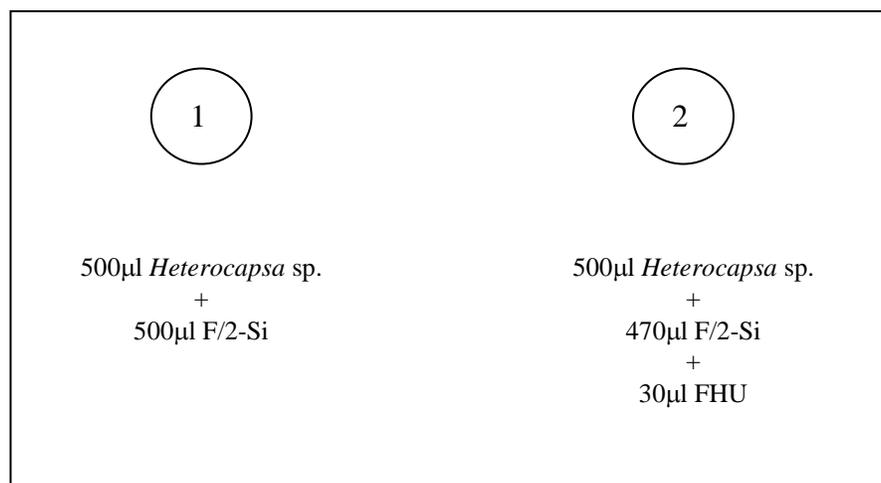


FIGURA 12: Estudio de la Especificidad del Efecto Alguicida de la Fracción Hidrofóbica obtenida por Ultrafiltración **1.** Control Negativo *Heterocapsa* sp. más F/2-Si y **2.** *Heterocapsa* sp. más Fracción Hidrofóbica Ultrafiltrada (FHU).

7.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados que se obtuvieron de los distintos experimentos fueron analizados con el Modelo Estadístico Split Plot o Parcelas Divididas (Gill, 1978).

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

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 , son los distintos tratamientos o efectos de cada uno de los SFD o células bacterianas de cultivos de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre las microalgas en estudio.

$D_{(ij)}$, representa el efecto dentro del tratamiento.

β_k , son los efectos del tiempo o el espacio.

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

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

Para saber dónde se encuentran las diferencias significativas se compararon las medias utilizando el Método de Tuckey (Taucher, 1997).

VIII. RESULTADOS.

8.1. Curva de Crecimiento Bacteriano.

La curva de crecimiento de *Pseudoalteromonas* sp. cepa AMA-02 muestra tres fases; una fase de Latencia que corresponde al crecimiento que se obtiene a 0,13 U Absorbancia en la primera hora de cultivo bacteriano, una segunda fase de crecimiento Exponencial a 0,47 U Absorbancia a las 5 horas de cultivo y una fase final de crecimiento Estacionaria a 0,95 U Absorbancia a las 16 horas de cultivo (Gráfico 1).

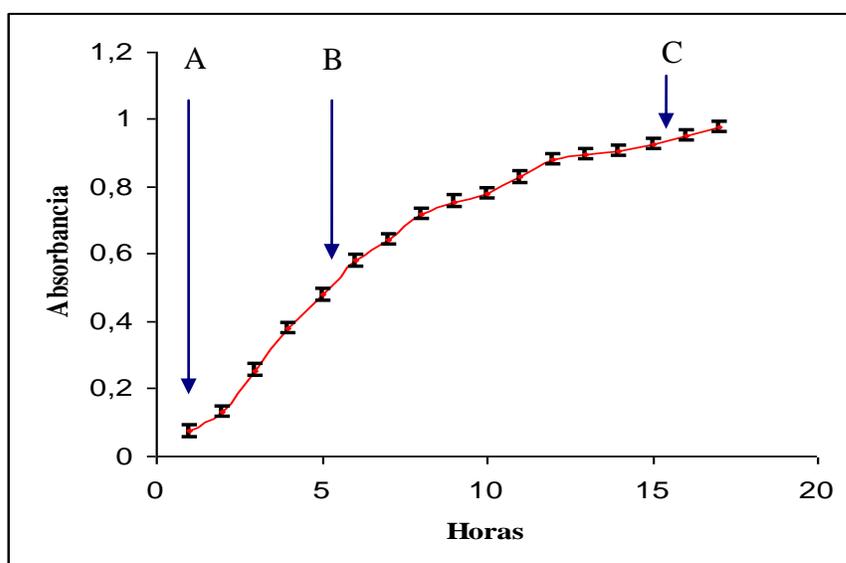


GRAFICO 1: Curva de crecimiento de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02. **A:** Fase de Latencia; **B:** Fase exponencial y **C:** Fase Estacionaria.

El número de bacterias por mL del cultivo bacteriano obtenido para cada fase de la curva de crecimiento, por el método de UFC, correspondió a: $1,5 \times 10^9$ células/mL, para la fase de latencia, a $2,2 \times 10^9$ células/mL para la fase exponencial y a $3,4 \times 10^{12}$ células/mL para la fase estacionaria.

8.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.

8.2.1. Efecto Alguicida Directo.

El Gráfico 2 muestra la sobrevivencia de células de *A. catenella* ACC01, en presencia de células de *Pseudoalteromonas* sp.

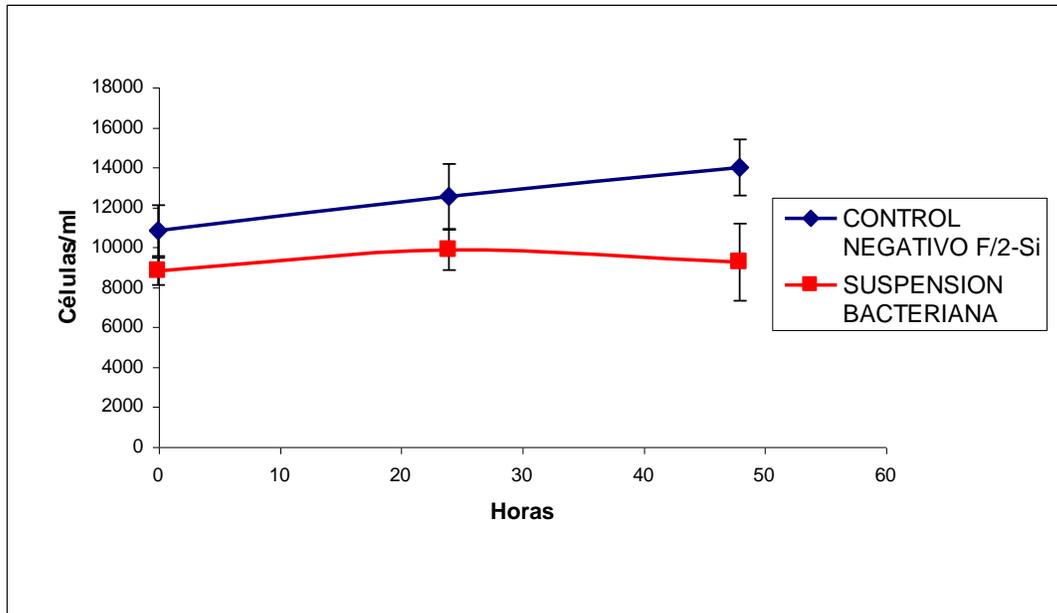


GRAFICO 2: Efecto Alguicida Directo de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01

El control negativo F/2-Si, muestra un crecimiento celular obtenido a las 24 y 48 horas de incubación. El tratamiento con las bacterias, muestra que hay un crecimiento de la microalga levemente menor que el control a las 24 y 48 horas de cultivo; sin embargo, no se observa lisis celular, ni disminución del número de células con respecto al inicio del experimento.

Al realizar el análisis estadístico Split-plot de los resultados, no se encuentra diferencia significativa ($p > 0,01$) entre el crecimiento celular de *A. catenella* enfrentadas a la suspensión bacteriana, con respecto al control negativo F/2-Si durante las primeras 24 y 48 horas de incubación, tal como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de Análisis Estadístico Split-Plot, Efecto Alguicida Directo

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	<i>f</i> observado	<i>f</i> tabular (<i>f</i> > 0,01)
A	1	44733187,6	44733187,6	15,8811048	21,2
D/A	4	11267021,6	2816755,39		
B	2	10829512,1	5414756,06	3,76726495	8,65
AB	2	5933805,44	2966902,72	2,06419431	8,65
ERROR	8	11498540,4	1437317,56		

8.2.2. Efecto Alguicida Indirecto.

El Gráfico 3 muestra el efecto alguicida que ejercen cada uno de los SFD de las distintas etapas de crecimiento bacteriano de *Pseudoalteromonas* sp AMA-02, sobre las células de un cultivo en crecimiento exponencial de *A. catenella* ACC01.

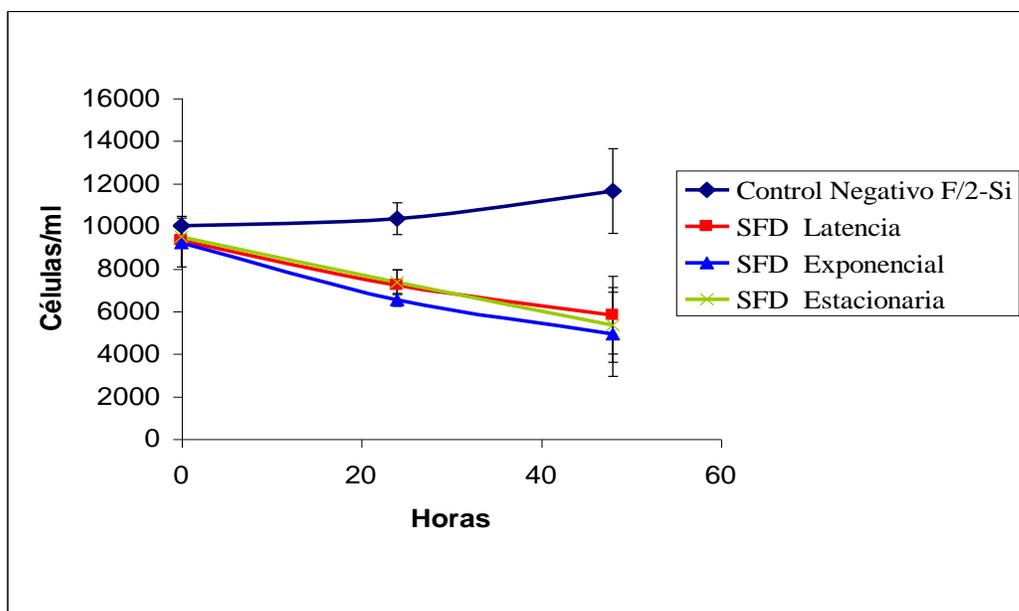


GRAFICO 3: Efecto Alguicida de los SFD de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01

Se observó que el control negativo F/2-Si, mostraba un leve crecimiento celular a las 24 y 48 horas de iniciado el experimento; los matraces que poseían el SFD de cada una de las etapas, mostraron una disminución del número de microalgas a las 24 y 48 horas de cultivo con respecto al tiempo 0.

Al realizar el análisis estadístico Split-plot de los resultados, se determinó que el efecto lítico ejercido por el SFD de cada una de las etapas de crecimiento bacteriano, sobre las células de *A. catenella* ACC01, era estadísticamente significativo ($p > 0,01$), con

respecto al crecimiento observado en el cultivo de microalgas del control negativo F/2-Si, tal como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2: Resumen de Análisis Estadístico Split-Plot, Efecto Alguicida Indirecto.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	f observado	f tabular ($f > 0,01$)
A	3	80952597,6	26984199,2	9,7296813*	7,59
D/A	8	22187118,7	2773389,83		
B	2	41004379,4	20502189,7	25,6261915*	6,23
AB	6	36196449,9	6032741,66	7,54047229*	4,2
ERROR	16	12800772	800048,25		

Debido a ésto se realizó el Método de Tuckey para poder comparar las diferencias entre las medias, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3:Resumen Método de Tuckey.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$S_x = \sqrt{C_{MD}/ni}$
A	3	80952597,6		
D/A	8	22187118,7	2773389,83	961

	q tabular	$S_x q$
Nivel de confianza 5%	4,04	3884
Nivel de confianza 1%	5,63	5413

X_1 = Media Control Negativo F/2-Si.

X_2 = Media SFD Latencia.

X_3 = Media SFD Exponencial.

X_4 = Media SFD Estacionaria.

Tiempo 0: No existen diferencias significativas.

	$X_1 : 10013$	$X_2 : 9302$	$X_3 : 9213$	$X_4 : 9489$
$X_1 : 10013$				
$X_2 : 9302$	711			
$X_3 : 9213$	800	89		
$X_4 : 9489$	524	-187	276	

Tiempo 24: No existen diferencias significativas.

	$X_1 : 10342$	$X_2 : 7217$	$X_3 : 6524$	$X_4 : 7346$
$X_1 : 10342$				
$X_2 : 7217$	-3125			
$X_3 : 6524$	-3818	693		
$X_4 : 7346$	-2996	129	822	

Tiempo 48: Se observaron diferencias significativas entre el control negativo F/2-Si y los distintos SFD de cada una de las fases de crecimiento bacteriano.

	$X_1 : 11639$	$X_2 : 5795$	$X_3 : 4911$	$X_4 : 5346$
$X_1 : 11639$				
$X_2 : 5795$	-5844*			
$X_3 : 4911$	6728*	884		
$X_4 : 5346$	-6292*	-449	435	

*** Nivel de confianza 99%.**

8.2.3. Determinación del Efecto Algucida, a Distintas Diluciones, del SFD.

El Gráfico 4 muestra el efecto algucida del SFD a distintas diluciones en el medio (1:10 y 1:5).

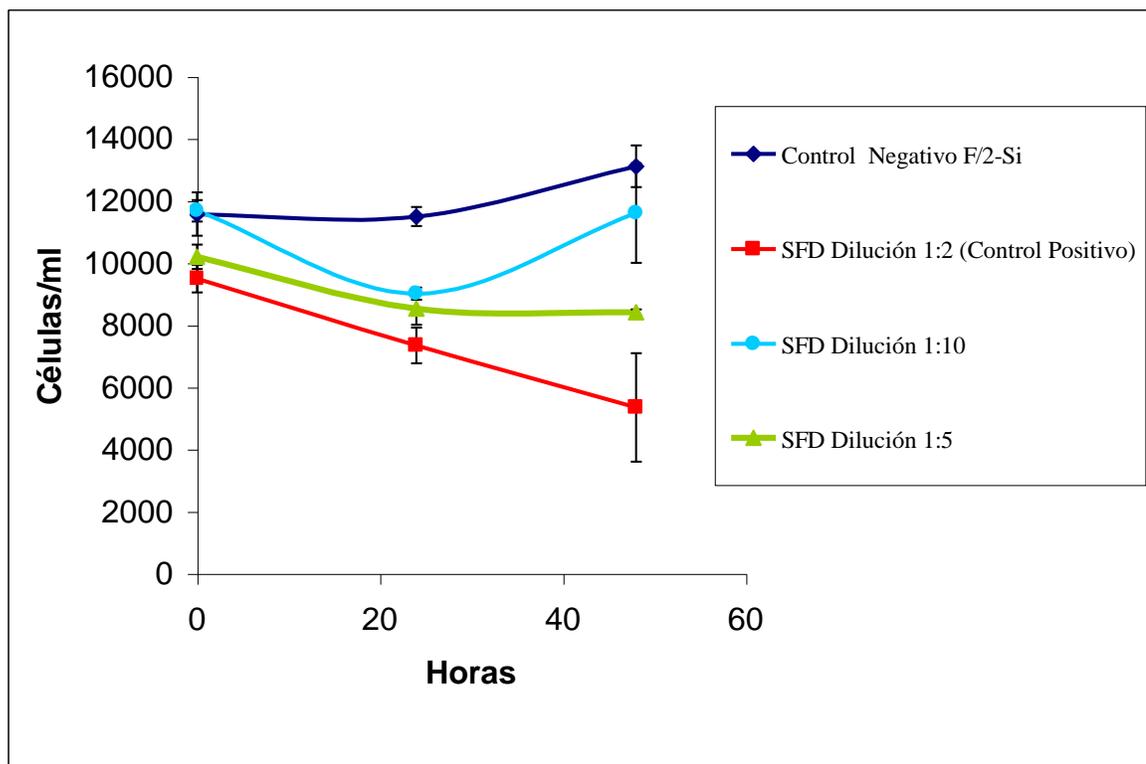


GRAFICO 4: Efecto Algucida del SFD de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 a distintas diluciones sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01

Se puede observar que el control negativo F/2-Si creció a las 24 y 48 horas de cultivo, con respecto al tiempo 0; el control positivo con SFD de la etapa estacionaria (dilución 1:2), disminuyó el número de células en el cultivo en forma sostenida a las 24 y 48 horas de cultivo comparado con el tiempo 0; al diluir el SFD diez veces, se observó una disminución del crecimiento de la microalga a las 24 horas de cultivo con respecto al

tiempo 0, con una recuperación en el crecimiento del cultivo de microalgas al las 48 horas. Al diluir cinco veces el SFD, se observó un menor crecimiento a las 24 horas de cultivo con respecto al tiempo 0, manteniéndose estable el número de células a las 48 horas.

Al realizar el análisis estadístico Split-plot de los resultados (Tabla 4) se observó una diferencia significativa ($p > 0.01$) entre el control negativo F/2-Si, y el control positivo del SFD (dilución 1:2), como también con las diluciones 1:10 y 1:5 del SFD.

Tabla 4: Resumen de Análisis Estadístico Split-Plot, Efecto Alguicida a Distintas Diluciones del SFD.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	<i>f</i> observado	<i>f</i> tabular (<i>f</i> > 0.01)
A	3	111473057,3	37157685,78	36,9240794*	7,59
D/A	8	8050613,333	1006326,667		
B	2	16781158,5	8390579,25	17,8499622*	6,23
AB	6	33777237,5	5629539,583	11,9761778*	4,2
ERROR	16	7520983,333	470061,4583		

Luego se comparó las medias utilizando el método de Tukey, tal como se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen Método de Tuckey.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$S_x = \sqrt{C_{MD}/ni}$
A	3	111473057,3	37157685,78	
D/A	8	8050613,333	1006326,667	579

	<i>q</i> tabular	<i>S_{xq}</i>
Nivel de confianza 5%	4,04	2340
Nivel de confianza 1%	5,63	3261

X_1 = Media Control Negativo F/2.

X_2 = Media SFD Dilución 1:2 (Control Positivo).

X_3 = Media SFD Dilución 1:10.

X_4 = Media SFD Dilución 1:5.

Tiempo 0: No existen diferencias significativas.

	$X_1 : 11569$	$X_2 : 9489$	$X_3 : 11680$	$X_4 : 10195$
$X_1 : 11569$				
$X_2 : 9489$	2079			
$X_3 : 11680$	-111	-2190		
$X_4 : 10195$	1374	-706	-1485	

Tiempo 24: Se observa diferencia significativa ($p > 0,01$) entre el control negativo F/2-Si y el control positivo del SFD (dilución 1:2) y entre el control negativo F/2-Si y la dilución 1: 5 del SFD ($p > 0,05$).

	$X_1 : 11493$	$X_2 : 7346$	$X_3 : 9013$	$X_4 : 8533$
$X_1 : 11493$				
$X_2 : 7346$	-4147*			
$X_3 : 9013$	-2480	-1667		
$X_4 : 8533$	-2960**	1187	-480	

Tiempo 48: Se observa diferencia significativa ($p > 0,01$), entre el control negativo F/2-Si, el control positivo del SFD (dilución 1:2) y la dilución 1:5 del SFD. Por otro lado, se observa una diferencia significativa ($p > 0,01$), entre el control positivo del SFD (dilución 1:2) y la dilución 1:10 del SFD. La dilución 1:5 del SFD presenta diferencia significativa ($p > 0,05$) al ser comparado con control positivo del SFD (dilución 1:2) y la dilución 1:10 del SFD.

	X₁ : 13111	X₂ : 5346	X₃ : 11604	X₄ : 8408
X₁ : 13111				
X₂ : 5346		-7765*		
X₃ : 11604	1507		-6258*	
X₄ : 8408	-4703*	3062**		-3196**

*** Nivel de confianza 99%.**

****Nivel de confianza 95%.**

8.3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ALGUICIDA.

8.3.1. Detección de las Actividades Enzimáticas Presentes en Cultivos de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02.

La Tabla 6 muestra las diferentes actividades enzimáticas asociadas a las células de *Pseudoalteromonas* sp. y las actividades enzimáticas extracelulares (exoenzimas) presentes en el SFD de cada una de sus fases de crecimiento bacteriano.

Dentro de las actividades asociadas a las células, se encontraron las enzimas: Fosfatasa Alcalina, Esterasa, Esterasa Lipasa, Leucina Arilamidasas, Valina Arilamidasas, Cistina Arilamidasas, Tripsina, Fosfatasa Ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. Por otro lado, las actividades enzimáticas presentes en los SFD de cada una de las fases de crecimiento bacteriano correspondieron a: Fosfatasa Alcalina, Esterasa, Esterasa Lipasa, Leucina Arilamidasas, Fosfatasa Ácida y Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.

Tabla 6: Actividades Enzimáticas Asociadas a Células de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 y a los SFD de las Distintas Etapas de Crecimiento Bacteriano.

Actividad Enzimática	Asociada a Células	Exoenzimas		
		SFD	SFD	SFD
		Latencia	Exponencial	Estacionaria
Control	0	0	0	0
Fosfatasa Alcalina	5	4	5	5
Esterasa	1	1	2	2
Esterasa Lipasa	2	0	1	2
Lipasa	0	0	0	0
Leucina Arilamidasa	4	0	1	2
Valina Arilamidasa	4	0	0	0
Cistina Arilamidasa	1	0	0	0
Tripsina	1	0	0	0
α -quimiotripsina	0	0	0	0
Fosfatasa ácida	5	1	2	4
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	4	1	2	4
α -galactosidasa	0	0	0	0
β -galactosidasa	0	0	0	0
β -glucuronidasa	0	0	0	0
α -glucosidasa	0	0	0	0
β -glucosidasa	0	0	0	0
N-acetil- β -glucosaminidasa	4	0	0	0
α manosidasa	0	0	0	0
α frucosidasa	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.

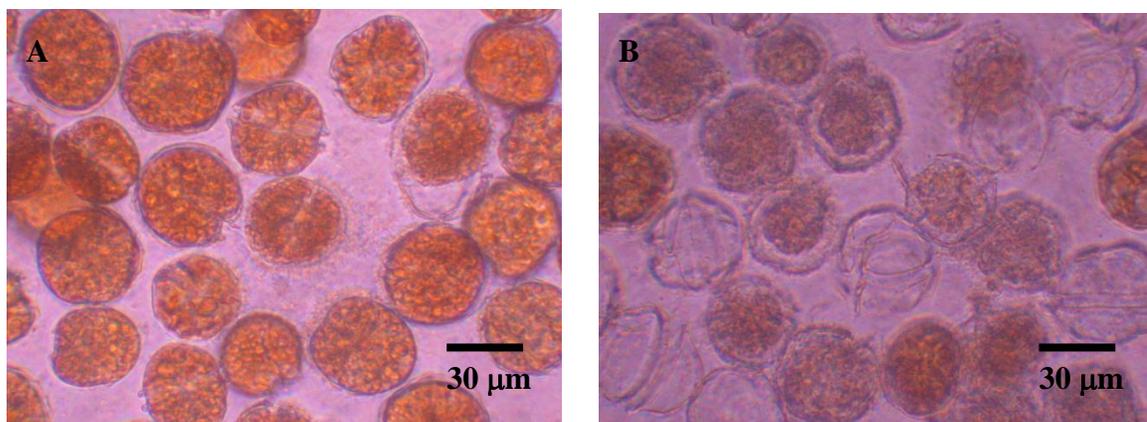
8.3.2. Fraccionamiento Hidrofóbico del SFD de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02.

Al pasar 200 mL de SFD de la etapa estacionaria de *Pseudoalteromonas* sp AMA-02, por la columna que contenía 6 mL de Phenyl Sepharosa, se obtuvo unos 200 mL de fracción no hidrofóbica y seis fracciones eluidas de la columna, de 4 ml de cada una y denominadas fracciones hidrofóbicas 0,7M; 0,5M; 0,3M; 0,15M; 0,075M y 0M NaCl.

8.3.3. Medición de la Actividad Algucida Presente en las Fracciones Obtenidas por HIC.

Al enfrentar las diferentes fracciones hidrofóbicas y no hidrofóbicas del SFD obtenidas por el Método HIC, a células de *A. catenella* ACC01 en crecimiento exponencial, se observó que en el control negativo F/2-Si, las microalgas nadaban con gran vitalidad tanto a los 30 primeros minutos como a las 24 y 48 horas de incubación. Las fracciones no hidrofóbicas y los controles de los Buffer TRIS-EDTA 0M y 3M NaCl presentaron un patrón similar al del control negativo F/2-Si, a lo largo del tiempo. La fracción hidrofóbica 0,7M presentó a los 30 minutos de incubación aproximadamente un 90% de microalgas muertas, las que se observaron inmóviles y precipitadas en el fondo del pocillo; a las 24 y 48 horas de incubación se observó destrucción celular de las microalgas muertas (Fotografía 5). La fracción hidrofóbica 0,5M, presentó a los 30 minutos de incubación aproximadamente 75% de microalgas muertas, a las 24 y 48 horas también se observó destrucción celular. La fracción hidrofóbica 0,3M, presentó aproximadamente 50% de microalgas muertas a los 30 minutos de incubación; al igual que en los casos anteriores, a las 24 y 48 horas se observó destrucción celular. Las fracciones hidrofóbicas

0,075M; 0,15M y 0M no presentaron mortalidad a ningún tiempo, presentando así un patrón similar al control negativo F/2-Si.



Fotografía 5. Efecto Alguicida de la Fracción Hidrofóbica 0,7M, sobre *Alexandrium catenella*. **A:** Microalgas Muertas, inmóviles y precipitadas en el fondo del pocillo a los 30 minutos de incubación. **B:** Microalgas destruidas por acción lítica, a las 24 horas de incubación.

8.3.4. Ultrafiltración de las Fracciones Hidrofóbicas con Actividad Lítica.

Las fracciones hidrofóbicas 0,7M; 0,5M y 0,3M, que presentaron actividad alguicida, se juntaron y pasaron por cámara de ultrafiltración AMICON®, obteniéndose una FHU > 10 KDa, una FHU entre 10 y 1 KDa y una FHU < 1 KDa.

8.3.5. Medición de la Actividad Alguicida de las Fracciones Hidrofóbicas Ultrafiltradas (FHU).

Se enfrentó cultivos de *A. catenella* cepa ACC01, con las tres fracciones hidrofóbicas ultrafiltradas (FHU).

En el control negativo F/2-Si se observó gran vitalidad de las microalgas, tanto a los 30 minutos como a las 24 y 48 horas de incubación. La FHU > 10 KDa y la FHU entre 10

y 1 KDa, presentaron un patrón similar al control negativo F/2-Si. En la FHU < 1 KDa, se observó una mortalidad aproximadamente 90% de microalgas inmóviles y precipitadas en el fondo del pocillo a los 30 minutos de incubación; luego a las 24 y 48 horas se observó lisis celular de las microalgas muertas.

8.3.6. Determinación de la Concentración de Proteínas de las Distintas fracciones del SFD con Actividad Lítica.

Por Método del Acido Bicinconínico, se determinó la concentración de proteínas de las distintas muestras que produjeron efecto alguicida (Tabla 7).

TABLA 7. Determinación de la Concentración de Proteínas, Método del Ácido Bicinconínico.

MUESTRAS	Concentración de Proteínas (µg/mL)
SFD Fase Latencia	7,3
SFD Fase Exponencial	6,1
SFD Fase Estacionaria	3,7
Fracción Hidrofóbica 0,7M	3,6
Fracción Hidrofóbica 0,5M	3,9
Fracción Hidrofóbica 0,3M	6,3
Fracción no Hidrofóbica	1,8
FHU < 1 KDa	0,5
Buffer TRIS-EDTA 0M NaCl	0
Buffer TRIS-EDTA3M NaCl	0

8.4. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL EFECTO ALGUICIDA.

8.4.1. Efecto Alguicida del SFD sobre cultivos de *Alexandrium catenella* cepa ACC02:

Se enfrentaron los SFD de un cultivo de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, con cultivos de *A. catenella* cepa ACC02, y se procedió según la metodología descrita.

Como se observa en el Gráfico 5, al igual que con el clon ACC01 de *A. catenella* el SFD muestra poder alguicida sobre cultivos del clon ACC02; sin embargo, se observan diferencias respecto al efecto del SFD de la fase estacionaria del cultivo bacteriano, debido a que la disminución del crecimiento de la microalga a las 48 horas es menos acentuada.

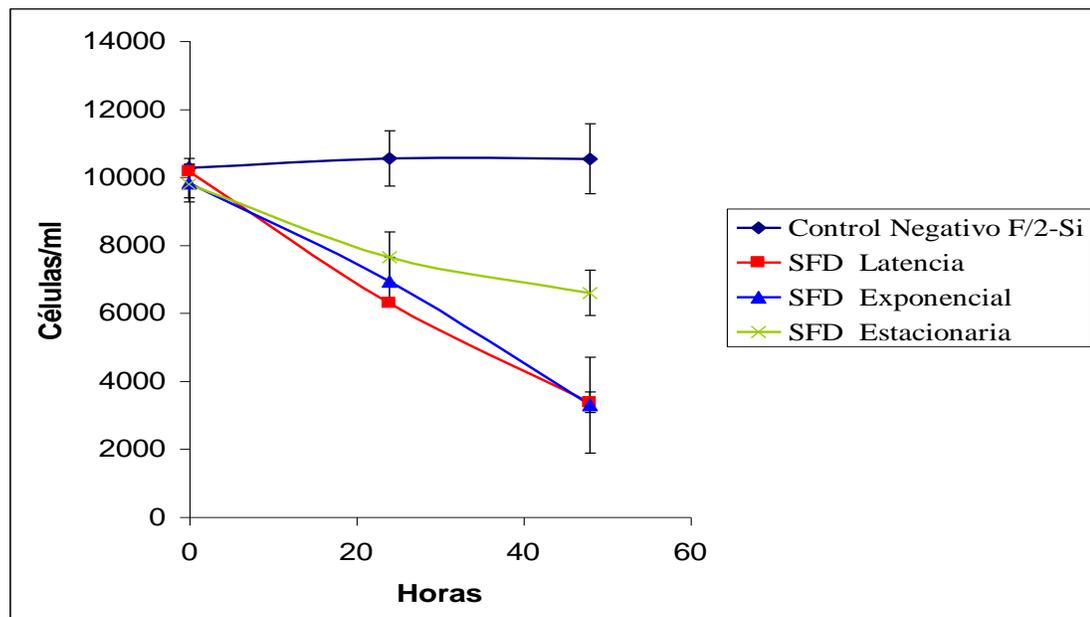


GRAFICO 5: Efecto Alguicida de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC02

Estos resultados analizados con el Método Split-Plot, con un nivel de confianza del 99% ($p > 0,01$), dan diferencias significativas entre el control negativo F/2-Si y los SFD de

las distintas etapas de crecimiento bacteriano, tal como se describe en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de Análisis Estadístico Split-Plot, Especificidad del Efecto Alguicida (*A. catenella* ACC02).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	<i>f</i> observado	<i>f</i> tabular (<i>f</i> > 0.01)
A	3	87158979,64	29052993,21	53,89438293*	7,59
D/A	8	4312582	539072,75		
B	2	99195558,39	49597779,19	105,1990211*	6,23
AB	6	50648911,61	8441485,269	17,90475301*	4,2
ERROR	16	7543458,667	471466,1667		

La evaluación de las diferencias significativas con el Método de Tuckey, se detalla en la Tabla 9.

Tabla 9: Resumen Método de Tuckey.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$S_x = \sqrt{C_{M/D}/n_i}$
A	3	87158979,64	29052993,21	
D/A	8	4312582	539072,75	424

	<i>q</i> tabular	$S_x q$
Nivel de confianza 5%	4,04	1713
Nivel de confianza 1%	5,63	2387

X_1 = Media Control Negativo F/2-Si.

X_2 = Media SFD Latencia.

X_3 = Media SFD Exponencial.

X_4 = Media SFD Estacionaria.

Tiempo 0: No se observan diferencias significativas.

	X_1 : 10271	X_2 : 10151	X_3 : 9813	X_4 : 9773
X_1 : 10271				
X_2 : 10151	120			
X_3 : 9813	458	338		
X_4 : 9713	497	377	-40	

Tiempo 24: Se observan diferencias significativas entre el control negativo F/2-Si y los SFD de las etapas de latencia, exponencial y estacionaria.

	X_1 : 10537	X_2 : 6289	X_3 : 6919	X_4 : 7631
X_1 : 10537				
X_2 : 6289	-4249*			
X_3 : 6919	-3618*	-631		
X_4 : 7631	-2907*	1342	711	

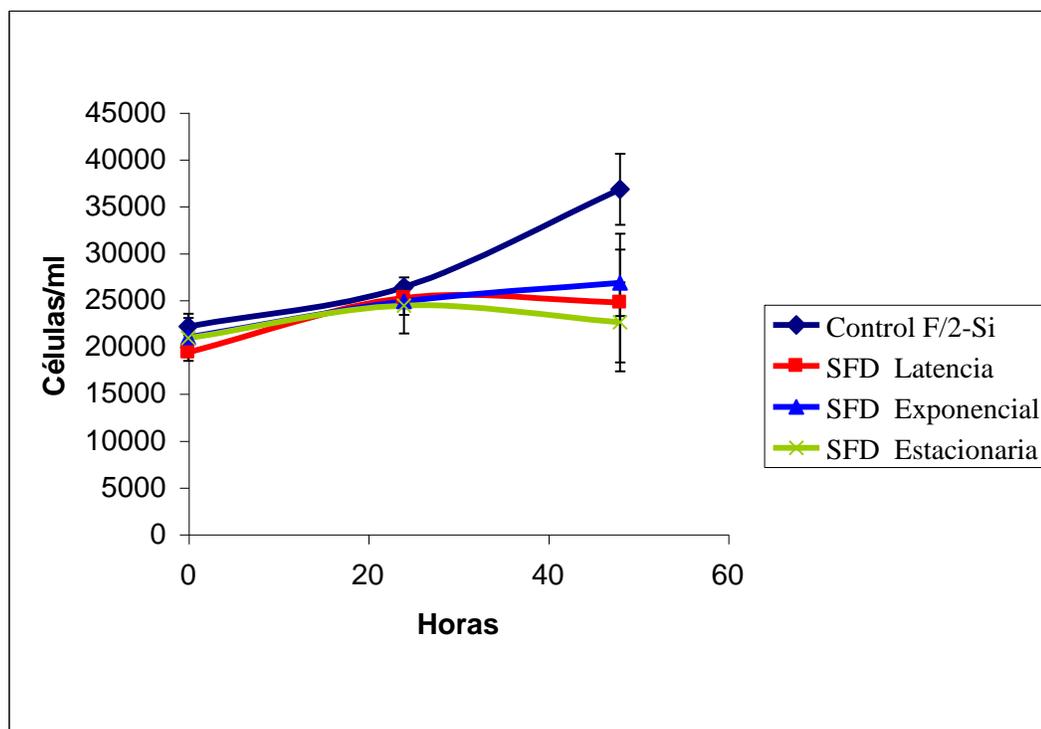
Tiempo 48: Se observan diferencias significativas entre el control negativo F/2-Si y los SFD de las etapas de latencia, exponencial y estacionaria; además, existen diferencias significativas entre el SFD fase estacionaria respecto a los SFD fase de latencia y exponencial.

	X₁ : 10529	X₂ : 3360	X₃ : 3284	X₄ : 6582
X₁ : 10529				
X₂ : 3360	-7169*			
X₃ : 3284	7245*	76		
X₄ : 6582	-3947*	3222*	3298*	

*** Nivel de confianza 99%.**

8.4.2. Efecto Algucida del SFD sobre cultivos de *Heterocapsa* sp. cepa SGM01:

El Gráfico 6 muestra el efecto de los SFD de cada uno de las etapas de crecimiento de un cultivo líquido de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, sobre el dinoflagelado *Heterocapsa* sp. SGM01. Se aprecia que a las 24 horas de cultivo, no hay diferencias entre el control negativo F/2-Si y los diferentes SFD de cada una de las etapas de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria); sin embargo, a las 48 horas de cultivo se observa una disminución en el crecimiento de la microalga.



GRFICO 6: Efecto Algucida de *Pseudoalteromonas* sp. sobre *Heterocapsa* sp.

Al aplicar el Método estadístico Split-Plot, se encontraron diferencias significativas entre los distintos cultivos para un 99% de confianza ($p > 0,01$) (Tabla 10).

Tabla 10: Resumen de Análisis Estadístico Split-Plot, Especificidad del Efecto

Alguicida (*Heterocapsa* sp.).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	<i>f</i> observado	<i>f</i> tabular (<i>f</i> > 0.01)
A	3	188815539,2	62938513,06	9,949879238*	7,59
D/A	8	50604443,78	6325555,472		
B	2	290075245,1	145037622,5	12,14260637*	6,23
AB	6	185075432,7	30845905,45	2,582431245	4,2
ERROR	16	191112343,6	11944521,47		

La comparación de las distintas medias con el Metodo Tuckey, se describe en la Tabla 11.

Tabla 11: Resumen Método de Tuckey.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$S_x = \sqrt{CMD/ni}$
A	3	188815539,2	62938513,06	
D/A	8	50604443,78	6325555,472	1452

	<i>q</i> tabular	$S_x q$
Nivel de confianza 5%	4,04	5866
Nivel de confianza 1%	5,63	8175

X_1 = Media Control negativo F/2-Si.

X_2 = Media SFD Latencia.

X_3 = Media SFD Exponencial.

X_4 = Media SFD Estacionaria.

Tiempo 0: No existen diferencias significativas.

	X_1 : 22137	X_2 : 19386	X_3 : 20991	X_4 : 20917
X_1 : 22137				
X_2 : 19386	2751			
X_3 : 20991	1147	-1604		
X_4 : 20997	1220	-1531	-73	

Tiempo 24: No existen diferencias significativas.

	X_1 : 26373	X_2 : 25222	X_3 : 24848	X_4 : 24382
X_1 : 26373				
X_2 : 25222	-1152			
X_3 : 24848	-1525	373		
X_4 : 24382	-1991	-840	-466	

Tiempo 48: Se observó diferencias significativas entre el control negativo F/2-Si y los SFD de las fases: latencia, exponencial y estacionaria.

	X_1 : 36800	X_2 : 24715	X_3 : 26822	X_4 : 22586
X_1 : 36800				
X_2 : 24715	-12085*			
X_3 : 26822	9978*	-2107		
X_4 : 22586	-14214*	-2129	-4236	

*** Nivel de confianza 99%.**

8.4.3. Medición de la Especificidad de la Actividad Alguicida de la Fracción Hidrofóbica Ultrafiltradas (FHU).

Debido a que la FHU < 1 KDa presentó efecto alguicida, se enfrentó a un cultivo de *Heterocapsa* sp. El control negativo F/2-Si, se observó con gran vitalidad y movilidad de las microalgas tanto a los 30 minutos como a las 24 y 48 horas de incubación. Por otro lado, la FHU < 1 KDa produjo un 75% aproximadamente, de microalgas muertas e inmóviles, precipitadas en el fondo del pocillo a los 30 minutos de incubación, a las 24 y 48 horas dicha mortalidad se mantuvo, sin embargo, no se observó lisis celular, permaneciendo intactas las microalgas en el tiempo.

IX. DISCUSION.

Durante los últimos años, distintos autores han estudiado el rol que las bacterias marinas, asociadas a microalgas, juegan en la dinámica de las Floraciones de Algas Nocivas (FAN) o Mareas Rojas. Los mecanismos por los cuales se desarrollan estas interacciones es aún discutido. Por otro lado, no está claro el posible grado de especificidad que pueda existir en esta asociación, ni la influencia que las bacterias puedan tener en la toxicidad atribuidas a microalgas.

En Chile, en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se han aislado e identificado las bacterias marinas: *Cytophaga* sp. AMA-01, *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 y *Ruegeria atlantica* AMA-03, tres cepas bacterianas fuertemente asociadas a los cultivos de la microalga tóxica *Alexandrium catenella* ACC01 (Amaro *et al.*, 2005).

Autores como Lovejoy *et al.*, (1998), Kato *et al.*, (1998), Holmström y Kjelleberg., (1999), Lee *et al.*, (2000), Hoffman y Decho., (2000), Lee *et al.*, (2002) e Ivanova *et al.*, (2003), describieron que bacterias del Género *Pseudoalteromonas* asociadas a microalgas, producen distintos compuestos biológicamente activos, los cuales podrían estar relacionados con el efecto alguicida descrito para las bacterias de este Género.

La bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. cepa AMA-02, identificada en el país en 2002, al ser cultivada en forma aislada de la microalga y bajo condiciones ricas en nutrientes orgánicos, se comprobó que era capaz de producir un efecto lítico en cultivos de *A. catenella*. Dicho efecto sólo se evidenció cuando la bacteria creció, separada del alga, en un medio de cultivo suplementado con Bactopectona (F/2-Si más 0,25% Bactopectona).

Para determinar si el efecto alguicida producido por esta bacteria es por contacto directo o por efecto indirecto, se determinó la curva normal de crecimiento bacteriano en el medio suplementado con Bactopectona. La identificación de las distintas fases de crecimiento (Gráfico 1), permitieron establecer el número de bacterias presentes en ellas.

Al probar el efecto directo, ejercido por la bacteria *Pseudoalteromonas* sp AMA-02 sobre un cultivo de *Alexandrium catenella* ACC01, no se encontró actividad alguicida (Gráfico 2); en tanto que, los sobrenadantes filtrados y dializados (SFD), de cada una de las fases de crecimiento bacteriano sí lo manifestaron (Gráfico 3), por lo que el efecto alguicida evidenciado en este caso es de tipo indirecto, coincidiendo con lo postulado por Doucette *et al.*, (1998) y Lovejoy *et al.*, (1998), quienes estudiaron otras interacciones Alga-Bacteria.

Esta experiencia demostró actividad alguicida en los SFD de las tres etapas de crecimiento bacteriano, situación no dilucidada anteriormente, ya que sólo señala el empleo de cultivos en fase estacionaria. Para conocer la potencia de dicho efecto, se eligió el SFD de la fase estacionaria, el que se enfrentó, en diferentes concentraciones, ante un cultivo de *Alexandrium catenella*. Como se aprecia en el Gráfico 4, el mayor efecto se presentó en el SFD (Dilución 1:2), en una relación de volumen 1:1 (volumen SFD/ volumen cultivo de *A. catenella*). Este efecto, disminuyó en la medida que la dilución del SFD en el medio fue mayor, observándose incluso recuperación en el cultivo de microalga luego de 48 horas de incubación cuando la dilución del SFD en el medio fue de 1:10. Debido a que el período total de observación fue hasta las 48 horas, no se puede concluir si el efecto de la otras diluciones empleadas permitiría también la recuperación de la microalga pasado dicho

tiempo.

Respecto a la caracterización de el o los factores involucrados en la actividad alguicida, se concluye que corresponde a un componente de características hidrofóbicas que va acompañado de actividades enzimáticas, las que se muestra en la Tabla 6. Las actividades enzimáticas: Fosfatasa Alcalina, Esterasa, Fosfatasa Acida y Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa se encontraron tanto asociadas a la célula, posiblemente unidas a la membrana celular de *Pseudoalteromonas* sp., como en el SFD de todas las etapas del cultivo bacteriano (exo-enzimas que se liberan al medio). Las enzimas Esterasa Lipasa y Lecina Arilamidasa, se identificaron asociadas a células y en los SFD de la etapa exponencial y estacionaria, y por ultimo las enzimas: Valina Arilamidasa, Cistina Arilamidasa, Tripsina y N-acetil- β -glucosaminidasa, sólo se detectaron asociadas a las células. Este resultado nos orienta a que tanto en la bacteria como en su entorno existen variadas actividades enzimáticas, que podrían estar asociadas a estructuras celulares, que poseen capacidad de romper enlaces y degradar distintos sustratos, los cuales posiblemente serían usados por la bacteria como fuente nutritiva.

Al analizar las actividades enzimáticas presentes en los SFD de cada una de las etapas de crecimiento bacteriano, se observó que a medida que el cultivo bacteriano fue creciendo y por lo tanto, acercándose a una fase estacionaria, nuevas actividades enzimáticas fueron apareciendo en número y cantidad. Por otro lado, se evidencia una relación entre las actividades enzimáticas asociadas a bacterias, con las del SFD, ya que no existe ninguna enzima presente en los SFD que no se encuentre dentro de las actividades asociadas a las bacterias.

El fraccionamiento hidrofóbico del SFD, obtenido por medio de una elución salina de una columna de Phenyl Sepharosa, permitió obtener seis fracciones hidrofóbicas llamadas 0,7 M; 0,5 M; 0,3 M; 0,15 M; 0,075 M y 0 M, según la concentración de sal a la cual se eluyeron. El análisis de estas diferentes fracciones, nos permitió observar que el poder alguicida se mantiene presente en las fracciones 0,7 M; 0,5 M y 0,3 M, a diferencia del resto de fracciones hidrofóbicas y no hidrofóbica que no presentaron efecto alguicida, ésto evidencia que el o los factores alguicidas, poseen características hidrofóbicas, ya que son retenidas en la columna y, por otro lado, tienen un carácter proteico, debido a que reaccionan de forma positiva con el reactivo del Acido Bicinconínico (Tabla 7).

Paralelamente, y con el fin de complementar estos resultados, se realizó durante la investigación una Electroforesis Unidimensional, bajo condiciones desnaturantes SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 15% (Laemli, 1970), de las distintas fracciones hidrofóbicas obtenidas por HIC, observándose que no existían diferencias entre los patrones electroforéticos de las fracciones hidrofóbicas que presentaron efecto alguicida, con las que no presentaron.

Las fracciones hidrofóbicas con efecto alguicida al ser ultrafiltradas y enfrentadas a cultivos de microalgas, mostraron que sólo la FHU < 1 KDa era capaz de inmovilizar a las microalgas y promover un efecto lítico después de 24 horas de incubación; ésto nos induce a pensar que el o los factores alguicidas pueden corresponder a moléculas de bajo peso molecular, con características hidrofóbicas y proteicas.

Si el efecto alguicida está asociado a un compuesto menor a 1 KDa, como se describió anteriormente, llama la atención que no desapareciera con la diálisis al emplear

una membrana de 10 KDa; pensamos que el factor alguicida sólo puede haberse retenido si estuviera unido a una molécula de mayor tamaño y que al momento de interactuar con la resina de Phenyl Sepharosa del fraccionamiento hidrofóbico, lo más probable es que el factor alguicida se haya separado de la proteína a la cual se encontraría asociada. Esto último nos permitiría explicar por qué el SFD, mantuvo su poder alguicida aún después de la diálisis.

En cuanto a la especificidad del efecto alguicida que ejerce *Pseudoalteromonas* sp. sobre la especie *Alexandrium catenella*, probada sobre otra cepa de la misma especie (*Alexandrium catenella* ACC02) y otra especie como es el dinoflagelado no tóxico *Heterocapsa* sp. SGM01 perteneciente al Phylum *Pyrrophyceae*, se comprobó que al enfrentar los SFD de las distintas fases de crecimiento bacteriano con la cepa ACC02, se producía un efecto similar a lo observado con la cepa ACC01 (Gráfico 5). Sobre *Heterocapsa* sp. se encontró diferencias; es así como a las 24 horas no se inhibió el cultivo de la microalga; sin embargo, a las 48 horas de incubación, pese a que se observó crecimiento algal, éste fue ligero (Gráfico 6). Con esto se concluye que existe efecto alguicida específico para la especie, no así con claridad sobre la otra especie algal.

Por otro lado, al ser enfrentado un cultivo de *Heterocapsa* sp. con la FHU < 1 KDa (Punto 8.4.3), la cual estaba concentrada alrededor de 20 veces, se observó aproximadamente un 75% de microalgas inmóviles y muertas en el fondo del pocillo; sin embargo, “no se evidenciaron signos de lisis celular”, lo que se contrapone a lo observado con *A. catenella*. Con estos antecedentes no es posible determinar aún el real grado de especificidad que podría existir entre *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 y *Heterocapsa* sp.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, el o los factores promotores de la actividad alguicida poseen un tamaño < 1 KDa, los cuales producen inmovilidad de las microalgas, e inducen su muerte celular.

La lisis de la microalga observada a las 24 y 48 horas de incubación, estaría relacionada con la presencia de enzimas hidrolíticas, detectadas tanto en la célula bacteriana como en su entorno (Tabla 6), con capacidad de degradar distintos componentes estructurales de la teca y de la membrana celular. Estas actividades podrían ser aportadas por las bacterias normalmente asociadas al cultivo de *A. catenella*, dado a que se trabajó con un cultivo no axénico.

Con estos antecedentes, se podría postular un Modelo para el Efecto Alguicida ejercido por *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01, que complementarí­a al Modelo de Interacción Alga-Bacteria planteado por Doucette *et al.*, (1999). En dicho modelo, los autores plantean cuatro etapas para el desarrollo de una FAN; Inicio, Desarrollo, Mantenimiento y Término, en que las bacterias interactúan con las microalgas apreciándose que en un inicio, crecen lentamente como respuesta al incremento de nutrientes proporcionados por las microalgas; luego se produce un feedback entre ambos, para finalmente llegar a una etapa en la cual el crecimiento comienza a declinar y, es en ese momento, en que los restos de las primeras microalgas muertas inducen la liberación, por parte de la bacteria, de un factor alguicida que sería capaz de asociarse a la teca de la microalga, produciendo inmovilidad y muerte celular. Posteriormente, la lisis celular se produciría por medio de las enzimas hidrolíticas liberadas por las bacterias libres en el medio y por aquellas provenientes de las microalgas muertas, tal como se describe en

la figura 10.

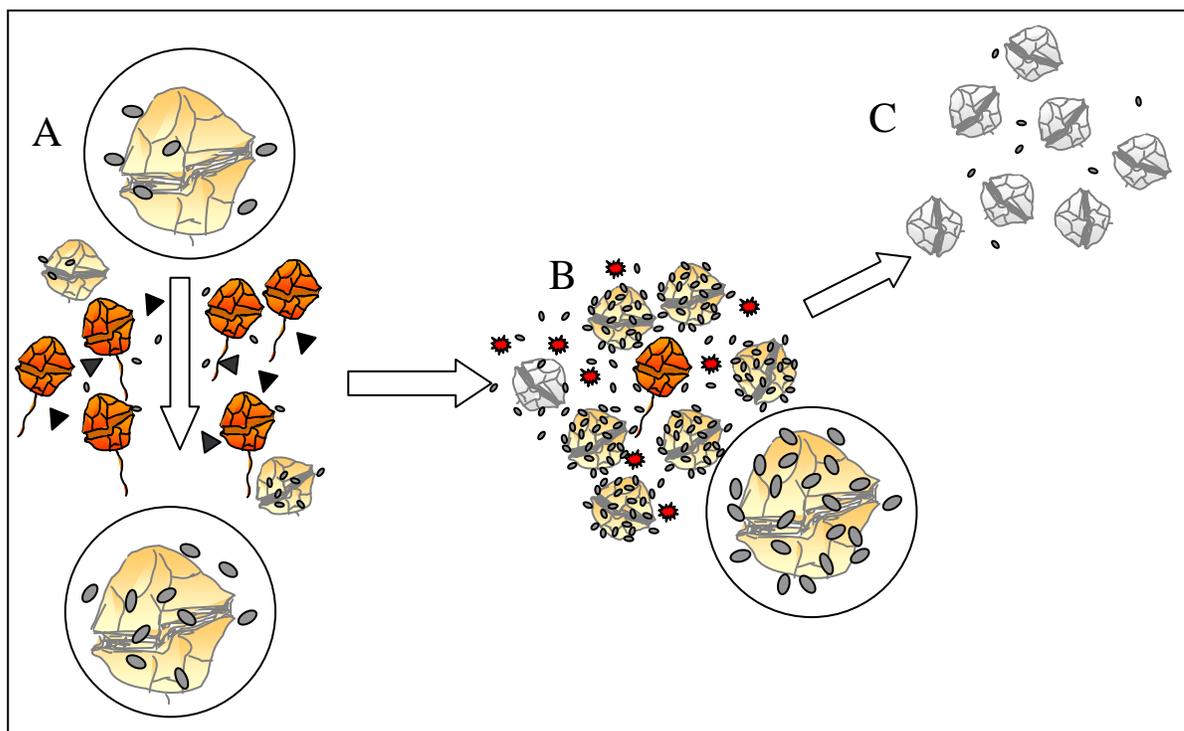
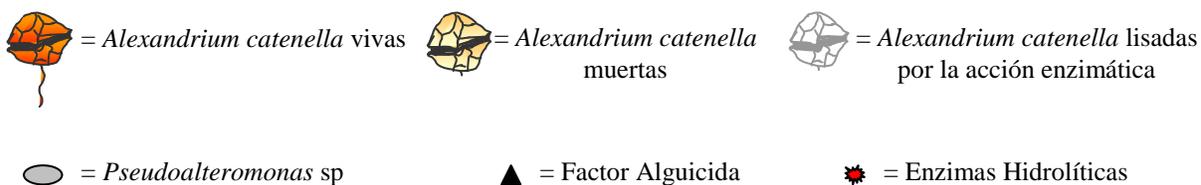


FIGURA 10: Modelo del Efecto Alguicida que ejerce *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01, durante la fase de término de un crecimiento algal (condiciones de laboratorio) o de una FAN. **A.** Liberación del factor alguicida y aumento del número de bacterias; **B.** Muerte celular inducida por el factor alguicida y liberación de enzimas hidrolíticas; **C.** Lisis celular inducida por enzimas hidrolíticas bacterianas.



Es importante destacar el hecho de que la FHU < 1 KDa, fue capaz de producir muerte celular, pero no la lisis de la microalga *Heterocapsa* sp. Esto se explicaría por la posible ausencia de enzimas hidrolíticas que en el caso de *A. catenella* son aportadas por las bacterias específicas de esta microalga. El desconocimiento que se tiene de la existencia de bacterias asociadas a cultivos de *Heterocapsa* sp. y de sus posibles propiedades hidrolíticas, no nos permite explicar el grado de especificidad para esta microalga, de el o los factores involucrados en este proceso. Por esta razón, la actividad alguicida ejercida por bacterias sobre microalgas es un fenómeno que reviste una compleja red de eventos y circunstancias específicas dentro de la ecología marina.

A futuro, esta interrogante podría ser resuelta; sin embargo, para ello habría que tomar en cuenta todas las posibles variantes que existen y que son capaces de producir actividad alguicida.

X. CONCLUSIONES.

La bacteria marina *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, ejerce un efecto alguicida de tipo indirecto sobre el dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* cepa ACC01.

La actividad alguicida que ejerce la bacteria se observa en las distintas etapas del crecimiento bacteriano.

La magnitud del efecto, tiene que ver con la concentración de el o los factores alguicidas presentes en el medio.

La actividad alguicida ejercida por *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, posee un grado de especificidad sobre el género *Alexandrium catenella*, ya que afecta tanto a la cepa ACC01 como a la cepa ACC02.

Tanto *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02 como sus sobrenadantes filtrados y dializados de las distintas etapas del crecimiento, presentan actividades enzimáticas hidrolíticas, que poseen la capacidad de degradar polímeros asociados a estructuras celulares de *Alexandrium catenella* y serían responsables de su lisis.

El factor alguicida presente en el sobrenadante filtrado y dializado de la fase estacionaria de *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02, que promueve la lisis de *Alexandrium*

catenella ACC01, es una molécula con características hidrofóbicas y con un peso molecular menor a 1 KDa.

El efecto alguicida podría ocurrir en dos etapas, la primera promovería la inmovilidad y muerte celular, para luego en una segunda etapa permitir la actividad de enzimas hidrolíticas liberadas por la flora bacteriana asociada a la microalga.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

AMARO, A.M.; FUENTES, S.; OGALDE, S.; VENEGAS, J.; SUAREZ-ISLA, B.A.

2005. Identification and Characterization of Potentially Algal-lytic Marine Bacteria Strongly Associated with the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 52(3). pp. 191-200.

ARRIAGADA, G.; CORDOVA, 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 Chiloe, Xª región, Chile. **In:** 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE), November 17-21, 2003, Viña del Mar, Chile.

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. 649-652.

DOUCETTE, G.; MCGOVERN, E.; BABINCHAK, J. 1999. Algicidal bacteria

active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *J. Phycol.* 35: 1447-1454.

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.
- GOEBEL, W.; GROSS, R.** 2001. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends in Microbiology*. 9(6): 267-273
- GUILLARD, R.R.L.** 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In: Smith, W. L.& Chanley, M.H. (ed), *Cultures of Marines Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York, p. 29-60.
- HOFFMAN, M.; DECHO, A.** 2000. Proteolytic enzymes in the marine *bacterium Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. *Aquatic Microbial Ecology*. 23: 29-39.
- HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology*. 30: 285-293.
- IMAI, I.; ISHIDA, Y.; HATA, Y.;** 1993. Killing of marine phytoplankton by aggliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the costal sea of Japan. *Mar. Biol.* 116: 527-532.
- IVANOVA, E.; BAKUNINA, I.; NEDASHKOVSKAYA, O.; GORSSHKOVA, N.; ALEXEEVA, Y.; ZELEPUGA, E.; ZVAYGINTSEVA, T; NICOLAU, D.; MIKAHAILOV, V.** 2003. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachekonii*, and *P. nigrifaciens* . *Current Microbiology*. 46: 6-10.

- KAO, C.** 1993. Paralytic shellfish poisoning: In: Algal toxin in seafood and drinking water. Falconer, I.R. (ed) Academic Press, London and New York, pp. 75-86.
- KATO, J.; AMIE, J.; MURATA, Y.; KURODA, A.; MITSUTANI, A.; OHTAKE, H.;** 1998. Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(6): 2061-2064.
- KODAMA, M.; SAKAMOTO, S.; KOIKE, K.** 1996. Symbiosis of bacteria in *Alexandrium tamarense*. In: Harmful and toxic algal blooms. Yasumoto, T. and Fukuyo, Y. (ed). IOC, UNESCO, pp. 351-354.
- LAEMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- 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.
- LEE, S.; KATO, J.; NAKASHIMA, K.; KURODA, A.; IKEDA, T.; TAKIGUCHI, N.;**
OHTAKE, H. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Bioscience Biotechnological Biochemistry*. 66(6): 1366-1369.
- 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. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51(2): 139-144.
- 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 bacteriumstrain from *Alexandrium tamarense* Ipswichstrain and its significance. **In:** Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto , T. Oshima , Y. Fukuyo, Y.(eds) IOC of UNESCO, Sendai, Japan, pp 359-362.
- SIMON, N.; BIEGALA, I.; SMITH, I.; VAULOT, D.** 2002. Kinetics of attachment of potentially toxic bacteria to *Alexandrium tamarense*. *Aquatic Microbial Ecology.* 28:249-256.
- SMITH, P.K.; KROHN R.I.; HERMANSON G.T.; MALLIA A.K.; GARTNER F.H.; PROVENZANO M.D.; FUJIMOTO E.K.; GOEKE N.M.; OLSON B.J.; KLENK D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- STOECKER, D.; GUSTFSON, D.** 2003. Cell-surface proteolytic activity of photosynthetic dinoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology.* 30: 175-183.
- SUÁREZ, B.A.; GUZMÁN, L.** 1999. Mareas rojas y toxinas marinas. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 77 p.

TAUCHER, E. 1997. Bioestadística. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. pp
161-186.

XII. ANEXO.

12.1 Composición F/2-Si (Guillar, 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-Si	
1 mL	Vitaminas para F/2	

Completar a 1 Litro V/F con agua de mar y luego filtrar.

Metales Traza para F/2-Si

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.

12.2. Soluciones Stock de Buffer Empleados en HIC.

Soluciones Buffer	Compuesto	Cantidad
Buffer 0 M (1 Litro)	Tris pH 7,5	40 mL
	EDTA (100 μ M)	0,2 mL
Buffer 1 M (100 mL)	Tris pH 7,5	4 mL
	EDTA (100 μ M)	0,2 mL
	NaCl	5,84 g
Buffer 3 M (100 mL)	Tris pH 7,5	4 mL
	EDTA (100 μ M)	0,2 mL
	NaCl	17,52 g