

## Variations in growth and toxicity in *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California under different ratios of nitrogen and phosphorus

### Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gymnodinium catenatum* Graham del golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo

JJ Bustillos-Guzmán<sup>1\*</sup>, CJ Band-Schmidt<sup>2</sup>, DJ López-Cortés<sup>1</sup>, I Gárate-Lizárraga<sup>2</sup>, EJ Núñez-Vázquez<sup>1</sup>, FE Hernández-Sandoval<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Apdo. postal 128, CP 23000 La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>2</sup> Departamento de Plancton y Ecología Marina, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 592, CP 23000 La Paz, Baja California Sur, México.

\* Corresponding author. E-mail: jose04@cibnor.mx

**ABSTRACT.** A strain of *Gymnodinium catenatum* Graham (GCCV-7), isolated from the Gulf of California, was submitted to conditions with different nitrogen-to-phosphorus ratios (5.4, 9.2, 23.5, 44.7, and 74.3) to determine the effect of these ratios on the growth, toxicity, and variations in toxin profile. No differences in toxicity and toxin profile were found among the treatments. Highest cell density occurred at the N:P ratio of 23.5:1, yielding 33% more cells than the 44.5:1 and 74.3:1 treatments, which in turn had 34% and 30% more cells than the 5.4:1 and 9.2:1 treatments. Toxin cell quota and variations in toxin composition were clearly related to growth rates. Toxicity remained relatively invariable because of changes in toxin composition rather than changes in the toxin cell quota during the different growth stages. The data suggest that changes in the N:P ratios do not stimulate production of toxins or changes in toxin profiles, but do affect cell density, and that cellular toxin dynamics is related to the growth stage.

*Key words:* *Gymnodinium catenatum*, nitrogen, phosphorus, toxins, Gulf of California.

**RESUMEN.** Se sometió a una cepa de *Gymnodinium catenatum* Graham (GCCV-7), aislada del golfo de California, a diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo (5.4, 9.2, 23.5, 44.7 y 74.3) para determinar el efecto de estas proporciones en el crecimiento, toxicidad y variaciones en el perfil de toxinas. No se encontraron diferencias en la toxicidad ni en el perfil de toxinas entre los tratamientos. Sin embargo, la mayor densidad celular se presentó en la proporción de N:P de 23.5:1 con 33% más células que en los tratamientos N:P de 44.5:1 y 74.3:1, los cuales a su vez presentaron 34% y 30% más células que en los tratamientos 5.4:1 y 9.2:1. El contenido de total de toxinas por célula y la variación en el perfil de toxinas estuvo claramente relacionado con las tasas de crecimiento. La toxicidad se mantuvo relativamente constante debido, principalmente, a los cambios en el perfil que al contenido celular de toxinas en las diversas etapas de crecimiento. Estos datos sugieren que los cambios en la proporción de N:P no estimulan la producción de toxinas ni cambios en el perfil de toxinas paralizantes, pero sí afectan la densidad celular, y que la dinámica celular de toxinas está relacionada con la fase de crecimiento.

*Palabras clave:* *Gymnodinium catenatum*, nitrógeno, fósforo, toxinas, golfo de California.

## INTRODUCTION

The Gulf of California has been recognized as a high productivity zone where physical processes enrich the surface waters with nutrients (Zeitzschel 1969, Álvarez-Borrego and Lara-Lara 1991). Together with these physical phenomena, anthropogenic nutrient inputs are important and come mainly from agriculture and river flows (Páez-Osuna 2001, Miranda *et al.* 2009). Increase in nutrient concentration and imbalance of their ratios in coastal areas is reflected in the increase and selectivity of autotrophic organisms (Lancelot *et al.* 1987, Hodgkiss and Ho 1997).

*Gymnodinium catenatum* Graham is a naked dinoflagellate that produces paralytic toxins and is widely distributed worldwide (Oshima *et al.* 1993; Negri *et al.* 2001; Holmes

## INTRODUCCIÓN

El golfo de California ha sido reconocido como una zona altamente productiva donde ocurren procesos físicos que enriquecen las aguas superficiales con nutrientes (Zeitzschel 1969, Álvarez-Borrego y Lara-Lara 1991). Además de estos eventos físicos, las aportaciones antropogénicas de nutrientes son importantes y provienen principalmente de ríos y actividades de agricultura (Páez-Osuna 2001, Miranda *et al.* 2009). El incremento en la concentración de nutrientes y el desbalance de sus proporciones en áreas costeras se refleja en el incremento y la selectividad de organismos autótrofos (Lancelot *et al.* 1987, Hodgkiss y Ho 1997).

*Gymnodinium catenatum* Graham es un dinoflagelado desnudo que produce toxinas paralizantes, con una amplia

*et al.* 2002; Band-Schmidt *et al.* 2006, 2010). Along the Pacific coast of Mexico, *G. catenatum* is conspicuous and responsible for the formation of blooms in areas such as the bays of Mazatlán (Mee *et al.* 1986, Cortés-Altamirano and Núñez-Pasten 1992), Manzanillo (Morales-Blake *et al.* 2000), and Acapulco (Licea *et al.* 1999), and the coasts of Oaxaca (Saldate-Castañeda *et al.* 1990, 1991), among others. Proliferation of this species in the Mexican Pacific has been linked mainly to eutrophic environments such as coastal and upwelling zones (Bravo *et al.* 1990, Cortés-Altamirano and Núñez-Pasten 1991, Alonso-Rodríguez 2004, Alonso-Rodríguez and Ochoa 2004, Band-Schmidt *et al.* 2010, Quijano-Scheggia *et al.* 2012). In the Gulf of California, particularly off Mazatlán, annual average values of nitrate between 1 and 10 m depth show an increase from around 0.7 to 3.16  $\mu\text{M}$  during a 15-year period (1980–1995). Concomitantly, N:P ratios increased from values below 2 to values between 15 and 25 (Mee *et al.* 1986, García de La Parra 1995, Alonso-Rodríguez 1998). This increment was related to the increase in nitrate since phosphates remained around 0.8  $\mu\text{M}$ . In contrast, in La Paz Bay, which has mesotrophic conditions and a N:P ratio of 2.1 (López-Cortés *et al.* 2006), this species is also present but generally in low densities ( $<100$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) (Gárate-Lizárraga *et al.* 2009, Hernández-Sandoval *et al.* 2009). These data suggest that high nutrients and high N:P ratios promote the growth of *G. catenatum*. Mexican strains of *G. catenatum* have moderate toxicity with the presence of high percentages (81–86%) of N-sulfo-carbamoyl toxins (C-type toxins) together with decarbamoyl (6.5–8.8%) derivatives (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006). Variations in the toxin profile have been observed with the culture media, culture age, and origin of the strain (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006); however, more information is needed to understand the effect of environmental variables on the toxin production of *G. catenatum* strains from the Gulf of California. Because the saxitoxin and analogs are N-rich compounds (*ca.* 30% by weight) and as much as 5–10% of the total cellular N may be found in *G. catenatum* (Flynn *et al.* 1996), it has been postulated that these toxins can be used as nitrogen storage (Cembella and John 2006).

In this study we simulated different N:P ratio scenarios to analyze their effects on the growth, toxicity, and toxin profile of a *G. catenatum* strain isolated from the Gulf of California. We would expect high N:P ratio conditions to support greater growth and changes in the toxin profile.

## MATERIAL AND METHODS

### Isolation and culture of *G. catenatum*

Vegetative cells of *G. catenatum* were collected from Concepción Bay, Gulf of California, by vertical tows using a 20- $\mu\text{m}$  phytoplankton net. The cell concentrate was sieved

distribución geográfica (Oshima *et al.* 1993; Negri *et al.* 2001; Holmes *et al.* 2002; Band-Schmidt *et al.* 2006, 2010). A lo largo de la costa del Pacífico mexicano, *G. catenatum* es una especie conspicua y responsable de la formación de florecimientos algales nocivos en áreas como bahía de Mazatlán (Mee *et al.* 1986, Cortés-Altamirano y Núñez-Pasten, 1992), bahía de Manzanillo (Morales-Blake *et al.* 2000), bahía de Acapulco (Licea *et al.* 1999), las costas de Oaxaca (Saldate-Castañeda *et al.* 1990, 1991), entre otras. La proliferación de esta especie en el Pacífico mexicano se ha relacionado principalmente con ambientes eutrofizados de zonas costeras y de surgencia (Bravo *et al.* 1990, Cortés-Altamirano y Núñez-Pasten 1991, Alonso-Rodríguez 2004, Alonso-Rodríguez y Ochoa 2004, Band-Schmidt *et al.* 2010, Quijano-Scheggia *et al.* 2012). En el golfo de California, particularmente en la bahía de Mazatlán, los promedios anuales de nitrato entre 1 y 10 m de profundidad han incrementado de  $\sim 0.7$  a 3.16  $\mu\text{M}$  durante un periodo de 15 años (1980–1995). Asimismo, las proporciones de N:P incrementaron de valores menores que 2 a valores entre 15 y 25 (Mee *et al.* 1986, García de La Parra 1995, Alonso-Rodríguez 1998). Este incremento está relacionado con la mayor concentración de nitrato, ya que los fosfatos permanecieron en alrededor de 0.8  $\mu\text{M}$ . En contraste, en la bahía de La Paz, que presenta condiciones mesotróficas y proporciones de N:P de 2.1 (López-Cortés *et al.* 2006), esta especie también está presente pero generalmente en densidades bajas ( $<100$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) (Gárate-Lizárraga *et al.* 2009, Hernández-Sandoval *et al.* 2009). Estos datos sugieren que la alta concentración de nutrientes y las altas proporciones de N:P promueven el crecimiento de *G. catenatum*. Las cepas mexicanas de *G. catenatum* tienen toxicidad moderada y porcentajes elevados (81–86%) de toxinas sulfocarbamatadas (toxinas tipo C) junto con derivados de decarbamamatadas (6.5–8.8%) (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006). Se han observado variaciones en el perfil de toxinas con el medio de cultivo, edad del cultivo y origen de la cepa (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006); sin embargo, se requiere mayor información para comprender el efecto de las variables ambientales en la producción de toxinas en cepas de *G. catenatum* del golfo of California. Debido a que la saxitoxina y sus análogos son moléculas ricas en nitrógeno (*ca.* 30% por peso) y que se puede encontrar entre el 5% y 10% del total del nitrógeno celular en *G. catenatum* (Flynn *et al.* 1996), se ha propuesto que estas toxinas pueden ser un almacenamiento de nitrógeno (Cembella y John 2006).

En este estudio se simularon diferentes proporciones de N:P para analizar su efecto en el crecimiento, la toxicidad y el perfil de toxinas de una cepa de *G. catenatum* aislada del golfo de California. Esperaríamos que en altas proporciones de N:P habría un mayor crecimiento y cambios en el perfil de toxinas.

through a 60- $\mu\text{m}$  mesh to eliminate larger organisms. This concentrate was placed in a 250-mL culture container filled with seawater enriched with GSe medium (Doblin *et al.* 2000). In the laboratory, vegetative cells of *G. catenatum* were isolated from the enrichment cultures with micropipettes under an inverted microscope (Carl Zeiss Axiovert 100). Single cells and chains were transferred to 96-well plates with f/2 medium, modified by the addition of  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  ( $10^{-8}$  M) and by reducing the concentration of  $\text{CuSO}_4$  to  $10^{-8}$  M, and maintained at  $20 \pm 1$  °C with overhead illumination of  $150 \mu\text{mol photon}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  supplied by cool-white fluorescent lights in a 12:12 light:dark cycle under nonaxenic conditions. The clonal strain GCCV-7 of *G. catenatum*, which has been maintained in the laboratory since 2000, was used for our experiments. Details of the strain isolation and culture conditions can be found in the archives of the Marine Dinoflagellate Collection (CODIMAR) at CIBNOR, La Paz, Mexico ([www.cibnor.mx/colecciones/codimar/icodimar.php](http://www.cibnor.mx/colecciones/codimar/icodimar.php)) and in Band-Schmidt *et al.* (2005).

### Experimental design

On day 0 an exponentially growing culture was used as an inoculum for batch cultures with N:P ratios of 5.4, 9.2, 23.5, 44.7, and 74.3 (in triplicate). The five N:P ratios were initiated by adding an inoculum of 50 mL of *G. catenatum* ( $2.068 \times 10^5$  cells) to 350 mL of seawater enriched with f/2 medium. Pyrex carboys of 500 mL were used in the experiment. Final  $\text{NO}_3$  and  $\text{PO}_4$  concentration and N:P ratios are shown in table 1. Culture conditions were as described previously (see isolation and culture of *G. catenatum*). Every second day until day 16 of growth, between 09:00 and 10:00, 45-mL samples were removed for cell counts and peridinin, nutrient (nitrate and phosphates), and toxin analysis. Culture flasks were gently swirled before sampling. For peridinin and toxin analysis, 20 mL of culture were taken and concentrated by filtering through GF/F filters and frozen immediately to  $-40$  °C until analysis. Filtered medium (40 mL) was

**Table 1.** Average nitrate and phosphorus concentration and N:P ratios in the different treatments: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5). Standard deviation in parentheses.

**Tabla 1.** Concentración promedio de nitrato y fósforo, y la proporción N:P en los diferentes tratamientos. 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5). La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Treatment	$\text{NO}_3$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{PO}_4$ ( $\mu\text{M}$ )	N:P ratio
T1	194 (9)	35.9 (0.9)	5.4 (0.19)
T2	235 (16)	25.4 (0.3)	9.2 (0.76)
T3	412 (12)	17.4 (0.7)	23.5 (1.09)
T4	412 (2)	9.2 (0.3)	44.7 (1.55)
T5	469 (9)	6.3 (0.1)	74.3 (1.87)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento y cultivo de *G. catenatum*

Se recolectaron células vegetativas de *G. catenatum* de bahía Concepción, golfo de California, mediante arrastres verticales con una red de fitoplancton de 20  $\mu\text{m}$ . El concentrado celular se tamizó a través de una malla de 60  $\mu\text{m}$  para eliminar organismos de mayor tamaño. Este concentrado se colocó en un recipiente de cultivos de tejidos de 250 mL con agua de mar enriquecida con medio de cultivo GSe (Doblin *et al.* 2000). En el laboratorio, las células vegetativas de *G. catenatum* se aislaron con pipetas capilares adelgazadas bajo un microscopio invertido (Carl Zeiss Axiovert 100). Las células individuales y cadenas se transfirieron a placas de 96 pocillos con medio f/2, modificado por la adición de  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  ( $10^{-8}$  M) y por la reducción de  $\text{CuSO}_4$  a  $10^{-8}$  M, y se colocaron a  $20 \pm 1$  °C con una iluminación de  $150 \mu\text{mol fotón}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  utilizando lámparas fluorescentes de luz de día en un ciclo de luz:oscuridad 12:12 en condiciones no axénicas. Se utilizó la cepa clonal GCCV-7 de *G. catenatum* para los experimentos, que se ha mantenido en nuestro laboratorio desde el año 2000. Los detalles del aislamiento de la cepas y condiciones de mantenimiento se pueden ver en el archivo de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) del CIBNOR, La Paz, México ([www.cibnor.mx/colecciones/codimar/icodimar.php](http://www.cibnor.mx/colecciones/codimar/icodimar.php)) y en Band-Schmidt *et al.* (2005).

### Diseño experimental

En el día 0 un cultivo en fase exponencial de crecimiento se utilizó como inóculo en cultivos de lote con proporciones de N:P de 5.4, 9.2, 23.5, 44.7 y 74.3 (por triplicado). Las cinco proporciones de N:P se iniciaron adicionando un inóculo de 50 mL de *G. catenatum* ( $2.068 \times 10^5$  células) a 350 mL de agua de mar enriquecida con medio f/2 modificado a matraces de Pyrex de 500 mL. Las concentraciones finales de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  y las proporciones N:P se muestran en la tabla 1. Las condiciones de cultivo fueron las descritas anteriormente (ver aislamiento y cultivo de *G. catenatum*). Cada segundo día hasta el día 16 de crecimiento, entre 09:00 y 10:00, se tomaron muestras de 45 mL para realizar los conteos celulares, la determinación de peridinin y nutrientes (nitrato y fosfatos), y el análisis de toxinas. Los cultivos se agitaron suavemente antes de tomar las muestras. Para el análisis de peridinin y toxinas, se tomaron 20 mL del cultivo y se concentraron por filtración a través de filtros GF/F y se congelaron inmediatamente a  $-40$  °C hasta su análisis. Para el análisis de nutrientes se filtró el medio de cultivo (40 mL) (ver detalles más adelante). El resto del cultivo (5 mL) se preservó con una solución de Lugol para conteos celulares. La densidad celular se estimó mediante una cámara para microscopio invertido de 5 mL (Zeiss, Alemania). Los conteos celulares se realizaron por duplicado (ver tasas de crecimiento). El resto de los datos de este

used for nutrient analysis (see below). The rest of the culture (5 mL) was fixed with a Lugol solution for cell counting. Cell density was estimated using a 5-mL chamber in an inverted microscope (Zeiss, Germany). Cell counts were only determined in duplicate (see growth rates below). Unless otherwise stated, all values presented in this study represent the mean of three independent cultures with the same N:P ratio. The different treatments (table 1) were identified as T1, T2, T3, T4, and T5 for N:P ratios of 5.4, 9.2, 23.5, 44.7, and 74.3, respectively.

### Nutrients

Nutrients ( $\text{NO}_3$  and  $\text{PO}_4$ ) were measured according to Strickland and Parsons (1972), using a continuous ion flow auto-analyzer (Lachat Instruments QuikChem 8000).

### Toxin extraction and analysis

Extraction of toxins was done by adding 2 mL of acetic acid (0.03 N) to each sample, sonicating (35 kHz) for 5 min in an ice bath, and clarifying by centrifugation (3000 rpm for 5 min). The supernatant was filtered with a single-use syringe filter (0.45  $\mu\text{m}$ ). An aliquot (150  $\mu\text{L}$ ) of the clarified extract was used for the hydrolysis with HCl (1 M) to transform decarbamoyl toxins (B and C types) to their analogs. Finally, 10  $\mu\text{L}$  of both extracts (with and without hydrolysis) were injected into the HPLC system (HP 1100). Chromatography was performed as published by Hummert *et al.* (1997) and Yu *et al.* (1998). Briefly, an ion-pair buffer gradient, composed of a solution of octansulfonic acid and ammonia phosphate at pH 6.9 and acetonitrile, was used to separate paralytic toxins. After post-column oxidation with alkaline periodic acid the resulting products were detected with a fluorescence detector (HP 1116) set at 330 nm excitation wavelength and 395 nm emission wavelength. Identification of paralytic toxins was carried out comparing chromatograms obtained from sample extracts with those resulting after the injection of standard solutions (National Research Council of Canada). Quantification of toxin content was carried out comparing peak areas in chromatograms of sample extracts with the corresponding response factor. Detection limits for the diverse toxins were 247, 10, 17, 218, 77, 16, and 7 pg for GTX1–4, neosaxitoxin, dc-saxitoxin, and saxitoxin, respectively (Yu *et al.* 1998).

### Growth rates

To obtain the regression equation, cell counts from each treatment were related to the peridinin content data, measured by HPLC according to Vidussi *et al.* (1996). Regression coefficients ( $r$ ) were all higher than 0.90 (table 2). The resulting equation (table 2) was used to calculate the cell density in all flasks with the peridinin content. With these data, the growth rates for each growth curve were determined for the period when maximum density was reached (exponential

estudio fueron el promedio de tres cultivos independientes bajo la misma proporción de N:P. Los diferentes tratamientos N:P (tabla 1) se nombraron como T1, T2, T3, T4 y T5 para las proporciones de N:P de 5.4, 9.2, 23.5, 44.7 y 74.3, respectivamente.

### Nutrientes

Los nutrientes ( $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ ) se determinaron de acuerdo con Strickland y Parsons (1972), con un autoanalizador de flujo continuo de iones (Lachat Instruments QuikChem 8000).

### Extracción y análisis de toxinas

La extracción de toxinas se realizó adicionando 2 mL de ácido acético (0.03N) a cada muestra, sonicando (35 kHz) por 5 min en un baño de hielo y clarificando por centrifugación (3000 rpm por 5 min). El sobrenadante se filtró con una jeringa con filtro (0–45  $\mu\text{m}$ ) de un solo uso. Una alícuota (150  $\mu\text{L}$ ) del extracto clarificado se utilizó para la hidrólisis con HCl (1M) para transformar a toxinas decarbamamadas (tipo B y C) a sus análogos. Finalmente, se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de ambos extractos (con y sin hidrólisis) en el sistema de HPLC (HP 1100). La cromatografía se llevó a cabo como lo sugerido por Hummert *et al.* (1997) y Yu *et al.* (1998). Brevemente, se utilizó un gradiente amortiguado de pares de iones (*ion-pair buffer*), compuesto de una solución de ácido octanosulfónico y fosfato de amonio a un pH de 6.9 y acetonitrilo, para separar las toxinas paralizantes. Después de una oxidación postcolumna con ácido periódico alcalino, los productos resultantes se detectaron con un detector de fluorescencia (HP 1116) a una longitud de onda de 330 nm (excitación) y de 395 nm (emisión). La identificación de toxinas se llevó a cabo comparando cromatogramas de muestras de estándares (National Research Council, Canadá). La cuantificación de toxinas se llevó a cabo comparando áreas de picos de extractos de estándares con el correspondiente factor de respuesta. Los límites de detección de las diversas toxinas fueron 247, 10, 17, 218, 77, 16 y 7 pg para GTX1–4, neosaxitoxina, dc-saxitoxina y saxitoxina, respectivamente (Yu *et al.* 1998).

### Tasas de crecimiento

Los conteos para cada tratamiento se relacionaron con los datos de peridinin, determinados por HPLC de acuerdo con Vidussi *et al.* (1996), para obtener la ecuación de regresión. Todos los coeficientes de regresión ( $r$ ) fueron mayores que 0.90 (tabla 2). La ecuación resultante (tabla 2) se utilizó para calcular la densidad celular en todos los tratamientos utilizando el contenido de peridinin. Con estos datos, se determinaron las tasas de crecimiento para cada curva de crecimiento para el periodo en que se alcanzó la máxima densidad celular (fase de crecimiento exponencial) y para cada

growth rate) and for every second day (daily growth rate) according to the following equation (Guillard 1973):

$$\mu = \log(N_1/N_2) / \Delta t \quad (1)$$

where  $N_2$  and  $N_1$  are the cell concentration at the end ( $t_2$ ) and beginning ( $t_1$ ) of a period of time, and  $\Delta t$  is  $t_2 - t_1$ .

### Statistical analyses

Differences in exponential growth rates in the different treatments were tested by analysis of variance (ANOVA). To determine the effect of the main factor (N:P ratio) at each time on every response variable, a one-way ANOVA was applied. Normality fit was checked by the Kolmogorov-Smirnov test. If this assumption was not met the data were log-transformed to fulfill the assumption. All analyses were performed using Statistica v5.0 (StatSoft, Inc.) at a minimal significance level of  $\alpha = 0.05$ . Also, PSP toxins of strains examined were expressed as molar percentages (mol %). These data were used to construct a Bray-Curtis similarity dendrogram using the BioDiversity Professional v2 software (McAleece 1997). Regression and correlation analyses were tested between the growth rates and toxicity, cell toxin quota, and toxin profile (mol %) grouping the carbamoyl, decarbamoyl, and sulfocarbamoyl toxins. Significant relationships were considered if  $\alpha$  was the same or lower than 0.05.

## RESULTS

### Nutrient variation during cultures

Phosphate content declined steadily in the higher N:P ratios to reach values below the level of detection on day 6 (T4 and T5) and day 8 (T3) (fig. 1a). In treatments T1 and T2,  $PO_4$  also declined steadily until day 8 and then remained relatively constant onward. The  $PO_4$  values for T1 and T2 after day 8 were between 8.7 and 22.1  $\mu M$ , respectively.

Nitrate content also decreased steadily in all treatments to reach low values after day 8 (T1 and T2) and onward (fig. 1b). In T5,  $NO_3$  concentration was not exhausted in the medium and the lowest value was 40  $\mu M$ . Therefore, nitrogen was limiting in the lower N:P ratio treatments (T1 and T2) after 8 to 10 days of growth, and after day 12 in treatments T3 and T4. Interestingly,  $NO_3$  continued diminishing even when  $PO_4$  was exhausted or remained quasi constant in the medium. This suggests that *G. catenatum* cells continued obtaining nitrate from the medium.

### Growth rates

All treatments exhibited a classical growth curve, with a short, if any, lag-phase followed by logarithmic growth until day 8 of culture in the two lower N:P ratio treatments (T1 and T2), and until day 10 in the rest of the treatments (fig. 2).

**Table 2.** Equation and correlation coefficient ( $r$ ) obtained from the relationship between peridinin (p) and cell concentration (n) for each treatment (all relationships are significant at  $\alpha = 0.05$ ): 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5).

**Tabla 2.** Ecuación y coeficiente de correlación ( $r$ ) obtenidos de la relación entre la concentración de peridina (p) y la densidad celular (n) para cada tratamiento (todas las relaciones son significativas con  $\alpha = 0.05$ ): 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5).

Treatment	Equation	$r$
T1	$n = 48.3p + 412$	0.92
T2	$n = 42.3p + 366$	0.96
T3	$n = 59.5p + 40$	0.97
T4	$n = 52.2p + 85$	0.94
T5	$n = 48.9p + 379$	0.92

segundo día (tasa de crecimiento diario) de acuerdo con la siguiente ecuación (Guillard 1973):

$$\mu = \log(N_1/N_2) / \Delta t \quad (1)$$

donde  $N_2$  y  $N_1$  son las concentraciones celulares al final ( $t_2$ ) y al inicio ( $t_1$ ) de un periodo de tiempo,  $\Delta t$  es  $t_2 - t_1$ .

### Análisis estadísticos

Las diferencias en las tasas de crecimiento en los diferentes tratamientos se determinaron con una prueba de análisis de varianza (ANDEVA). Para determinar el efecto del factor principal (proporción N:P) a cada tiempo y en cada variable respuesta, se aplicó un ANDEVA de una sola vía. Para probar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolvorov-Smirnof. Si los datos no fueron normales se transformaron a logaritmo. Los análisis se realizaron utilizando el software Statistica v5.0 (StatSoft, Inc.) con un nivel mínimo de significación de  $\alpha = 0.05$ . Los datos de toxinas paralizantes de las cepas se analizaron expresados en porcentaje molar (% mol). Estos datos se emplearon para elaborar un dendrograma de similitud de Bray Curtis utilizando el programa BioDiversity Professional Beta v2 (McAleece 1997). Se realizaron análisis de regresión y correlación entre tasas de crecimiento y toxicidad, contenido celular de toxinas y perfil de toxinas (% mol) agrupando las toxinas carbamatadas, decarbamatadas y sulfocarbamatadas. Se consideraron que presentaban relaciones significativamente diferentes si  $\alpha$  era igual o menor que 0.05.

## RESULTADOS

### Variación de los nutrientes en el cultivo

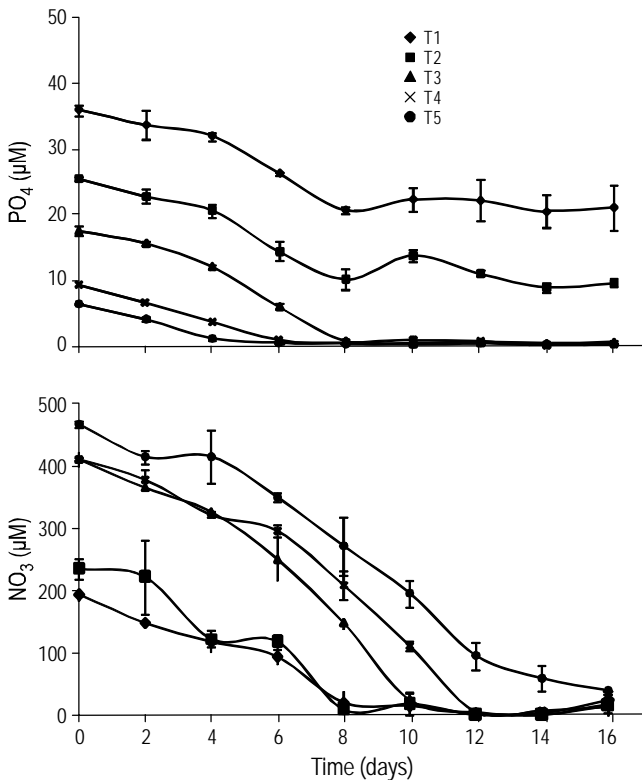
El  $PO_4$  disminuyó constantemente en los tratamientos con mayor proporción de N:P hasta alcanzar niveles fuera del intervalo de detección a los días 6 (T4 y T5) y 8 (T3)

Stationary phase was not evident; a rapid decadence phase was observed in all treatments after reaching the highest cell density.

Exponential growth rates varied from 0.20 to 0.24 d<sup>-1</sup> (table 3). Statistical analysis showed no significant differences in the growth rates among treatments; however, when considering maximum cell yield for each treatment, the intermediate N:P ratio (T3) yielded almost twice the number of cells (5852 cells mL<sup>-1</sup>) than the lower N:P treatments (T1 and T2, 2553 cells mL<sup>-1</sup>). Treatments T4 and T5 reached intermediate densities (3600–3800 cells mL<sup>-1</sup>). There were no significant differences in maximum cell densities between T3 and the rest of the treatments. No significant differences were found in the cell density between T1 and T2, nor between T4 and T5. Growth rates for every second day (data not shown) oscillated between -0.5 and 0.45 d<sup>-1</sup>.

### Toxicity

The initial toxicity value in all treatments was 21.75 ± 2.93 pg STXeq. cell<sup>-1</sup>. In general, toxicity data did not show a



**Figure 1.** Nutrient variations in culture medium during the growth of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5).

**Figura 1.** Variación de los nutrientes en los medios de cultivo durante el crecimiento de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) sometidos a diversas proporciones de N:P. Las proporciones fueron 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5).

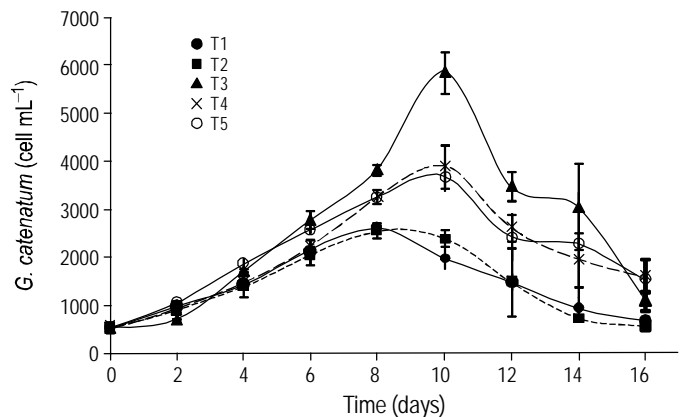
(fig. 1a). En T1 y T2, el PO<sub>4</sub> decayó de manera regular hasta el octavo día y luego se mantuvo relativamente constante. Para T1 y T2, la concentración de PO<sub>4</sub> luego del octavo día fue de 8.7 and 22.1 µM, respectivamente.

El contenido de NO<sub>3</sub> también disminuyó de manera constante en todos los tratamientos y alcanzó su valor mínimo del octavo día en adelante (fig. 1b). En T5, el NO<sub>3</sub> no se agotó del medio y quedó un valor mínimo de 40 µM. Por lo tanto, el nitrógeno fue limitante en los cultivos con las proporciones de N:P más bajas (T1 y T2) después de los días 8 y 10, y después del día 12 en T3 y T4. Es interesante que el NO<sub>3</sub> continuó disminuyendo aun cuando el PO<sub>4</sub> se había agotado o bien permanecía casi constante en el medio. Esto sugiere que las células de *G. catenatum* continuaron asimilando nitrato del medio.

### Tasas de crecimiento

Todos los cultivos presentaron la típica curva de crecimiento, con una fase de aclimatación corta, en caso de presentarse, seguida de una clara fase logarítmica hasta el día 8 de cultivo en los tratamientos de menor proporción de N:P (T1 y T2), y hasta el día 10 en el resto de los cultivos (fig. 2). La fase estacionaria no fue muy clara ya que se observó que la fase de decaimiento se presentó rápidamente después de alcanzar la máxima densidad celular.

Las tasas de crecimiento exponencial variaron entre 0.20 y 0.24 d<sup>-1</sup> (tabla 3). Los análisis estadísticos mostraron que no hubieron diferencias en las tasas de crecimiento entre los tratamientos. Sin embargo, al considerar el número máximo de células para cada tratamiento, T3 (5852 cél mL<sup>-1</sup>) tuvo una densidad casi dos veces mayor que T1 y T2 (2553 cél mL<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Growth of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5).

**Figura 2.** Crecimiento de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) sometidos a diversas proporciones de N:P. Las proporciones fueron 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5).

**Table 3.** Exponential growth rates of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios. Standard deviation in parentheses.

**Tabla 3.** Tasas de crecimiento para la fase exponencial de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) en los tratamientos con diferentes proporciones de N:P. La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

Treatment	N:P ratio	Growth rate (d <sup>-1</sup> )*
T1	5.4	0.202 (0.004)
T2	9.2	0.199 (0.009)
T3	23.5	0.243 (0.007)
T4	44.7	0.202 (0.011)
T5	74.3	0.196 (0.008)

\* No significant differences were found ( $\alpha = 0.05$ )

clear variation pattern during the experimental period (fig. 3). No significant differences in total cell toxicity among treatments was noted, except on day 12, in T3, when values were significantly lower than in T1, T4, and T5. All treatments showed a slight decreasing trend in cell toxicity from day 0 to days 10 and 14, with toxicity values decreasing to almost half of the initial toxicity (10 pg STXeq. cell<sup>-1</sup>). At the end of the experimental period, an increase in total toxicity was evident in all treatments, with toxicity values ranging from 20 to 31 pg STXeq. cell<sup>-1</sup>; however, no significant differences were observed between treatments.

### Toxin variability

A total of nine saxitoxin analogs (STX, NeoSTX, dcSTX, dcGTX2-3, B1-2, and C1-3) were detected. On a weight

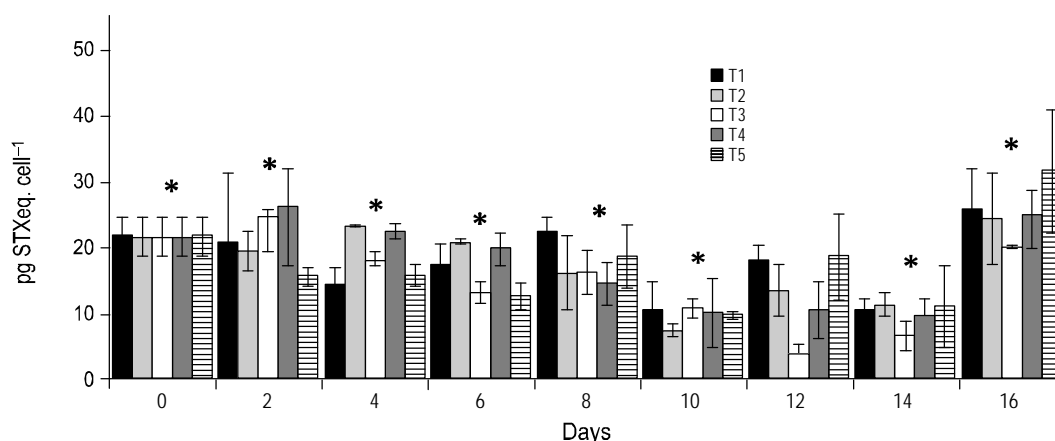
En el caso de los tratamientos T4 y T5, las densidades oscilaron entre 3600 y 3800 cél mL<sup>-1</sup>. No se encontraron diferencias estadísticas en los máximos celulares entre T3 y el resto de los tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias entre las densidades de T1 y T2 ni entre T4 y T5. Las tasas de crecimiento calculadas para cada dos días oscilaron (datos no mostrados) entre -0.5 y 0.45 d<sup>-1</sup>.

### Toxicidad

Los valores iniciales de toxicidad en todos los tratamientos fueron de  $21.75 \pm 2.93$  pg STXeq. célula<sup>-1</sup>. En general, los datos de toxicidad no mostraron una variación clara durante el periodo experimental (fig. 3). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto el día 12, en T3, cuando los valores fueron menores que en T1, T4 y T5. En todos los tratamientos se notó una tendencia ligera a disminuir la toxicidad desde el inicio del cultivo hasta los días 10 y 14, notándose una disminución de casi la mitad del valor inicial (10 pg STXeq. célula<sup>-1</sup>). Al final del experimento, se observó un incremento en la toxicidad total con valores de entre 20 y 31 pg STXeq. célula<sup>-1</sup>; sin embargo, esta diferencia no fue significativa entre los tratamientos.

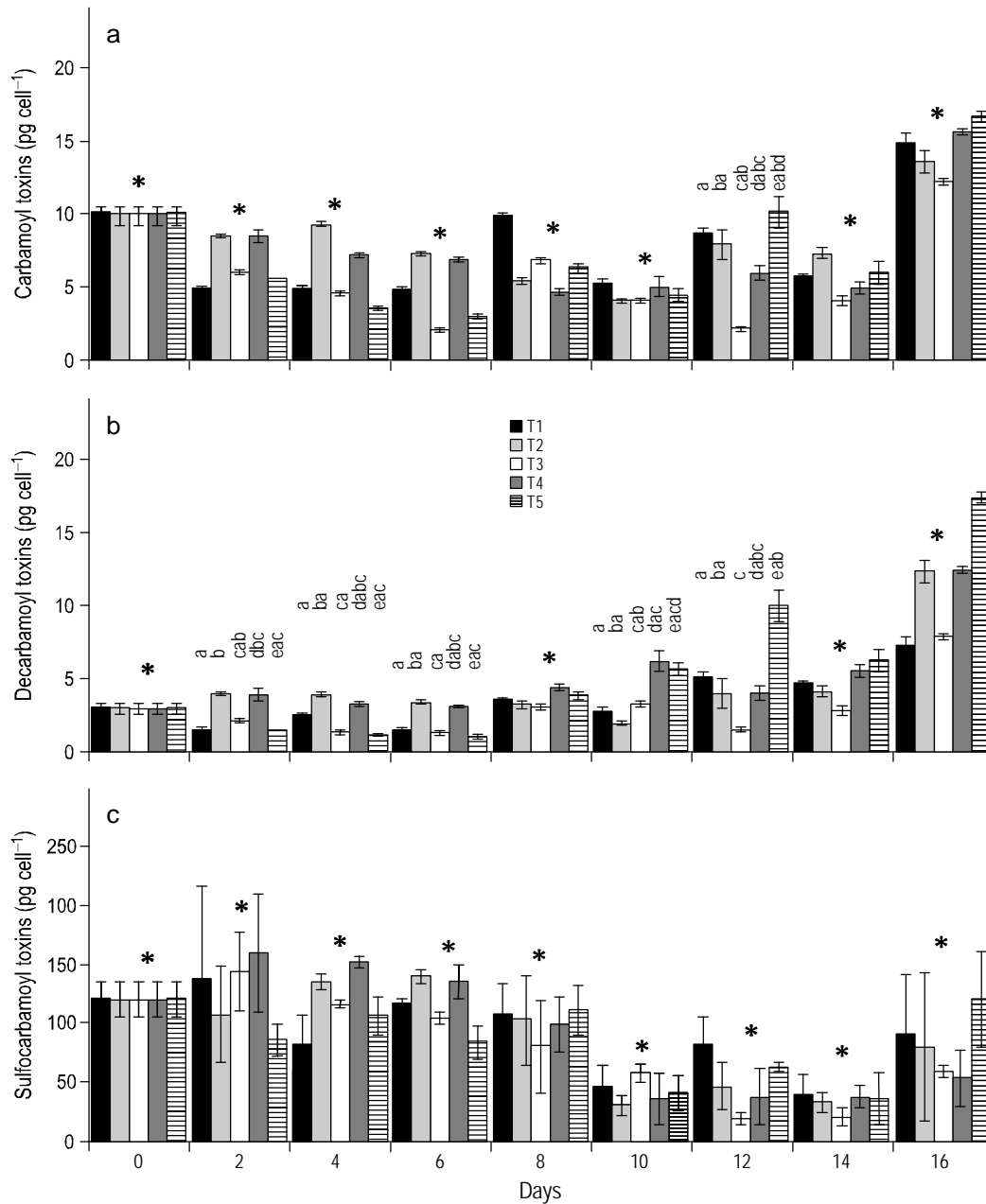
### Perfil de toxinas

Se detectaron nueve análogos de la saxitoxina (STX, NeoSTX, dcSTX, dcGTX2-3, B1-2 y C1-3). Considerando su peso, al tiempo 0, la concentración de las toxinas carbamatas, decarbamatas y sulfocarbamatas fue de 10.1, 3.0 y 119.0 pg célula<sup>-1</sup>, respectivamente (fig. 4). No se observaron diferencias claras en el perfil de toxinas entre los tratamientos con la edad del cultivo. Cuando se considera la edad del



**Figure 3.** Total toxicity (pg saxitoxin equivalents cell<sup>-1</sup>) of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5). The asterisk indicates no statistical differences. Columns with same lower case letter do not differ significantly at a minimal significance level of  $\alpha = 0.05$ . Bars represent the standard deviation.

**Figura 3.** Toxicidad total (pg de saxitoxina equivalentes cél<sup>-1</sup>) de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) sometidos a diversas proporciones N:P: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5). El asterisco indica diferencias no significativas. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ . Las barras representan la desviación estándar.



**Figure 4.** Toxin cell quota ( $\text{pg cell}^{-1}$ ) of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5). **(a)** Carbamoyl (STX + NeoSTX), **(b)** decarbamoyl (dcGTX2–3 + dcSTX), and **(c)** sulfocarbamoyl (B + C) toxins. The asterisk indicates no statistical differences. Columns with same lower case letter do not differ significantly at a minimal significance level of  $\alpha = 0.05$ . Bars represent the standard deviation.

**Figura 4.** Toxicidad por célula ( $\text{pg cell}^{-1}$ ) de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) sometidos a diversas proporciones de N:P: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5). **(a)** Carbamatadas (STX + NeoSTX), **(b)** decarbamatadas (dcGTX2–3 + dcSTX) y **(c)** sulfocarbamatadas (B + C). El asterisco indica diferencias no significativas. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ . Las barras representan la desviación estándar.

basis, at time 0, the concentrations of carbamoyl, decarbamoyl, and sulfocarbamoyl toxins were 10.1, 3.0, and 119.0  $\text{pg cell}^{-1}$ , respectively (fig. 4). No clear differences were found among treatments in the toxin composition with culture age. When considering the culture age, a tendency to decrease was observed for the sulfocarbamoyl group until

cultivo, se nota una tendencia a disminuir en las toxinas sulfocarbamatadas hasta casi a la mitad (50  $\text{pg célula}^{-1}$ ) entre los días 10 y 14 (fig. 4c). Para el caso del grupo de las carbamatadas, la tendencia a disminuir fue clara entre el día 10 y 14 (fig. 4a), y luego las concentraciones se mantuvieron oscilando hasta el día 14 para luego incrementarse al día 16. La



reaching nearly half of the initial value (about 50 pg cell<sup>-1</sup>) between days 10 and 14 (fig. 4c). In the case of the carbamoyl group, a tendency to diminish was evident from day 0 to day 6 (fig. 4a), after which the concentrations oscillated until increasing on day 16. For the decarbamoyl toxins, concentrations remained relatively constant until day 8, after which they also oscillated and towards the end of the experiment there was an increase in toxin content (fig. 4b).

When comparing variations in the toxin mole percent, clearly sulfocarbamoyl toxins were the most abundant, particularly toxins B1–2 (fig. 5c), followed by the carbamoyl toxins (STX and NeoSTX) (fig. 5a). The first group represented more than 80% during the first 6 to 8 days of culture and then decreased, contributing around 60% of the total toxin content at the end of the experiment (fig. 5c). Contrary to the sulfocarbamoyls, the contribution of the carbamoyl and decarbamoyl toxins was lower during the first 8 days of culture and higher, between 15% and 25%, respectively, when the cultures aged (fig. 5a, b).

When the toxin abundance (mol %) was used to construct a similarity dendrogram, no differences were observed between the N:P ratio treatments (data not shown); differences were only noticed with the culture age (fig. 6). Two major clusters were evident, separating samples harvested between days 2 and 8 from samples harvested between days 10 and 16, with 81% of similarity.

#### **Relationship of growth rates with toxicity, cell toxin quota, and toxin profile**

Growth rate and toxicity showed no significant relationship (fig. 7a), but there was a significant relationship between growth rate and toxin cell quota (fig. 7b). When considering toxin composition (mol %), negative relationships were found for the carbamoyl and decarbamoyl groups (fig. 8a, b), and positive relationships for the sulfocarbamoyl group (fig. 8c).

#### **DISCUSSION**

Our results do not show important effects of the diverse N:P ratios used on toxicity and toxin profile but significant differences were observed in maximum biomass yield. Variability in the toxin content and toxin profile seemed more linked to the changing physiological conditions of the cells during the different growth phases (growth stage variability) as suggested by several authors (Anderson *et al.* 1990, Band-Schmidt *et al.* 2006). Before addressing the discussion of these particular results, we will discuss them in a general context by comparing them with previous results on growth and toxins for other paralytic toxin-producing strains.

A general comparison of growth, toxicity, and toxin profile with other *G. catenatum* strains isolated from the Gulf of California and cultured in the same medium showed similar features (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2005, 2006; Gárate-

concentración de las toxinas decarbamatas se mantuvo constante hasta el día 8, luego oscilaron y aumentaron hacia el final del experimento (fig. 4b).

Si consideramos el porcentaje molar de las toxinas, las toxinas sulfocarbamatadas fueron las más abundantes, en particular las del tipo B1–2 (fig. 5c), seguidas de las carbamatadas (STX y NeoSTX) (fig. 5a). El primer grupo representó más del 80% durante los primeros 6 y 8 días de cultivo y después disminuyó, con una contribución de hasta el 60% del total de toxinas hacia el final de los experimentos (fig. 5c). Opuesto al grupo de las sulfocarbamatadas, la contribución de las carbamatadas y decarbamatas fue baja en los primeros días de cultivo y más alta, con una contribución de entre 15 y 25%, respectivamente, cuando el cultivo se avejentó (fig. 5 a, b).

Cuando se utilizó la abundancia de toxinas (mol %) para construir un dendrograma de similitud, no se observaron diferencias entre los tratamientos (datos no mostrados), pero sí con la edad del cultivo (fig. 6). Se evidenciaron dos grupos y se separaron las muestras recolectadas entre los días 2 y 8, y las muestras recolectadas entre los días 10 y 16, con un 81% de similitud.

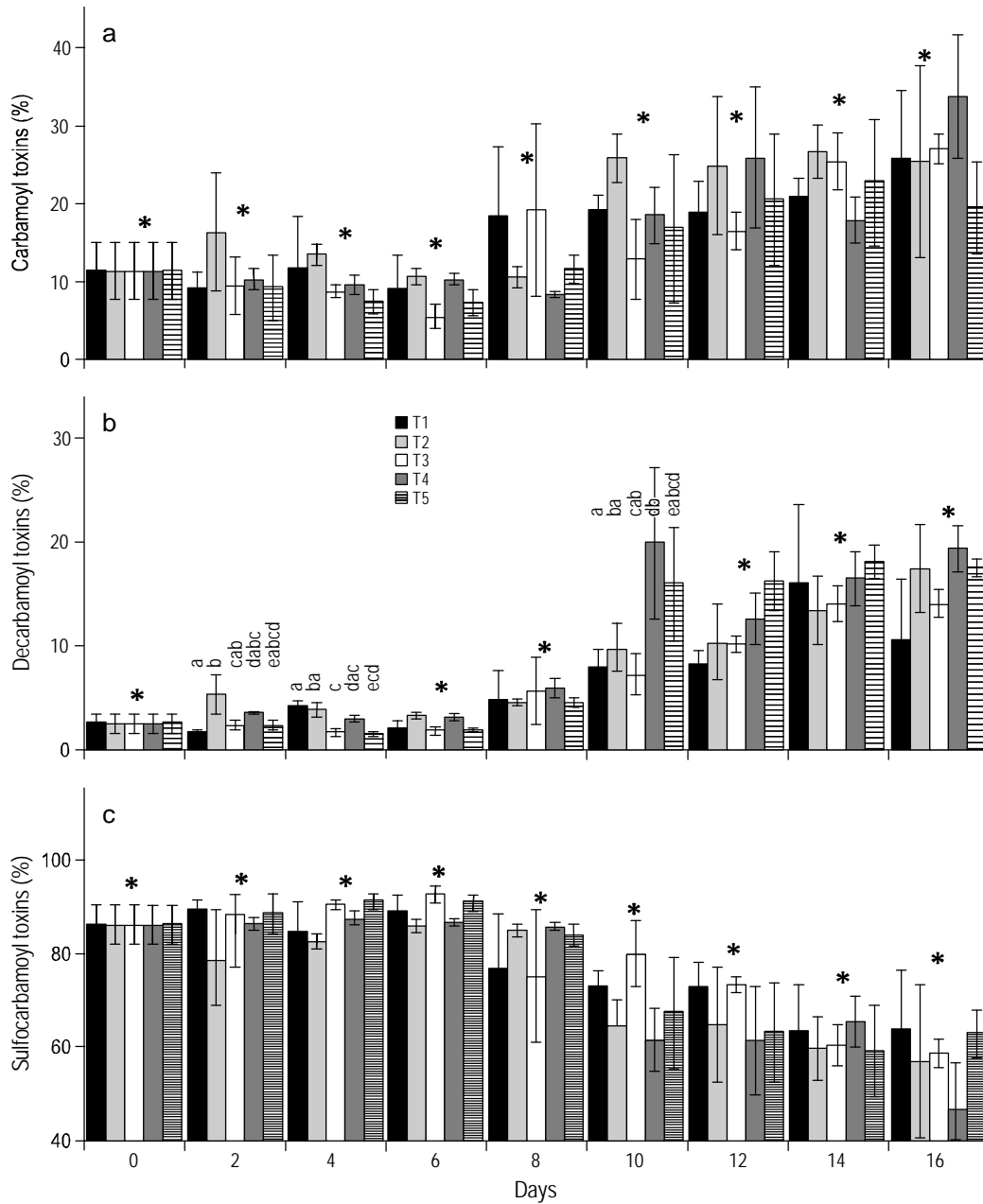
#### **Relación entre la tasa de crecimiento y la toxicidad, el contenido de toxinas y el perfil de toxinas**

Las tasas de crecimiento y la toxicidad no fueron significativas (fig. 7a), pero sí entre la tasa de crecimiento y el contenido celular de toxinas (fig. 7b). Considerando la composición de toxinas (% mol), se observó una relación negativa entre las tasas de crecimiento y el grupo carbamatado y el decarbamato (fig. 8a, b), y una relación positiva con el grupo de las sulfocarbamatadas (fig. 8c).

#### **DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos no muestran efectos importantes en la toxicidad y el perfil de toxinas bajo los diversos tratamientos de N:P; sin embargo, sí se observan cambios en las densidades del dinoflagelado. La variación en la toxicidad y el perfil de toxinas parece estar más relacionada con los cambios fisiológicos de las células durante las diferentes fases de crecimiento (variación de la etapa de crecimiento) como lo han sugerido varios autores (Anderson *et al.* 1990, Band-Schmidt *et al.* 2006). Antes de abordar la discusión de estos resultados de manera más particular, se discuten en un contexto general y en referencia a resultados previos sobre crecimiento y toxinas de otras cepas productoras de toxinas paralizantes.

Comparando el crecimiento, la toxicidad y el perfil de toxinas con otras cepas de *G. catenatum* aisladas del golfo de California y mantenidas en el mismo medio de cultivo tenemos que son muy similares a otros resultados (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2005, 2006; Gárate-Lizárraga *et al.* 2005): tasas de crecimiento y toxicidad moderadas y una dominancia de

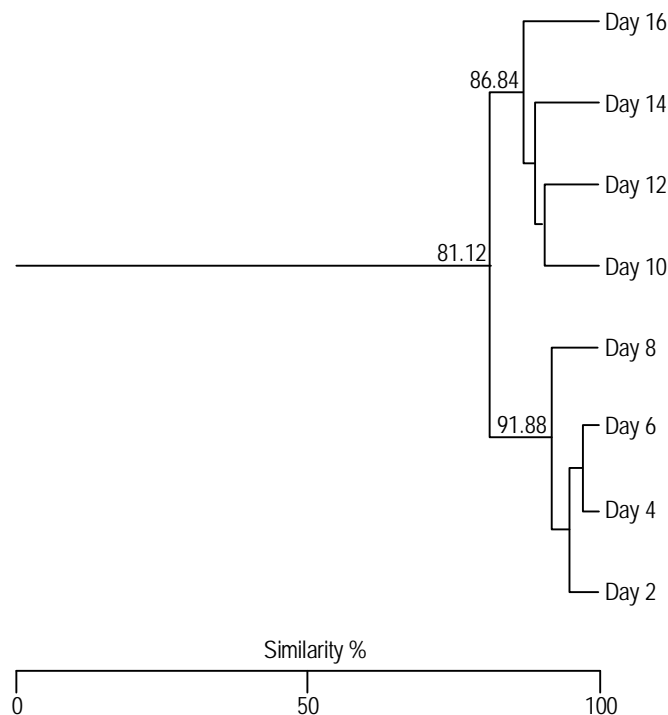


**Figure 5.** Average toxin profile (mol %) of *Gymnodinium catenatum* (strain GCCV-7) under different N:P ratios: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4), and 74.3 (T5). (a) Carbamoyl (STX + NeoSTX), (b) decarbamoyl (dcGTX2-3 + dcSTX), and (c) sulfocarbamoyl (B + C) toxins. The asterisk indicates no statistical differences. Columns with same lower case letter do not differ significantly at a minimal significance level of  $\alpha = 0.05$ . Bars represent the standard deviation.

**Figura 5.** Perfil de toxinas promedio (% mol) de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) sometidos a diversas proporciones de N:P: 5.4 (T1), 9.2 (T2), 23.5 (T3), 44.7 (T4) y 74.3 (T5). (a) Carbamatadas (STX + NeoSTX), (b) decarbatadas (dcGTX2-3 + dcSTX) y (c) sulfocarbamatadas (B + C). El asterisco indica diferencias no significativas. Las columnas con la misma letra no difieren significativamente con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ . Las barras representan la desviación estándar.

Lizárraga *et al.* 2005): moderate growth rates and toxicity, and dominance of sulfocarbamoyl toxins followed by decarbamoyl toxins, with a change in toxin profile according to culture age and chain length. However, when comparing with strains cultured in other mediums (Band-Schmidt *et al.*

las toxinas sulfocarbamatadas seguidas de las carbamatadas, con un cambio en el perfil de las toxinas relacionado con la edad del cultivo y la longitud de las cadenas. Sin embargo, cuando se comparan con cepas cultivadas en medios diferentes (Band-Schmidt *et al.* 2004), las toxicidades encontradas



**Figure 6.** Similarity dendrogram based on the toxin profile (mol %) of *Gymnodinium catenatum* cultivated under different N:P ratios in f/2 medium in batch cultures at different culture age.

**Figura 6.** Dendrograma de similitud basado en el perfil de toxinas (% mol) de *Gymnodinium catenatum* sometido a diversas proporciones de N:P en cultivos de lote con medio f/2 a diferentes edades de cultivo.

2004), the strain used in this study had relatively higher exponential growth rates (table 3).

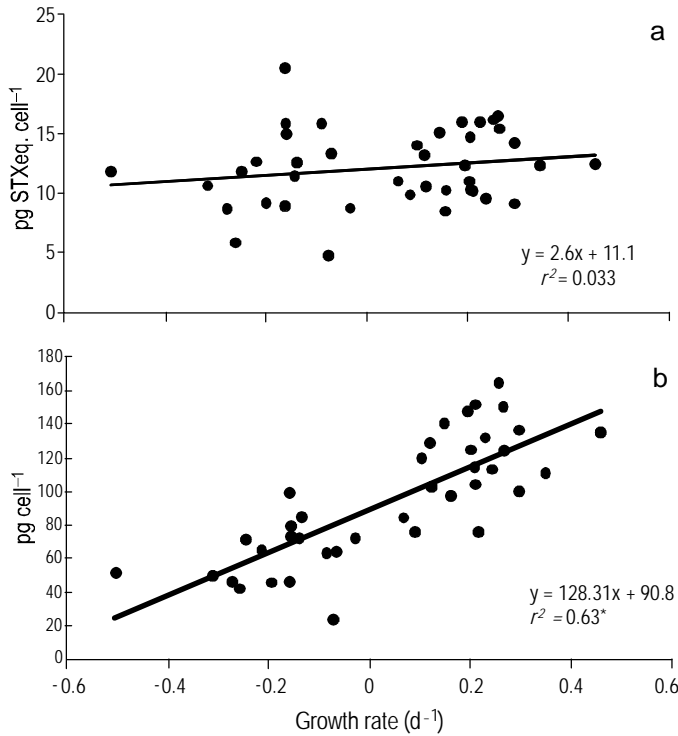
Dinoflagellate species that produce saxitoxin seem to consistently produce higher amounts of toxins on a cell basis during the exponential growth phase (Ianora *et al.* 2006). It remains to be seen if the higher toxin production of *G. catenatum* during exponential growth is important for their proliferation under bloom conditions in the environment as has been suggested by Ianora *et al.* (2006).

Nitrate concentration in the medium diminished almost linearly with culture age even when phosphate was undetected in the medium at the highest N:P ratios used or when it remained almost constant (fig. 2). The opposite, diminishing of phosphate when nitrogen was exhausted, was not observed. Phosphate in the medium decreased at a higher rate in all treatments between days 4 and 8 of culture. In the highest N:P treatment (74.3), phosphate concentration remained constant in the medium after day 8. Both nutrients, nitrogen and phosphate, are related to saxitoxin production in dinoflagellates. Nitrogen can be stored within the vacuole of the cell. Although we did not measure intracellular nitrogen, it is plausible to think that nitrogen from the medium was incorporated by the dinoflagellate and stored or excreted to the medium as free amino acids, as recorded for other

en este estudio fueron relativamente mayores durante las fase exponencial (tabla 3).

Los dinoflagelados productores de toxinas paralizantes parecen tener una producción mayor de toxinas por célula durante la fase exponencial de crecimiento (Ianora *et al.* 2006). Sería interesante ver si esta mayor producción de toxinas encontrada también en *G. catenatum* es un factor determinante para favorecer su proliferación en condiciones naturales como lo ha sugerido Ianora *et al.* (2006).

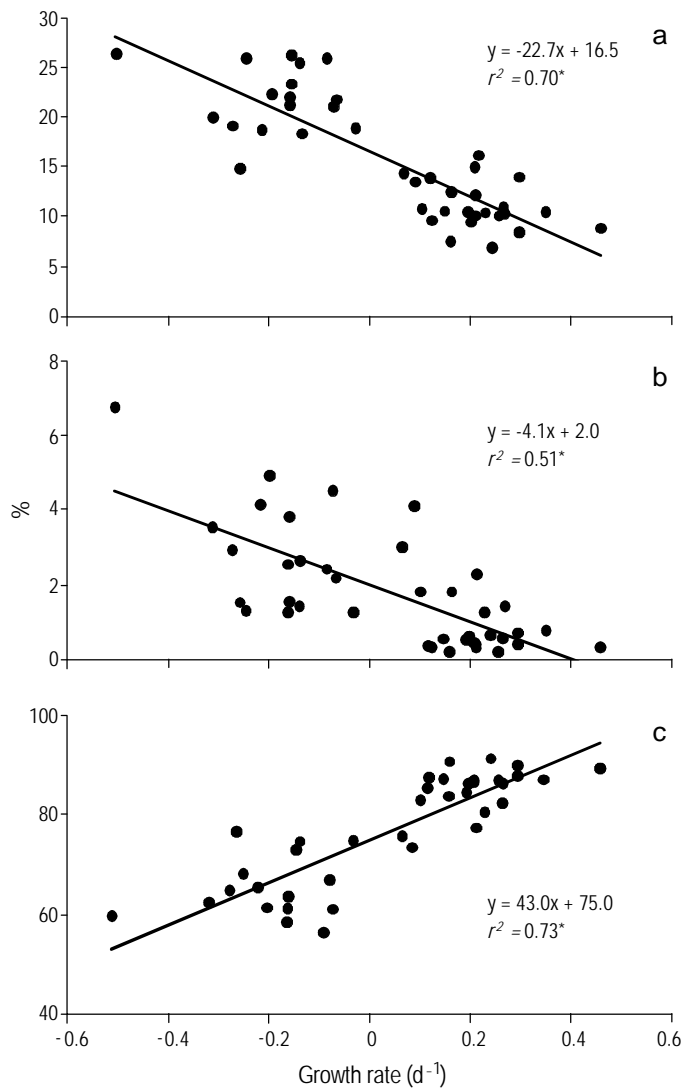
La concentración de nitrato en el medio disminuyó continuamente con la edad del cultivo y continuó disminuyendo aún cuando el fósforo se agotó en el medio en los tratamientos con la mayor proporción de N:P o cuando el fosfato permaneció casi constante (fig. 2). Lo contrario, la disminución de fósforo cuando el nitrógeno se agotó, no se observó. El fosfato del medio disminuyó a una tasa mayor en todos los tratamientos entre el cuarto y el octavo día de cultivo. En el tratamiento de N:P de 74.3, la concentración de fosfato se mantuvo constante después del octavo día. Ambos nutrientes,  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ , están relacionados con la producción de saxitoxina en los dinoflagelados. Una explicación lógica para la disminución continua del nitrógeno del medio podría ser que, debido a que el nitrógeno puede ser almacenado en las vacuolas, éste continuó siendo asimilado por la célula y almacenado para posteriormente ser excretado al medio en forma de aminoácidos libres, como se ha descrito para otras especies de fitoplancton (Zehr y Falkowsky 1988; Flynn *et al.* 1993, 1996). Experimentalmente, también se ha demostrado que, durante la síntesis de toxinas, se puede utilizar nitrógeno celular reciclado y no sólo el nitrógeno inorgánico recientemente incorporado (Anderson *et al.* 1990, John y Flynn 2000). Algunos aminoácidos (licina, arginina, acetato, etc.) forman parte intermedia en la producción de la saxitoxina (Flynn *et al.* 1994, Shimizu 1996, Ishida *et al.* 1998, Kellmann y Neilan 2007), por lo que, bajo estrés de nitrógeno, se puede presentar una disminución de la producción de esta toxina en los dinoflagelados (Flynn *et al.* 1994). También la deficiencia de fósforo en el medio se ha asociado a una alta producción de saxitoxina en los dinoflagelados (Wang y Hsieh 2002). Si bien la saxitoxina y sus análogos no tienen fósforo en su estructura, la enzimas encargadas de la fosforilación (e.g., la carbamoil fosfatasa) y productos metabólicos intermedios en la producción de saxitoxina sí lo contienen, por lo que el estrés de fósforo también puede afectar la producción de éstas toxinas (Flynn *et al.* 1994, Cembella 1998, Kellmann y Neilan 2007). Estos mecanismos de estrés de fósforo y nitrógeno en el metabolismo de la saxitoxina, sin embargo, no son aplicables a todos los dinoflagelados. La disminución de nitrógeno y fósforo del medio demuestran también su alta tasa de afinidad del dinoflagelado hacia estos nutrientes, como lo han registrado Yamamoto *et al.* (2004). En una cepa japonesa de *G. catenatum*, por ejemplo, se encontró una tasa de afinidad de  $6.48 \mu\text{M}$  para el  $\text{NO}_3$  y de  $1.42 \mu\text{M}$  para el  $\text{PO}_4$  (Yamamoto *et al.* 2004). Nuestros resultados no muestran cambios importantes en el contenido



**Figure 7.** Relationship between growth rates (measured every two days) during the experimental period versus (a) toxicity and (b) toxin cell quota. \* Significant relationship.

**Figura 7.** Relación entre las tasas de crecimiento (medido cada dos días) versus (a) la toxicidad y (b) el contenido celular por célula. \* Relación significativa.

phytoplankton species (Zehr and Falkowsky 1988; Flynn *et al.* 1993, 1996). Experimental results have shown that toxins may be synthesized using nitrogen recycled within the cell, rather than solely using inorganic nitrogen taken recently into the cell (Anderson *et al.* 1990, John and Flynn 2000). Some amino acids (lysine, arginine, acetate) are intermediates in the production of saxitoxin (Flynn *et al.* 1994, Shimizu 1996, Ishida *et al.* 1998, Kellmann and Neilan 2007), so cells under N-stress can present a decline in toxin production (Flynn *et al.* 1994). A deficiency of phosphate in the medium has also been related to a decrease in saxitoxin production in dinoflagellates (Wang and Hsieh 2002). Although PSP toxins contain no phosphate in their structure, phosphorylation of enzymes (e.g., carbamoyl phosphate) and metabolic intermediates in saxitoxin production is common, so there must be points at which P-stress can affect toxin metabolism (Flynn *et al.* 1994, Cembella 1998, Kellmann and Neilan 2007). Nonetheless, the response to N- or P-stress/limitation in PSP-producing dinoflagellates is not universal. The high diminishing rate of nitrate and phosphorus from the medium supports the results where high affinity rates of this species towards these nutrients have been demonstrated (Yamamoto *et al.* 2004). A high rate of affinity to  $\text{NO}_3$  (6.48  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{PO}_4$  (1.42  $\mu\text{M}$ ) was recorded for a



**Figure 8.** Relationship between growth rates during the experimental period versus (a) carbamoyl, (b) decarbamoyl, and (c) sulfocarbamoyl toxins. \* Significant relationship.

**Figura 8.** Relación entre las tasas de crecimiento versus las toxinas del grupo (a) carbamatadas, (b) decarbamatadas y (c) sulfocarbamatadas. \* Relación significativa.

celular de toxinas ni en el perfil de éstas, quizás debido a que *G. catenatum* tiene una alta capacidad de almacenar fósforo y nitrógeno bajo condiciones de inanición y emplearlos para mantener el crecimiento y la síntesis de toxinas. Otra posibilidad sería que las toxinas son utilizadas como reservorios de nitrógeno, ya que se observó que cuando el nitrógeno y el fósforo (cultivos viejos) disminuyeron, el contenido celular de toxinas aumentó (Boyer *et al.* 1987).

El contenido celular de toxinas varió en todos los tratamientos, aunque los valores se mantuvieron dentro del intervalo (13–47 pg STXeq. célula<sup>-1</sup>) encontrado en otros estudios para cepas aisladas de la misma área (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2005, 2006). Nuestros resultados difieren de otros

clonal *G. catenatum* strain from Japan (Yamamoto *et al.* 2004). We did not observe important changes in the toxin quota or toxin profile with the different N:P ratios used. Perhaps *G. catenatum* has a high storage capacity for phosphorus and nitrogen under starvation conditions, and these intracellular pools seem to be sufficient for maintaining growth and toxin synthesis. Another possibility is that toxins in this species have a nutrient-storage capability, since the toxin content increases in “old” cultures when the nitrate and phosphate content in the medium has decreased (Boyer *et al.* 1987).

Cell toxin quota oscillated in all treatments but values were within the range (13–47 pg STXeq. cell<sup>-1</sup>) previously recorded for strains of this species isolated from the same area (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2005, 2006). These results differ from studies using other *G. catenatum* strains, where highest toxicity was found with nitrate concentrations between 110 and 220  $\mu\text{m}$  due to a higher production of GTX6 (Reguera and Oshima 1990). The cell toxin quotas found in our study and by others (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2006) are higher than those reported for natural populations that averaged between 1.2 (Gárate-Lizárraga *et al.* 2004) and 10.9 pg STXeq. cell<sup>-1</sup> (Quijano-Scheggia *et al.* 2012). Unlike our findings, it has been established that typically cultured cells of PSP-producing cells of *Alexandrium* species are less toxic than cells from natural populations (White 1986, Cembella *et al.* 1990). According to Cembella (1998), an artifact of “forced growth” by high nutrient conditions, relaxation of selective pressure for high toxin production in natural populations, higher cell division rates (reduction of cell toxin quota), and a genetic drift in culture can be expressed as reduced toxin biosynthetic enzyme activity. More toxicity tests remain to be done in natural populations of the Gulf of California to confirm if the low toxicity recorded under natural conditions is a feature of the “Mexican” *G. catenatum* population or whether those values already reported (Gárate-Lizárraga *et al.* 2004, Quijano-Scheggia *et al.* 2012) are the exception.

Diel variation in toxin content and production has been observed in dinoflagellates (Flynn *et al.* 1996, Taroncher-Oldenburg *et al.* 1997), and it is linked to the early M1 cell cycle phase and triggered by light (Taroncher-Oldenburg *et al.* 1997). It is plausible to suppose that our batch culture samples reflect the toxicity and toxin profiles of cells under different growth phases; however, our comparison among different treatments is valuable since all samples were obtained at the same time of the day. Toxin content was not variable with different N:P rations, supporting the work of Flynn *et al.* (1996) that shows relatively small changes, if any, for a *G. catenatum* strain isolated from Spain, under P- and N-stressed conditions. Toxin profile changes were not observed here, suggesting that the Gulf of California strains showed a similar behavior under the different N:P conditions they were subjected to. Although Flynn *et al.* (1996) also analyzed quantity variation in the toxin profile (mol %), a

estudios, donde se han registrado toxicidades mayores para otras cepas de *G. catenatum* cultivadas en altas concentraciones de nitratos, entre 110 y 220  $\mu\text{m}$ , debido a la alta producción de GTX6 (Reguera y Oshima 1990). La toxicidad por célula, en este y otros estudios (Band-Schmidt *et al.* 2004, 2006), fue mayor que aquellos registrados para poblaciones en condiciones naturales que se encuentran en promedio entre 1.2 (Gárate-Lizárraga *et al.* 2004) y 10.9 pg STXeq. célula<sup>-1</sup> (Quijano-Scheggia *et al.* 2012). A diferencia de estos resultados, se ha encontrado que las células de algunas especies productoras de toxinas paralizantes del género *Alexandrium* en cultivo son menos tóxicas que las de células del medio natural (White 1986, Cembella *et al.* 1990). De acuerdo con Cembella (1998), esto se debe a un artefacto que “fuerza” el crecimiento por la alta concentración de nutrientes, al relajamiento de la presión de selección a una producción de toxinas en condiciones naturales, a la mayor tasa de crecimiento (reducción de la tasa de toxinas o célula) y a la deriva genética en condiciones de cultivo que se expresa en una menor actividad de biosíntesis de las toxinas. En este contexto, se debe realizar un mayor número de mediciones de la toxicidad en condiciones naturales de *G. catenatum* en las costas del golfo de California a fin de probar si la baja toxicidad registrada es una característica de la población “mexicana” o si los valores bajos de toxinas encontrados por Gárate-Lizárraga *et al.* (2004) y Quijano-Scheggia *et al.* (2012) son una excepción.

Las variaciones nictimerales del contenido y producción de toxinas han sido demostradas para los dinoflagelados (Flynn *et al.* 1996, Taroncher-Oldenburg *et al.* 1997), y se han asociado a la fase M1 temprana de la división celular iniciada por la irradiancia (Taroncher-Oldenburg *et al.* 1997). Por ello, es posible suponer que nuestras mediciones en cultivos en lote reflejan la toxicidad y los perfiles de toxinas de las células bajo diversas fases de crecimiento, y que estas mediciones son comparables entre sí debido a que se siempre se muestreó a la misma hora del día. Los resultados del contenido celular de toxinas apoya el trabajo de Flynn *et al.* (1996), quienes también muestran cambios pequeños en este parámetro en una cepa de *G. catenatum* de origen español sometida a estrés de nitrógeno y fósforo. No fueron evidentes los cambios en el perfil de toxinas en nuestros resultados, lo que sugiere que las cepas del “golfo de California” se comportan igual bajo las diferentes condiciones de N:P a las que se sometieron. No es posible hacer una comparación directa de nuestros resultados del perfil de toxinas (% mol) con los de Flynn *et al.* (1996), ya que el factor de respuesta utilizado por estos autores fue el de la saxitoxina para todos los análogos.

Se observaron cambios importantes (tanto en peso como en moles) en todos los tratamientos con la edad de cultivo (fig. 4, 5). El dendrograma de similitud, considerando este parámetro, también agrupó a todos los cultivos hasta el día 8 y a aquellos de entre el día 10 y 16 (fig. 6). Así, el perfil de

direct comparison with our data cannot be done since they calculated concentrations of all toxins with the response factor of the saxitoxin.

Important changes (both in weight and mol %) were observed in all treatments in relation to the culture age (figs. 4, 5). A similarity dendrogram grouped toxin profiles of samples collected during the first 8 days, separating them from those from days 10 to 16 (fig. 6). During the first days of culture, a similar toxin profile in all treatments was observed, but afterwards an increase in carbamoyl and decarbamoyl toxins was observed together with a decrease in sulfocarbamoyl toxins, particularly C1 and C2. This toxin dynamics can be interpreted as a selective elimination of more complex toxins and/or a transformation of more complex B- and C-type toxins (less potent) to less complex but more potent toxins (carbamoyl and decarbamoyl toxins). These findings support that described for other strains of *G. catenatum* isolated from the Gulf of California and cultivated in GSe (Band-Schmidt *et al.* 2006).

Cultures from day 10 onwards presented maximum cell density or were already in the decadence phase (T1 and T2) (fig. 2); these cultures may have suffered from nutrient limitation with a diminished growth rate. This decadence phase may have been concomitant with a decrease in B- and C-type toxins and an increase in the other toxins (figs. 4, 5). Regression and correlation analyses of the growth rates versus average mole percent clearly support this dynamic (fig. 7). This suggests that toxin dynamics may be linked to the growth stage. Our data clearly show that the growth stages of *G. catenatum* do not influence toxicity since it remained almost constant despite the increase in toxin cell quota. This low variation in toxicity seems to be a consequence of the dynamics of the diverse toxins. Low or negative growth induces a higher proportion of the less potent toxins, whereas high growth favors the production of more potent toxins. These data suggest that an increase in the proportion of more potent toxins is triggered by negative or null growth conditions to maintain toxicity.

It is possible that the low variation of toxicity and toxic profiles among the diverse N:P ratios recorded in our study could have been due to the null acclimation period of the strain to each nutrient condition. Hernández-Sandoval (2010), however, acclimated other *G. catenatum* strains from the Gulf of California for at least four cell cycles under diverse N:P ratios and only observed small changes in toxicity and toxin profiles, supporting our data. These results suggest that the N:P ratios tested have no or small effects on the toxicity and toxin profile of *G. catenatum* strains from the Gulf of California.

Although in our study the strain was not pre-adapted to the different treatments, excluding T3, it is plausible to establish that even with pre-adapted organisms our results are representative. As shown for other *G. catenatum* strains (Oshima *et al.* 1993, Flynn *et al.* 1996), the toxicity and toxic profile remained stable regardless of great variation in

toxinas fue similar durante los primeros días de cultivo, pero luego se observó un incremento en las toxinas de los grupos carbamatado y decarbamatado, y una disminución del grupo sulfocarbamatado, en particular la C1 y C2. Esta dinámica sugiere que existe una eliminación selectiva de las toxinas más complejas y/o una transformación de las toxinas más complejas (menos potentes) hacia las menos complejas pero de mayor potencia (toxinas carbamatadas y decarbamatadas). Esto concuerda con otros resultados para otras cepas de *G. catenatum* aisladas del golfo de California y cultivadas en medio GSe (Band-Schmidt *et al.* 2006).

Al décimo día, los cultivos presentaron la densidad celular máxima y algunos se encontraban en la fase de decadencia (T1 y T2) (fig. 2), lo que sugiere una limitación por nutrientes y la consiguiente disminución de la tasa de crecimiento. En esta fase de decadencia se observa la disminución de las toxinas tipo B y C, y el incremento de los otros análogos de la saxitoxina (fig. 4, 5). El análisis de regresión entre las tasas de crecimiento y los porcentajes molares muestra también esta asociación (fig. 7), y sugiere que la dinámica de las toxinas es dependiente de la tasa de crecimiento. Nuestros resultados muestran claramente que, aunque hay una dinámica importante en las toxinas con las fases de crecimiento, la toxicidad se mantiene más o menos constante. Esto pudiera deberse a la dinámica de las toxinas de baja y alta potencia: el bajo o nulo crecimiento induce una baja proporción de las toxinas menos potentes, mientras que con un crecimiento alto se favorece la producción de las toxinas de mayor potencia. Estos resultados también sugieren que el crecimiento bajo o nulo de *G. catenatum* favorece la producción de las toxinas más potentes, manteniéndose una toxicidad relativamente constante.

También es posible que la baja variación en la toxicidad y en el perfil de toxinas observada en este estudio sea una consecuencia del poco tiempo de aclimatación de la cepa a los diversos tratamientos. Sin embargo, Hernández-Sandoval (2010) aclimató otras cepas de *G. catenatum*, aisladas del golfo de California, al menos por cuatro ciclos celulares a varias condiciones de N:P y también observó cambios pequeños en la toxicidad y en el perfil de toxinas. Estos resultados sugieren que *G. catenatum* del golfo de California sometido a cambios en las proporciones de N:P, sólo tienen efectos pequeños en la toxicidad y en el perfil de toxinas.

En síntesis, nuestro estudio muestra que, aunque la cepa no fue adaptada a los diversos tratamientos, excepto T3, nuestros resultados concuerdan con lo demostrado para otras cepas de ésta especie (Oshima *et al.* 1993, Flynn *et al.* 1996), donde se observó que la toxicidad y el perfil de las toxinas sufren pocos cambios. En este trabajo el grupo de las toxinas sulfocarbamatadas fue el más abundante seguido de las carbamatadas (principalmente NeoSTX), y coincide con trabajos previos en los que usaron cepas aisladas del golfo de California (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006). Claramente,

nutrient conditions. In our study, the sulfocarbamoyl toxins were the most abundant followed by the carbamoyl toxins (mainly NeoSTX), coinciding with previously reported profiles for other strains from the Gulf of California (Band-Schmidt *et al.* 2005, 2006). According to our results, *G. catenatum* can grow in a wide range of N:P ratios and maintain moderate growth rates and similar toxicity and toxin profiles. Also, high N:P ratios stimulated the production of higher cell density, in agreement with data recorded in eutrophic natural conditions, suggesting that this species was stimulated under these conditions. Differences in toxin cell quota and toxin composition were only observed for growth rates, whereas toxicity remained constant. Invariable toxicity seemed to be linked to an interconversion or a selective excretion of less potent toxins. Finally, as has been established, there exists a huge variability in physiological and biochemical parameter response for diverse strains of the same species and from the same area (Wood and Leathan 1992, Burkholder and Gilbert 2006, Kodama 2010). Changes in toxicity have been observed even among subclones of *Alexandrium tamarense* (Ogata *et al.* 1987). Therefore, our results should be taken only as a first contribution to the knowledge of the “Mexican” *G. catenatum* response to nutrients. The conservation under laboratory conditions over several years of the *G. catenatum* strain used has to be considered in the interpolation of our results to natural conditions. Concerning the toxin profiles, the presence of NeoSTX should be taken with caution because the post-column oxidation used (Yu *et al.* 1998) is not very efficient in separating dcNeo from NeoSTX (data not shown). Recently, a strain from the Gulf of California was negative for the presence of NeoSTX (Bustillos-Guzmán *et al.* 2011).

Future work on more strains from the same and other areas will be helpful to elucidate a general response pattern, if any, of this species to nutrient variation. In view of the plans for the development of the Gulf of California for recreational and productive purposes, it is to be expected that changes in nutrient inputs in coastal areas will keep occurring, causing imbalance in the N:P ratios.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by several institutional projects (SIP 20110590, CICIMAR-IPN; PC3.1 and PC3.2, CIBNOR), and by the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT projects SEP2007-84064, SNI2008-90102, and 61126). CJBS and IGL acknowledge receipt of COFAA and EDI fellowships. We thank I Fogel and DW Johnson for English language editing, and M Cerro for technical assistance. We also thank the anonymous reviewers for clarifying the statistical analysis and for suggesting modifications to the structure of the paper.

*G. catenatum* puede crecer en un intervalo amplio de proporciones de N:P y mantener un crecimiento moderado y toxicidad similar. También es claro que las tasas altas de N:P pueden estimular la producción de una mayor biomasa celular, lo que coincide con datos del estado nutricional (eutróficos) de los lugares donde prolifera, y sugieren que estas condiciones favorecen su crecimiento. Las diferencias observadas en el perfil de toxinas con la fase de crecimiento parecen deberse a la interconversión o a la excreción selectiva de las toxinas menos potentes. Finalmente, es importante señalar que existen diferencias importantes en muchos parámetros fisiológicos y bioquímicos entre cepas de la misma especie aún siendo aisladas de la misma área (Wood y Leathan 1992, Burkholder y Gilbert 2006, Kodama 2010). Más aún, se han observado cambios importantes en la toxicidad a nivel de subcepas de *Alexandrium tamarense* (Ogata *et al.* 1987). Por lo tanto, nuestros resultados deben verse sólo como una contribución al conocimiento de la respuesta de la cepa “mexicana” de *G. catenatum* a los nutrientes. También el mantenimiento de esta cepa en condiciones de laboratorio por varios años tiene que tomarse en consideración para la inferencia de nuestros resultados a condiciones naturales. Con respecto a la presencia de neosaxitoxina, ésta también debe considerarse de manera tentativa ya que el método usado (Yu *et al.* 1998) no es tan eficiente en la separación de NeoSTX de la dcNEO (datos no mostrados). Recientemente, se encontró que una cepa del golfo de California no presentó neosaxitoxina (Bustillos-Guzmán *et al.* 2011).

El trabajo futuro en mayor número de cepas de la misma zona y otras áreas será útil para generar un patrón de respuesta, si es que lo tiene, de *G. catenatum* a la variación de los nutrientes. Con los planes de desarrollo del golfo de California para uso recreacional y de producción acuícola, podrían esperarse cambios en los flujos de nutrientes en las áreas costeras y, por lo tanto, en los balances de nitrógeno y fósforo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el soporte financiero de proyectos institucionales (SIP 20110590, CICIMAR-IPN; PC3.1 y PC3.2, CIBNOR) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyectos SEP2007-84064, SNI2008-90102 y 61126). CJBS y IGL son becarios COFAA y EDI. Los autores agradecen a I Fogel y DW Johnson su ayuda en la edición en inglés de este trabajo, y a M Cerro su ayuda en el laboratorio. Agradecemos también a los revisores anónimos su ayuda para definir el análisis estadístico de los datos y su sugerencia sobre la reestructuración del artículo.

## REFERENCES

- Alonso-Rodríguez R. 1998. Mareas rojas y su relación con la calidad del agua en la porción sur de la Bahía de Mazatlán, Sin., México. MSc thesis, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 165 pp.
- Alonso-Rodríguez R. 2004. Hidrología y condiciones ambientales que determinan la proliferación de dinoflagelados causantes de marea roja en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. PhD thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México, 117 pp.
- Alonso-Rodríguez R, Ochoa JL. 2004. Hydrology of winter-spring "red tides" in Bahía de Mazatlán, Sinaloa, Mexico. *Harmful Algae* 3: 163–171.
- Álvarez-Borrego S, Lara-Lara JR. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. In: Dauphin JP, Simoneit B (eds.), *The Gulf and Peninsular Provinces of the Californias*. Am. Assoc. Petrol. Geol. Mem. 47, pp. 555–567.
- Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Hall S, Lee C. 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* 104: 511–524.
- Band-Schmidt CJ, Morquecho L, Lechuga-Devéze C, Anderson DM. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California. *J. Plank. Res.* 26: 1459–1470.
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, Lechuga-Devéze CH, Reinhard K, Luckas B. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G. B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae* 4: 21–31.
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, Morquecho L, Gárate-Lizárraga I, Alonso-Rodríguez R, Reyes-Salinas A, Erler K, Luckas B. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from the Gulf of California, Mexico. *J. Phycol.* 42: 757–768.
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán JJ, López-Cortés DJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vázquez EJ, Hernández-Sandoval FE. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A review. *Mar. Drugs* 8: 1935–1961.
- Boyer GL, Sullivan JJ, Andersen RJ, Harrison PJ, Taylor FJR. 1987. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* 96: 123–128.
- Bravo I, Reguera B, Fraga S. 1990. First report of *Gymnodinium catenatum* Graham on the Spanish Mediterranean coast. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 449–452.
- Burkholder JM, Gilbert PM. 2006. Intraspecific variability: An important consideration in forming generalizations about toxigenic algal species. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 28: 177–180.
- Bustillos-Guzmán J, Vale P, Band-Schmidt CJ. 2011. Presence of benzoate-type toxins in *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Mexican Pacific. *Toxicon* 57: 922–926.
- Cembella AD. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (eds.), *Physiology and Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series G 41, pp. 381–403.
- Cembella AD, John U. 2006. Molecular physiology of toxin production and growth regulation in harmful algae. In: Granéli E, Turner JT (eds.), *Ecology of Harmful Algae*, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 215–227.
- Cembella AD, Destombe C, Turgeon J. 1990. Toxin composition of alternative life history of *Alexandrium excavatum*, as determined by high-performance liquid chromatography. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 333–338.
- Cortés-Altamirano R, Núñez-Pasten A. 1991. Registros de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México (1985–1990). *Rev. Invest. Cient. Univ. Autón. Baja Calif. Sur* 2: 44–55.
- Cortés-Altamirano R, Núñez-Pasten A. 1992. Doce años (1979–1990) de registros de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Inst. Cienc. Mar. Limnol. Univ. Nac. Autón. Mex.* 19: 113–121.
- Doblin MA, Blackburn SI, Hallegraeff GM. 2000. Intraspecific variation in the selenium requirement of different geographic strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *J. Plankton Res.* 22: 421–432.
- Flynn K, Flynn KJ, Jones KJ. 1993. Intracellular amino acids in dinoflagellates: Effects of diurnal changes in light and N-supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 245–252.
- Flynn K, Franco JM, Fernández P, Reguera B, Zapata M, Wood G, Flynn KJ. 1994. Changes in the toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorous stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111: 99–109.
- Flynn KJ, Flynn K, John EH, Reguera B, Reyero ML, Franco JM. 1996. Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. *J. Plankton Res.* 18: 2093–2111.
- Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán JJ, Alonso-Rodríguez R, Luckas B. 2004. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 378–402.
- Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán JJ, Morquecho L, Band-Schmidt CJ, Alonso-Rodríguez R, Releer K, Luckas B, Reyes-Salinas A, Góngora-González DT. 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 208–236.
- Gárate-Lizárraga I, Band-Schmidt CJ, Grayeb-del Alamo T. 2009. A multi-species microalgae bloom in Bahía de La Paz, Gulf of California, Mexico (June 2008). *Oceanides* 24: 15–29.
- García de La Parra LM. 1995. Estimaciones de tasas de fijación de nitrógeno atmosférico en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. MSc thesis, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 100 pp.
- Guillard RRL. 1973. Division rates. In: Stein JR (ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, London, pp. 289–311.
- Hernández-Sandoval F. 2010. Efecto de la razón N:P en el crecimiento y toxicidad de *Gymnodinium catenatum* del Golfo de California. Ph.D. Thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, La Paz, 107 pp.
- Hernández-Sandoval FE, López-Cortés DJ, Band-Schmidt CJ, Gárate-Lizárraga I, Núñez-Vázquez EJ, Bustillos-Guzmán JJ. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de la Paz, México. *Hidrobiológica* 19: 245–256.
- Hodgkiss IJ, Ho KC. 1997. Are changes in N:P ratios in coastal waters the key to increased red tide blooms? *Hydrobiologia* 352: 141–147.
- Holmes MJ, Bolch CJS, Green DH. 2002. Singapore isolates of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) produce



- a unique profile of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 38: 96–106.
- Hummert C, Ritscher M, Reinhardt K, Luckas B. 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia* 45: 312–316.
- Ianora A, Boersma M, Casotti R, Fontana A, Harder J, Hoffmann F, Pavia H, Potin P, Poulet SA, Toth G. 2006. The H.T. Odum Synthesis Essay. New trends in marine chemical ecology. *Estuar. Coasts* 29: 531–551.
- Ishida Y, Uchida A, Sako Y. 1998. Genetic and biochemical approaches to PSP toxin production of toxic dinoflagellates. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series G 41, pp. 49–58.
- John EH, Flynn KJ. 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): The effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *Eur. J. Phycol.* 35: 11–23.
- Kellmann R, Neilan BA. 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. *J. Phycol.* 43: 497–508.
- Kodama M. 2010. Paralytic shellfish poisoning toxins: biochemistry and origin. *Aqua-BioSciences monographs* 3: 1–38.
- Lancelot C, Billen G, Sourmiana D, Weisse T, Colijn F, Veldhuis M, Davies D, Wassmann P. 1987. *Phaeocystis* blooms and nutrient enrichment in the coastal zones of the North Sea. *Ambio* 16: 38–40.
- Licea S, Gómez-Aguirre S, Cortés-Altamirano R. 1999. Notas sobre algunos florecimientos algales y la presencia de especies tóxicas en cinco localidades del Pacífico mexicano (1996–1999). In: Tresierra-Aguilar AE, Culquichicón-Malpica ZG (eds.), VIII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar, pp. 335–337.
- López-Cortés DJ, Bustillos-Guzmán JJ, Gárate-Lizárraga I. 2006. Unusual mortality of krill (Crustacea: Euphausiacea) in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Pac. Sci.* 60: 235–242.
- McAleece N. 1997. BioDiversity Professional V2. The Natural History Museum and the Scottish Association for Marine Science. Available at <http://www.nrmc.demon.co.uk/bdpro/>.
- Mee LD, Espinosa M, Díaz G. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Environ. Res.* 19: 77–92.
- Miranda A, Voltolina D, Frías-Espéricueta MG, Izaguirre-Fierro G, Rivas-Vega ME. 2009. Budget and discharges of nutrients to the Gulf of California of a semi-intensive shrimp farm (NW Mexico). *Hidrobiológica* 19: 43–48.
- Morales-Blake A, Hernández-Becerril DU, Cavazos-Guerra C. 2000. Registros de mareas rojas en las bahías de Manzanillo, Colima, México. In: Ríos-Jara E, Juárez-Carrillo E, Pérez-Peña M (eds.), *Estudios sobre Plancton en México y El Caribe*. Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara, pp. 81–82.
- Negri AP, Bolch CJS, Blackburn SI. 2001. Paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum* strains from six countries. In: Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ (eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 210–213.
- Ogata T, Kodama M, Ishimaru T. 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 25: 923–928.
- Oshima Y, Blackburn SI, Hallegraeff GM. 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.* 116: 471–476.
- Páez-Osuna F. 2001. Flujos y balance de masas de nutrientes en estanques camaronícolas. In: Páez-Osuna F (ed.), *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, pp. 176–192.
- Quijano-Scheggia S, Olivos-Ortiz A, Bustillos-Guzmán JJ, Garcés E, Gaviño-Rodríguez JH, Galicia-Pérez MA, Patiño-Barragan M, Band-Schmidt CJ, Hernández-Sandoval FJ, López-Cortés DJ. 2012. Bloom of *Gymnodinium catenatum* in Bahía Santiago and Bahía Manzanillo, Colima, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 60:173–186.
- Reguera B, Oshima Y. 1990. Response of *Gymnodinium catenatum* to increasing levels of nitrate: Growth patterns and toxicity. In: Granéli E, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 316–319.
- Saldate-Castañeda O, Vázquez-Castellanos JL, Sánchez-Anguiano A. 1990. Intoxicación por toxina paralizante de moluscos en México. In: Comisión Interministerial de Guatemala para la Vigilancia de la Marea Roja, Guatemala. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (Eds.), *Seminario-taller sobre intoxicación paralítica por mariscos (marea roja) para Centro América, México, Cuba y República Dominicana*. pp. 61–64.
- Saldate-Castañeda O, Vázquez-Castellanos JL, Galván J. 1991. Poisoning from paralytic shellfish toxins in Oaxaca, Mexico. *Sal. Púb. Méx.* 33: 240–247.
- Shimizu Y. 1996. Microalgal metabolites: A new perspective. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 431–465.
- Strickland JDH, Parsons TR. 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Canada, Ottawa, 310 pp.
- Taroncher-Oldenburg G, Kulis DM, Anderson DM. 1997. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1178–1188.
- Vidussi F, Claustre H, Bustillos-Guzmán JJ, Cailleau C, Marty JC. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll *a* from divinyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.* 18: 2377–2382.
- Wang DZ, Hsieh DPH. 2002. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarensis* CI01 in culture. *Mar. Pollut. Bull.* 45: 286–289.
- White AW. 1986. High toxin content in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in nature. *Toxicon* 24: 605–610.
- Wood AM, Leathan T. 1992. The species concept in phytoplankton ecology. *J. Phycol.* 28: 723–729.
- Yamamoto T, Oh SJ, Kataoka Y. 2004. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 70: 108–115.
- Yu RC, Hummert C, Luckas B, Qian PY, Zhou MJ. 1998. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia* 48: 671–676.
- Zehr JP, Falkowsky P. 1988. Pathway of ammonium assimilation in marine diatom determined with the radiotracer <sup>13</sup>N. *J. Phycol.* 24: 588–591.
- Zeitzschel B. 1969. Primary productivity in the Gulf of California. *Mar. Biol.* 3: 201–207.

Received December 2010,  
received in revised form November 2011,  
accepted November 2011.