

## Efecto del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* sobre el consumo, la producción de huevos y la tasa de eclosión del copépodo *Acartia clausi*

### Effect of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on the grazing, egg production, and hatching success of the copepod *Acartia clausi*

Ricardo Palomares-García<sup>1\*</sup>, José Bustillos-Guzmán<sup>2</sup>, Christine J Band-Schmidt<sup>1</sup>, David López-Cortés<sup>2</sup>, Bernd Luckas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Plancton y Ecología Marina, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, Apartado postal 592, La Paz, BCS, México. \* E-mail: rpalomar@ipn.mx

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Apartado postal 128, La Paz CP 23090, BCS, México

<sup>3</sup> Department of Food Chemistry, Faculty of Biology and Pharmacy, Friedrich-Schiller University, Dornburgerstra 25, 07743 Jena, Germany

#### Resumen

En este estudio se analiza la influencia de *Gymnodinium catenatum* Graham sobre la reproducción del copépodo *Acartia clausi* Giesbrecht. Se seleccionaron hembras maduras de *A. clausi* y se alimentaron con una mezcla de fitoplancton natural y *G. catenatum* en proporciones de 100:0%, 75:25%, 50:50%, 25:75% y 0:100%, respectivamente. Se evaluó el tipo y concentración de toxinas en la cepa de *G. catenatum* utilizada. No se detectaron efectos adversos ni parálisis de los copépodos alimentados con el dinoflagelado tóxico. La ingestión y la tasa de producción de huevos fueron mayores en el cultivo puro alimentado exclusivamente con el dinoflagelado *G. catenatum*. No se detectó una diferencia significativa en el porcentaje de eclosión y éste siempre se mantuvo por arriba del 90%. *Acartia clausi* es la especie más ampliamente distribuida en Bahía Concepción y nuestros resultados indican que es capaz de alimentarse con este tipo de dinoflagelados tóxicos, a tasas similares o aún mayores a las que se alimenta del fitoplancton natural. Por lo anterior, *A. clausi* podría jugar un papel preponderante en el control de la aparición de las mareas rojas en Bahía Concepción.

*Palabras clave:* toxinas PSP, dinoflagelados, copépodos, Bahía Concepción.

#### Abstract

The influence of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham on the reproductive response of the calanoid copepod *Acartia clausi* Giesbrecht was examined. Mature females of *A. clausi* were selected and fed a mixture of natural phytoplankton and *G. catenatum* in nominal ratios of 100:0%, 75:25%, 50:50%, 25:75%, and 0:100%, respectively. The concentration and type of toxins of the *G. catenatum* strain used were evaluated. The ingestion of *G. catenatum* did not produce either adverse effects nor incapacitation of *A. clausi*. Ingestion and egg production rates were not diminished by *G. catenatum* and were highest at the 0:100% ratio. Egg hatching rates were similar (>90%) for all diets. *Acartia clausi* is an ubiquitous copepod in Concepción Bay (Baja California Sur, Mexico), and our results indicate that it was able to feed on this toxic dinoflagellate at rates similar or higher than those at which it feeds on natural phytoplankton; therefore, *A. clausi* could play a key role in controlling the occurrence of red tides in Concepción Bay.

*Key words:* PSP toxins, dinoflagellate, copepod, Concepción Bay.

#### Introducción

El conocimiento de la aparición de mareas rojas en México se remonta a más de dos siglos (Cortés-Altamirano 1987). En el Golfo de California son comunes este tipo de eventos, y a lo largo de la costa peninsular se ha documentado la presencia recurrente de mareas rojas producidas por especies no tóxicas (Morquecho-Escamilla *et al.* 2000, Gárate-Lizárraga *et al.* 2001). Durante el otoño e invierno en Bahía Concepción, en el Golfo de California, son frecuentes las proliferaciones de *Noctiluca scintillans*, pero durante la época fría (invierno y primavera) se ha detectado la presencia de algunos productores de toxinas paralizantes (ó PSP, por sus siglas en inglés) como

#### Introduction

Red tides off the coast of Mexico have been known to occur for more than two centuries. The first reports dealing with the occurrence of red tides off the Pacific coast of Mexico appeared more than two decades ago (Cortés-Altamirano 1987). These events are common in the Gulf of California and along the coast of the Baja California Peninsula, where most red tides have been caused by non-toxic species (Morquecho-Escamilla *et al.* 2000, Gárate-Lizárraga *et al.* 2001). In Concepción Bay (Gulf of California), red tides of *Noctiluca scintillans* frequently occur during autumn and winter, but during winter and spring several species that produce paralytic

*Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium catenella* (Verdugo-Díaz 1997, Gárate-Lizárraga *et al.* 2001, Góngora-González 2001). En los meses comprendidos entre marzo y agosto se ha documentado la presencia de toxinas paralizantes asociadas con la presencia de *G. catenatum*, en muestras de fitoplancton de red y de almejas (Mee *et al.* 1986, Gárate-Lizárraga *et al.* 2002, Band-Schmidt *et al.* 2005).

Por su abundancia el grupo de los copépodos es uno de los principales consumidores de fitoplancton y por tanto, estos organismos son potenciales consumidores de las especies de dinoflagelados que producen toxinas (Turner y Tester 1997). En Bahía Concepción, el copépodo calanoide *Acartia clausi* es la especie dominante y generalmente representa más del 50% de la comunidad de copépodos a lo largo del año, alcanzando su máxima abundancia a finales del invierno (Palomares-García *et al.* 2002). Esto implica que existe una coincidencia entre los máximos de abundancia de esta especie y una mayor presencia de dinoflagelados en particular de la especie productora de toxinas PSP *G. catenatum*. Con objeto de explorar si esta coincidencia en los máximos poblacionales de ambas especies pudiera traducirse en una presión de pastoreo y un probable control del copépodo sobre *G. catenatum*, se diseñó un experimento para probar si *A. clausi* era capaz de consumir este dinoflagelado y si la ingestión de las toxinas produciría cambios en su tasa de mortalidad, producción de huevos y el porcentaje de eclosión de los mismos.

## Material y métodos

### Cultivo de fitoplancton

Las cepas utilizadas fueron aisladas a partir de material recolectado en Bahía Concepción (Band-Schmidt *et al.* 2004) y cultivado en el laboratorio de cultivo de algas de CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste). Entre 16 posibles, se seleccionó la cepa GCCV-14 para ser utilizada en estos experimentos debido su alto contenido de toxinas, 60.3 pgSTX equivalentes  $\text{cél}^{-1}$  (Band-Schmidt *et al.* 2004). Esta cepa fue cultivada en frascos de 2 L utilizando medio marino f/2 modificado (Guillard 1975). Se le adicionó  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  ( $10^{-8}$  M), y se redujo la concentración de  $\text{CuSO}_4$  a  $10^{-8}$  M (Anderson *et al.* 1984). Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas, a una salinidad de 33–34 ups y  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura, con un régimen de iluminación de 12:12 h de luz/obscuridad utilizando una iluminación de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los cultivos fueron cosechados en la fase de crecimiento exponencial y se tomaron muestras de 10 mL del cultivo puro para evaluar el contenido de toxinas.

La extracción de toxinas se llevó a cabo mediante el filtrado de 10 mL del cultivo de *G. catenatum* en filtros GF/F, a los cuales se adicionó 1 mL de ácido acético (0.03 N), para después someterlos a sonicación (35 KHz) por 5 min en un baño con hielo, centrifugando a 1008.9 g por otros 5 min en una centrífuga refrigerada, para luego filtrar el sobrenadante con un filtro desechable ( $0.45 \mu\text{m}$ ). Posteriormente se hidrolizó

shellfish poisoning (PSP) toxins have been detected, including *Gymnodinium catenatum* y *Alexandrium catenella* (Verdugo-Díaz 1997, Gárate-Lizárraga *et al.* 2001, Góngora-González 2001). From March to August, paralytic toxins associated with *G. catenatum* have been detected in phytoplankton and scallop flesh samples (Mee *et al.* 1986, Gárate-Lizárraga *et al.* 2002, Band-Schmidt *et al.* 2005).

Copepods are one of the most important groups that prey on phytoplankton and are therefore potential grazers of toxic dinoflagellates (Turner and Tester 1997). In Concepción Bay, *Acartia clausi* generally represents more than 50% of the copepod community throughout the year, reaching maximum abundance in winter (Palomares-García *et al.* 2002). Coincident copepod and dinoflagellate abundances suggest that *A. clausi* grazes on dinoflagellates, including toxic species like the PSP producer *G. catenatum*, and is thus controlling their proliferation. To explore this possibility, the calanoid copepod *A. clausi* was fed *G. catenatum* to determine whether it grazes on this toxic dinoflagellate and, if so, to evaluate the effect on its mortality, egg production, and hatching success.

## Material and methods

### Phytoplankton culture

Cultures were isolated from Concepción Bay (Band-Schmidt *et al.* 2004) and maintained in the algal culture laboratory at CIBNOR (Biological Research Center of the Northwest, Mexico). *Gymnodinium catenatum* strain GCCV-14, with toxicity of 60.3 pgSTX equivalents  $\text{cell}^{-1}$ , was selected for this study since it was the most toxic of 16 strains tested (Band-Schmidt *et al.* 2004). The isolated algae were cultured in 2-L flasks containing f/2 medium (Guillard 1975), modified by adding  $\text{H}_2\text{SeO}_3$  ( $10^{-8}$  M), and reducing the  $\text{CuSO}_4$  concentration to  $10^{-8}$  M (Anderson *et al.* 1984). Cultures were kept in seawater at 33–34 psu, controlled at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  12:12 h light/dark cycle, with overhead illumination of  $150 \text{mE m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cultures were harvested at the mid-exponential growth stage and 10-mL aliquots of culture were used for PSP toxin analysis.

Toxins were extracted by adding 1 mL acetic acid (0.03 N) to GF/F filters containing 10 mL *G. catenatum* cells, sonicating (35 kHz) for 5 min in an ice bath, centrifuging at 1008.9 g for 5 min, and filtering the supernatant with a disposable syringe-filter ( $0.45 \mu\text{m}$ ). A 150- $\mu\text{L}$  aliquot of clarified extract was hydrolyzed with 37  $\mu\text{L}$  of HCl (1 M). Finally, 10  $\mu\text{L}$  of the two extracts with and without hydrolysis were injected into an HPLC system. Chromatography was performed according to recently published articles (Hummert *et al.* 1997, Yu *et al.* 1998).

### Grazing, egg production, and hatching experiments

Two experiments were carried out, one in December 2001 and the other in March 2002. Mean sea surface temperature

una alícuota de 150 µL del extracto clarificado con 37 µL de HCl (1M). Finalmente se analizaron 10 µL de ambos extractos (con y sin hidrólisis) en un cromatógrafo de líquidos (HPLC). Las toxinas se separaron por cromatografía de líquidos y se detectaron por fluorescencia de acuerdo con Hummert *et al.* (1997) y Yu *et al.* (1998).

#### *Experimentos de pastoreo, producción de huevos y éxito de eclosión*

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno en diciembre de 2001 y otro en marzo de 2002. En ambos la temperatura media fue similar y varió en un intervalo de 19 a 20°C en diciembre y de 20 a 21°C en marzo.

El zooplancton fue recolectado utilizando una red de 333 µm de luz de malla, haciendo arrastres superficiales en la región central de Bahía Concepción. El zooplancton recolectado se transfirió a hieleras con agua filtrada del lugar y éstas fueron transportadas al laboratorio, para después separar a los copépodos utilizando un microscopio estereoscópico. Los ejemplares utilizados en el experimento se mantuvieron en aclimatación durante 2 h en agua de mar filtrada (GF/F), a la temperatura que fueron recolectados.

En el primer experimento se utilizó una densidad de *G. catenatum* de 66,000 cél L<sup>-1</sup>, mientras que en el segundo experimento la densidad fue de 151,800 cél L<sup>-1</sup>. Se utilizaron mezclas de alimento con diferentes proporciones de fitoplancton natural y cultivo de *G. catenatum* en proporciones de 100:0%, 75:25%, 50:50%, y 0:100% (tres réplicas por tratamiento más dos controles sin copépodos). Se filtró una muestra inicial de cada uno de los frascos experimentales y testigos para el análisis de huellas pigmentarias. Todos los frascos experimentales y testigos fueron incubados por 24 h a la misma temperatura en que fueron recolectados los organismos del medio (21 ± 1°C para diciembre y 22 ± 1°C en marzo). La cantidad de alimento ingerido durante el periodo de incubación se calculó a partir de los cambios observados en las principales huellas pigmentarias, utilizando la siguiente expresión (Frost 1972):

$$I_p \text{ (ng copépodo}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (P_0 - (P_t \times f)) / n$$

donde  $I_p$  = pigmento ingerido,  $P_0$  = concentración del pigmento al tiempo 0 (ng),  $P_t$  = concentración del pigmento al final de la incubación (ng),  $f$  = cambio relativo del pigmento en los frascos control ( $P_t/P_0$ ), y  $n$  = número de copépodos.

Para los experimentos de producción de huevos y éxito de eclosión, se prepararon mezclas de alimento en las mismas proporciones utilizadas en los experimentos de pastoreo. Se seleccionaron dos hembras saludables para ser incubadas en cada mezcla de alimento en 15 frascos de 250 mL. Se contaron los huevos producidos en cada frasco, se volvieron a incubar por otras 24 h en agua de mar filtrada (GF/F) y al término del periodo de incubación fueron contados de nuevo. El éxito de eclosión se determinó, haciendo un recuento de huevos y

was similar in both months, ranging from 19°C to 20°C in December and from 20°C to 21°C in March.

Zooplankton was collected in a 363-µm-mesh net by surface water tows in the middle of Concepción Bay, transferred to coolers filled with *in situ* surface water, and transported to the laboratory. Zooplankton was sorted and preconditioned at *in situ* temperature for 2 h in filtered (GF/F) seawater.

In the first experiment, *G. catenatum* cultures yielded a density of only 66,000 cells L<sup>-1</sup>, which was 2.3 times lower than that used in the second experiment (151,800 cells L<sup>-1</sup>). Food suspensions for grazing and egg production/hatching experiments consisted of a mixture of field phytoplankton and *G. catenatum*, in nominal ratios of 100:0%, 75:25%, 50:50%, and 0:100%, respectively (three replicates per treatment plus two controls lacking copepods). An initial sample of each treatment was GF/F-filtered for pigment analysis (see below). All experimental and control samples of each food suspension were incubated for 24 h at the temperature of the collection area (21 ± 1°C for December and 22 ± 1°C for March). Copepod ingestion over the incubation period was calculated using changes in the pigment signature of the main phytoplankton groups in the diets offered using the following expression (Frost 1972):

$$I_p \text{ (ng copepod}^{-1} \text{ d}^{-1}) = (P_0 - (P_t \times f)) / n$$

where  $I_p$  is the ingested pigment,  $P_0$  is the pigment concentration at time zero (ng),  $P_t$  is the pigment concentration at the end of the incubation time (ng),  $f$  is the relative pigment change in the control flasks ( $P_t/P_0$ ), and  $n$  is the number of copepods.

Samples for egg production/hatching experiments were prepared from each food suspension that was used in the grazing experiments. Two healthy females were sorted into fresh aliquots of each type of food suspension in 15 clear plastic jars of 250 mL. Eggs were counted and returned to incubation for an additional 24 h and then recounted. Hatching success was determined by subtracting the number of eggs remaining on the second day from the number present on the first day.

To evaluate the quality of natural phytoplankton, three different concentrations of natural phytoplankton were prepared, duplicating and quadruplicating the normal conditions by reverse filtration, following the same protocol for egg production experiments.

#### *Pigment analysis*

Pigments were identified and quantified by HPLC using known standards and following the method of Vidussi *et al.* (1996). Main diet pigments were identified through retention times and spectral characteristics, and quantified using the pigment response factor (Mantoura and Repeta 1997) obtained from commercial pigment standards (International Agency for <sup>14</sup>C determinations, Denmark). Peridinin, fucoxanthin, zeaxanthin, and chlorophyll *b* were used as signatures of

nauplios al final del segundo día y comparándolo con los huevos contados durante el primer día.

Con objeto de valorar la calidad alimenticia del fitoplancton natural, se prepararon tres diferentes concentraciones de fitoplancton natural, duplicando y cuadruplicando mediante filtración inversa, la concentración observada en el campo, siguiendo el mismo protocolo utilizado para los experimentos de producción de huevos.

#### Análisis de pigmentos

Las huellas pigmentarias fueron identificadas y cuantificadas por cromatografía de líquidos, utilizando estándares comerciales y siguiendo el método propuesto por Vidussi *et al.* (1996). Para la identificación de los principales pigmentos se consideraron los tiempos de retención, las características espectrales de estándares comerciales (Agencia Internacional para determinaciones de  $^{14}\text{C}$ , Dinamarca). La cuantificación se realizó utilizando los factores de respuesta de cada pigmento de acuerdo con Mantoura y Repeta (1997). La peridina, la fucoxantina, la zeaxantina, y la clorofila *b* fueron consideradas como huellas pigmentarias de dinoflagelados, diatomeas, cianobacterias y clorofitas, respectivamente (Bustillos-Guzmán *et al.* 1995, López-Cortés *et al.* 2003).

#### Análisis estadístico

Con objeto de probar si existía un efecto sobre la producción de huevos del copépodo *A. clausi*, derivado del consumo de dinoflagelados productores de toxinas PSP, se aplicó un análisis de varianza a los resultados de ambos experimentos, utilizando un nivel de probabilidad de 0.05. Se aplicó además una prueba *a posteriori* de Tukey-Kramer para probar si las diferencias encontradas entre los diferentes grupos de muestras cumplían con la mínima diferencia significativa con una probabilidad de 0.05 (Sokal y Rohlf 1981).

#### Resultados

El contenido y tipo de toxinas de *G. catenatum* fue el mismo en ambos periodos experimentales (dcSTX = 77 pg  $\text{cél}^{-1}$ ; dcGTX2 = 104 pg  $\text{cél}^{-1}$ ; dcGTX3 = 35 pg  $\text{cél}^{-1}$ ; C1 = 152 pg  $\text{cél}^{-1}$ ; C2 = 38 pg  $\text{cél}^{-1}$ ), registrándose un grado de toxicidad total de 63 pgSTXeq.  $\text{cél}^{-1}$ . Se observaron altas concentraciones de toxinas sulfocarbamoiladas (C1 y C2) y decarbamoiladas (dc STX, dcGTX2 y dcGTX3), características de las poblaciones de *G. catenatum* en el área (Band-Schmidt *et al.* 2005). En ambos experimentos el fitoplancton del medio mostró una composición pigmentaria semejante, aunque el contenido de peridina (dinoflagelados) y clorofila *b* (clorofitas) fue mayor en el primer experimento, en tanto que la fucoxantina (diatomeas) y la zeaxantina (cianobacterias) fueron las huellas pigmentarias más abundantes en el segundo experimento (tabla 1). La mortalidad de copépodos fue baja en

dinoflagelates, diatoms, cyanobacteria, and chlorophytes, respectively (Bustillos-Guzmán *et al.* 1995, López-Cortés *et al.* 2003).

#### Statistical analysis

To determine whether the egg production rate of *A. clausi* is affected by the ingestion of the PSP producer (*G. catenatum*), an ANOVA with a probability of 0.05 was applied to the results of both experiments. Additionally, the *post hoc* Tukey-Kramer test ( $P = 0.05$ ) was used to test for differences in the results of both experiments (Sokal and Rohlf 1981).

#### Results

The content and type of toxins of *G. catenatum* was the same in both experiments (dcSTX = 77 pg  $\text{cell}^{-1}$ , dcGTX2 = 104 pg  $\text{cell}^{-1}$ , dcGTX3 = 35 pg  $\text{cell}^{-1}$ , C1 = 152 pg  $\text{cell}^{-1}$ , and C2 = 38 pg  $\text{cell}^{-1}$ ). The total toxicity was 63 pgSTX eq.  $\text{cell}^{-1}$ , and the high concentrations of decarbamoyl (C1 and C2) and N-sulfocarbamoyl toxins (dcSTX, dcGTX2 and dcGTX3) were characteristic of *G. catenatum* strains from the area (Band-Schmidt *et al.* 2004).

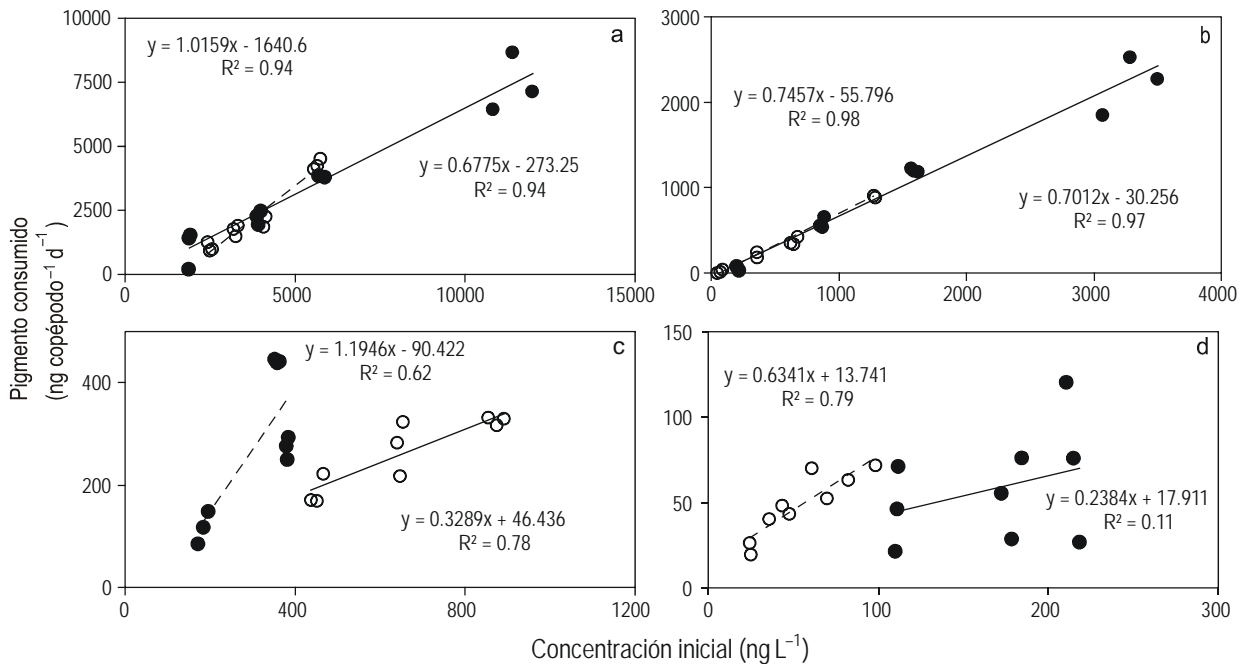
The field phytoplankton in both experiments showed similar pigment signatures, but the composition in the first experiment was richer in peridinin (dinoflagellates) and chlorophyll *b* (chlorophytes), while fucoxanthin (diatoms) and zeaxanthin (cyanobacteria) dominated in the second experiment (table 1). Copepod mortality was low in both grazing experiments: only one dead copepod was observed in each.

Although the *G. catenatum* density in the first experiment was 2.3 times lower than that in the second, a linear relationship between the experimental food concentration and the food ingested was observed in both experiments (fig. 1a). The copepods ingested a similar proportion of the peridinin offered in both experiments (fig. 1b). The same was observed for fucoxanthin (fig. 1c), but more variation was observed in the case of chlorophyll *b* (fig. 1d). In both experiments, zeaxanthin concentration increased (data not shown), suggesting that the zeaxanthin group was not grazed by *A. clausi*.

Egg production was lower in the control experiments (supplied only field phytoplankton) than in the other treatments in both experiments. Although the general trend was similar (fig. 2), the first experiment showed lower variability and mean egg production for the control organisms than those fed *G. catenatum* (*post hoc* Tukey-Kramer test,  $P < 0.05$ ). The results of the second experiment were more variable, with no significant difference between the first two mixtures (*post hoc* Tukey-Kramer test,  $P < 0.05$ ); however, mean hatch rates increased progressively with a greater proportion of the toxic dinoflagellate, and were maximal when *G. catenatum* was the only prey (fig. 2). This could indicate the higher nutritional value of *G. catenatum* relative to natural phytoplankton. The mean rates of egg production in natural phytoplankton were

**Tabla 1.** Huellas pigmentarias del fitoplancton natural (ng L<sup>-1</sup>) utilizadas en las mezclas de alimento junto con *Gymnodinium catenatum*.  
**Table 1.** Natural phytoplankton pigments (ng L<sup>-1</sup>) used in food mixtures with *Gymnodinium catenatum*.

Experimento	Huellas pigmentarias				
	Clorofila <i>a</i>	Fucoxantina	Peridinina	Clorofila <i>b</i>	Zeaxantina
Diciembre 2001	2478 ± 57	873 ± 18	69 ± 18	133 ± 4	194 ± 5
Marzo 2002	1884 ± 15	357 ± 5	208 ± 9	214 ± 4	36 ± 1



**Figura 1.** Concentración de pigmento inicial vs. pigmento ingerido, en las diferentes mezclas de alimento ofrecidas en los experimentos de diciembre de 2001 y marzo de 2002. Concentración de cada huella pigmentaria en el primer experimento (○) y en el segundo experimento (●): (a) clorofila *a*, (b) peridinina, (c) fucoxantina, y (d) clorofila *b*.

**Figure 1.** Ingested pigment vs initial pigment concentration in the food mixtures offered in the experiments conducted in December 2001 and March 2002. Concentration of each pigment signature in the first experiment (○) and in the second (●): (a) chlorophyll *a*, (b) peridinin, (c) fucoxanthin, and (d) chlorophyll *b*.

ambos experimentos, observándose un solo ejemplar muerto por experimento (este frasco no fue considerado en el análisis).

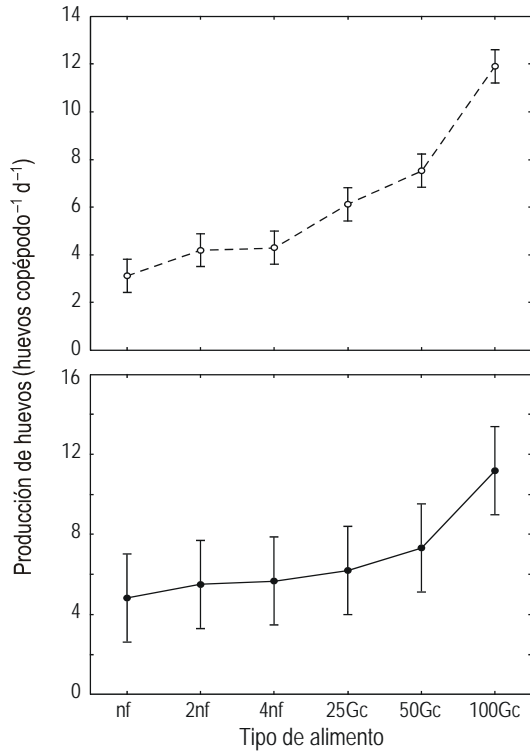
Aunque la densidad de *G. catenatum* en el segundo experimento fue 2.3 veces superior a la del primer experimento, en ambos casos se observó una relación lineal entre el consumo y la concentración de alimento ofrecido (fig. 1a), los copépodos consumieron en proporción con la peridinina disponible en ambos casos (fig. 1b). Lo anterior también se observó con la fucoxantina (fig. 1c). En cambio, el consumo de clorofila *b* fue más variable (fig. 1d). En ambos experimentos la concentración de la zeaxantina se incrementó (datos no mostrados), sugiriendo que este grupo no fue consumido por *A. clausi*.

La producción de huevos fue menor en los experimentos control (en los que se suministró fitoplancton natural) para ambos experimentos. Aunque la tendencia fue similar (fig. 2), en el primer experimento se observaron menor variabilidad y diferencias significativas entre los controles y las mezclas con *G. catenatum* (prueba *a posteriori* de Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ),

essentially the same as those in filtered seawater. In experiments with double and quadruple concentrations of natural phytoplankton, egg production was the same ( $4.5 \pm 1.3$  eggs copepod<sup>-1</sup> and  $4.7 \pm 1.2$  eggs copepod<sup>-1</sup>, mean  $\pm$  SD, respectively) than with the normal concentration. These data suggest that natural phytoplankton had little nutritional value.

Egg production rates in each food mixture in both experiments were similar, although there was higher variation in the second experiment with more concentrated diets (fig. 2). When comparing peridinin concentrations required for egg production in each experiment, the ingestion rate was evidently higher in the second experiment, but did not produce a corresponding increase in *A. clausi* egg production (fig. 3). In other words, *A. clausi* ingested more dinoflagellates, but egg production was unaffected.

We did not detect any effect on egg hatching success in these short-term experiments. Egg hatch rates were above 90%

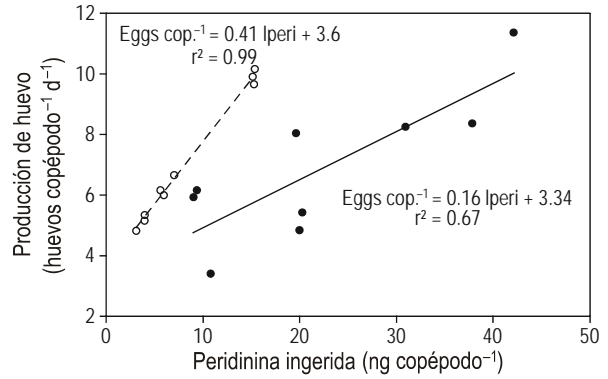


**Figura 2.** Promedio de los huevos producidos en los experimentos de diciembre de 2001 y marzo de 2002. Huevos vs Concentración de fitoplancton del medio (nf, 2nf, 4nf: concentración normal, doble y cuádruple), y porcentaje de *Gymnodinium catenatum* en la mezcla de alimento (100% indica 100% de *G. catenatum*), Las barras de error indican el error estándar.

**Figure 2.** Mean egg production in the experiments of December 2001 and March 2002. Eggs vs field phytoplankton concentration (nf, 2nf, 4nf: natural double and quadruple concentration), and percentage of *Gymnodinium catenatum* in the diet mixture (100% indicates 100% of *G. catenatum*); error bars are standard errors.

en tanto que en el segundo experimento no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones menores de *G. catenatum* y los controles alimentados con fitoplancton natural (prueba *a posteriori* de Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ). No obstante, en ambos experimentos el promedio de huevos producidos aumentó conforme se incremento la proporción de *G. catenatum*, siendo máximo cuando este dinoflagelado fue la única presa disponible. Esto podría ser indicativo de una mejor calidad nutricional del dinoflagelado con respecto al fitoplancton natural. Esta idea se refuerza cuando se compara el promedio de huevos producido en los experimentos con una concentración mayor de fitoplancton natural y se observa que no hay diferencias significativas ( $4.5 \pm 1.3$  huevos copépodo<sup>-1</sup> y  $4.7 \pm 1.2$  huevos copépodo<sup>-1</sup>, respectivamente).

La producción de huevos con cada una de las mezclas de alimento fue muy similar en los dos experimentos; sin embargo, la variabilidad observada en el segundo experimento, con mayor concentración de dinoflagelados, fue más alta. De hecho, cuando comparamos la concentración de peridina ingerida durante cada experimento, observamos que la



**Figura 3.** Ingestión de peridina y huevos producidos por el copépodo *Acartia clausi* en los experimentos de diciembre de 2001 (línea segmentada) y marzo de 2002 (línea continua). Se muestra la línea de regresión. Ambas ecuaciones son significativas ( $P > 0.05$ ).

**Figure 3.** Ingestion of peridinin and eggs produced by the copepod *Acartia clausi* in December 2001 (dashed line) and March 2002 (continuous line). Best-fitted equations are given. Both equations are significant ( $P > 0.05$ ).

and differences among food suspensions were not significant (*post hoc* Tukey-Kramer test,  $P > 0.05$ ). Dead copepods were not observed in the egg production and hatching experiments.

## Discussion

The literature indicates a great variation in the effects of toxic algae on zooplankton. Some zooplankton species seem to suffer high mortality rates when consuming toxic phytoplankton, whereas others are able to ingest and use them without any apparent deleterious consequences (Turner and Tester 1997, Teegarden 1999, Guisande *et al.* 2002). These effects can be more or less severe depending on the type of toxin and on each species' ability to tolerate the type of toxin or to avoid feeding on toxic algae (Colin and Dam 2002a).

In this study copepod mortality was negligible. It is therefore concluded that *A. clausi* is capable of ingesting the toxic dinoflagellate *G. catenatum* (strain GCCV14) with no apparent adverse effects. According to our results and those obtained by Dutz (1998) and Frangópulos *et al.* (2000), *A. clausi* is a cosmopolitan species that ingests PSP toxins with little if any short-term effect on mortality, egg production, or hatching. This copepod was found to eliminate 44.3% of toxins ingested daily and transfer around 1% of ingested toxins to eggs (Guisande *et al.* 2002). Perhaps these physiological adaptations give it a substantial competitive advantage over other heterotrophic species. On the other hand, Frangópulos *et al.* (2000) reported that *A. clausi* fecundity and egg production were negatively affected when fed the PSP producer *Alexandrium minimum* over several days, and suggested that there is a threshold limit on assimilated toxins. This shows that when copepods feed on more toxic cells, some of the assimilated energy is used to eliminate or manage toxins, and less energy is channeled into egg production (Dutz 1998). This is consistent

cantidad ingerida es superior en el segundo experimento, pero no se obtiene un correspondiente incremento en la producción de huevos (fig. 3). En otras palabras, *A. clausi* ingiere más dinoflagelados, pero no produce más huevos.

No se observó un efecto sobre el éxito de eclosión debido al consumo de toxinas, ya que éste fue superior a 90% con las diferentes mezclas de alimento probadas (prueba de Tukey-Kramer,  $P > 0.05$ ), y no se observaron copépodos o nauplios muertos en los experimentos de producción de huevos y eclosión de huevos.

## Discusión

Diversos estudios encuentran grandes diferencias en la respuesta al consumo de algas tóxicas por parte del zooplancton. Algunas especies sufren mortalidades elevadas, mientras que otras son capaces de ingerirlas y utilizarlas sin sufrir efectos deletéreos aparentes (Turner y Tester 1997, Teegarden 1999, Guisande *et al.* 2002). Colin y Dam (2002a) indican que estos efectos pueden variar en función del tipo de toxina y la capacidad de evadir o tolerar la ingesta de la especie tóxica. Considerando que la mortalidad experimental observada fue despreciable, podemos afirmar que el copépodo calanoide dominante en Bahía Concepción es capaz de ingerir al dinoflagelado productor de toxinas PSP *G. catenatum* (cepa GCCV14) y podría ser un depredador potencial relevante en el medio natural. *Acartia clausi* no mostró efectos adversos en la fecundidad, tasa de eclosión, ni en la mortalidad, en el corto plazo. Lo anterior coincide con lo observado por Dutz (1998) y Frangópulos *et al.* (2000), quienes encuentran que *A. clausi* puede eliminar hasta 44% de la ingesta diaria de toxinas y derivar alrededor de sólo 1% de estas hacia los huevos (Guisande *et al.* 2002). En cambio, Frangópulos *et al.* (2000) observaron un efecto negativo sobre la fecundidad y la producción de huevos en *A. clausi*, cuando es alimentado durante varios días con el dinoflagelado productor de toxinas PSP *Alexandrium minimum*, y sugieren que esta especie podría tener un umbral en su capacidad de asimilación de toxinas. Esto puede deberse a que al ingerir células con un mayor contenido de toxinas, parte de la energía obtenida es derivada a metabolizar o eliminar la toxina y por tanto queda una menor cantidad de energía para la producción de huevos (Dutz 1998). Esta idea es apoyada por nuestros resultados, que muestran una producción de huevos muy semejante en ambos experimentos a pesar de que el copépodo ingirió una mayor cantidad de *G. catenatum* en el segundo experimento. Por otro lado, el tipo de toxinas puede variar entre especies y aún dentro de las mismas cepas de la misma especie (Colin y Dam 2002a, Band-Schmidt *et al.* 2004), de ahí que la respuesta de los heterótrofos a la ingesta de una determinada especie tóxica es difícil de predecir o comparar (Turner *et al.* 1998) cuando se utilizan especies o cepas distintas. La cepa GCCV14 contiene sólo toxinas decarbamoiladas (dcGTK2 y dcGTK3), y sulfocarbamoiladas (tipo C), consideradas como de toxicidad moderada a baja, respectivamente. En contraste la cepa de *A. minimum* utilizada por

with our results showing similar egg production rates in both experiments, despite the higher ingestion rate of *G. catenatum* by the copepod in the second experiment.

The toxin composition may vary among species and even among strains of the same species (Colin and Dam 2002a, Band-Schmidt *et al.* 2005), so the response of heterotrophs to the ingestion of toxins is difficult to predict and compare when different species or strains are used (Turner *et al.* 1998). Strain GCCV14 only contains decarbamoyl (dcGTK2 and dcGTK3) and 21-N-sulfocarbamoyl C2 toxins, considered to have moderate and low toxicity, respectively. In contrast, the toxic *A. minimum* strain used by Guisande *et al.* (2002) had higher concentrations of gonyautoxins 1 and 4 (more than 90% on a mol basis), which are almost as potent as saxitoxin. Mean total toxicities of *G. catenatum* strains range from 9.8 to 22.7 pgSTX eq. cell<sup>-1</sup> (Holmes *et al.* 2002, Méndez and Ferrari 2002, Band-Schmidt *et al.* 2005), and are much higher than those of the *Alexandrium* species used in grazing experiments with *Acartia clausi* (Dutz 1998, Frangópulos *et al.* 2000, Guisande *et al.* 2002). Thus, the diverse responses of copepods fed PSP producers could be related to the types of toxins and total toxicity (Huntley *et al.* 1986).

From an ecological point of view, our results are important because this is the first study conducted on native species of the Gulf of California using *G. catenatum* strain GCCV14, the most toxic of 16 strains isolated from Concepción Bay (Band-Schmidt *et al.* 2004). It is also reasonable to infer that less toxic strains of this species would not have any short-term adverse effect on *A. clausi* mortality, egg production and hatching. The toxic dinoflagellate *G. catenatum* and the copepod *A. clausi* often co-occur in Concepción Bay, and our results suggest that the latter could be playing a key role in controlling the density of the former in the region. The limited low abundance of *G. catenatum* suggests that *A. clausi* can ingest and accumulate toxins up to a threshold without any negative effect on fecundity (White 1981, Colin and Dam 2002b), and when the limit is exceeded, the copepod becomes more selective and feeds on alternative non-toxic organisms. Records show that the concentration of *G. catenatum* is relatively low during cold periods (<1000 cells L<sup>-1</sup>, I. Gárate-Lizarraga *et al.* unpublished data), when *A. clausi* is more abundant (>45,000 org 100 m<sup>3</sup>), and higher during the transitional period (Gárate-Lizarraga *et al.* 2004, Morquecho-Escamilla and Lechuga-Devéze 2004).

## Acknowledgements

The authors thank the Mexican Council of Science and Technology for financial and logistical support (CONACYT grant 144384 (to CJB-S) and projects R33598-B, 33684-V, 37560-V, and CONACYT-DLH), and CIBNOR staff for English language editing. This research was also supported by CIBNOR (projects AYCG-8, PC3.2, and PC3.3). The first author was supported by fellowships from the Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA) and Estímulo al Desempeño en Investigación (EDI).

Guisande *et al.* (2002) contenía elevadas concentraciones de toxinas carbamoiladas (más de 90% fueron GTX1 y GTX4), que tienen una toxicidad similar a la de la saxitoxina. La toxicidad total media del dinoflagelado *G. catenatum* es variable (Holmes *et al.* 2002, Méndez y Ferrari 2002, Band-Schmidt *et al.* 2004) y fluctúa entre 9.8 y 22.7 pgSTX eq. cél<sup>-1</sup>, y es mucho mayor a la de las especies de *Alexandrium* utilizadas en los experimentos de pastoreo con la misma especie de copépodo (*Acartia clausi*) (Dutz 1998, Frangopulos *et al.* 2000, Guisande *et al.* 2002). Esto sugiere que la toxicidad total y el tipo de toxinas son las principales fuentes de variabilidad en las respuestas observadas ante el consumo de especies productoras de toxinas paralizantes (Huntley *et al.* 1986).

Desde una perspectiva ecológica, nuestros resultados son relevantes porque éste es el primer estudio realizado con especies que se distribuyen en aguas del Golfo de California y con la cepa de *G. catenatum*, la de más alto contenido de toxinas de un total de 16 aisladas en Bahía Concepción (Band-Schmidt *et al.* 2004). Por tanto, es razonable suponer que ninguna de las cepas de *G. catenatum* pudiera tener un efecto adverso sobre la mortalidad, la producción de huevos y el éxito de eclosión de *A. clausi* en el corto plazo. En Bahía Concepción coexisten permanentemente el dinoflagelado tóxico *G. catenatum* y el copépodo *A. clausi*, y dada la abundancia de este último, nuestros resultados sugieren que el pastoreo de este copépodo podría jugar un papel relevante en el control de las poblaciones de *G. catenatum* y otros dinoflagelados. Esta hipótesis se apoya en la capacidad del copépodo para utilizar la gran calidad nutritiva del dinoflagelado (White 1981, Colin y Dam 2002b) sin presentar efectos adversos, dentro de ciertos límites. Cuando esta capacidad es rebasada y el gasto energético necesario para eliminar la toxina es superior a la ganancia obtenida por su consumo (Colin y Dam 2002b), puede volverse más selectivo y aprovechar el alimento alternativo que proporcionan otras microalgas. Lo anterior concuerda con las bajas densidades poblacionales de *G. catenatum* en la época invernal (<1000 cél L<sup>-1</sup>; Gárate-Lizárraga *et al.*, datos no publicados), cuando *A. clausi* alcanza su máxima abundancia (>45,000 org 100 m<sup>3</sup>), y con sus altas densidades durante el periodo de transición hidrográfica (Gárate-Lizárraga *et al.* 2004, Morquecho-Escamilla y Lechuga-Devéze 2004).

### Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo logístico y financiero al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, beca 144384 a CJB-S, y proyectos R33598-B, 33684-V, 37560-V y CONACYT-DLH), al equipo de traducción del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por la edición al manuscrito en inglés. Se agradece también a los revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias al manuscrito. Esta investigación fue apoyada por recursos institucionales del CIBNOR (proyectos AYCG-8, PC3.2 y PC3.3). El autor RPG es becario de la Comisión de Operación y Fomento Actividades Académicas (COFAA) y Estímulo al Desempeño en Investigación (EDI).

### Referencias

- Anderson DM, Kulis DM, Binder BJ. 1984. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: Cyst yield in batch cultures. *J. Phycol.* 20: 418–425.
- Band-Schmidt CJ, Morquecho CH, Lechuga-Devéze CH, 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, Mexico. *J. Plankton Res.* 26: 1459–1470.
- Band-Schmidt CJ, Bustillos-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, Lechuga-Devéze CH, Reinhardt K, Luckas B. 2005. Paralytic shellfish toxin in strains of the dinoflagellate *G. catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J. Harmful Algae*, Vol. 4: 21–31.
- Bustillos-Guzmán B, Claustre H, Marty JC. 1995. Specific phytoplankton signatures and their relationship to hydrographic conditions in the coastal northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124: 247–258.
- Colin SP, Dam HG. 2002a. Latitudinal differentiation in the effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* spp. on the feeding and reproduction of populations of the copepod *Acartia hudsonica*. *J. Harmful Algae* 1: 113–125.
- Colin SP, Dam HG. 2002b. Testing for toxic effects of prey on zooplankton using sole versus mixed diets. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1430–1437.
- Cortés-Altamirano R. 1987. Observaciones de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Cienc. Mar.* 13(4): 1–19.
- Dutz J. 1998. Repression of fecundity in neritic copepod *Acartia clausi* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium lucitanicum*: Relationship between feeding and egg production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 175: 97–107.
- Frangópulos MC, Guisande C, Maneiro I, Rivero I, Franco J. 2000. Short- and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 203: 161–169.
- Frost BW. 1972. Effect of size and concentration of food particles in the feeding behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.* 17: 805–815.
- Gárate-Lizárraga I, Hernández-Orozco ML, Band-Schmidt CJ, Serrano-Casillas G. 2001. Red tides along the coasts of Baja California Sur, Mexico (1984 to 2001). *Oceanides* 16: 127–134.
- Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán J, Alonso-Rodríguez R. 2002. Distribution of *G. catenatum* Graham, in coastal waters of Mexico. *Harmful Algae News* 23: 1–2.
- 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. Poll. Bull.* 48: 378–402.
- Góngora-González DT. 2001. Estructura microfitoplanctónica y condiciones hidrológicas relacionadas con la presencia de dinoflagelados tóxicos en Bahía Concepción, Baja California Sur, BCS, México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, México, 52 pp.
- Guillard RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith LW, Chanley MH (eds.), *Culture of Marine Animals*. Plenum, New York, pp. 26–60.
- Guisande C, Frangopulos M, Carotenuto Y, Maneiro I, Riveiro I, Vergara R. 2002. Fate of paralytic shellfish poisoning toxins ingested by the copepod *Acartia clausi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 240: 105–115.
- Holmes MJ, Bolch CJS, Green DH, Cembella AD, Ming-Teo SL. 2002. Singapore isolates of the dinoflagellate *G. catenatum*



- (Dinophyceae) produce a unique profile of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 38: 96–106.
- Huntley ME, Sikes P, Rhoan S, Martin V. 1986. Chemically mediated rejection of the dinoflagellate prey of the copepod *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: Mechanisms, occurrence, significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 105–120.
- 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 chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia* 45: 312–316.
- López-Cortés DJ, Bustillos-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, Hernández-Sandoval FE, Murillo-Murillo I. 2003. Phytoplankton biomasses and hydrographic conditions during El Niño 1997–1998 in Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Geofís. Int.* 42: 495–504.
- Mantoura RFC, Repeta D. 1997. Calibration methods for HPLC. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds.), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publ., Paris, pp. 407–428.
- Mee LE, Espinosa M, Díaz G. (1986). Paralytic shellfish poisoning with a *G. catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Environ. Res.* 19: 77–92.
- Méndez S, Ferrari G. 2002. Floraciones algales nocivas en Uruguay: Antecedentes, proyectos en curso y revisión de resultados. En: Sar EA, Ferrario ME, Reguera B (eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, pp. 271–288.
- Morquecho-Escamilla L, Band-Schmidt CJ, Lechuga-Devéze C, Góngora D. 2000. Should Bahía Concepción, Mexico, be a model for harmful algae blooms? *Harmful Algae News* 20: 12–13.
- Morquecho-Escamilla L, Lechuga-Devéze CH. 2004. Seasonal occurrence of planktonic dinoflagellates and cyst production in relationship to environmental variables in subtropical Bahía Concepción, Gulf of California. *Bot. Mar.* 47: 313–322.
- Palomares-García JR, Martínez-López A, Gárate-Lizárraga I. 2002. Plankton community changes in Bahía Concepción, Mexico. *Oceánides* 17: 113–128.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry*. WH Freeman, San Francisco. 859 pp.
- Teegarden GJ. 1999. Copepod grazing selection and particle discrimination on the basis of PSP toxic content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 181: 163–176.
- Turner JT, Tester PA. 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1203–1214.
- Turner JT, Tester PA, Hansen PJ. 1998. Interactions between toxic marine phytoplankton and metazoan and protistan grazers. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraf GM (eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer Verlag, Berlin, pp. 453–473.
- Verdugo-Díaz G. 1997. Cambios estacionales del fitoplancton y de la composición bioquímica del material orgánico particulado en Bahía Concepción, BCS. Tesis de maestría, CICIMAR-IPN, México, 100 pp.
- Vidussi F, Claustre H, Bustillos-Guzmán J, 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.
- White AW. 1981. Marine zooplankton can accumulate and retain dinoflagellate toxins and cause fish kills. *Limnol. Oceanogr.* 26: 103–109.
- Yu RC, Hummert C, Luckas B, Qian P, Zhou MJ. 1998. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia* 48: 671–676.

*Recibido en noviembre de 2004;  
aceptado en octubre de 2005*