



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACIÓN ENTRE LAS BACTERIAS ASOCIADAS AL
DINOFLAGELADO *PROROCENTRUM LIMA* Y LA
PRODUCCIÓN DE TOXINAS DIARREICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS DE LA TIERRA

CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN PELAYO ZÁRATE



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. SILVIA PAJARES MORENO

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Pelayo
Zárate
María del Carmen
56010044
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Ciencias de la Tierra
312108098
2. Datos del tutor
Dra.
Silvia
Pajares
Moreno
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de
Souza
Saldivar
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Ana Elena
Escalante
Hernández
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Lorena María
Durán
Riveroll
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Eria Alaide
Rebollar
Caudillo
7. Datos del trabajo escrito
RELACIÓN ENTRE LAS BACTERIAS ASOCIADAS AL DINOFLAGELADO
PROROCENTRUM LIMA Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS
DIARREICAS.
57 p.
2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres, a mi papá Alejandro Pelayo quien siempre ha sido un ejemplo de trabajo duro, honestidad, dedicación y rectitud, eres mi ídolo y modelo a seguir. A mi madre Angélica Zárate, quien siempre me ha dado su apoyo y cuya paciencia me motiva a ser mejor persona. Todos mis logros son suyos.

Agradezco a mi familia, por su cariño y apoyo. A mis abuelos, Mari, Cheche, Camilo y especialmente a Machines por todo el tiempo dedicado a escuchar mis logros y sueños. A mis tías Verónica, Marilú, Paty y Juana y a Juan quienes han sido fundamentales en mi crecimiento. A mis primos, Melos, Toño, Henry, Gustavo, Luisa, Pavel e Israel cuya alegría y logros personales son una inspiración constante en mi vida.

Agradezco infinitamente a Ricardo Luque, quien ha apoyado, alentado, cuestionado y respaldado cada una de mis decisiones y con quien he crecido para ser una mejor persona.

A mi tutora la Dra. Silvia Pajares, de quien he aprendido el valor del trabajo bien hecho, la dedicación y la constancia. Gracias por ser una guía y un ejemplo excepcional de lo que una mujer en la ciencia pueda lograr.

A mis amigos de la preparatoria Varsovia, Ángel, Rodrigo, Laura, Chiviz e Itzel y a todo el *Team Tumbas*, quienes son una constante en mi evolución personal. A mis amigos de la facultad Antoine, Leo, Alejandro, Alejandra y Elisa por ser el mejor equipo y los mejores compañeros de viaje que he tenido. Y a mi mejor amigo Pony, por todas esas invaluable pláticas, *athfeizar*.

A mis compañeros de laboratorio Ramiro, Cassandra, Flor, José Antonio, Cinthya y Andrea quienes pasaron su invaluable tiempo enseñándome protocolos y técnicas de laboratorio necesarios para completar este trabajo. Infinitas gracias.

Gracias a mi querida UNAM, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por permitirme desarrollar mi conocimiento y pasión por las Ciencias de la Tierra. Gracias al proyecto PAPIIT-IA201617 de la Dra. Pajares por subvencionar parte de la investigación llevada a cabo en esta tesis.

De igual forma agradezco a la Dra. Lorena Durán por confiar en mí para colaborar en esta investigación, a la Red Temática sobre Florecimientos Algales Nocivos, a la M.C. Laura Márquez Vadelamar quien colaboró en la secuenciación, al Dr. Fernando González Farías, al Dr. Martín López Hernández, al Arg. Manuel Victoria quien apoyó en los muestreos, al Dr. Yuri Okolodkov quien identificó los cultivos, al Ing. Manuel Rodríguez Gómez director del Acuario de Veracruz y quien nos dona el agua de mar para los cultivos y al Dr. Hugo Pérez López encargado del cerapio. Gracias a la M.C. Ulrike Tarazona, al Dr. Bernard Krock y al Dr. Allan Cembella por brindar los datos de identificación de toxinas. Gracias a la M.C. Laura Gómez Lizárraga por facilitar las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Infinitas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1 Factores fisicoquímicos y biológicos que promueven los florecimientos algales nocivos de dinoflagelados bentónicos	12
3.2 <i>Prorocentrum sp</i> , dinoflagelado bentónico productor de toxinas diarreicas ...	16
3.3 Importancia de las bacterias asociadas a dinoflagelados tóxicos.....	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos particulares.....	20
6. HIPÓTESIS.....	20
7. MÉTODOS.....	21
7.1 Descripción de los morfotipos bacterianos	22
7.2 Identificación molecular y análisis filogenético de representantes bacterianos	23
7.3 Identificación de bacterias mediante microscopía electrónica	24
7.4 Análisis de toxinas	25
7.5 Análisis de datos	25
8. RESULTADOS	26
8.1 Análisis filogenético, abundancia y distribución de bacterias asociadas a <i>Prorocentrum lima</i> y <i>Coolia sp</i>	26
8.2 Análisis de toxinas	32
8.3 Relación de toxinas y bacterias asociadas a <i>P. lima</i>	35
8.4 Microscopía electrónica	39
9. DISCUSIÓN	41
9.1 Relación de <i>Prorocentrum lima</i> y <i>Coolia sp</i> con sus bacterias asociadas	41
9.2 Análisis de toxinas	44
9.3 Relación de toxinas y bacterias asociadas a <i>P. lima</i>	45
9.4 Microscopía electrónica	46
10. CONCLUSIONES.....	47
11. PERSPECTIVAS	48
12. BIBLIOGRAFÍA.....	48
13. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de <i>Prorocentrum</i>	17
Figura 2 Curvas de acumulación de morfotipos bacterianos en función de las colonias obtenidas en los cultivos de <i>P. lima</i> y <i>Coolia</i> sp.	27
Figura 3 Curvas de acumulación de géneros bacterianos en función de las cepas obtenidas en los cultivos de <i>P. lima</i> y <i>Coolia</i> sp.....	27
Figura 4 Árbol filogenético de los representantes bacterianos aislados de los cultivos de <i>P. lima</i>	29
Figura 5 Géneros bacterianos en los cultivos de <i>P. lima</i> y <i>Coolia</i> sp	31
Figura 6 Diagrama de Venn-Euler de los géneros bacterianos asociados a <i>P.lima</i> y <i>Coolia</i> sp.	32
Figura 7 Mapa de color de las toxinas mostrando su concentración (fmol *cel ⁻¹) en los cultivos de <i>P. lima</i>	34
Figura 8 Presencia de toxinas y géneros bacterianos encontrados en cada cultivo de <i>P. lima</i>	36
Figura 9 NMDS, Distribución de los cultivos de <i>P. lima</i> con respecto a la presencia de morfotipos..	37
Figura 10 NMDS. Distribución de los cultivos de <i>P. lima</i> con respecto a la abundancia de géneros bacterianos obtenidos	38
Figura 11 Imágenes de bacterias aisladas de los cultivos de dinoflagelados, obtenidas mediante MEB.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efectos adversos y principales productores de toxinas marinas	11
Tabla 2 Concentraciones máximas permitidas por la FAO y concentraciones máximas permitidas en México según la NOM-242-SSA1-2009.	12
Tabla 3 Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en la PCR.	24
Tabla 4 Condiciones de la PCR durante 30 ciclos.	24

1. RESUMEN

Los florecimientos algales nocivos (FAN) son el resultado del aumento masivo en la densidad de ciertos tipos de microalgas, como diatomeas o dinoflagelados. De la misma manera, existen FAN en los bentos, aunque pocas veces son visibles y generalmente incluyen al dinoflagelado *Prorocentrum lima*. Los florecimientos son a menudo consecuencia de un incremento en la temperatura del agua y de la alta disponibilidad de nitrógeno y fósforo. Estos eventos pueden ser perjudiciales para los organismos marinos y las poblaciones humanas debido a la acumulación de toxinas que producen las microalgas y que se bioacumulan en mariscos y peces.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar las bacterias asociadas de cultivos del dinoflagelado *P. lima*, tanto las que se encuentran adheridas a las células como las que se encuentran de forma libre en la solución circundante, y determinar si existe una relación con las toxinas producidas por *P. lima*. Para ello, se aislaron bacterias asociadas a nueve cultivos del dinoflagelado y se identificaron mediante el gen 16S rRNA. Además, se analizaron las toxinas producidas por los cultivos de *P. lima* mediante HPLC-MS/MS. Finalmente, se obtuvieron imágenes de representantes bacterianos mediante microscopía electrónica de barrido.

Se identificaron 22 géneros bacterianos, incluyendo a los cosmopolitas *Pseudomonas* y *Microbacterium*. La clase γ -proteobacteria fue la dominante, entre las que destacan *Alteromonas* y *Halomonas* por sus efectos alguicidas, seguida en abundancia por la clase α -proteobacteria y Actinobacteria. Se identificaron las toxinas lipofílicas ácido okadaico (OA) y dinofisistoxina 1 (DTX1) y el análogo DTX1a, además de sus respectivas formas esterificadas.

En el cultivo con mayor producción de OA se identificaron representantes de la clase α -proteobacteria, los cuales sintetizan vitamina B₁₂ necesaria para el crecimiento de los dinoflagelados. Solo las toxinas DTX1a.D8 y DTX1.D8, encontradas en baja abundancia, tuvieron relación con la composición bacteriana de dos cultivos, por lo que se concluye que las bacterias aisladas en este estudio no se relacionan directamente con la producción de toxinas de *P. lima*.

2. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados reciben su nombre por su característico movimiento y los flagelos con los que cuentan; la palabra dinoflagelado proviene del griego *dinos*, girar, y del latín *flagellum*. Estos organismos son eucariontes y miembros del reino Protista. La gran mayoría de las especies de dinoflagelados se encuentran en ecosistemas marinos, pero existen también en sistemas de agua dulce (Santhanam, 2015). En ambos sistemas acuáticos los dinoflagelados ocupan nichos diversos en la base de la red trófica (Bravo, 2014).

En el océano, los dinoflagelados son considerados cosmopolitas por habitar tanto en el sedimento como en la columna de agua. Su nutrición es variada, aunque la mayoría son fotosintéticos o mixotróficos, y también pueden establecer relaciones simbióticas con plantas acuáticas o corales (Santhanam, 2015).

Varias especies de dinoflagelados se caracterizan por producir bioluminiscencia (fenómeno de producción de luz por organismos vivos mediante una reacción bioquímica regulada por los genes *lux*), mientras que otras especies están asociadas a florecimientos algales nocivos (FAN) (Sáenz-Marta *et al.*, 2010; Bravo, 2014). Los FAN consisten en un aumento masivo en la densidad de microalgas, como diatomeas o dinoflagelados, consecuencia de la alta disponibilidad de nitrógeno y fósforo, así como de un incremento en la temperatura del agua y de otros factores que no han sido aún del todo comprendidos. Estos eventos ocurren de manera natural, pero han sido potenciados por causas antropogénicas en las últimas cuatro décadas. Los FANs pueden ser perjudiciales para los organismos marinos y los consumidores de éstos, debido, entre otros factores, a la liberación y acumulación de toxinas producidas por estas microalgas (Santi-Deli *et al.*, 2015; Prego-Faraldo, 2016).

La acumulación de las toxinas en mariscos y peces se traduce en problemas socio-económicos directos e indirectos en las poblaciones humanas costeras. De forma directa, la presencia de estos eventos impone la prohibición del comercio de peces y mariscos, afectando a pescadores y comerciantes al ser su fuente principal de ingresos. Los casos de intoxicación en humanos también representan un gasto público directo, tanto en su tratamiento como en su prevención. De forma

indirecta, ocasionan un descenso en los ingresos del sector turístico, ya que como medida preventiva se implementan restricciones a ciertas actividades recreativas, lo cual afecta al comercio a pequeña y gran escala (Sanseverino, 2016).

Debido a que varias especies de organismos marinos son capaces de tolerar altos niveles de toxinas mediante la bioacumulación en sus tejidos, ocurre un proceso de biomagnificación de éstas al pasar por los diferentes niveles tróficos, lo que incrementa el riesgo hacia los humanos al ingerir algunos alimentos, como peces y moluscos, con altas concentraciones de toxinas (Camacho *et al.*, 2007). No todos los FAN pueden ser asociados con las conocidas mareas rojas, dado que muchos de estos eventos ocurren sin una señal de advertencia visible, lo que hace más difícil su identificación y prevención.

Si bien se tienen documentados los efectos de la exposición a las toxinas producidas por dinoflagelados, muchos de los mecanismos que causan los efectos adversos aún no son completamente entendidos, por lo que la exposición a las ficotoxinas requiere de un monitoreo constante, tanto en intoxicaciones puntuales como crónicas (Visciano *et al.*, 2016).

La clasificación de las ficotoxinas se divide en dos grupos principales dependiendo de su efecto tóxico y estructura química (**Tabla 1**): 1) toxinas hidrofílicas, que a su vez se pueden dividir en toxinas paralizantes (PSP) y toxinas amnésicas (ASP); y 2) toxinas lipofílicas, que incluyen a las toxinas diarreicas (DSP) y a las neurotoxinas (NSP). También en este grupo se encuentran las toxinas causantes de la ciguatera (CFP), que se encuentran principalmente en pescado y son muy conocidas por causar una enorme cantidad y variedad de síntomas digestivos, cardiacos y neurológicos (FAO, 2005; Visciano, 2016).

Aproximadamente el 5% de las especies conocidas de dinoflagelados son tóxicos, la mayoría son marinos plantónicos, sin embargo, se continúan identificando especies de dinoflagelados bentónicos (Faust *et al.*, 2002). Los dinoflagelados que producen las toxinas PSP son los más estudiados y comprenden los géneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* y *Gymnodinium* (**Tabla 1**). En el Golfo de México, el dinoflagelado *Karenia brevis* produce brevetoxinas, que se han relacionado con grandes mortandades de peces. Varias especies de los géneros *Prorocentrum* y

Dinophysis producen toxinas diarreicas, las cuales causan la intoxicación diarreica por consumo de mariscos (DSP por sus siglas en inglés, *Diarrhetic Shellfish Poisoning*) y desde su identificación, en 1970, han sido constantemente monitoreados en Europa. En México, *P. lima* fue aislado y analizado por primera vez en 1997 tras un episodio de intoxicación en la isla El Pardito, en Baja California Sur (Heredia-Tapia *et al.*, 2002). Finalmente, las toxinas ciguatéricas son producidas principalmente por miembros del género *Gambierdiscus* (Kotaki *et al.*, 2008; Steidinger *et al.*, 2008).

Tabla 1 Efectos adversos y principales productores de toxinas marinas. Modificada de Visciano *et al.* (2016).

	Grupo	Toxina	Sintomatología	Géneros productores
Toxinas hidrofílicas	PSP Intoxicación paralizante	Saxitoxina y más de 30 análogos	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas gastrointestinales • Hormigueo • Parálisis respiratoria completa 	<i>Alexandrium</i> sp
	ASP Intoxicación amnésica	Ácido domoico	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas neurológicos, pérdida de memoria anterógrada • Síntomas gastrointestinales • Dificultades cardíacas y respiratorias 	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp <i>Nitzschia</i> sp
Toxinas lipofílicas	DSP Intoxicación diarreica	Ácido okadaico Dinofisistoxinas y análogos	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas gastrointestinales, diarrea profusa • Vomito / náuseas • Dolores abdominales 	<i>Dinophysis</i> sp <i>Prorocentrum</i> sp
	NSP Intoxicación neurotóxica	Brevetoxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas neurológicos leves • Problemas respiratorios similares a los causados por el asma. 	<i>Karenai brevis</i>
	CFP Intoxicación ciguatérica	Ciguatoxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas gastrointestinales • Problemas cardíacos y neurológicos 	<i>Gambierdiscus</i> sp

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) establece los límites permisibles de estas toxinas basado en la premisa de que las intoxicaciones ocurren de forma ocasional durante eventos cortos y no de manera crónica. En México la NOM-242-SSA1-2009 establece los límites máximos permisibles. Las dosis de referencia para algunas toxinas se resumen en la **Tabla 2**.

Adicionalmente, el Plan de Contingencia para el Control de Biotoxinas Marinas de la Secretaría de Salud establece como prioridad el monitoreo mensual de las biotoxinas en costas mexicanas y considera una alerta sanitaria cuando se encuentran 200 células de *Prorocentrum* sp por litro de agua (SSA, 2015).

Tabla 2 Concentraciones máximas permitidas por la FAO, obtenida de Visciano *et al.* (2016), y concentraciones máximas permitidas en México según la NOM-242-SSA1-2009.

Biotoxina marina	Concentración máxima en carne de marisco (CM) (FAO)	Concentración máxima en carne de marisco (CM) (NOM-242)
Saxiotoxina	75 µg STX/kg CM	800 µg STX/kg CM
Ácido domoico	4.5 mg DA/kg CM	20 mg DA/kg CM
Ácido okadaico	45 µg OA/kg CM	160 µg OA/kg CM

3. ANTECEDENTES

3.1 Factores fisicoquímicos y biológicos que promueven los florecimientos algales nocivos de dinoflagelados bentónicos

Los eventos más conocidos de los FAN son las mareas rojas, las cuales a menudo son producidas por diatomeas o dinoflagelados planctónicos. Pero existen también dinoflagelados bentónicos o epibentónicos que se encuentran asociados a sedimentos, pastos, macroalgas y arrecifes y que pueden producir FAN que no dan señales visibles como la marea roja (Mancera-Pineda, 2014).

Entre los factores fisicoquímicos identificados durante los FAN bentónicos se encuentran la disponibilidad de luz y de nutrientes, las propiedades químicas del agua y la temperatura del medio. Dichos factores se explican a continuación.

Disponibilidad de luz

A diferencia de los dinoflagelados planctónicos, los bentónicos dependen en gran medida del sustrato al que se encuentran adheridos y, por tanto, de la posición que ocupan en el espacio, ya que esto determina la eficiencia que tendrán para utilizar la radiación solar.

Dado que los dinoflagelados bentónicos son comunes en el sedimento de las costas o están asociados a estructuras en la superficie del agua, como boyas o cuerdas, donde están expuestos a intensa radiación, lo que puede desencadenar la inhibición de la fotosíntesis. Sin embargo, la fotoinhibición puede ser contrarrestada por estrategias evolutivas, como la reducción del tamaño de los cloroplastos. Se ha observado que algunas especies de dinoflagelados como *A. tamarensis* poseen cloroplastos pequeños y pueden proliferar en zonas bien iluminadas; otros como *P. levis* han desarrollado cloroplastos de gran tamaño para contrarrestar la baja disponibilidad de luz de los lugares en donde se instalan, mientras que organismos de géneros como *Ostreopsis* y *Gambierdiscus* tienen tamaños intermedios de cloroplastos (Zapata *et al*, 2012). Debido a este tipo de adaptaciones morfológicas, los florecimientos pueden ocurrir en ambientes de poca turbulencia durante largos periodos de alta radiación (Heil, 2005).

Propiedades químicas del agua y nutrientes

La subsistencia de los dinoflagelados también depende del agua circundante, con características químicas a las que deben adaptarse (ej.: pH, disponibilidad de nutrientes y salinidad). A diferencia de los dinoflagelados planctónicos, los bentónicos juegan un papel mínimo en la definición de las propiedades químicas

del agua debido a que su biomasa es mucho menor al plancton en grandes volúmenes de agua (Fraga *et al.*, 2012).

A consecuencia de su baja movilidad, estos dinoflagelados dependen del movimiento del agua para la obtención de los nutrientes requeridos por su metabolismo, lo que resulta en una ventaja adaptativa con respecto a los dinoflagelados móviles. Debido a que la movilidad del agua es al menos tres órdenes de magnitud mayor que la velocidad de nado de un dinoflagelado, al depender del movimiento del medio, los nutrientes son suministrados continuamente a los dinoflagelados bentónicos aún en aguas oligotróficas. Aunado a esto, la biodisponibilidad y remineralización de nutrientes en el sedimento contribuye a satisfacer las necesidades nutricionales de los microorganismos adheridos al sustrato (Atkinson *et al.*, 2001; Fraga, 2012) lo que aumenta su tasa de reproducción.

También se debe tener en cuenta la actividad antropogénica en las costas y la acuicultura, ambas al ser actividades intensivas han derivado en un acelerado proceso de eutrofización costera que puede relacionarse con el incremento en los FAN (Heil *et al.*, 2005).

Temperatura y salinidad

Los dinoflagelados bentónicos son considerados euritermos por el gran margen de temperaturas en el que pueden ser encontrados. El aumento en la frecuencia y duración de los FAN de las últimas décadas puede estar relacionado con el aumento en la temperatura global (Heil *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2018).

Los dinoflagelados bentónicos se presentan con mayor frecuencia en ambientes con alta salinidad y altas temperaturas, mientras que una baja salinidad y un descenso en la temperatura inhiben el florecimiento de ciertos géneros de microalgas (Heil *et al.*, 2005). Asimismo, al presentarse un aumento en la temperatura la viscosidad del agua disminuye, lo que favorece el transporte de nutrientes y aumenta la disponibilidad de los mismos hacia los dinoflagelados bentónicos (Fraga *et al.*, 2012).

Además de los factores fisicoquímicos existen factores biológicos, mucho menos estudiados, que influyen en el desarrollo de los FAN, como la relación entre diatomeas, bacterias y dinoflagelados, la cual no ha sido del todo esclarecida.

Interacción entre diatomeas y dinoflagelados

Desde 1985 se han detectado fenómenos de FAN de *P. minimum* precedidos por florecimientos de las diatomeas *Skeletonema costatum* (Silva *et al.*, 1985; Kondo *et al.*, 1990). Estas observaciones han dado pie a la interpretación de una relación ecológica entre diatomeas y dinoflagelados.

Esta relación puede ser producto de la interacción de dos especies de frecuente proximidad que comparten condiciones de temperatura y salinidad. Además, algunos estudios en laboratorio sugieren que existe una interacción química entre ambas especies, ya que las sustancias excretadas por *S. constatum* propician el crecimiento de *P. mínimo* hasta tres veces más que en otros cultivos (Heil *et al.*, 2012). A nivel global, el estudio de esta dinámica revela el incremento de las poblaciones de diatomeas con respecto a las de dinoflagelados en aguas turbulentas y cálidas, mientras que las poblaciones de dinoflagelados son favorecidas en aguas poco turbulentas. Sin embargo, debido a la sinergia de ambas especies y los muchos factores que se encuentran involucrados en su crecimiento, aún no es posible afirmar que exista una relación directa entre la dinámica poblacional de especies específicas de diatomeas con especies de dinoflagelados (Hinder *et al.*, 2012, Fraga *et al.*, 2012).

Interacción entre bacterias y dinoflagelados

Actualmente existe un interés creciente en el estudio de las bacterias asociadas a los dinoflagelados, debido a que investigaciones recientes sugieren que las bacterias están involucradas en la producción de FAN y la consecuente presencia de toxinas, así como en el control de la dinámica poblacional de las microalgas

(Santi-Deli *et al.*, 2015). Por ejemplo, los dinoflagelados secretan compuestos orgánicos importantes para el crecimiento de las bacterias (Jasti *et al.*, 2005) mientras que éstas proveen a los primeros de vitaminas esenciales como la B₁ o B₁₂ (Park *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha encontrado una relación de control poblacional entre ambos organismos, ya que las bacterias son consideradas potenciales supresores de FAN. Se han reportado que algunas especies de los géneros *Flavobacterium*, *Alteromonas* y *Pseudoalteromas*, entre otros, presentan actividad algicida (Su *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2018).

3.2 *Prorocentrum* sp, dinoflagelado bentónico productor de toxinas diarreicas

Como parte de los dinoflagelados bentónicos se encuentra *Prorocentrum*, un género cosmopolita que incluye 81 especies marinas (Mancera-Pineda, 2014), de las cuales 21 se han reportado en el Pacífico Mexicano y 9 se han identificado como productores de toxinas (Muciño-Márquez, 2014).

Los organismos del género *Prorocentrum* son fotosintéticos y se reproducen de manera asexual por fisión binaria. Presentan una forma oblonga cuyo tamaño varía entre 32 y 50 µm. La célula está protegida con una teca formada de dos valvas porosas: cada valva contiene entre 50 y 80 poros pequeños en la periferia y de 60 a 100 poros grandes distribuidos al interior de la teca. Las células de *Prorocentrum* presentan un área periflagelar en forma de V debido a una ligera depresión en la valva derecha compuesta por ocho hendiduras de diferente tamaño (Faust *et al.*, 2002; Nascimento, 2016).

Este dinoflagelado habita principalmente en el lecho marino, aunque también puede hallarse en los corales, flotar adherido a detritos o crear conglomerados entre individuos al no encontrar un sustrato adecuado, por lo que se le define como un dinoflagelado epibentónico (Marasigan *et al.*, 2001).

Se encuentra presente en todo el mundo, pero su crecimiento es favorecido en temperaturas cálidas (20-24 °C) (Laza-Martinez *et al.*, 2011). Existen abundantes reportes de *Prorocentrum* en zonas tropicales, subtropicales y templadas; sin

embargo, hay pocos reportes de estos en África y Sudamérica debido principalmente al limitado monitoreo de FAN bentónicos en estas zonas (Heil, 2005). Entre las especies monitoreadas y estudiadas de *Prorocentrum* se ha determinado que *P. lima* es el que tiene mayor margen de tolerancia a cambios de temperatura, debido a que su presencia ha sido registrada en las costas de Canadá y Nueva Zelanda, por encima de otras especies como *P. mexicanum*, *P. minimum* o *P. concavum*. (Marasigan *et al.*, 2007).

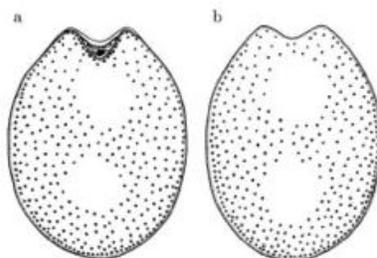


Figura 1 Morfología de *Prorocentrum*. (a) Vista de la valva derecha; (b) vista de la valva izquierda. Ilustración obtenida de Chomérat (2012).

Varias especies de *Prorocentrum* producen dos tipos de toxinas principales: ácido okadaico (OA por sus nombre en inglés) y las derivadas dinofisistoxinas (DTX1-4). Ambas toxinas son diarreicas y liposolubles que se acumulan en los tejidos de bivalvos. Los síntomas que comienzan a aparecer entre los 30 minutos a 4 horas después de la ingesta de los alimentos contaminados son: diarrea, náuseas, vómito, dolor abdominal. Sin embargo, estas toxinas no son letales ni requieren hospitalización, siempre que la persona intoxicada se encuentre bien hidratada (FAO, 2005; Valdiglesias *et al.*, 2013).

El OA también es un inductor de apoptosis, es decir, favorece el desarrollo de tumores en roedores al inflamar el tracto intestinal y ser un potente inhibidor de la enzimas fosfatasa (Prokic *et al.*, 1998; Valdiglesias *et al.*, 2013; Romero-Geraldo *et al.*, 2016), que a su vez inhibe la producción de serina y treonina, lo que afecta procesos intracelulares como el balance iónico (Santi-Deli *et al.*, 2015), la transcripción de genes y la estructura del citoesqueleto (Traoré, 2003). Debido a

estos efectos adversos, la FAO estableció el límite máximo permisible del AO y otras toxinas diarreicas derivadas en $45 \mu\text{g kg}^{-1}$ de carne de marisco (FAO, s.f.).

3.3 Importancia de las bacterias asociadas a dinoflagelados tóxicos

Si bien existen muchos estudios que han asociado los FAN con variables fisicoquímicas, la complejidad de las interacciones ecológicas que los promueven aún no ha sido comprendida.

Los dinoflagelados se caracterizan por presentar una asociación con comunidades bacterianas conformadas hasta por 1,000 especies distintas (Bolch *et al.*, 2011). Los cambios en las comunidades bacterianas, tanto en abundancia como en diversidad, a lo largo del desarrollo de los FAN indican que estas pueden estar implicadas en la estimulación y terminación de estos eventos (Jasti *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2015).

Existe entre los dinoflagelados y sus bacterias asociadas un intercambio de nutrientes necesario para la subsistencia de ambas especies, lo que conforma una relación mutualista. Por ejemplo, las bacterias heterótrofas son una fuente sustancial de vitamina B₁₂ en los océanos, la cual es requerida por los dinoflagelados para su crecimiento (Park *et al.*, 2015). A su vez, los dinoflagelados proporcionan materia orgánica disuelta (DOM) y particulada (POM), que proveen de diferentes ácidos grasos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares. La variación en la proporción de DOM y POM puede inducir cambios en la actividad metabólica y composición de las comunidades bacterianas (Park *et al.*, 2018), creando una dinámica poblacional bacteriana que varía durante las diferentes etapas de producción de los FAN (Park *et al.*, 2015).

Las comunidades bacterianas asociadas a dinoflagelados tóxicos y epibentónicos se dividen en tres grupos principales: bacterias intracelulares, extracelulares de vida libre y extracelulares adheridas al dinoflagelado (Jasti *et al.*, 2005). Estos tres grupos se han observado en cultivos mixtos y puros de *P. Lima* (Raush *et al.*, 1995): 1) bacterias intracelulares, observadas en cultivos mixtos rodeadas de tres membranas en el área periflagelar de *P. lima* (dado que las observaciones de este

grupo de bacterias son escasas, se piensa que el dinoflagelado tiene la capacidad de destruir a los intrusos); 2) bacterias extracelulares de vida libre, que no se encuentran adheridas al dinoflagelado y observadas en cultivos mixtos; 3) bacterias extracelulares, observadas en cultivos puros adheridas al dinoflagelado. Este último grupo de bacterias se encontraron adheridas a la teca con distribución aleatoria en forma de grandes conglomerados, utilizando de anclaje la misma sustancia mucosa que produce *P. lima* para adherirse a otras superficies. La interacción extracelular proporciona ventajas en la adquisición de nutrientes o provee protección contra la radiación UV (Dang *et al.*, 2000).

Varios estudios han demostrado que las bacterias adheridas al dinoflagelado son filogenéticamente cercanas a las bacterias de vida libre; sin embargo, sí muestran una especificidad mayor hacia los dinoflagelados con respecto a las de vida libre (Park *et al.*, 2018). Por ejemplo, entre los géneros bacterianos asociados al género *Prorocentrum* se ha identificado a *Roseobacter* como la más abundante y específica en cultivos tóxicos (Lafay *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2018).

Algunas bacterias también se han asociado con efectos alguicidas o supresores de toxinas. Uribe y colaboradores (2002) reportaron la eliminación de bacterias de cultivos específicos del dinoflagelado tóxico *A. Tamarense*, lo que no afectó la tasa de crecimiento de la especie, pero disminuyó la producción de toxinas, demostrando así una asociación de las bacterias con el efecto tóxico.

Debido al cambio paulatino en la POM y DOM y a la sucesión ecológica bacteriana que esto genera, Park y colaboradores (2018) encontraron que la proporción de bacterias de la clase Flavobacteriia incrementaba de forma significativa conforme el FAN llegaba al pico máximo. Dichas bacterias se consideran alguicidas al utilizar de manera eficiente los carbohidratos, polipéptidos y lípidos de dinoflagelados y ser usualmente encontradas en las etapas finales de los FAN.

4. JUSTIFICACIÓN

Además de los factores fisicoquímicos que promueven los FAN, el estudio de las relaciones ecológicas existentes entre dinoflagelados tóxicos y las comunidades bacterianas es importante, dado que esta interacción repercute en el FAN, su inhibición y en la modificación de toxinas (Park *et al.*, 2018).

Actualmente, el conocimiento de la composición bacteriana asociada a *P. lima* es escaso, pero el estudio de la relación de este dinoflagelado con las bacterias es importante en el actual contexto global y nacional, debido a que se ha observado un incremento en la frecuencia y duración de los FAN en las últimas décadas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar las bacterias asociadas a *P. lima* y su relación con las toxinas producidas por este dinoflagelado.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar bacterias asociadas a diferentes cultivos de *P. lima* obtenidos de costas mexicanas.
- Identificar los aislados bacterianos morfológicamente y molecularmente mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.
- Relacionar los géneros bacterianos aislados de *P. lima* con las toxinas producidas en los cultivos del dinoflagelado.

6. HIPÓTESIS

- Los grupos bacterianos aislados de los cultivos de *P. lima* serán distintos a los aislados en la solución circundante.

- Los grupos bacterianos asociados al dinoflagelado tóxico (*P. lima*) serán distintos a los asociados al dinoflagelado no tóxico (*Coolia* sp).
- Se encontrarán grupos bacterianos asociados a la producción de determinadas toxinas.

7. MÉTODOS

Se analizaron nueve cultivos de *P. lima* (PA) y un cultivo del dinoflagelado no tóxico *Coolia* sp (CA21) a modo de comparación. El cultivo de *Coolia* sp y ocho cultivos de *P. lima* fueron obtenidos de isla Verde (Veracruz) y uno más de *P. lima* fue obtenido de Puerto Morelos entre los meses de julio y octubre de 2017. Las especificaciones de los cultivos se encuentran en el **Anexo A1**.

Los dinoflagelados se obtuvieron *in situ* de muestras del pasto marino *Thalassia testudinum* y se transportaron al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICML) de la UNAM (Ciudad de México) en una hielera a 24°C aproximadamente. En el laboratorio se separaron los epífitos del pasto y se mantuvieron en incubación durante una semana en medio de cultivo GSe (Blackburn *et al.*, 2001) al 10% adicionado con GeO₂, para inhibir el crecimiento de diatomeas, a una temperatura de 24 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12:12 y una intensidad luminosa de 95 μmol m⁻²s⁻¹. De esta solución se aislaron células individuales de *P. lima* por medio de pipeta reducida en capas de 96 pozos (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) y se incubaron durante dos semanas en las mismas condiciones. Posteriormente, se transfirieron a cajas de 24 pozos (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania) con 2 mL de medio de cultivo GSe al 50%. Una vez que se observó crecimiento monoespecífico se transfirieron a cajas de Petri de 60x15 mm (Citotest, Haimen, China) y se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo. Los cultivos de *P. lima* se sembraron aproximadamente cada mes para mantener la población. *Coolia* sp fue colectado de restos de sargazo y se aisló de la manera descrita anteriormente.

De los cultivos seleccionados se obtuvieron muestras, tanto del conglomerado de dinoflagelados como de la solución circundante. El aislamiento de bacterias asociadas a *P. lima* y *Coolia* sp se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática del ICML utilizando tres tipos de medios: medio marino comercial (MM), medio LB adicionado con agua marina artificial y agar con agua marina artificial (AM) (Difco, E.U.A.). Estos medios de cultivo son ricos en NaCl y otras sales que permiten la proliferación de bacterias marinas (Lee *et al.*, 2009).

Para el aislamiento de las bacterias se utilizaron los siguientes tres procedimientos:

Para el primer procedimiento se tomaron 50 y 100 μL del conglomerado de los cultivos de dinoflagelados y de la solución, para inocular directamente en los medios MM y AM. Las muestras fueron esparcidas en la superficie del medio utilizando perlas de vidrio estériles y posteriormente se incubaron a 25 °C durante una semana y media.

El segundo procedimiento se llevó a cabo con los medios MM y LB. Se extrajeron 50 μL de muestra de dinoflagelado y solución para diluirse en 950 μL de agua. Posteriormente, 100 μL de la muestra fueron esparcidos en la superficie de los medios utilizando perlas de vidrio y fueron incubados en las mismas condiciones durante una semana.

El tercer procedimiento se realizó mediante la técnica de dilución-extinción en los medios MM y LB. Se realizaron cuatro diluciones seriadas de cada dinoflagelado y la solución asociada, de las que se sembraron 100 μL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en cada uno de los medios. La muestra se esparció con perlas de vidrio estériles y se incubó a 25 °C durante cuatro días.

7.1 Descripción de los morfotipos bacterianos

Se realizó una base de datos con las características morfológicas de las colonias representativas observadas en cada caja Petri utilizando la clave morfológica del **Anexo A2**.

De las colonias identificadas se seleccionaron los morfotipos representativos para realizar una resiembra por estriado con el fin de obtener biomasa para la posterior extracción de DNA y análisis de toxinas. Para las resiembras se utilizaron los mismos medios de cultivo y se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura iniciales.

7.2 Identificación molecular y análisis filogenético de representantes bacterianos

Se extrajo el DNA genómico de 64 representantes bacterianos con base en el protocolo de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) al 2% (Tris-HCl [10mM] pH 8.0; Na₂ EDTA H₂O [20 mM] pH 8.0; CTAB 2%; NaCl [1.4 M]). Dicho método consiste en la lisis de la membrana celular, la degradación de proteínas y lípidos y la posterior condensación y precipitación del DNA (Minas *et al.*, 2011). El DNA fue cuantificado mediante el espectrofotómetro NanoDrop 200c.

Se seleccionaron 51 muestras de DNA de buena calidad para la amplificación del gen 16S rRNA por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Se utilizaron los siguientes reactivos para la PCR: Buffer suplementado con MgCl₂ [15 mM] y dNTPs [5 mM], primers universales 27F y 1492R, Taq polimerasa (Bioline, Londres), muestras de DNA y agua grado molecular (**Tabla 3**). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf AG (**Tabla 4**).

La amplificación del gen 16S rRNA se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% adicionada con 0.3 µL GelRed (Biotium, E.U.A.). Para la observación del gel se utilizó el equipo Bio-Rad con el software ImageLab.

Los productos de PCR amplificados de forma satisfactoria se enviaron a secuenciar por Sanger al Instituto de Biología de la UNAM.

Se realizó una clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas mediante la herramienta *Classifier* del programa en línea *Ribosomal Database Project* (RDP): <https://rdp.cme.msu.edu/> (Cole *et al.*, 2014).

Finalmente, se elaboró un cepario de las bacterias identificadas con el fin de conservarlas a -80 °C en crioviales, colocando 1 mL de MM, MA o LB suplementado con glicerol al 20%.

Tabla 3 Reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados en la PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo de PCR (25 µL)
Buffer	[5 x]	[1 x]	5 µL
Primer 27F	[10 µM]	[0.3 µM]	0.75 µL
Primer 1492R	[10 µM]	[0.3 µM]	0.75 µL
My Taq	[5 u/µL]	[0.025 u/µL]	0-125 µL
DNA	[50-100 ng/µL]	[2-4 ng/µL]	1 µL
H ₂ O	-	-	Restante para aforar a 25 µL

Tabla 4 Condiciones de la PCR durante 30 ciclos.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Primera desnaturalización	94	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	52	1
Extensión	72	1.2
Última extensión	72	10

7.3 *Identificación de bacterias mediante microscopía electrónica*

Para llevar a cabo la identificación morfológica de bacterias mediante microscopía electrónica se realizó una selección de tres géneros bacterianos: *Pseudomonas*, encontrada tanto en solución como en los cultivos de dinoflagelado, *Kocuria*, asociada a los aislados de la solución, y *Thalassospira*, asociada a los cultivos de dinoflagelado. El procedimiento completo de la preparación de muestras se encuentra en el **Anexo A3**.

7.4 Análisis de toxinas

El análisis de toxinas se hizo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) en el *Alfred-Wegener-Institut Herlmohtz Center of Polar and Marine Research* en Bremerhaven (Alemania), con los métodos reportados por Krock *et al.*, 2008 y Nielsen *et al.*, 2013.

7.5 Análisis de datos

Se realizó el análisis filogenético mediante el software BioEdit, en donde se ejecutó el alineamiento múltiple de las secuencias mediante el algoritmo Clustal W y la edición de éstas. La construcción del árbol filogenético se hizo con el software MEGA 7 mediante el método de *Neighbour-joining* (Kumar *et al.*, 2016) con un bootstrap de 10,000 repeticiones. La edición del árbol filogenético se hizo en el programa en línea Tree of Life (iTOL): <https://itol.embl.de/> (Ciccarelli *et al.*, 2006).

El análisis de datos se llevó a cabo en el software R: <https://www.R-project.org> (R Core Team, 2018). Se obtuvieron dos gráficas de curvas de acumulación usando el paquete *vegan* para representar el esfuerzo de muestreo de los morfotipos bacterianos aislados de dinoflagelados y cepas bacterianas identificadas, respectivamente, con respecto a las colonias encontradas. Posteriormente, se elaboró un diagrama de Venn-Euler usando el paquete *Venn Diagram* para observar los géneros bacterianos compartidos entre *P. lima* y *Coolia* sp.

Además, se elaboró una gráfica de abundancia de géneros bacterianos y otra de presencia y ausencia de toxinas y bacterias entre todas las muestras analizadas, utilizando el paquete *ggplot2*. Se realizó un mapa de calor usando el paquete *gplot* para mostrar las concentraciones de las toxinas encontradas en las muestras de *P. lima* y la relación existente entre ellas en función de su contenido total de toxinas.

Finalmente, se elaboraron dos análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), usando el paquete *vegan*, para analizar la distribución de

bacterias y toxinas respecto a los cultivos de *P. lima*. Para el primer NMDS se utilizó una matriz de Jaccard, tomando en consideración la presencia o ausencia de los morfotipos identificados para calcular la similitud entre los cultivos de *P. lima*. Para el segundo NMDS se utilizó una matriz de Bray-Curtis, tomando en consideración la abundancia de los géneros bacterianos para calcular la similitud entre los cultivos de *P. lima*. Las toxinas identificadas fueron sometidas a un test de permutaciones (n=1000) para obtener los vectores estadísticamente significativos (P-value < 0.1).

8. RESULTADOS

8.1 *Análisis filogenético, abundancia y distribución de bacterias asociadas a Prorocentrum lima y Coolia sp.*

Se obtuvieron 2,023 colonias que se caracterizaron en 110 morfotipos, de los cuales se extrajo el DNA a 64 representantes para amplificar el gen 16S rRNA. Se seleccionaron 51 productos amplificados de buena calidad para su secuenciación. Las curvas de acumulación de los morfotipos encontrados en función de las colonias obtenidas en cada uno de los dinoflagelados analizados muestran que la mayoría de estas curvas alcanzaron la asíntota, con excepción de PA2 y PA12 (con 15 morfotipos cada uno), indicando que, en general, el esfuerzo de muestreo de morfotipos bacterianos fue suficiente (**Figura 2**). Por otro lado, las curvas de acumulación de las cepas identificadas en función de las colonias obtenidas muestran que solo las curvas de los cultivos PA17 y PA11 (con 23 y 19 cepas, respectivamente) tuvieron una asíntota definida, seguidas de las curvas de PA2, PA3, PA19, PA26 y CA21, que prácticamente alcanzaron la asíntota; mientras que las curvas de acumulación de PA1, PA12 y PA14 (con 9, 15 y 19 cepas, respectivamente) no alcanzaron una asíntota (**Figura 3**). Por lo tanto, el esfuerzo de muestreo de cepas aisladas fue menor que el de morfotipos, salvo para los cultivos PA17 y PA11, que estuvieron suficientemente muestreados en cepas bacterianas.

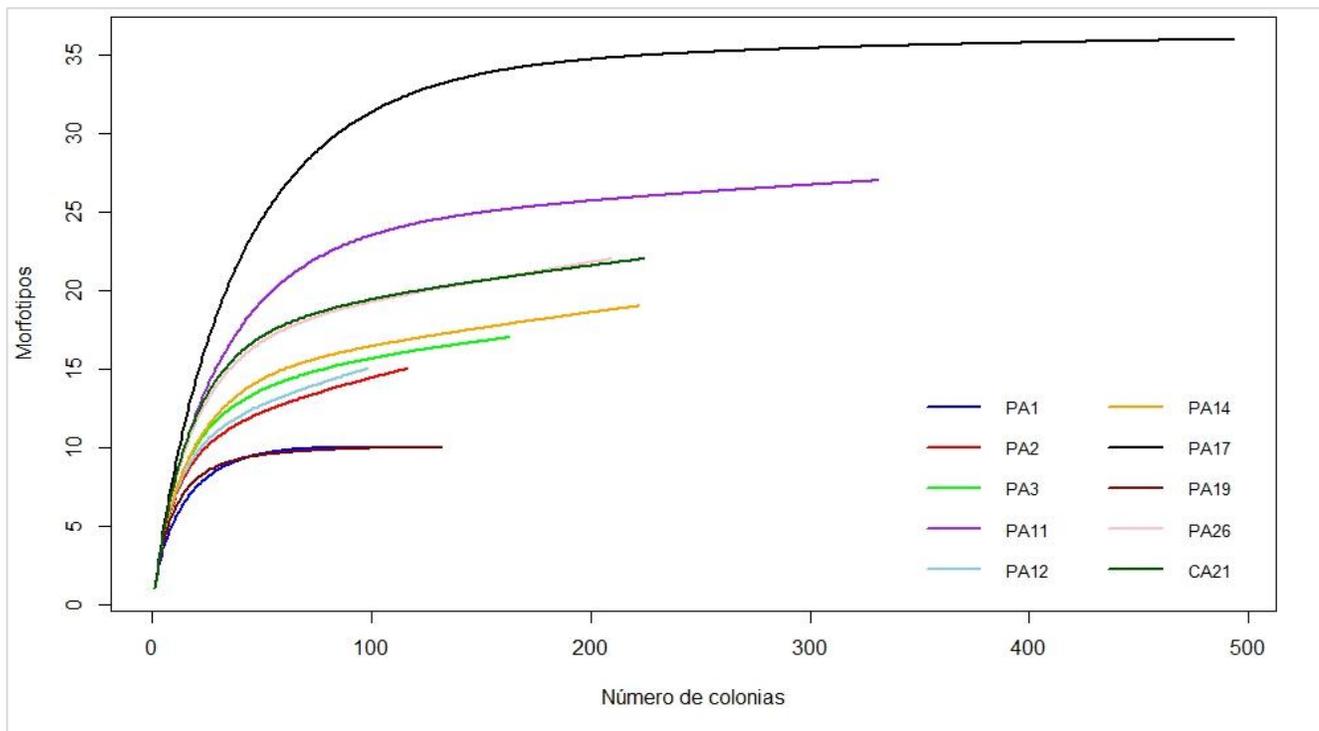


Figura 2 Curvas de acumulación de morfotipos bacterianos en función de las colonias obtenidas en los cultivos de *P. lima* y *Coolia* sp.

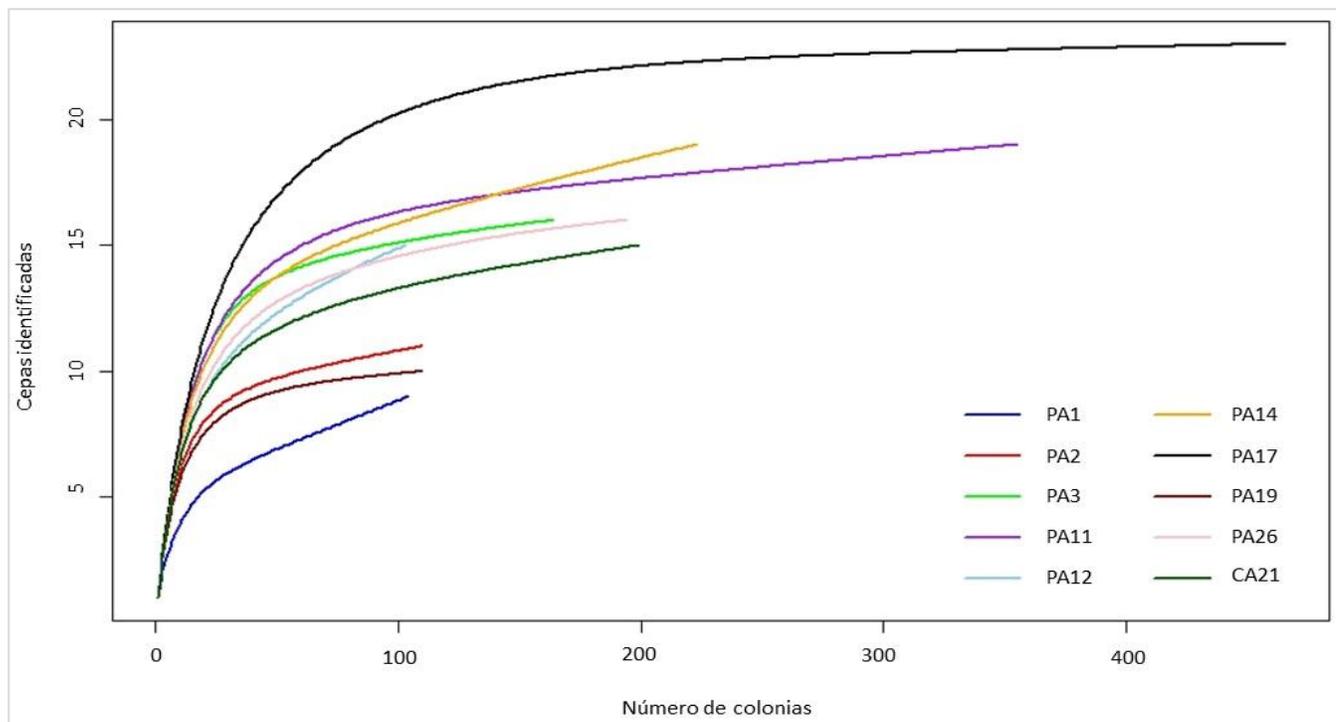


Figura 3 Curvas de acumulación de cepas bacterianas en función de las colonias obtenidas en los cultivos de *P. lima* y *Coolia* sp.

El árbol filogenético obtenido muestra 22 géneros bacterianos pertenecientes a 12 familias, 11 órdenes y 5 clases dentro de los fila Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (**Figura 4**). Dentro de Proteobacteria, para la clase α -proteobacteria se encontraron los géneros *Paracoccus*, *Roseicyclus*, *Marispirillum*, *Thalassospira* y *Sphingobium*, mientras que para la clase γ -proteobacteria, la más abundante en este estudio, se encontraron los géneros *Agaribacter*, *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Songiibacter*, *Halomonas*, *Larsenimonas*, *Corallomonas*, *Azomonas*, *Pseudomonas*, *Serpens* y *Chiayiivirga*.

Dentro de las Actinobacterias se encontró la clase Actinomycetales con los géneros *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus* y *Okibacterium*. De las fila Bacteroidetes y Firmicutes solo se obtuvieron los géneros *Euzebyella* (clase Flavobacteriia) y la familia Planococcaceae (clase Bacilli) respectivamente.

El 27% de las secuencias correspondieron al género *Microbacterium*, el 17% a *Pseudomonas*, el 10% a *Alteromonas*, seguido por *Halomonas* con un 9%. Los géneros *Marinobacter* y *Agaribacter* representaron un 7% y 6%, respectivamente, mientras que *Sphingobium*, *Songiibacter* y *Kocuria* contribuyeron con un 4%. El resto de los géneros fueron representantes únicos.

A la derecha del árbol filogenético se construyó una gráfica de barras que representan la abundancia de cada género bacteriano en los cultivos de los dinoflagelados o en la solución circundante. En general, la distribución de los aislados resultó parecida: 55% de géneros se obtuvieron de los dinoflagelados y 45% de la solución.

El género *Microbacterium* fue el más abundante en los aislados obtenidos del dinoflagelado (con 32%) y *Pseudomonas* en los aislados de la solución circundante (con 22%). La mayoría de los géneros bacterianos fueron encontrados tanto en el dinoflagelado como en la solución, con algunas excepciones: *Azomonas*, *Corallomonas*, *Euzebyella*, *Kocuria* y *Paracoccus* fueron exclusivos de la solución circundante, mientras que *Larsenimonas*, *Marispirillum*, *Okibacterium*, un género no identificado de Planococcaceae, *Serpens* y *Thalassospira* solo se encontraron en los dinoflagelados.

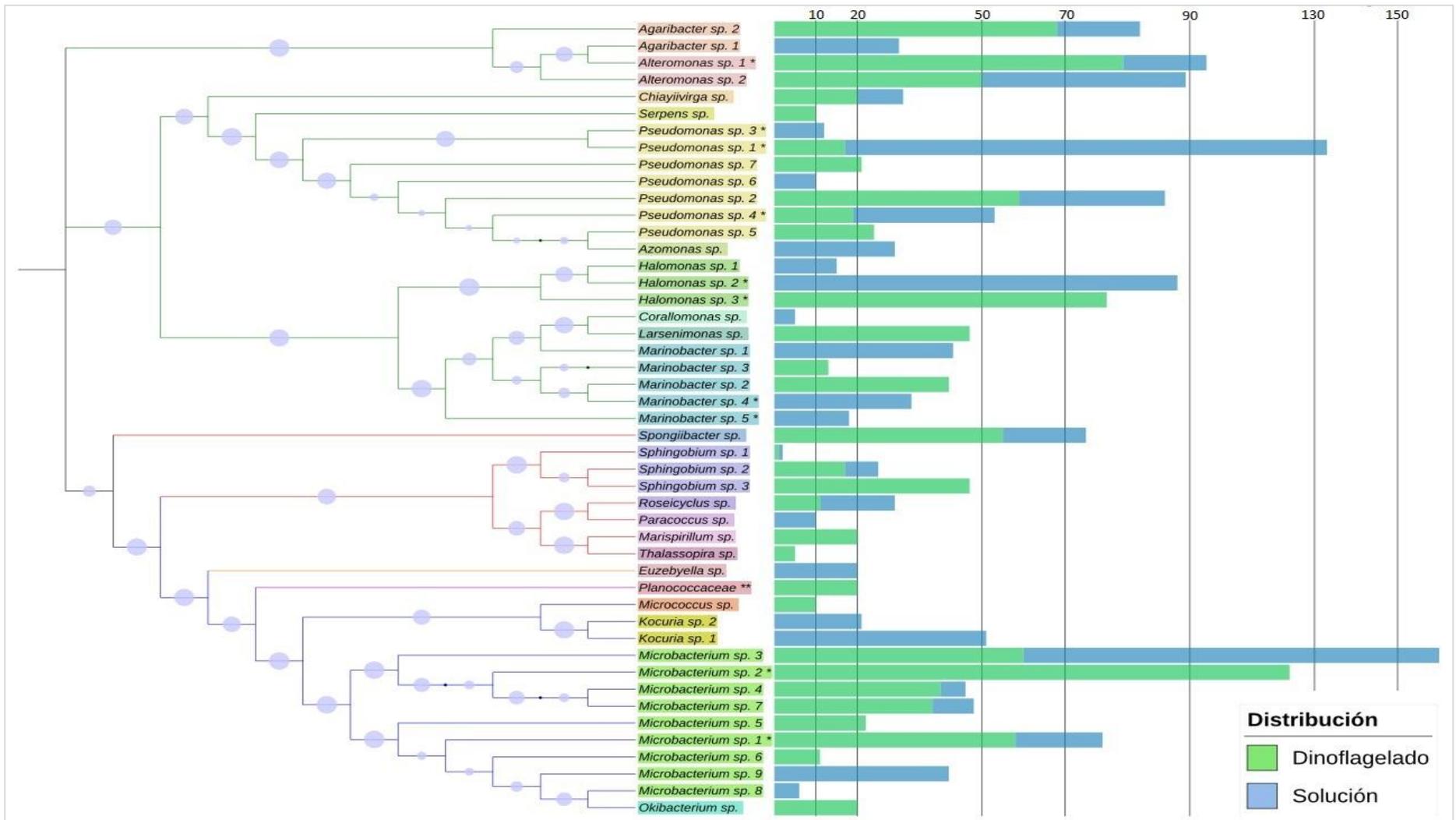


Figura 4 Árbol filogenético de los representantes bacterianos aislados de los cultivos de *P. lima*. El valor del bootstrap aparece en los nodos con un círculo azul. El asterisco junto a las etiquetas indica los géneros bacterianos aislados también del cultivo de *Coolia* sp y dos asteriscos indican que fueron aislados exclusivamente de *Coolia* sp. El color de las etiquetas denota los diferentes géneros encontrados y el color de las líneas representa la clase correspondiente: verde para γ -proteobacteria, rojo para α -proteobacteria, anaranjado para Flavobacteriia, morado para Bacilli y azul para Actinobacteria. A la derecha, las barras representan el número de colonias identificadas de cada género, en azul las de la solución circundante y en verde las del cultivo del dinoflagelado.

En la **Figura 5** se muestra la distribución de los géneros en cada una de los cultivos de *P. lima* y *Coolia* sp. Los géneros *Pseudomonas* y *Microbacterium* fueron los únicos que se encontraron en todos los cultivos, mientras que *Marinobacter* estuvo ausente solo en PA26. El cultivo PA1 presentó la menor diversidad bacteriana con solo los tres géneros antes mencionados, mientras que la muestra con mayor diversidad bacteriana fue PA17, con 13 géneros que comprenden a *Agaribacter*, *Alteromonas*, *Corallomonas*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Larsenimonas*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Roseicyclus*, *Sphingobium* y *Spongiibacter*.

Si bien la mayoría de los géneros bacterianos se encontraron en todas los cultivos, también se identificaron algunos específicos en ciertas cultivos como *Okibacterium* en PA2, *Micrococcus* en PA3, *Thalassospira* en PA11, *Euzebyella* en PA14, *Corallomonas* y *Paracoccus* en PA17, *Serpens* en PA26 y un género no identificado de la familia Planococcaceae en CA21. El cultivo PA14, de interés especial ya que fue colonizado por cianobacterias, fue el única en presentar al género *Euzebyella*.

El cultivo PA17 también presentó la mayor abundancia de colonias identificadas, mientras que PA1 y PA12 presentaron la menor abundancia, siendo PA1 la menos abundante en colonias aisladas de la solución y PA12 en colonias aisladas del dinoflagelado.

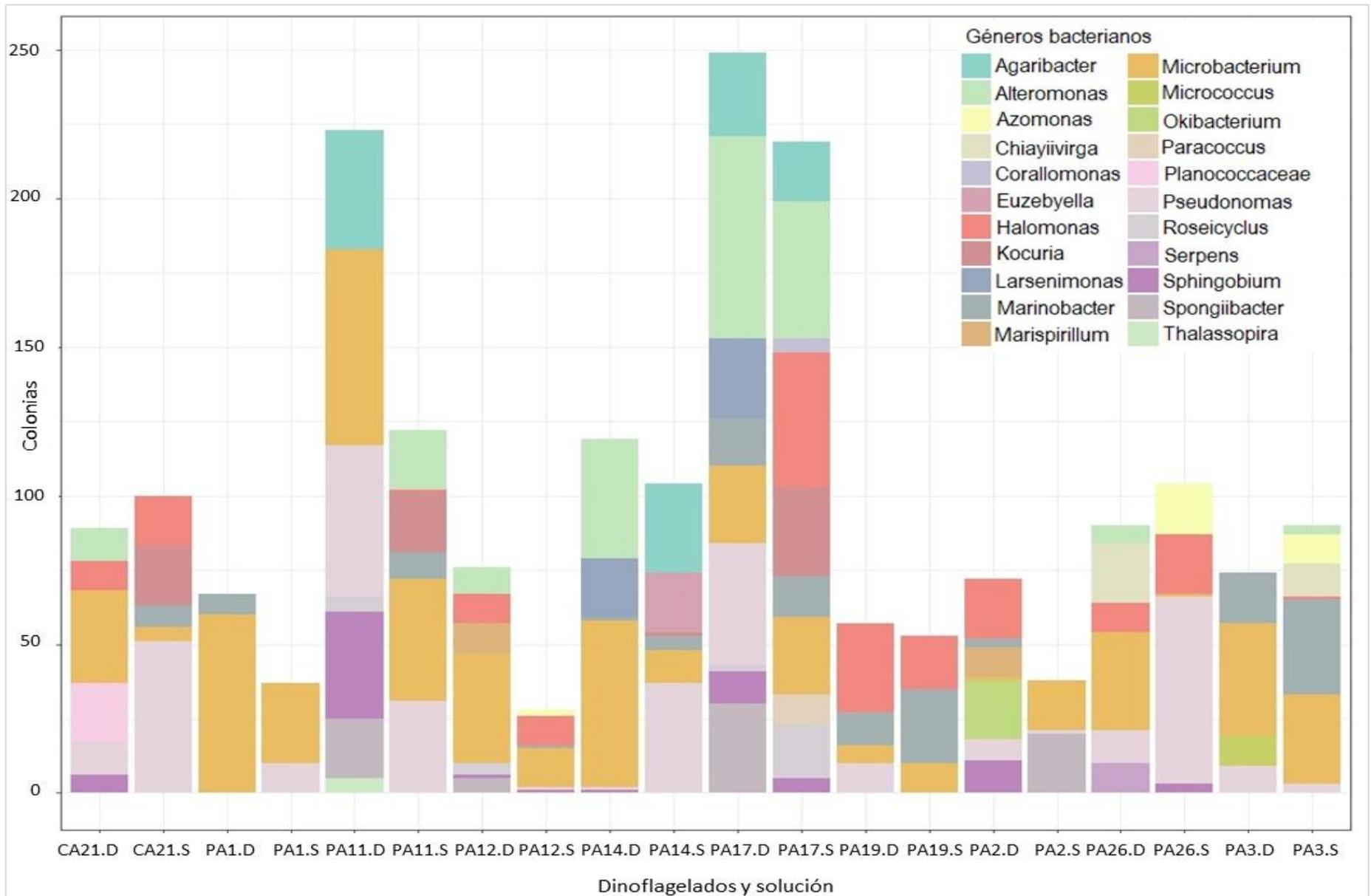


Figura 5 Géneros bacterianos identificados en los cultivos de *P. lima* y *Coolia* sp. La D denota a los géneros bacterianos aislados de los cultivos de dinoflagelados y la S a bacterias aisladas de la solución circundante

El diagrama de Venn-Euler obtenido muestra la distribución de los géneros bacterianos asociados a los dinoflagelados *P. lima* y *Coolia sp* (**Figura 6**). Como era de esperar, el mayor número de géneros bacterianos (16 de 22 géneros) se encontraron exclusivamente en los cultivos de *P. lima*, mientras que el cultivo de *Coolia sp* tuvo en exclusiva al único representante de la familia Planococcaceae. Ambos dinoflagelados compartieron los géneros *Alteromonas*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Marinobacter* y *Microbacterium*.

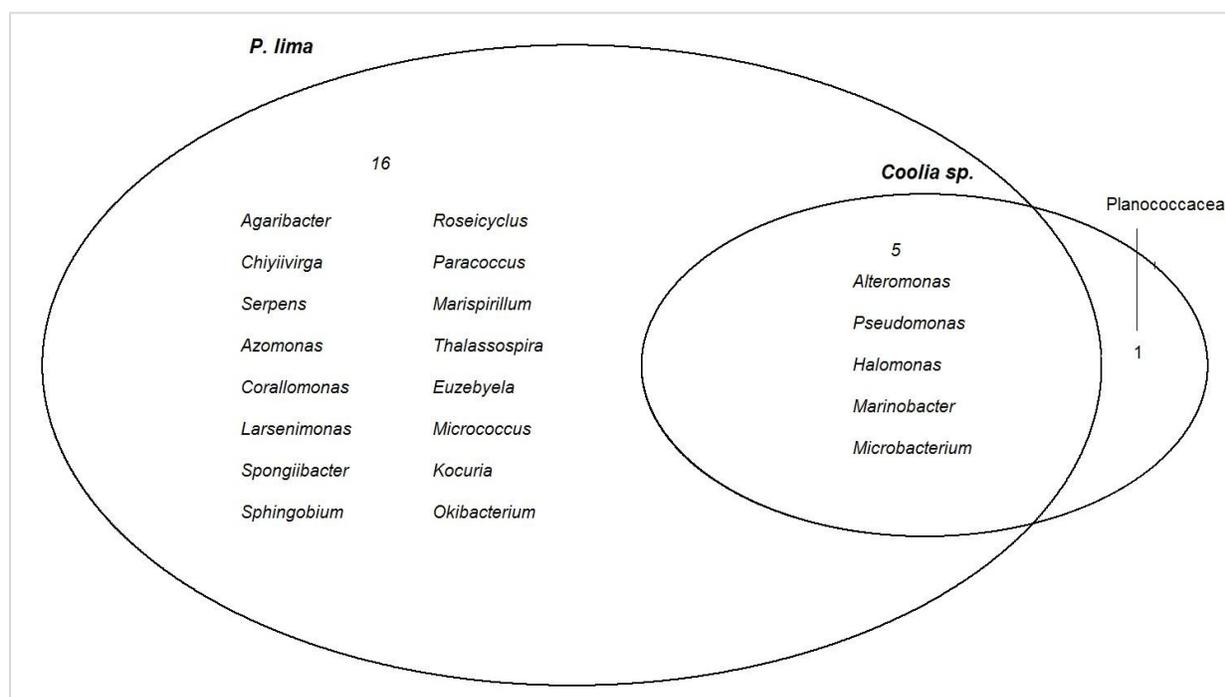


Figura 6 Diagrama de Venn-Euler de los géneros bacterianos asociados a *P. lima* y *Coolia sp*.

8.2 Análisis de toxinas

El mapa de calor de la **Figura 7** muestra la concentración de toxinas encontradas en los diferentes cultivos de *P. lima*. Se excluyó de este análisis al cultivo P14 debido a que fue colonizado por cianobacterias antes de la prueba de toxicidad. Se identificaron las toxinas OA y DTX1, además de un isómero no reportado anteriormente al que se nombró DTX1a y sus respectivas formas diol-éster OA.D8, DTX1.D8 y DTX1a.D8. El OA estuvo presente en todos los cultivos, mientras que

la DTX1a.D8 solo se encontró en PA1 y PA2. Los cultivos PA17 y PA19 presentaron solo 3 análogos y PA2 5 análogos, mientras que el resto de los cultivos presentaron 4 análogos.

Los cultivos de *P. lima* se agruparon en 2 grupos grandes: el primero, conformado por PA17, PA1 y PA26, los cuales fueron los más tóxicos, principalmente el PA17, mientras que el segundo *grupo* estuvo formado por PA2, PA3, PA11 y PA12 y correspondió a los cultivos menos tóxicos, principalmente PA11 y PA12.

Todas las muestras presentaron OA, siendo PA17 la que tuvo mayor concentración, con $21.828 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$, y PA12 la de menor concentración, con $1.334 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$. La toxina DTX1 fue encontrada en PA2, PA11, PA12 y PA26, siendo PA26 la que presentó mayor concentración, con $14.962 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$, y PA12 la de menor concentración, con $1.527 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$. El isómero DTX1a fue identificado en PA1, PA2, PA3, PA17 y PA19, siendo PA17 la que tuvo mayor concentración, con $2.574 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$, y PA2 la de menor concentración, con $0.134 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$.

La forma diol-éster del OA también se encontró en todas los cultivos analizados. La mayor concentración se encontró en PA26 con $14.962 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$ y la menor concentración en PA12 con $1.527 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$. El análogo DTX1.D8 se encontró en PA2, PA11, PA12 y PA19, siendo PA2 el de mayor concentración con $0.09 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$ y P4 el de menor concentración, con $0.219 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$. Finalmente, el análogo DTX1a.D8 solo se encontró en PA1 (con $0.2 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$) y PA3 (con $0.12 \text{ fmol} \cdot \text{cel}^{-1}$). La tabla completa de las concentraciones se presenta en el **Anexo 3**.

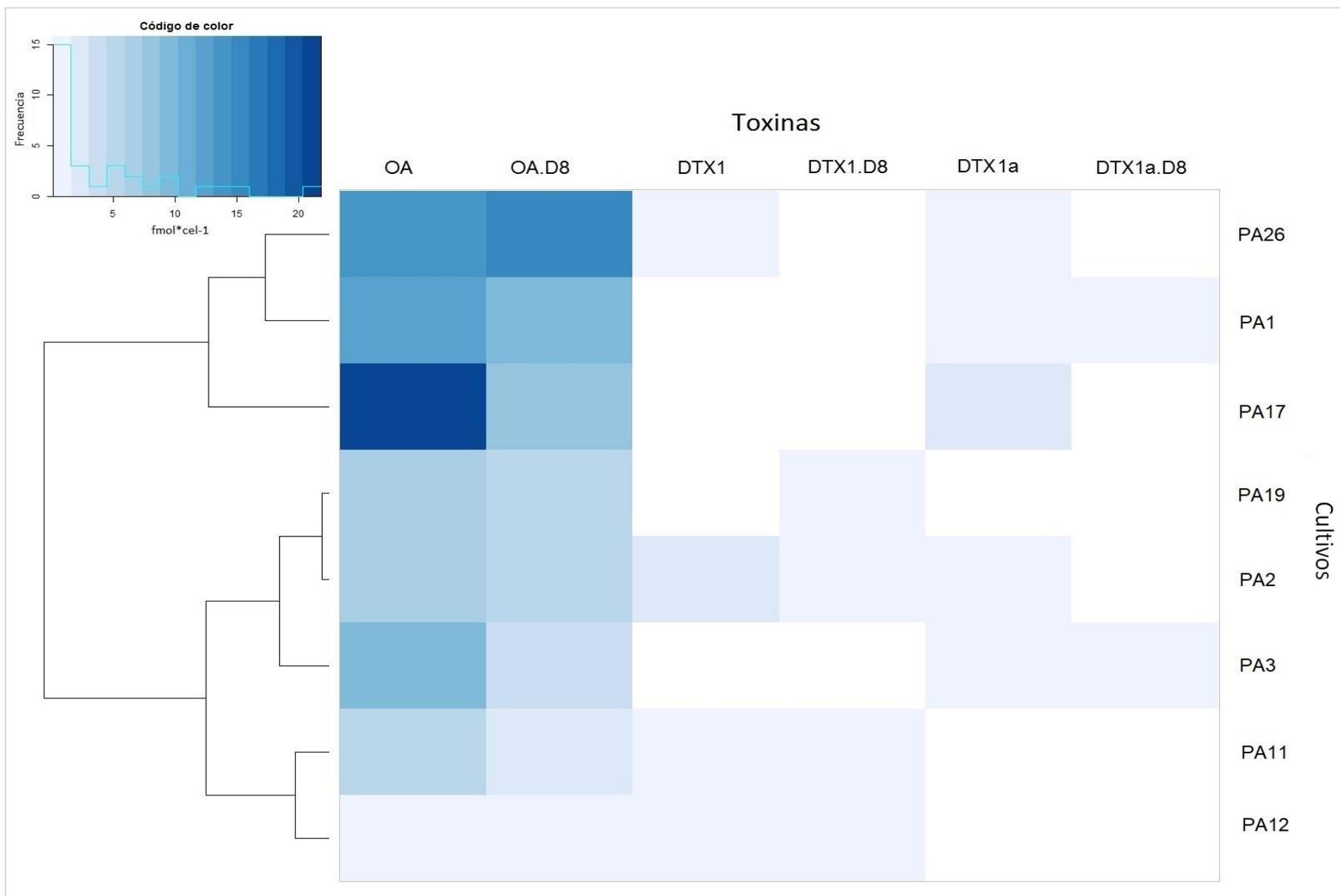


Figura 7 Mapa de color de las toxinas mostrando su concentración (f_{mol} *cel⁻¹) en los cultivos de *P. lima*. El dendrograma muestra la relación de las muestras con respecto a su toxicidad total.

8.3 Relación de toxinas y bacterias asociadas a *P. lima*

En la **Figura 8** se muestra la presencia de toxinas y géneros bacterianos en los nueve cultivos de *P. lima*.

Los cultivos PA1 y PA2 presentaron cinco de las seis toxinas identificadas, compartiendo las toxinas OA, OA.D8, DTX1a y DTX1.D8, pero difirieron en la presencia de DTX1 y DTX1a.D8, respectivamente. Con relación a sus bacterias asociadas, PA1 solo presentó los géneros *Marinobacter*, *Microbacterium* y *Pseudomonas*, mientras que PA2 tuvo una mayor abundancia de géneros (*Halomonas*, *Marinobacter*, *Marispirillum*, *Microbacterium*, *Okibacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingobium* y *Spongiibacter*). El cultivo PA3 presentó las toxinas OA y DTX1a, así como sus respectivas formas esterificadas, y ocho de los 22 géneros identificados en este estudio.

Si bien PA11 y PA12 presentaron los mismos análogos, OA y DTX1 con sus respectivas formas esterificadas, estos cultivos presentaron diferencias en su composición bacteriana; PA11 registró los géneros *Agaribacter*, *Alteromonas*, *Kocuria* y *Thalassospira*, mientras que PA12 registró los géneros *Azomonas*, *Marispirillum* y *Roseicyclu*. Sin embargo, ambos cultivos presentaron 6 géneros en común incluyendo a las cosmopolitas *Microbacterium* y *Pseudomonas*.

El cultivo PA17 fue el de mayor diversidad bacteriana con 16 géneros, pero solo presentó los análogos OA, DTX1a y OA.D8. En PA19 se identificaron los análogos OA, OA.D8 y DTX1.D8OA y los géneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Microbacterium* y *Pseudomonas*. Finalmente, PA26 presentó las toxinas OA.D8, DTX1 y DTX1a, así como nueve géneros bacterianos.

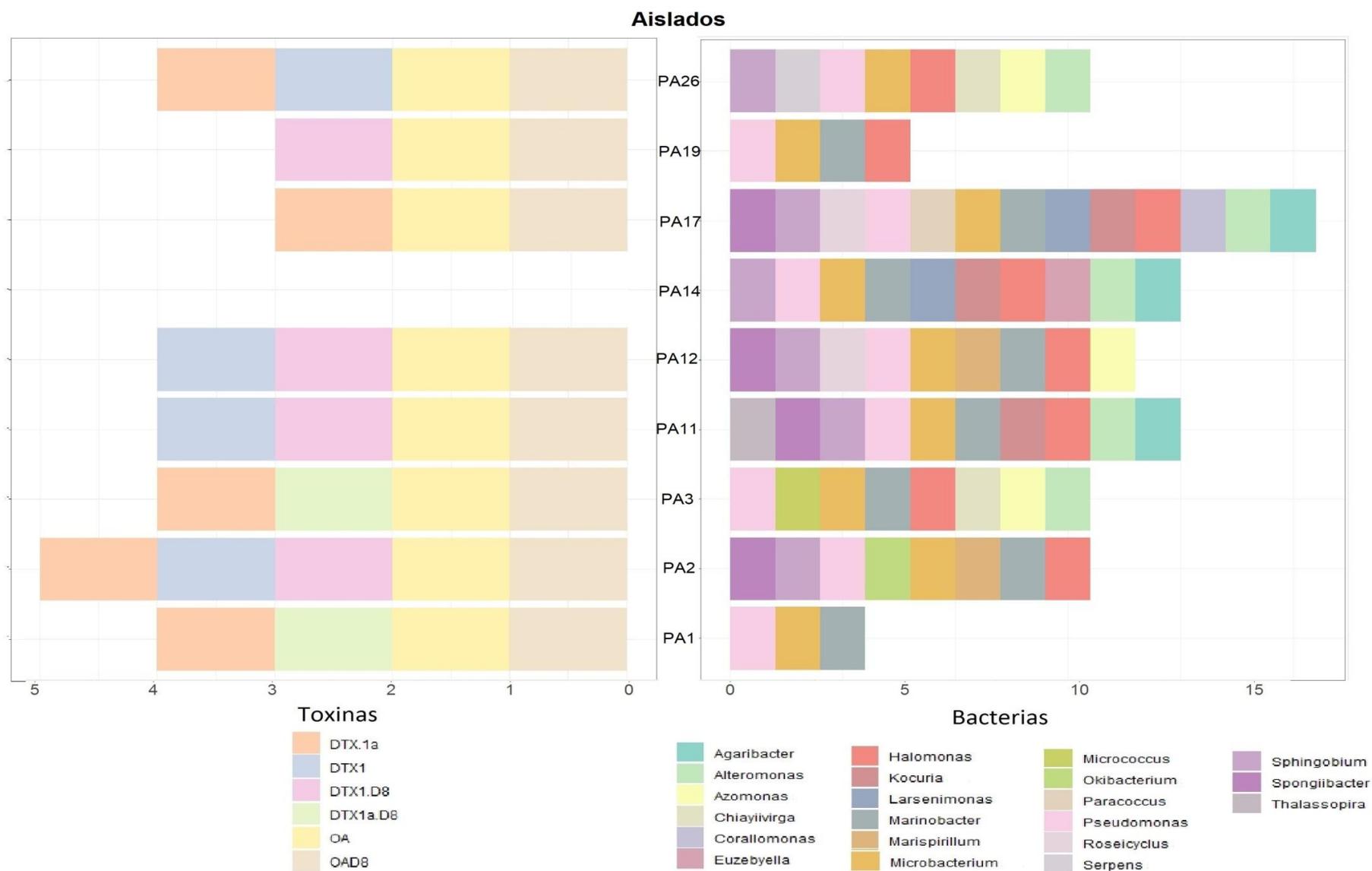


Figura 8 Presencia de toxinas (izquierda) y géneros bacterianos (derecha) encontrados en cada cultivo de *P. lima*.

La primera gráfica de NMDS (**Figura 9**) muestra la distribución de los cultivos de *P. lima* con respecto a la presencia de morfotipos bacterianos, ajustando los vectores de toxinas con un p-value < 0.1. En este NMDS se observan tres grupos: en el primer grupo se encuentran los cultivos PA1, PA11, PA17 y PA26; el segundo grupo está conformado por los cultivos PA2, PA12 y PA19; mientras que en el tercer grupo se encuentra solamente el cultivo PA3. Solo el cultivo PA12 mostró una relación positiva con la toxina DTX1.D8.

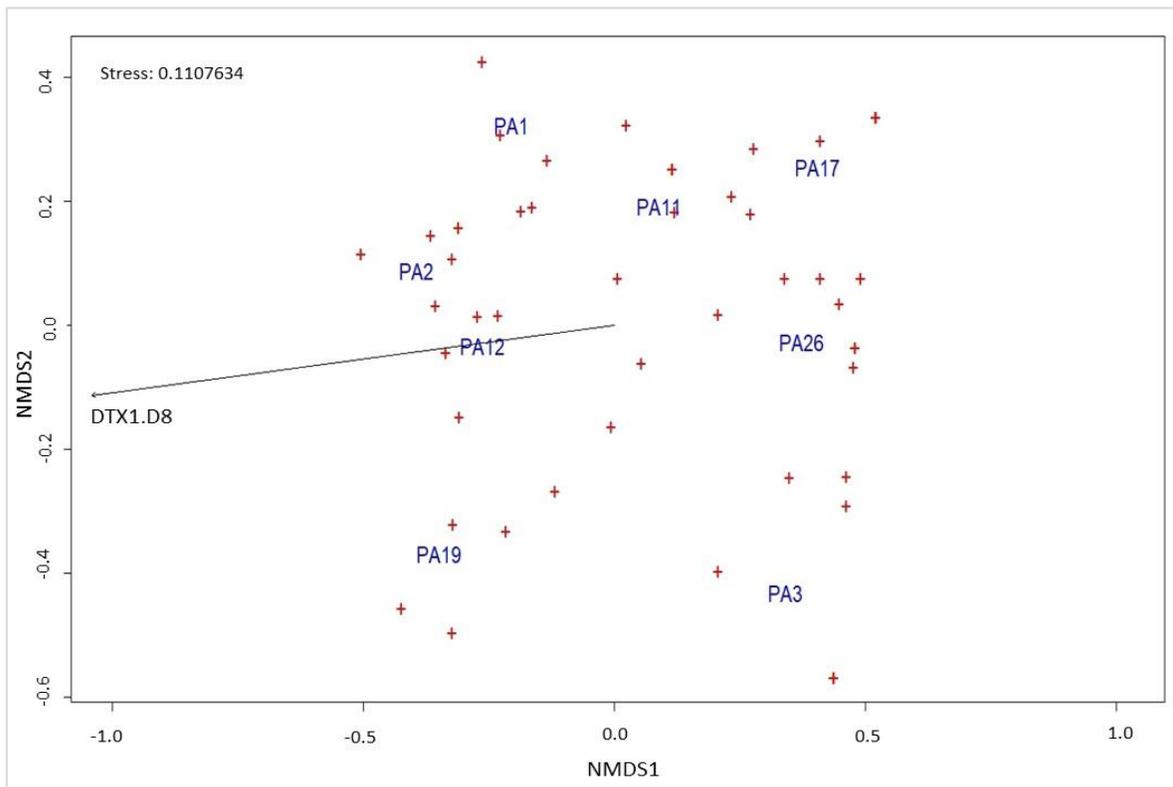


Figura 9 NMDS de la distribución de los cultivos de *P. lima* con respecto a la presencia de morfotipos. La longitud del vector (toxina) indica la magnitud y correlación con las muestras.

La segunda gráfica de NMDS (**Figura 10**) muestra la distribución de los cultivos de *P. lima* con respecto a la abundancia de los diferentes géneros bacterianos obtenidos, así como su correlación con las toxinas. De este análisis se excluyeron a los géneros *Pseudomonas* y *Microbacterium*, debido a su carácter cosmopolita. En la gráfica se observan cuatro agrupaciones: los cultivos PA1 y PA3 se agruparon por la abundancia de *Marinobacter*. PA1 fue el único en mostrar una

correlación positiva con la toxina DTX1a.D8. En el segundo grupo se encuentran los cultivos PA19 y PA26, relacionados por los géneros *Halomonas* y *Marinobacter*. PA2 y PA12 se encontraron agrupados por los géneros *Marispirillum* y *Roseicyclus*. Finalmente, el cuarto grupo estuvo conformado por P11 y P17, cuya composición bacteriana fue similar. El resto de los cultivos de *P. lima* y sus respectivas bacterias aisladas no mostraron relación con las toxinas identificadas en este estudio.

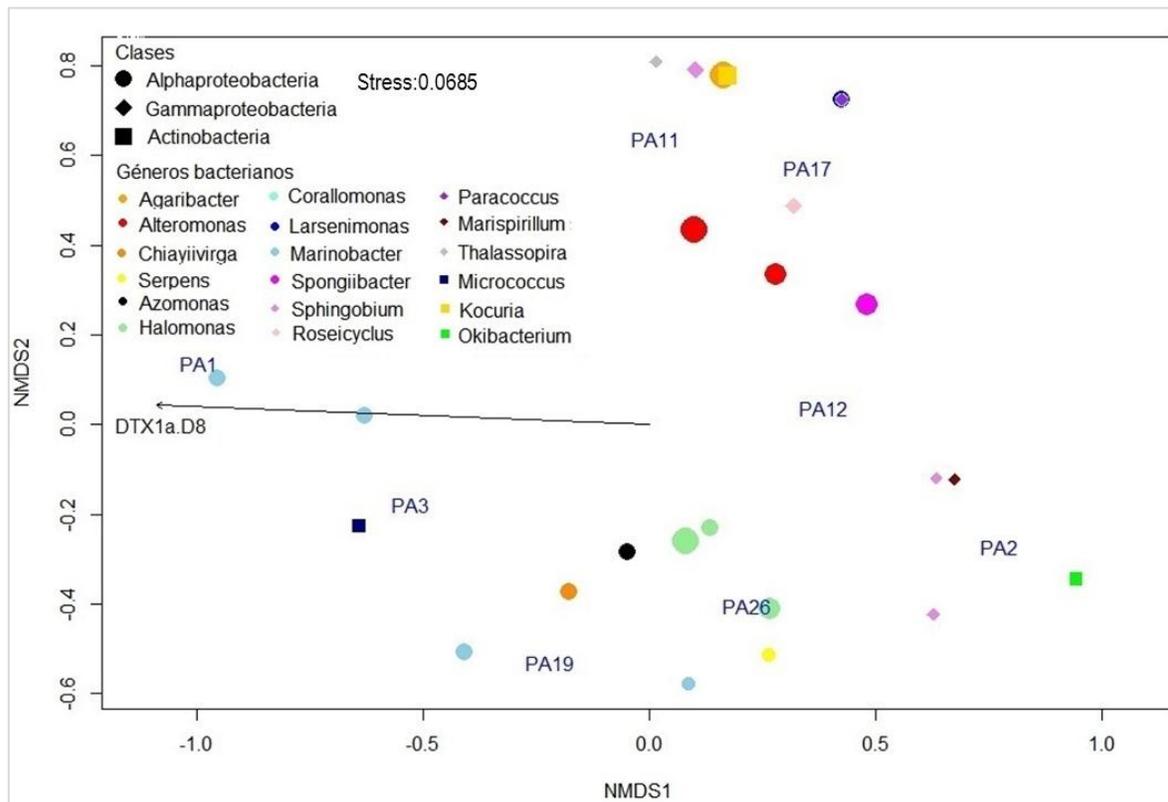


Figura 10 NMDS de la distribución de los cultivos de *P. lima* con respecto a la abundancia de géneros bacterianos obtenidos, excluyendo a los géneros *Pseudomonas* y *Microbacterium*. La figura de los símbolos denota la Clase, el color denota los géneros bacterianos y el tamaño la abundancia, siendo los más pequeños los menos abundantes y los más grandes los más abundantes. La longitud del vector (toxina) indica la magnitud y correlación con los cultivos.

8.4 Microscopía electrónica

La **Figura 11** muestra una selección de imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las bacterias obtenida.

Las imágenes A_1 y A_2 pertenecen al género *Kocuria*, que se obtuvo exclusivamente de los aislados de la solución circundante de PA11, PA16, PA17 y CA21. Se identificaron dos cepas con diferentes morfologías, la colonia obtenida de la muestra PA11 fue rosa y la obtenida de la PA26 amarilla, ambas crecieron en medio LB.

Las imágenes B_1 y B_2 corresponden al género *Pseudomonas*, la cual se aisló de todos los cultivos. Las morfologías de estos géneros fueron variadas: en medio LB se presentaron como colonias de color café o amarillo mientras que en medio MM fueron anaranjadas, blancas o amarillas.

Las imágenes C_1 y C_2 corresponden al género *Thalassospira*, que se aisló exclusivamente del dinoflagelado en la muestra PA11 y presentó un color rosa brillante en el medio MM.

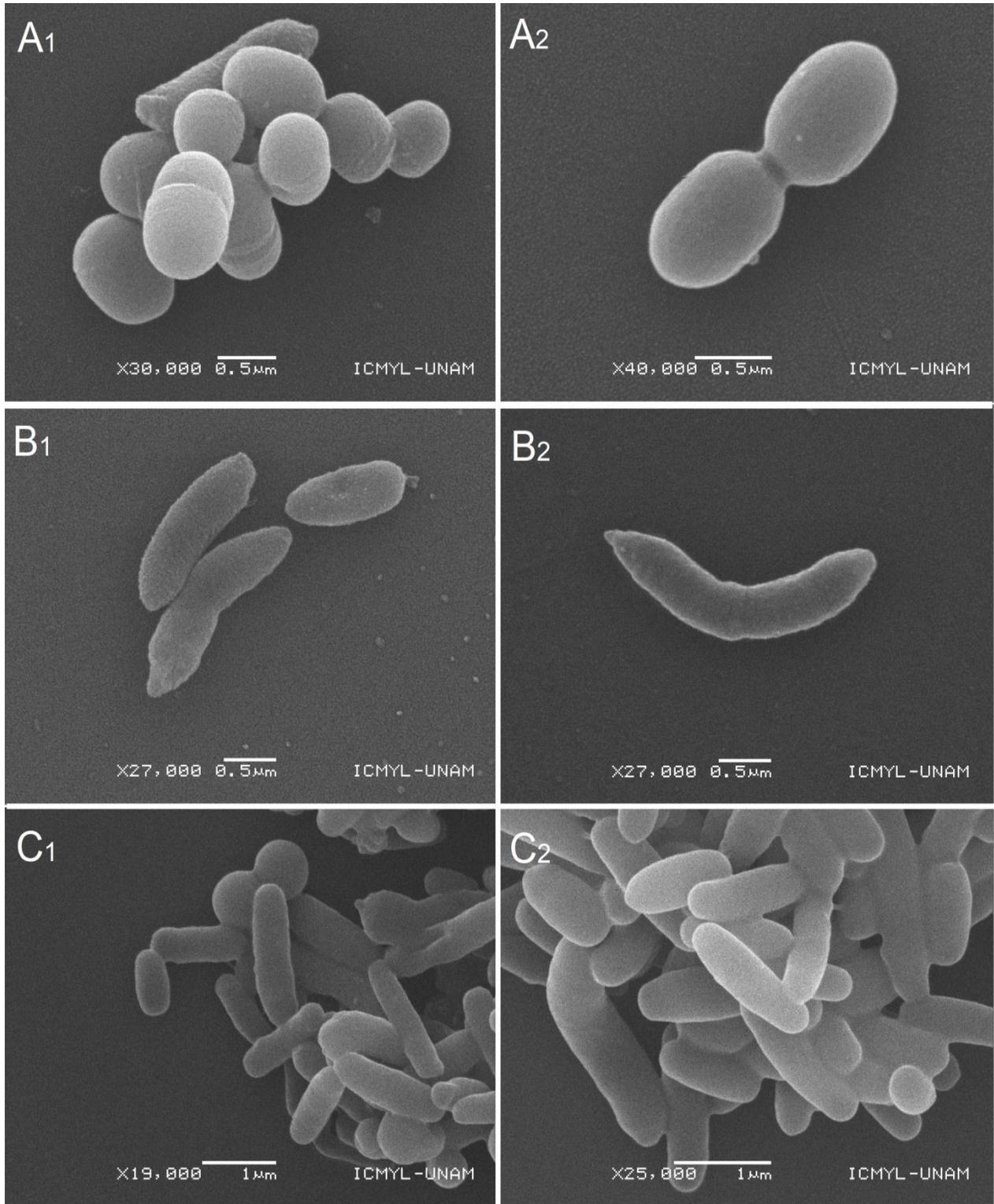


Figura 11 Imágenes de bacterias aisladas de los cultivos de dinoflagelados, obtenidas mediante MEB. Las imágenes A₁ y A₂ corresponden al género *Kocuria*, las imágenes B₁ y B₂ corresponden al género *Pseudomonas* y las imágenes C₁ y C₂ corresponden al género *Thalassospira*.

9. DISCUSIÓN

9.1 Relación de *Prorocentrum lima* y *Coolia* sp con sus bacterias asociadas

Las curvas de acumulación muestran que, en general, el esfuerzo de muestreo por morfotipos bacterianos en función del número de colonias obtenidas de los cultivos de dinoflagelados fue mayor que el de géneros bacterianos, salvo para los cultivos PA2 y PA12, cuyas curvas de acumulación de morfotipos no alcanzaron la asíntota y, por tanto, la caracterización de morfotipos no fue suficiente, y los cultivos PA17 y PA11, que sí estuvieron suficientemente muestreados en cepas. Por lo tanto, se debería de haber incrementado el esfuerzo de muestreo en los cultivos PA2 y PA12 para tener suficiente representación de morfotipos en función de las colonias bacterianas obtenidas, así como el esfuerzo de muestreo de cepas bacterianas en la mayor parte de los cultivos de dinoflagelados analizados.

Por otro lado, algunos autores han demostrado que la comunidad de las bacterias asociadas al dinoflagelado y las encontradas en la solución circundante son diferentes (Pérez *et al.*, 1998; Prokic *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio, el porcentaje de bacterias aisladas de los dinoflagelados y de la solución circundante fue prácticamente igual. Además, los dinoflagelados y la solución circundante compartieron 11 de los 22 géneros bacterianos encontrados, mientras que en la solución se presentaron cinco géneros únicos (*Azomonas*, *Corallomonas*, *Euzebyella*, *Kocuria* y *Paracoccus*) y en los dinoflagelados seis géneros únicos (*Larsenimonas*, *Marispirillum*, *Okibacterium*, un género no identificado de Planococcaceae, *Serpens* y *Thalassospira*).

Diversos estudios han comprobado que hay una relación entre las bacterias heterótrofas y los dinoflagelados que modifica la dinámica de los FAN (Park *et al.*, 2015; Santi-Deli *et al.*, 2015). Existen marcadas diferencias en la comunidad bacteriana a lo largo de los diferentes estados del FAN: la clase γ -proteobacteria suele estar en baja proporción durante las etapas iniciales del florecimiento (Park *et al.*, 2015), mientras que varios géneros de la clase α -proteobacteria disminuyen conforme aumenta el número de dinoflagelados (Guidi *et al.*, 2017).

En un estudio reciente, se ha identificado diferentes órdenes de α -proteobacteria en la evolución del FAN del dinoflagelado *Margalefidium (Cochlodinium) polykrioides* (Park *et al.*, 2015). En la etapa inicial del FAN la clase α -proteobacteria fue la más abundante, con los órdenes Rhizobiales, Rhodobacterales, Rhodospirillales y Shingomonadales. En este estudio, α -proteobacteria representó solo el 8% de la diversidad encontrada, obteniéndose los órdenes Rhodobacterales, Rhodospirillales y Shingomonadales en los cultivos PA1, PA2, PA11, PA12, PA14, PA17 y PA26, así como en CA21. Los Rhodobacterales resultan de especial interés, ya que han demostrado tener una correlación positiva con el inicio de los FAN de *P. lima*, dado que el 90% de los Rhodobacterales cuenta con vías metabólicas para la síntesis de vitamina B₁₂, componente principal para el crecimiento de las algas (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2013). Sin embargo, los Rhodobacterales pueden pasar de una relación mutualista a una patógena con el dinoflagelado dependiendo de los metabolitos del alga, lo cual explica su aparición a inicio y término de los FAN (Riclea *et al.*, 2012; Guidi *et al.*, 2017).

La segunda clase con mayor presencia en todos los cultivos fue Actinobacteria (33%), la cual es abundante en los FAN de dinoflagelados durante las fases de mantenimiento y declive (Guidi *et al.*, 2017). En este estudio se identificaron cuatro géneros de Actinobacterias, incluyendo a la cosmopolita *Microbacterium* y un aislado de *Micrococcus* en PA3. Algunas Actinobacterias como *Micrococcus* han mostrado actividad algicida contra diversos dinoflagelados (Park *et al.*, 1998; Mayali *et al.*, 2004). Cabe resaltar que PA3 solo presentó las clases Actinobacteria (48%) y γ -proteobacteria (52%), las cuales están relacionadas con las fases de mantenimiento y declive de los FAN (Park *et al.*, 1998; Mayali *et al.*, 2004).

Muchas bacterias aisladas de las costas reciben especial atención al ser consideradas alguicidas, tales como *Alteromonas* y *Pseudoalteromas* (Su *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2018). Existen dos estrategias por las cuales una bacteria es capaz de lisar un alga: 1) de forma directa: la bacteria sintetiza compuestos alguicidas al interior de la célula y la ataca mediante contacto directo, y 2) de forma indirecta: la más reportada, la bacteria sintetiza enzimas capaces de

degradar la pared celular del alga (Mayali *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2018).

Algunos géneros de γ -proteobacteria tienen actividad algicida sobre varias especies de *Prorocentrum* y, por tanto, su predominio suele estar asociado con la terminación del FAN (Kim *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2015). En este estudio la clase γ -proteobacteria fue la más abundante (57%), destacando entre sus géneros la presencia de *Alteromonas*, *Halomonas* y sobre todo *Pseudomonas*, la cual estuvo presente en todos los cultivos. En *Alteromonas* y *Pseudomonas* se ha identificado la síntesis de componentes hidrolíticos capaces de matar múltiples especies de algas (Mayali *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2018), mientras que se ha comprobado que *Halomonas* inhibe la movilidad de *P. donghaiense* y otros dinoflagelados como *Alexandrium tamarense* y *Karenia mikimotoi* (Wang *et al.*, 2018).

El efecto alguicida también se puede encontrar en otros grupos bacterianos, como el género *Thalassospira* de la clase α -proteobacteria, aislado en PA11. Este género ha sido utilizado en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en derrames de crudo en el mar y sus enzimas para el control del dinoflagelado *K. mikimotoi* (Kodama *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2016).

En este estudio se aisló al género *Euzebyella* en PA14, el cual fue colonizado por cianobacterias poco después de realizar el aislamiento de bacterias. *Euzebyella* es un representante del grupo Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes (CFB) que se distingue por sintetizar proteínas con actividad algicida, por lo que incrementa su actividad durante el pico y la terminación de los FAN (Mayali *et al.*, 2002; Roth 2005; Park *et al.*, 2015).

El cultivo de *Coolia* sp presentó cinco géneros bacterianos en común con los obtenidos de *P. lima*: *Alteromonas*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Marinobacter* y *Microbacterium*. Estos géneros se pueden considerar cosmopolitas dado que se presentaron en todos los cultivos de dinoflagelados en este estudio, lo que sugiere que su presencia cumple roles ecológicos para los dinoflagelados, pero no influyen directamente en la producción de toxinas (Uribe *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2015), por encontrarse presentes tanto en dinoflagelados tóxicos y no tóxicos.

9.2 Análisis de toxinas

P. lima es conocido por producir la toxina del ácido okadaico (OA) y sus análogos, las dinofisistoxinas (DTXs), ambas poliéteres lipofílicos termoestables. Dentro de las DTXs se encuentran la DTX1, que posee un grupo metilo adicional respecto al OA, la DTX2, con uno de los grupos metilo en distinta posición (Murakami *et al.*, 1982; Hu *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 2006; Fernández-Martínez, 2015), y la DTX3, que solo se ha encontrado en la glándula digestiva de bivalvos y moluscos y se transforma a DTX1 en el estómago humano después del consumo, lo que implica que tampoco existe en el dinoflagelado (Lee *et al.*, 2016), y por ello no fue encontrada en este estudio.

En este estudio se encontraron las toxinas OA, DTX1, el análogo no descrito, llamado provisionalmente DTX1a, y sus respectivas formas esterificadas, las cuales se encontraron en menor proporción respecto a las toxinas libres, lo que puede deberse a la rápida transformación de las moléculas. La formación de las toxinas en *Prorocentrum* comienza en los cloroplastos, en presencia de luz, mediante la forma de los compuestos hidrosolubles DTX5 y DTX4, los cuales son posteriormente transportados a las vacuolas donde, mediante reacciones enzimáticas, son convertidas a formas esterificadas o diol-éster y finalmente a formas libres en cuestión de horas (Windust *et al.*, 2000; Bauder *et al.*, 2001; Vale *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2016).

En este estudio todos los cultivos de *P. lima* presentaron a la toxina OA como la más abundante, seguida por su forma esterificada. En segundo lugar, la toxina DTX1, la cual se identificó en cuatro de los ocho cultivos analizados. Finalmente, el isómero DTX1a, que se encontró en cinco de los ocho cultivos. Este resultado es congruente con la literatura dado que en diversos estudios se ha demostrado que en las especies bentónicas de *Prorocentrum* se obtiene OA como toxina principal, ya sea en forma libre o conjugada (Lee *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2017), mientras que la DTX1 suele ser la segunda más abundante en el contenido total de toxinas (Fernández-Cañamero, 2007). Cabe resaltar que PA17, el cultivo más tóxico del estudio porque registró los valores más altos de OA, no presentó DTX1 ni su forma esterificada.

Ambas toxinas esterificadas de las dinofisistoxinas se observaron en los siguientes cultivos de *P. lima*: DTX1.D8 en PA2 y PA19 y DTX1a.D8 en PA1 y PA3. Debido a que las DTXs suelen producirse en menor proporción que OA en *Prorocentrum*, la detección de las formas esterificadas es aún más escasa (Hu *et al.*, 2017), por lo que es lógico que el isómero DTX1a fuese encontrado en muy pocas muestras y su forma esterificada fuera la de menor abundancia.

9.3 Relación de toxinas y bacterias asociadas a *P. lima*

Se sabe que el tipo y contenido de toxina por célula de dinoflagelado depende de la especie y se han observado grandes diferencias en función de las poblaciones y las condiciones fisiológicas (Lee *et al.*, 1989). En este estudio, los cultivos PA11 y PA12, los menos tóxicos, coincidieron en composición de toxinas dado que ninguno presentó al isómero DXT1a ni su diol-éster DTX1a.D8. Sin embargo, PA11 y PA12 tuvieron una composición bacteriana más similar con PA17 y PA2, respectivamente, en cuanto a morfotipos y géneros compartidos (confirmado por los dos NMDS), a pesar que sus concentraciones de toxinas fueron muy diferentes.

De acuerdo al segundo NMDS, PA11 y PA17 estuvieron relacionados por el género *Alteromonas* en cuanto a su abundancia. La alta abundancia de *Alteromonas* en el cultivo PA17 puede deberse a que las γ -proteobacteria aumentan hacia el pico de un FAN, mientras que en PA11 se podría relacionar con su actividad algicida, ya que se ha reportado que las γ -proteobacteria disminuyen al término de un FAN para dar paso a las α -proteobacteria (Su *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2018).

Los cultivos PA1 y PA3 también coincidieron en su composición tóxica (de acuerdo al mapa de calor) y mostraron una relación positiva con la toxina DTX1a.D8 (de acuerdo con el segundo NMDS). Sin embargo, ambos cultivos no mostraron tener morfotipos en común y su composición bacteriana solo coincidieron en los géneros cosmopolitas *Pseudomonas* y *Marinobacter*. Además, no presentaron representantes de la clase α -proteobacteria, posiblemente

indicando que la fase de mantenimiento-declive de estos cultivos permitió la acumulación de la forma esterificada de la dinofisistoxina menos abundante (Hu *et al.*, 2017).

El tercer cultivo más tóxico y el de menor diversidad de géneros bacterianos aislados fue PA1, el cual presentó cuatro de las seis toxinas identificadas y en su composición bacteriana se encontraron solo los géneros *Microbacterium*, *Marinobacter* y *Pseudomonas*. En esta muestra solo se identificaron bacterias pertenecientes a la clase Actinobacteria y γ -proteobacteria, asociadas a la fase de estabilidad y final de los FAN (Park *et al.*, 1998; Mayali *et al.*, 2004).

El resto de los cultivos de *P. lima* no presentaron una relación entre la composición bacteriana cultivable y las toxinas identificadas, lo cual sugiere que estas bacterias aisladas no interfieren directamente en la producción de toxinas. Se obtuvo un resultado similar en *P. hoffmannianum*, donde no se encontraron diferencias importantes con respecto a la composición de toxinas en cultivos axénicos y no axénicos, lo que indica que las toxinas son producidas por *Prorocentrum* y no por las bacterias asociadas (Morton *et al.*, 1994).

9.4 Microscopia electrónica

Se obtuvieron imágenes del género *Kocuria*, que son bacterias en forma de cocos, Gram positivas, aerobias y sin movilidad (Kim *et al.*, 2004). Se aislaron dos cepas de este género en la solución circundante de los cultivos PA11 y PA17 (*Kocuria* sp1) y en *Coolia* sp (*Kocuria* sp2). Este género ha sido identificado como parte de la composición bacteriana encontrada en la fase de declive de los FAN (Basu *et al.*, 2013).

También se obtuvieron imágenes de *Pseudomonas*, que es un género Gram negativo no fermentativo con forma de bacilo ligeramente curvo que posee varios flagelos polares (Hancock, 1998). En las imágenes obtenidas, estos flagelos no se observan debido a que la técnica utilizada para la preparación de las muestras, que incluye la deshidratación utilizando una serie de alcoholes, elimina las estructuras como flagelos o pili (Kaláb *et al.*, 2008). Este género cosmopolita está

compuesto por más de 100 especies que son capaces de desarrollarse en un gran número de hábitats gracias a su capacidad de utilizar diversos nutrientes (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015). Por lo tanto, su presencia en todas las muestras es congruente y esperada.

Finalmente, se obtuvieron imágenes de *Thalassospira*, un género Gram negativo, anaeróbico facultativo y con forma de bacilo (Nogi *et al.*, 2014). Se aisló exclusivamente del dinoflagelado PA11, por lo que al estar asociada al dinoflagelado se puede inferir que tiene una especificidad mayor que las bacterias de vida libre y que podría presentar un efecto algicida en cultivos de *P. lima* parecido al que presenta para *K. mikimotoi* (Lu *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018).

10. CONCLUSIONES

La distribución de las bacterias aisladas resultó similar entre el dinoflagelado *P. lima* y la solución circundante; sin embargo, la presencia de géneros exclusivamente asociados al dinoflagelado sugiere que existe una relación específica entre este dinoflagelado y sus bacterias extracelulares adheridas a la teca.

Se encontró solo un grupo bacteriano exclusivo de *Coolia* sp. Sin embargo, este dinoflagelado no tóxico compartió con *P. lima* los géneros *Microbacterium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* y *Alteromonas*, siendo todos estos géneros bacterianos cosmopolitas, lo que sugiere que estos géneros no tienen influencia directa en la producción de toxinas.

Los NMDS agruparon cultivos de *P. lima* similares en composición bacteriana que no necesariamente producían las mismas toxinas. Solo dos toxinas (DTX1.D8 y DTX1a.D8), encontradas en baja abundancia, fueron relacionadas con los cultivos utilizados (PA12 y PA1 respectivamente). El resto de las toxinas no tuvo relación con las bacterias aisladas en los otros cultivos de *P. lima*, por lo que se concluye que las bacterias identificadas en este estudio no interfieren de manera directa en la producción de toxinas de *P. lima*.

11. PERSPECTIVAS

El presente trabajo contribuye en la identificación de las bacterias aisladas asociadas al dinoflagelado tóxico *P. lima* en condiciones de cultivo, ya que las bacterias tienen un rol fundamental en el ciclo de vida de los dinoflagelados y la consecuente producción de toxinas.

Para trabajos futuros resultaría imprescindible realizar la identificación y cuantificación de comunidades bacterianas durante las fases de inicio, mantenimiento y declive del FAN producido por *P. lima*. Además, sería aconsejable utilizar muestras de *P. lima* de más regiones de México con el fin de comparar su composición bacteriana y de toxinas.

Además, para un mejor entendimiento de la relación entre bacterias y dinoflagelados se debe identificar las bacterias mediante técnicas de secuenciación masiva con el fin de obtener resultados más precisos.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, M. J., Falter, J. L., y Hearn, C. J. (2001). Nutrient dynamics in the Biosphere 2 coral reef mesocosm: water velocity controls NH₄ and PO₄ uptake. *Coral Reefs*, 20(4), 341-346.
- Basu, S., Deobagkar, D., Matondkar, P., y Furtado, I. (2013). Culturable bacterial flora associated with the dinoflagellate green *Noctiluca miliaris* during active and declining bloom phases in Northern Arabian Sea. *Microbiology of aquatic systems* (65), 934-954.
- Blackburn, S. I.; Bolch, C. J. S.; Haskard, K. A., and Hallegraeff, G. M. (2001). Reproductive Compatibility Among Four Global Populations of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, 40(1):78-87.
- Bauder, A., Cembella, A., Bricelj, V., y Quilliam, M. (2001). Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (213), 39-52.
- Bolch, J. S., y Green, H. G. (2011). The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) requires marine bacteria for growth. *Phycology*, 1009-1022.
- Bravo, I., y Figueroa, R. I. (2014). Towards an Ecological Understanding of Dinoflagellate Cyst Functions. *Microorganisms*, 2(1), 11-32.
- Camacho, F. G. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, 25(2), 176-194.
- Chomérat, N., Saburova, M., Bilien, G., y Al-Yamani, F. (2012). *Prorocentrum bimaculatum* sp. nov. (Dinophyceae, Prorocentrales) a new benthic dinoflagellate species from Kuwait (Arabian Gulf). *Phycology Society of America*, 48(1), 211-221.
- Chung-Hugh Lee, T., Long-Yan Fong, F., Kin-Chung, H., y Wang-Fat Lee, F. (2016). Review: The mechanism of diarrhetic shellfish poisoning toxin production in *Prorocentrum* spp: physiological and molecular perspectives. *Toxins*, 8(272), 2-23.
- Ciccarelli, F., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B., y Bork, P. (2006). Of a highly resolved tree of life. *Science*, 1283-1288.

- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., Mcgarrell, D., Sun, Y., y Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acid Research* (42), 633-642.
- CONABIO. (2012). *Mares mexicanos*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/mares>.
- Cruz, P., Daranas, A., Fernandez, J., Souto, M., y Norte, M. (2006). DTX5c, a new OA sulphate ester derivative from cultures of *Prorocentrum belizeanum*. *Toxicon*, 47(8), 920-924.
- Dang, H., y Quinn, G. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 467-475.
- European Food Safety Authority. (2008). Marine biotoxine in shellfish-okadaic acid and analogues. Scientific opinion of the panel of contaminants in the food chain. *The EFSA journal* (589), 1-62.
- FAO. (2005). *Estudio FAO: Alimentación y nutrición. Biotoxinas marinas*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO. (s.f.). *Regulations and monitoring of marine toxins*. Retrieved from Marine Toxins. FAO: <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0m.htm>.
- Faus, M. A., y Gulledge, R. (2002). Identifying harmful marine dinoflagellates. *Contributions from the United States Herbarium. Smithsonian Institution*, 42, 1-44.
- Faust, M. A., y Gulledge, R. A. (2002). Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. *Contributions from the United States National Herbarium*, 1-144.
- Fernández-Cañamero. (2007). Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos. *Universidad de Santiago de Compostela. Tesis doctoral*, 350.
- Fernández-Martínez, D. A. (2015). Mecanismos de toxicidad y permeabilidad transeptelial de toxinas marinas y de agua dulce. *Universidad de Santiago de Compostela. Tesis doctoral*, 145.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., y Marañón, E. (2012). Review of the main Ecological Features Affecting Benthic Dinoflagellate Blooms. *Cryptogamie, Algologie*, 33(2), 171-179.
- Guidi, F., Pezzolesi, L., y Vanucci, S. (2017). Microbial dynamics during harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* growth: bacterial succession and viral abundance pattern. *Microbiology Open*, 7(4), 1-15.
- Hancock, R. W. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(1), 93-99.
- Heil, C. A., Glibert, P. M., y Fan, C. (2005). *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. A review of harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae*, 4, 449-470.
- Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B., Nuñez-Vázquez, E., Yasumoto, T., Yasuda, M., y Ochoa, J. (2002). Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DPS) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon*, 40, 1121-1127.
- Hinder, S., Hays, G., Edward, M., Roberts, E., Walne, A., y Gravenor, M. (2012). Changes in marine dinoflagellate and diatom abundance under climate change. *Nature Climate Change*, 2(4), 271-275.
- Hu, T., Curtis, J., Walter, J., McLachlan, J., y Wright, J. (1995). Two new water-soluble DPS toxic derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: Possible storage and excretion products. *Tetrahedron letters*, 36, 9273-9276.
- Hu, T., LeBlanc, P., Burton, I., Walter, J., McCarron, P., Melanson, J. y Wright, J. (2017). Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: Self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DPS) toxins. *Harmful Algae*, 63, 85-93.
- Jasti, S., Sierachi, M., Poulton, N., Giewat, M., y Rooney-Varga. (2005). Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium spp.* and other phytoplankton. *Applied environmental microbiology*, 71(1), 3483-3494.
- Kaláb, M., Yang, A., y Chabot, D. (2008). Conventional scanning electron microscopy of bacteria. *Infocus*, 44-61.
- Kim Bum, S., Nedashkovskaya, O., Mikhailov, V., Kyun Han, S., Kim, K.-O., Rhee, M.-S., y Sook Bae, K. (2004). *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine

- sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1617-1620.
- Kim, D., Kim, J., Yim, J., Kwon, S., Lee, C., y Lee, H. (2008). Red to red, the marine bacterium *Hahlla chejuensis* and its prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *J. Microbiology Biotechnology*, 18, 1621-1629.
- Kodama, Y., Ueki, K., Stiknowati, L., y Watanabe, K. (2008). *Thalassospira tepidiphila* sp. nov. a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterium isolated from seawater. *Int. J. Sys. Evol. Mycobiol.*, 58, 711-715.
- Kotaki, Y., Koike, K., Yoshida, M., Thuoc, C., Minh Huyen, N., Chu Hoi, N. y Kodama, M. (2008). Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture in Do Son, Vietnam. *Journal of Phycology*, 36(6), 1057-1060.
- Krock, B., Tillmann, U., John, U., & Cembella, A. (2008). LC-MS/MS Aboard ship: Tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(5): 797–803.
- Kumar, S., Stecher, S., y Tamura, K. (2016). Mega 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger databaset. *Molecular Biology and Evolution*, 1870-1874.
- Lafay, B., Rausch de Traubenberg, C., Breitmayer, V., Gauthier, M., y Chisten, R. (1995). *Roseobacter algicola* sp. no., a New Marine Bacterium Isolated from Phycosphere of the Toxic-Producing Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 290-296.
- Laza-Martinez, A., Orive, E., y Miguel, I. (2011). Morphological and genetic chracterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology*, 46, 45-65.
- Lee, C. W., Narayanan, K., Ng, A., Sim, E., y Ng, C. (2009). Isoalation and characterization of culturable bacteria from tropical coastal waters. *Ciencias Marinas*, 35(2), 153-167.
- Lee, J., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., y Yasumoto, T. (1989). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Jour. Appl. Phycol.*, 1, 147-152.
- Lee, T., Fong, F., Ho, K., y Lee, F. (2016). The mechanism of diarrhetic shellfish poisoning toxin production in *Prorocentrum* spp: physiological and molecular perspectives. *Toxins*, 8, 1-23.
- Lu, X., Zhou, B., Xu, L., Liu, L., Wang, G., Liu, X., y Tang, X. (2016). A marine algicidal *Thalassospira* and its active substance against the harmful algal bloom species *Karenia mikimotoi*. *Micrобиology Biotechnology*, 100, 5131-5139.
- Magdeldin, S. (2012). *Gel Electrophoresis - Principle and Basics*. Croacia: InTech.
- Maidak, B., Larsen, N., McCaughey, M., Overbeek, R., Olsen, R., Fogel, K, y Woese, C. (1994). The Ribosomal Database Proyect. *Nucleic Acids Research*, 22(17), 3485-3487.
- Mancera-Pineda, J. E., Montalvo-Talaigua, M., y Gavio, B. (2014). Dinoflagelados potencialmente tóxicos asociados a material orgánico flotante en San Andrés, reserva internacional de la biosfera. *Caldasia*, 36(1), 139-156.
- Marasigan, A. N., Tamse, A. F., y Fukuyo, Y. (2001). *Prorocentrum* (Prorocentrales: Dinophyceae) populations on seagrass-blade surface in Taklong Island, Guimaras Province, Philippines. *Plankton, Biology and Ecology. The Pankton Society of Japan*, 48(2), 79-84.
- Mayali, X., y Azam, F. (2004). Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Eukaryotic Microbiology*, 51(2), 139-144.
- Mayali, X., y Doucette, G. J. (2002). Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenai brevis* (Dinophyceae). *Harmful algae*, 277-293.
- Meyer, K., O'Neil, J., Hitchcock, G., y Heil, C. (2014). Microbial production along thw West Florida Shelf: Responses of bacteria and viruses to the presence and phase of *Karenai brevis* blooms. *Harmful Algae*, 38, 110-118.
- Morton, S. L., Bomber, J., y Tindall., P. (1994). Environmental effects on the production of okadaic acid from *Prorocentrum hoffmanniun*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 178(1), 67-77.
- Muciño-Márquez, R. E., Gárate-Lizárraga, I., y López-Cortés, D. J. (2014). Variación estacional del género *Prorocentrum* en dos granjas atuneras en la bahía de la paz, México. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 195-206.

- Murakami, Y., Oshima, Y., y Yasumoto, T. (1982). Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48, 69-72.
- Nascimento, S. M., Salgueiro, F., Menezes, M., De Andréa Oliveira, F., Portella Magalhaes, V., Campos de Paula, J., y Morris, S. (2016). *Prorocentrum lima* from South Atlantic: Morphological, molecular and toxicological characterization. *Harmful Algae*(57), 39-48.
- Nielsen, L. T., Krock, B., & Hansen, P. J. (2013). Production and excretion of okadaic acid, pectenotoxin-2 and a novel dinophysistoxin from the DSP-causing marine dinoflagellate *Dinophysis acuta* - effects of light, food availability and growth phase. *Harmful Algae* 23. Elsevier B.V.: 34-45.
- Nogi, Y., Yoshizumi, M., y Miyazaki, M. (2014). *Thalassospira povolilytica* sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1149-1153.
- NOM-242-SSA1-2009. (2009). *Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Park, B. S., Kim, J.-H., Kum, J.-H., Gobler, C. J., Baek, S. H., y Han, M. S. (2015). Dynamics of bacterial community structure during blooms of *Cochlodinium polykrikoides* /Gymnodiles, Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 48, 44-54.
- Park, B. S., Guo, R., Lim, W.-A., y Jang, S.-K. (2018). Importance of free living and particle associated bacteria for the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*: evidence in culture stages. *Marine and Freshwater Research*, 69, 290-299.
- Park, Y., Park, J., Chung, S., Song, B., Lim, W., Kim, C., y Lee, W. (1998). Isolation and algicidal properties of Micrococcus sp. LG-1 possessing killing activity for harmful dinoflagellate. *Journal Korean Fishing Society*, 31, 767-773.
- Pérez, R., Liu, L., López, J., An, T., y Rein, K. S. (2008). Diverse bacterial PKS sequences derived from okadaic acid-producing dinoflagellates. *Marine Drugs*, 6(2), 164-179.
- Pérez-Alvaréz, S., Coto-Arbelo, O., Echemendía-Pérez, M., y Ávila-Quezada, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens*, ¿Control biológico o patógeno? *Rev. Protección. Veg.*, 30(3), 225-234.
- Prego-Faraldo, V. M., Valdiglesias, V., Laffon, B., Mendez, J., y Eirin-López, J. M. (2016). Early Genotoxic and Cytotoxic Effects of the Toxic Dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxins*, 6(8), 159.
- Prokic, I., Brümmer, F., Brigge, T., Görtz, H. D., Gerdts, G., Schütt, C., y Müller, W. E. (1998). Bacteria of Genus *Roseobacter* Associated with the Toxic Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Protist*, 149(4), 347-357.
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Riclea, R., Gleitzmann, J., Bruns, H., Junker, H., Schulz, C., y Dickschat, J. (2012). Algicidal lactones from the marine *Roseobacter* clade bacterium *Ruegeria Pomeroyi*. *Journal of Organic Chemistry*, 8(1), 941-950.
- Romero-Geraldo, R. J., García-Lagunas, N., y Hernández-Saavedra, Y. (2016). *Crassostrea gigas* exposure to the dinoflagellate *Prorocentrum lima*: Histological and gene expression effects on the digestive gland. *Marine Environmental Research* (120), 93-102.
- Roth, P. (2005). The microbial community associated with the Florida Red Tide Dinoflagellate *Karenia brevis*: Algicidal and Antagonistic Interactions. *College of Charleston. Tesis de Maestría*.
- Sáenz-Marta, C. I., y Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). La bioluminiscencia de microorganismos marinos y su potencial biotecnológico. *Revista Científica de la Universidad Nacional de Coahuila*, 2(3), 1-7.
- Sanseverino, I., Conduto, D., Pozzoli, L., Dobricic, S., y Lettieri, T. (2016). *Algal bloom and its economic impact*. European Union, Italy: Joint Research Center.
- Santhanam, R. (2015). *Marine Dinoflagellates [e-book]*. Nova Science Publisher.
- Santi-Deli, A., Carusco, G., Melcarne, L., Carusco, G., Parisi, S., y Laganá, P. (2015). Chapter 2: Biological Toxins from Marine and Freshwater Microalgae. In G. Carusco, *Microbial Toxins and Related Contamination in Food Industry*, 13-55.

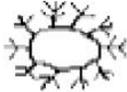
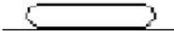
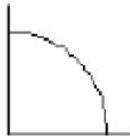
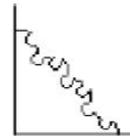
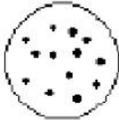
- Sañudo-Willhelmy, S., Gómez-Consarnau, L., Suffridge, C., y Webb, E. (2013). The role of B vitamins in marine biogeochemistry. *Rev. Mar. Sci.*, 6, 14.1-14.29.
- Seibol, A., Wichels, A., y Schütt, C. (2001). Diversity of endocytic bacteria in the dinoflagellate *Noctiluca scintillans*. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(3), 229-235.
- Shi, X., Liu, L., Li, Y., Xiao, Y., Ding, G., Lin, S., y Chen, J. (2018). Isolation of an algicidal bacterium and its effects against the harmful-algal-bloom dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 80, 72-79.
- SSA. (2015). *Plan de contingencia para el control de biotoxinas marinas*. México: Secretaria de Salud.
- Steidinger, K. A., Lansberg, J. H., Flewelling, L. J., y Kirkpatrick, A. B. (2008). Toxic Dinoflagellate. In P. J. Walsh, S. Smith, L. Fleming, H. Solo-Gabriele, & W. Gerwick, *Oceans and Human Health; Risks and Remedies for the Seas* (pp. 239-256). U.S.A: Academic Press.
- Su, J., Yang, X., Zhou, Y., y Zheng, T. (2011). Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Biological Control*, 56(2), 132-138.
- Suzuki, T., y Mitsuya, T. (2001). Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussle *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 39, 905-908.
- Traoré, A., Baudrimont, I., Drano, S., Sanni, A., Larondelle, Y., y Schneider, J. Y. (2003). Epigenetic properties of the diarrhetic marine toxin okadaic acid: Inhibition of the gap junctional intercellular communication in a human intestine epithelial cell line. *Archives of Toxicology*, 77(11), 657-662.
- Uribe, P., Espejo, R.T. (2002). Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 659-662.
- Vale, P., Veloso, V., y Amorin, A. (2009). Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coasts. *Toxicon*, 54(2), 145-152.
- Venables, W., y Smith, D. (2018). An introduction to R. *R-Proyect*.
- Visciano, P., Schirone, M., y Berti, M. (2016). Marine biotoxins: occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods. *Frontiers in microbiology*, 7, 1-10.
- Vladiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J., y Laffon, B. (2013). Okadaic Acid: More than a diarrhetic toxin. *Marine Drugs*, 11 (11), 4328-4349.
- Wang, D., Zhu, X., Xie, L., Bi, X., Zheng, Y., y Zhu, Y. (2018). Study on the metabolites of DH-e, a *Halomonas* marine bacterium against three toxic dinoflagellate species. *Water Sci Technol*, 78(7), 1535-1544.
- Windust, A., Hu, T., Wright, J., Quilliam, M., y McLachlan, J. (2000). Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *Journal of Phycology*, 36(2), 342-350.
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., y Garrido, J. (2012). Pigment-bases chloroplast types in dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, 33(52), 33-52.

13. ANEXOS

Anexo 1 Tabla de especificaciones de las muestras utilizadas.

Cultivos	Dinoflagelado	Lugar de procedencia	Fecha de muestreo
PA1	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	21 / 07 / 2017
PA2	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	26 / 05 / 2017
PA3	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	26 / 05 / 2017
PA11	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	26 / 05 / 2017
PA12	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	26 / 05 / 2017
PA14	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	26 / 05 / 2017
PA17	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	21 / 07 / 2017
PA19	<i>P. lima</i>	Isla Verde, Veracruz	21 / 07 / 2017
CA21	<i>Coolia</i> sp	Isla Verde, Veracruz	19 / 10 / 2017
PA26	<i>P. lima</i>	Puerto Morelos	29 / 10 / 2017

Anexo 2 Clave morfológica de colonias bacterianas.

1. TAMAÑO:					
	Grande (5 mm)	Mediano (2 a 5 mm)	Pequeño (2 mm)		
2. FORMA:					
	Circular	Irregular	Rizoide	Filamentosa	Puntiforme
3. ELEVACIÓN:					
	Cóncava	Elevada	Ondulada		
					
	Protuberante	Achatada	Convexa		
4. BORDES:					
	Lisos	Lacerados	Lobulados	Filamentosos	Ondulados
5. ESTRUCTURA:					
	Lisa	Granulosa	Filamentosa	Rugosa	
6. BRILLO:	transparente, translúcida, opaca.				
7. COLOR:	incolora, pigmentada.				

Anexo 3 Protocolo para realizar la observación de bacterias en microscopio electrónico de barrido (MEB).

Cultivo de bacterias

Para llevar a cabo la identificación morfológica de bacterias mediante microscopía electrónica se realizó una selección de géneros bacterianos y se sembraron en medio MM comercial por estriado, se incubaron a 25°C durante 3 días. Posteriormente, se obtuvo biomasa de estas resiembras para inocular tubos de ensaye con caldo marino comercial y se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente durante 6 días.

Fijación y deshidratación de bacterias

Al finalizar la incubación se seleccionaron los tubos más turbios respecto a un blanco y se trasladó 1.5 mL de la muestra a un eppendorf de 2 mL. A los tubos eppendorf se les adicionó 100 µL de glutaraldehído al 25% y se mezclaron 15 veces por inversión. Se dejaron reposar por 45 minutos.

Posteriormente, se eliminó de la muestra las sales del medio marino realizando tres lavados con agua destilada y centrifugando a 8 mil revoluciones durante 10 min a 4°C. El lavado mediante una serie de alcoholes se realizó bajo dos procedimientos especificados en las **Tablas A1 y A2**

Para el primer procedimiento se utilizaron membranas Milipore de 0.22 µm de poro colocadas en Swinnex donde los alcoholes fueron colocados uno tras otro pasando por la membrana por goteo (**Tabla A1**). Es importante resaltar que en esta técnica el filtro no debe secarse.

TablaA 1 Especificaciones de alcoholes para el procedimiento 1

[%] alcohol	mL	Especificaciones
30%	3 mL	
50%	3 mL	
70%	3 mL	La muestra debe reposar 1 hr
90%	3 mL	
99%	3 mL	

En el segundo procedimiento no se utilizó la membrana y los alcoholes fueron colocados directamente en el eppendorf con la muestra. Al final del tiempo indicado en la **Tabla A2** los tubos fueron centrifugados a 8,000 revoluciones por 10 min para eliminar el sobrenadante y colocar el siguiente alcohol.

TablaA 1 Especificaciones de alcoholes para el procedimiento 2

[%] alcohol	mL	Tiempo de reposo
30%	3 mL	10 min
50%	3 mL	1 hr
70%	3 mL	24 hr
90%	3 mL	10 min
99%	3 mL	10 min

Al final de la serie de alcoholes en ambos procedimientos se adicionó a la muestra 1 mL de reactivo HDMS y alcohol (1:1) y se dejó reposar por 3 min. Finalmente, se colocó 1 mL de HDMS puro y se dejó reposar por 3 min.

Se tomaron 10 μ L de la muestra y se colocaron en cubreobjetos redondos para la subsecuente preparación para microscopio.

Muestras para MEB

En un porta muestras de aluminio se colocó una cinta de carbón y sobre ella el filtro del procedimiento 1 o los 10 μ L de muestra del procedimiento 2.

Se metalizó la muestra con oro mediante ionización a 6.5 a 1.5 kV por 2 min y en vacío a 5 a 1.5 kV por 3 minutos

Para ser observadas al MEB se utilizó una apertura de 1 de diafragma (20 μ m), WD: 8mm, Acc Voltaje: 22kV, Spotsize.

Anexo 4 Valores de toxinas

Muestras	cell quota (fmol.cell-1)					
	OA	OA-D8	DTX1	DTX-1a	DTX1-D8	DTX1a-D8
PA1	11.85	9.48	0	0.68	0	0.19
PA2	6.30	5.6	2.69	0.13	0.9	0
PA3	10.11	4.24	0	1.17	0	0.11
PA11	4.73	2.11	1.12	0	0.21	0
PA12	1.33	1.52	0.38	0	0.52	0
PA17	21.82	7.63	0	2.57	0	0
PA19	6.6	5.3	0	0	0.4	0
PA26	13.89	14.96	1.0	0.29	0	0