



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST – GRADO

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, CLONACIÓN Y
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA MICROALGA
Prorocentrum minimum (PAVILLARD) J. SCHILLER
1933 AISLADA DE LA BAHÍA DEL CALLAO- PERÚ.**

Tesis para optar al Grado de:

MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA

Bach. Carmen Milagros Ruiz Huamán.

Asesora: Mg. Mirtha Roque Alcarraz

Lima- Perú

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las 11:00 horas del viernes 19 de diciembre 2013 se reunieron en el Auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador, presidido por el Dr. Gerardo Gamarra Ballena e integrado por los siguientes miembros: Mg. Margarita Eva Lobatón Erazo, Mg. Elena Rafaela Benavides Rivera, Mg. Mirtha Roque Alcarraz, (Asesora), Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz, para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, CLONACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA MICROALGA *Prorocentrum minimum* (PAVILLARD) SCHILLER, 1933 AISLADA DE LA BAHÍA DEL CALLAO-PERÚ", de la Bachiller en Biología CARMEN MILAGROS RUIZ HUAMÁN, egresada de la Maestría en Biotecnología.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Biotecnología. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy Bueno (17)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Biología CARMEN MILAGROS RUIZ HUAMÁN, el Grado Académico de Magíster en Biotecnología.

Siendo las *12:30* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *12:45* hrs. del 19 de diciembre 2013.


.....
Dr. Gerardo Gamarra Ballena (P.P., T.C.)
Presidente


.....
Mg. Margarita Eva Lobatón Erazo (P.P., T.C.)
Miembro


.....
Mg. Elena Rafaela Benavides Rivera (P. P., T.C.)
Miembro


.....
Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
Miembro - Asesora


.....
Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos sinceros a todas las personas que me permitieron la realización de este estudio en especial al Dr. Francisco Rodríguez Hernández, por su apoyo profesional en el conocimiento molecular de las Floraciones Algales, así como también al Dr. Santiago Fraga Rivas y a la Dra. Pilar Riobó Agulla, del Instituto Español Oceanográfico de Vigo- España. (Que gracias a la beca en Biotoxinas Marinas tuve la oportunidad de conocerlos).

Un agradecimiento especial a la Mg. Mirtha Roque Alcarraz en la orientación de esta tesis, al Dr. Gerardo Gamarra Ballena por la enseñanza impartida en las aulas de estudios.

A los miembros del jurado examinador y calificador

Presidenta: Mg. Elena Rafaela Benavides Rivera

Miembros:

Dr. Gerardo Gamarra Ballena

Mg. Margarita Eva Lobatón Erazo

Mg. Mirtha Roque Alcarraz (Asesora)

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Por sus sugerencias y todo el apoyo brindado en la culminación del presente trabajo de tesis.

Al Instituto del Mar del Perú por los diferentes laboratorios, como son el Laboratorio de Microalgas, Laboratorio de Fitoplancton, Laboratorio de Genética Molecular, en especial al Laboratorio de Biotecnología Acuática a cargo de la MSc. Carla Aguilar Samanamud, que en conjunto con su equipo de trabajo conformado por la Ingeniera Pesquera Cecil Tenorio, Bióloga Geraldine Inga,

Químico Lenin Flores y el Ingeniero Pesquero Alberto Oscanoa, agradezco por el apoyo profesional brindado a lo largo de la realización de esta investigación.

A la Blga. Rosa Elcira Delgado Loayza, por su apoyo en la clasificación taxonómica de la especie *Prorocentrum minimum* del Laboratorio de Fitoplancton y Producción Primaria del Instituto del Mar del Perú.

Al Biólogo Edgardo Palomino del Instituto Tecnológico Pesquero (ITP), por el apoyo del Laboratorio Microbiológico- Biotoxinas Marinas.

DEDICATORIA

A Dios porque es él mi Fortaleza y enseñanza de vida. Camila, es la luz de mis ojos, que es una bendición recibida con mucho amor.

A mis padres, por ser siempre mi apoyo incondicional en todo momento, los amo.

A mis hermanos y sobrinos por su cariño y paciencia hacen de nuestra familia la unión familiar.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Problemática.....	15
1.2. Justificación	16
1.3. Justificación práctica.....	16
1.4. Objetivos.....	17
1.4.1. Objetivo General.....	17
1.4.2. Objetivos Específicos.....	17
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Fitoplancton y sus generalidades.....	17
2.1.1. Microalgas.....	17
2.1.2. Dinoflagelados.....	18
2.1.3. Floraciones Algales o Mareas Rojas	18
2.1.4. Mareas Rojas Nocivas.....	18
2.1.5. Episodios de microalgas.....	19
2.1.6. Ficotoxina.....	19
2.1.7. Ácido Okadaico	20
2.1.8. Eutrofización o Eutroficación.....	21
2.1.9. Especie criptogénica	21
2.2. Marco epistemológico la investigación	21
2.3. Antecedentes de la Investigación	22
2.3.1. Características del Orden Prorocentrales	24
2.3.2. Certificado de Taxonomía de <i>Prorocentrum minimum</i>	26
2.3.3. Descripción de la Clase Dinophyceae	29
2.3.4. Descripción Química del Orden Prorocentrales.....	30
2.3.5. Precedente de las Floraciones Algales	32
2.3.6. Aislamiento y Caracterización fenotípica y genotípica del Orden Prorocentrales.....	37

2.3.7. Cultivos microalgales.....	40
2.3.8. Identificación de Biotoxinas Marinas	41
3. METODOLOGÍA	43
3.1. Lugar de Muestreo.....	43
3.2. Muestreo de Campo.....	44
3.3. Aislamiento purificación de la microalga.....	44
3.4. Preparación de la solución nutriente.....	44
3.5. Preparación y esterilización del medio de cultivo.....	45
3.6. Establecimiento de purificación unialgal	45
3.6.1. Aislamiento por pipeteo y lavados sucesivos.....	45
3.6.2. Curva de crecimiento de la microalga <i>Prorocentrum</i> <i>minimum</i>	49 46
3.6.3. Análisis estadístico.....	50
3.6.4. Concentración de <i>P. minimum</i> para análisis moleculares.....	50
3.6.5. Concentración de <i>P. minimum</i> para análisis de toxinas.....	51
3.7. 0. Filogenia Molecular de <i>Prorocentrum minimum</i>	52
3.7.1. Extracción del ADN microalgal.....	52
3.7.2. Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR).	53
3.7.3. Preparación del gel de Agarosa	55
3.7.4. Secuenciación de las Muestras de Microalgas	55
3.7.5. Alineamiento de Secuencias y construcción de árboles.....	55
3.7.6. Secuencias provenientes del banco de secuencias NCBI.....	56
3.7.7. Evaluación de la capacidad toxigénica de <i>Prorocentrum</i> <i>minimum</i>	56
3.7.8. Bioensayo en ratón.....	57
4. RESULTADOS	59

4.1. Lugar de muestreo.....	59
4.2. Muestreo de campo	59
4.3. Aislamiento de la microalga.....	59
4.4. Preparación de solución nutriente y esterilización del medio de cultivo	62
4.5. Purificación por pipeteo y lavado de célula	62
4.6. Curva de crecimiento de la microalga <i>P. minimum</i> a temperatura de 19 y 21 °C.....	63
4.7. Análisis estadístico.....	64
4.8. Concentración de <i>Prorocentrum minimum</i> para análisis de toxina y análisis molecular	64
4.9. Verificación del Gel de Agarosa	64
4.9.1. Secuenciamiento del Productos de PCR.....	65
4.9.2. Análisis de secuencia y construcción de árboles filogenéticos.....	67
4.10. Evaluación de la capacidad toxigénica de <i>Prorocentrum minimum</i>	69
4.11. Resultado de análisis del bioensayo en ratón	69
5. DISCUSIÓN.....	70
6. IMPACTO.....	74
7. CONCLUSIONES.....	75
8. RECOMENDACIONES.....	76
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	77
10. ANEXOS.....	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura química del Ácido Okadaico
- Figura 2.** Relaciones filogenéticas entre las especies propuestas por (Dogde, 1975).
- Figura 3.** Morfología de los Prorocentrales.
- Figura 4.** *Prorocentrum minimum*
- Figura 5.** Microfotografía electrónica de la vista valvar de *Prorocentrum minimum*
- Figura 6.** *Prorocentrum gracile*
- Figura 7.** Registro de Mareas Rojas en la Bahía Paracas Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005- 2008).
- Figura 8.** Mapas de Parámetros de calidad acuática. Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005).
- Figura 9.** Mapas de Oxígeno Disuelto (mg/L). Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005).
- Figura 10.** Mareas Rojas en la costa central del litoral peruano. Callao 2007. Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005)
- Figura 11.** Cartografía del Muelle de IMARPE. Lugar de toma de muestreo
- Figura 12.** Adición de 1mL de Medio Guillar en la placa de multipocillos.
- Figura 13.** Técnica de lavado de células sucesivas.
- Figura 14.** Placa multipocillos a la cámara de flujo laminar.
- Figura 15.** Tubos de ensayo con medio F2 Guillar con una célula microalgal
- Figura 16.** Cámara de Cultivo.
- Figura 17.** Curva de crecimiento a 21 +/- 2 °C del Cultivo de *Prorocentrum minimum*.
- Figura 18.** Curva de crecimiento a 19 +/- 2 °C del Cultivo de *Prorocentrum*

minimum.

Figura 19. Concentración de células de *Prorocentrum minimum*.

Figura 20. Corrida del LSU de *Prorocentrum minimum* en el termociclador marca Eppendorf.

Figura 21. Inoculación de la biotoxina en el ratón

Figura 22. Células de *Prorocentrum minimum* observadas al microscopio binocular de 40x. Microfotografía por C.Ruiz

Figura 23. Morfología de *Prorocentrum gracile* Schutt 1895. Presenta células vivas. Microfotografía por C. Tenorio

Figura 24. Curva de crecimiento de la densidad celular de la microalga *Prorocentrum minimum* a diferentes temperaturas de 19 y 21°C

Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de los genes de *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum gracile*.

Figura 26. Análisis Filogenético Molecular por el método del árbol Máximo Likelihood, basado en el análisis LSU rRNA de *Prorocentrum minimum*.

Figura 27. Análisis Filogenético Molecular por el método del árbol Máximo Likelihood, basado en el análisis LSU rRNA de las especies de *Prorocentrum* usando *Scrippsiella thochoidea*.

Figura 28. Bioensayo de Ratón

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores usados en la amplificación y secuenciación del gen LSU rRNA y el fragmento genómico parcial del ITS 1- 5.8 S rRNA – ITS 2 de varias cepas de *Prorocentrum*

Tabla 2. Cultivos de *Prorocentrum* de los que proceden las secuencias en el presente estudio.

ANEXOS

RESUMEN

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN) o Mareas Rojas son decoloraciones del agua visible a simple vista debido a la proliferación de uno o más microorganismos planctónicos como las microalgas, estas pueden alcanzar niveles altos y producir efectos adversos a la salud humana, como también, causar daños a otros organismos marinos cercanos a la costa. Por tal motivo, existió el interés de aislar, identificar y hacer un estudio filogenético de la especie *Prorocentrum minimum* encontrada en la Bahía del Callao- Perú. Se realizaron varias tomas de muestras de agua de mar para su posterior identificación morfológica, se les efectuó la técnica de purificación de la microalga, y a su vez, se adquirió un estándar de *Prorocentrum minimum* del Instituto Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), USA. Se realizó la curva de crecimiento para la concentración de la densidad microalgal, posteriormente se efectuó la extracción de ADN y la filogenia molecular a partir de las secuencias de las subunidades del ribosoma LSU rRNA de la especie *Prorocentrum minimum*. Se identificó *P. minimum* y *P. gracile*, que fueron especies epibentónicas cercanas por ser más recientes evolutivamente.

Para la confirmación de la presencia ausencia de alguna biotoxina marina en el cultivo de *Prorocentrum minimum*, se estableció un análisis cuantitativo de la dosis respuesta del animal en el bioensayo en ratón. Se logró obtener la purificación de cultivo de *Prorocentrum minimum* y estandarizar el protocolo de trabajo, se confirmó la filogenia de la especie de microalgas. No se logró obtener la toxina DSP del cultivo de la microalga.

Palabras claves: *Prorocentrum minimum*, filogenia molecular, Bahía del Callao.

SUMMARY

Harmful algal blooms (HABs) or red tides are water discolorations visible to the naked eye because of the proliferation of one or more planktonic microorganisms such as microalgae, can reach high levels, adverse effects to human health and harm other marine near shore. Why the interest to isolate, identify and phylogenetic study of the species *Prorocentrum minimum* found in the Bay of Callao, Peru. There were several shots of seawater samples for subsequent morphological identification, were made purification technique microalgae, in turn, was acquired *Prorocentrum minimum* standard Provasoli Institute-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), USA. We performed the growth curve for the concentration of microalgal density, subsequently effected DNA extraction and molecular phylogeny of the sequences from the ribosomal subunits LSU rRNA of the species *Prorocentrum minimum*. *Prorocentrum minimum* and *Prorocentrum gracile*, were identified which were close by epibenthic species be more evolutionarily recent. For verification of the presence biotoxins absence of any present in the culture of *Prorocentrum minimum*, quantitative analysis for the dose response observed animal was performed using the mouse bioassay. For confirmation of the presence or absence of any marine biotoxin *Prorocentrum minimum* cultivation, established a quantitative analysis using the mouse bioassay for the dose response observed animal.

Keywords: *Prorocentrum minimum*, Molecular Phylogeny, Callao Bay.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática.

Algunas microalgas potencialmente nocivas han causado mortandades y varazones de peces, las cuales han estado asociados a efectos causados por la descomposición incompleta de la materia orgánica, anoxia, saturación o ulceraciones del aparato branquial y fuentes externas de la contaminación marina en las especies filtradoras, principalmente en los bancos naturales de concha de abanico. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad que estas especies se vuelvan tóxicas debido a cambios ambientales o procesos de eutroficación.

La eutroficación, enriquecimiento del agua de mar por nutrientes a un ritmo superior al de eliminación, ocasionando cambios sustanciales en el equilibrio del ecosistema ecológico. El agua se enriquece de oxígeno provocando el aumento de fitoplancton y se acelera la adición de nutrientes. Por este motivo, se observan elevadas concentraciones de uno o más millones de células de microalgas planctónicas por litro. El color del agua de mar dependerá de la microalga, en muchos casos puede ser; verdoso, pardo, rojizo, naranja etc. Las Floraciones Algales Nocivas (FANs, en inglés HAB= Harmful Algal Blooms), es un término adoptado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO y aceptado internacionalmente para denominar cualquier proliferación de microalgas (independiente de su concentración) percibidas como un daño en la salud pública, la acuicultura, el medio ambiente y las actividades recreativas.

1.2. Justificación

En el Perú, existen pocos especialistas dedicados al estudio taxonómico del fitoplancton nocivo. IMARPE es una institución de investigación, la cual reporta a través de los análisis cuantitativos y cualitativos la presencia morfológica de las microalgas presentes en un evento de marea roja. La gran similitud morfológica entre las diferentes especies de fitoplancton dificulta su seguimiento mediante la microscopía óptica. El tamaño de las microalgas es también un factor limitante y se hace necesario el uso de la técnica instrumental de microscopía electrónica para tener la exactitud de la especie presente en estudio. Con el fin de solucionar este problema se solicita el apoyo de profesionales de los diferentes centros de investigación de la región. La necesidad de procesar en un tiempo mínimo el elevado número de muestras complejas de plancton requeridas para los estudios de campo, hace imprescindible el desarrollo de técnicas alternativas que sean rápidas, específicas y cómodas. En la actualidad, se desconoce la identificación taxonómica a nivel molecular de este fitoplancton que genera impacto en el medio ambiente marino. Por tal motivo, se requiere estudios minuciosos a nivel molecular, existiendo en este trabajo una iniciativa de investigación en el campo, al realizar el estudio del aislamiento, identificación, clonación y análisis filogenético de la especie de floración algal nociva *Prorocentrum minimum*.

1.3. Justificación práctica.

Los aislamientos y establecimientos de cultivos monoalgales de la especie *Prorocentrum minimum*, nos permitió efectuar la identificación taxonómica, molecular y presencia/ausencia de las biotoxinas marinas al disponerse de abundantes células por mililitro de este organismo debido a las concentraciones de microalgas obtenidas a nivel laboratorio para sus posteriores análisis.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General.

Identificar la microalga *Prorocentrum minimum* (Pavillard) J.Schiller 1933 a partir de muestras de agua tomadas en la Bahía del Callao.

1.4.2. Objetivos Específicos

1.4.2.1. Aislar, purificar y clonar el cultivo unialgal de *P. minimum*

1.4.2.2. Estudiar la filogenia de la especie *P. minimum*

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fitoplancton y sus generalidades

Se define como fitoplancton a la comunidad de microorganismos, en su mayoría fotosintéticos (microalgas, dinoflagelados, cianobacterias, flagelados heterótrofos y otro grupo sin clorofila), que vive suspendida en la masa de agua Reynolds (1983)

2.1.1. Microalgas

El fitoplancton constituye el primer eslabón de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos Nyholm et al. (1989), de modo que al alterarse la composición de la comunidad de microalgas como consecuencia del estrés toxicológico, se modifica la estructura y su función Prósperi (2000). Las microalgas se encuentran ampliamente distribuidas en la biósfera, por tal motivo,

son los principales productores de materia orgánica necesaria en la alimentación y supervivencia de todo los organismos acuáticos Aidar et al. (2002).

2.1.2. Dinoflagelados

Los dinoflagelados son algas microscópicas, generalmente unicelulares que habitan en aguas marinas frescas, siendo los mares tropicales donde se sitúan un mayor número de especies. Se conocen aproximadamente unas 2000 especies, de las cuales unas 300, son las que, en ocasiones, pueden proliferar de manera descontrolada alcanzando niveles tan altos que producen coloración en la superficie del agua, dando lugar al fenómeno conocido como “mareas rojas” Faust et al. (1999)

2.1.3. Floraciones algales o Mareas Rojas

Las floraciones algales o mareas rojas, son coloraciones o manchas del agua de mar debido a la presencia de concentraciones elevadas de uno o más millones de células por litros de microalgas planctónicas. El color dependerá de la microalga, puede ser verdoso, pardo, rojizo, naranja etc. Sin embargo no todas estas floraciones son beneficiosas. Reguera (2002)

2.1.4. Mareas Rojas Nocivas

Las Floraciones Algales Nocivas (FANs, en inglés HAB= Harmful Algal Blooms), es un término adoptado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO y aceptado internacionalmente para denominar cualquier proliferación de microalgas (independiente de su concentración) percibidas como un daño en la salud pública, la acuicultura, el medio ambiente y las actividades recreativas.

Algunas especies de microalgas producen potentes venenos o toxinas. Cuando estas microalgas son filtradas por los mejillones y otros bivalvos, las toxinas se acumulan en sus tejidos y se transmiten a niveles superiores de la red

alimentaria, incluyendo a los seres humanos. Las toxinas son tan potentes, que incluso a bajas concentraciones de microalgas (10^3 - 10^4 cel x L⁻¹) y sin que se formen manchas en el agua, pueden convertir a los bivalvos en no aptos para el consumo. Reguera (2002).

2.1.5. Episodios de microalgas.

Son aquellos eventos que en la presencia de microalgas las concentraciones moderadas (no causantes de discoloraciones) confiere niveles de toxinas a los moluscos, tales que pueden constituir un peligro para la salud y obligan a las autoridades competentes a prohibir su recolección y comercialización. Los mariscos tóxicos pueden transmitir estas sustancias a niveles superiores de la cadena trófica, actuando como vectores que dan lugar a la intoxicación por marisco que afecta a los vertebrados y al hombre. Anderson (1989)

2.1.6. Ficotoxinas

Las ficotoxinas comprenden un amplio espectro de sustancias de estructura molecular, mecanismo de acción y actividad biológica muy diversa, pueden clasificarse atendiendo a sus diferentes efectos toxicológicos. Basándose en la sintomatología de la intoxicación y en los vectores de transmisión, se han definido cinco tipos de síndromes asociados a las siguientes toxinas o venenos:

La Intoxicación Paralizante por Mariscos (Paralytic Shellfish Poisoning = PSP), la Intoxicación Diarreica por Mariscos» (Diarrhetic Shellfish Poisoning = DSP), la Intoxicación Amnésica por Mariscos» (Amnesic Shellfish Poisoning = ASP) y la Intoxicación Neurotóxica por Mariscos» (Neurotoxic Shellfish Poisoning = NSP). Veneno Ciguatérico (Ciguatera Fish Poisoning= CFV). Yasumoto & Murata, (1993)

La presencia de ficotoxinas en alimentos de origen marino, principalmente en moluscos, representa un grave problema sanitario y económico de extensa incidencia geográfica, y que afecta tanto a países industrializados como a países en desarrollo. La transferencia y acumulación de estas toxinas, producidas principalmente por un reducido número de especies de dinoflagelados y diatomeas, tiene lugar a través de las redes tróficas. Los principales vectores de transmisión son los moluscos bivalvos (mejillones, vieiras o conchas de abanico, almejas, berberechos, ostras, etc.) y en el caso de la ciguatera, algunas especies de peces de zonas intertropicales. Asimismo, diferentes especies de gasterópodos y crustáceos pueden actuar como transvectores

2.1.7. Ácido Okadaico

Los dinoflagelados productores de estas toxinas están relacionadas con episodios de contaminación del molusco, son diferentes especies del género *Dinophysis* tales como *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis fortii*, *Dinophysis acuta*, y *Dinophysis norvergica* Yasumoto et al. (1980). El dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima*, es también productor de estas sustancias pero su implicancia en episodios de intoxicación diarreica sólo se ha demostrado en moluscos de aguas canadienses. Lawrence et al. (1998).

Existen datos epidemiológicos de intoxicaciones producidas por el AO y derivados que han cursado con trastornos gastrointestinales tales como diarreas, náuseas y vómitos Yasumoto et al. (1980). El nivel de AO necesarios para producir diarrea en adultos es de 40 y 50 µg de AO, siendo 200 µg. kg⁻¹ la dosis letal en ratón por administración intraperitoneal (LD50). El ácido Okadaico y la DTX1 son potentes inhibidores de las protein – fosfatasa, enzimas que intervienen en el control de proceso biológicos tales como la división y el crecimiento celular, organización estructural, metabolismo, control hormonal etc. Cohen et al. (1989).

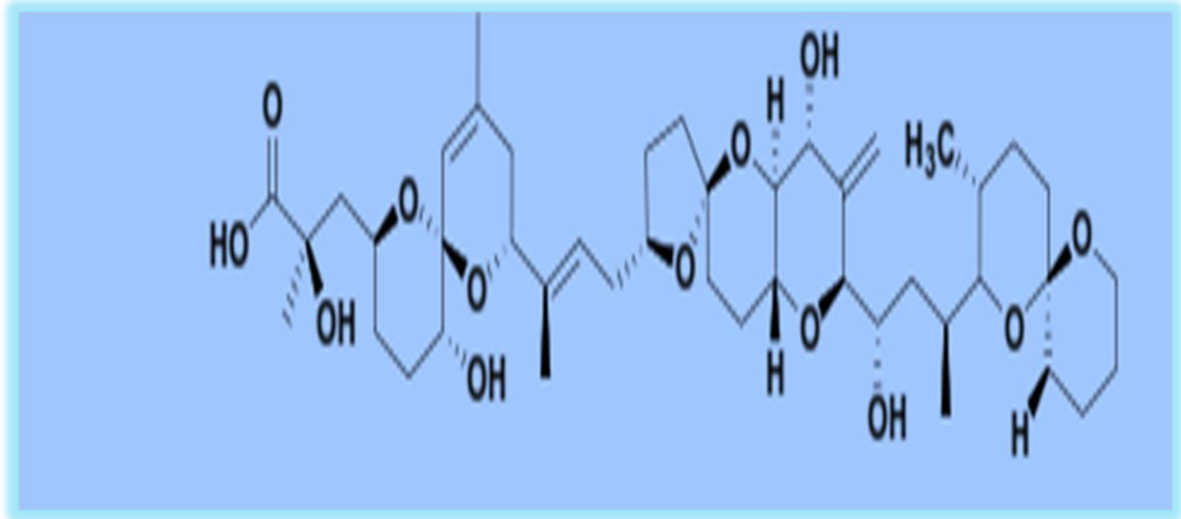


Figura 1. Estructura química del Ácido Okadaico.

2.1.8. Eutrofización o Eutroficación

Proceso natural o antropogénico que consiste en el enriquecimiento de las aguas por nutrientes, por la descomposición de la materia orgánica, produciendo disminución en las aguas profundas, las masas de agua eutróficas tienen un alto nivel de productividad y de biomasa en todo lo niveles tróficos. Andersen et al. (2006)

2.1.9. Especie criptogénica

Es aquella cuyo origen es desconocido, no se puede considerar como especie nativa. Heil et al. (2005).

2.2 Marco epistemológico de la investigación.

Las microalgas juegan un papel predominante en el desarrollo de la acuicultura, ya que constituyen el primer alimento vivo para las fases tempranas de desarrollo de casi todos los organismos cultivados, siendo altamente nutritivas y fácil de

ingerir debido al tamaño que poseen Brown et al. (1997). Los cultivos de microalgas han sido utilizados para dilucidar diversos aspectos sobre la biología de estos organismos, particularmente en lo referente a su variabilidad morfológica, fisiológica y atributos bioquímicos. También ha sido posible, gracias a los cultivos in vitro, generar datos para redefinir los límites taxonómicos de algunos taxa, así como incrementar el conocimiento de los ciclos de vida. Otros cultivos se utilizan para bioensayos, particularmente para la detección de tóxicos en cuerpos de agua González et al. (1995), debido al incremento de las mareas rojas y la problemática que esto representa para la salud pública (Hallegraeff, 1993). Se han realizado también experimentos para probar los factores limitantes del crecimiento de las microalgas Terlizzi, et al. (2002). Otros estudios de dinoflagelados se han enfocado en mejorar los actuales medios de cultivo, o bien a innovar formulaciones, con el principal objetivo de cultivar especies que no han podido ser cultivadas, como es el caso de algunas del género *Ceratium* Álvarez et al. (1997) & De Lara-Isassi et al. (2006) en prensa.

2.3. Antecedentes de la Investigación

Las relaciones filogenéticas descritas por Dodge (1975) fueron las primeras en explorar las posibles relaciones entre las especies de *Prorocentrum*, basadas en la evolución de los caracteres del grupo (Figura 2) como; las valvas lisas y las valvas con depresiones y / o espinas, así como también las células redondas y alargadas, la adquisición de la espina apical cada vez más larga al presentar dos espinas. Los cambios de los caracteres que propuso no fueron suficientes para fundamentar una hipótesis comprensiva que incluya a las 21 especies que consideró en su análisis. Por ello y como bien lo ilustra (Figura 2), una cuarta parte de las especies, que incluyó el segmento marcado con una línea punteada desde *Prorocentrum minimum* (Pavillard) J. Schiller hasta *Prorocentrum dentatum* Stein, pareciendo no tener una relación clara con las otras especies.

2.3.1. Características del Orden Prorocentrales

El grupo se caracteriza por que sus miembros presentan una teca bivalvar con presión lateral más o menos notable. En vista lateral, la valva derecha muestra una depresión anterior con forma de “v”, en el lugar en donde se insertan los flagelos. En esta zona, ambas placas aprisionan un conjunto de plaquitas (8 a 9) que delimitan un par de poros por donde emergen los flagelos. En la zona que rodea al conjunto de placas y poros, dos grandes placas laterales se ensanchan formando un reborde interno y a veces también externo. En ocasiones, alguna de las placas se prolonga en un apéndice agudo triangular o espiniforme poco o muy desarrollado. Las dos placas mayores o laterales que forman las valvas, suelen estar perforadas por poros generalmente oblicuos, a veces densos y que con frecuencia se disponen en zonas o en hileras cortas bien definidas. Puede también haber poros densos de poca profundidad (denominados poroides) y espínulas muy pequeñas. (Figura 3).

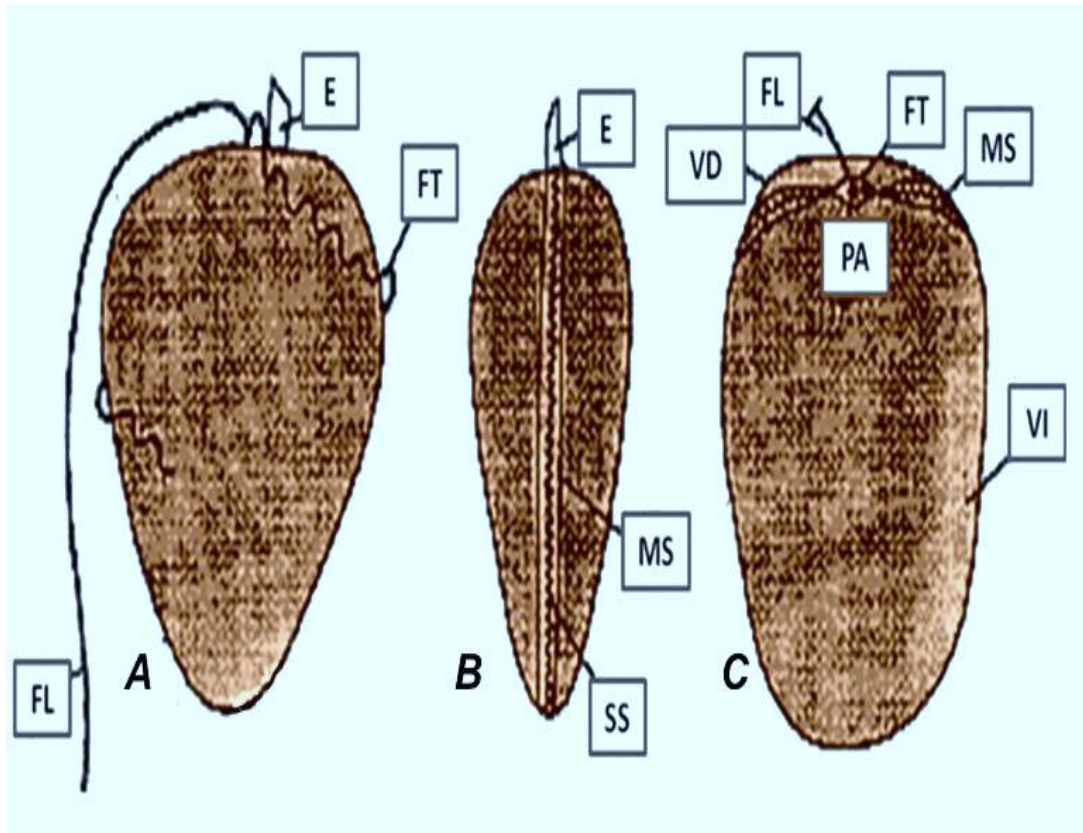


Figura 3. Morfología de los Prorocentrales. FL: Flagelo longitudinal, FT: Flagelo transversal, E: Espina apical, MS: Margen de sutura o reborde, SS: Sutura sagital, VI: Valva izquierda, VD: Valva derecha, PA: Poro apical

2.3.2. Certificado de Taxonomía

El presente documento certifica la clasificación taxonómica según la base de datos de algaebase de algas terrestres, marinas y de aguas dulces a nivel mundial. Esta base de datos es utilizada en el Instituto del Mar del Perú, como referencia taxonómica (www.algaebase.org)

Clasificación

Dominio : Eucariota
Reino : Chromista
Filo : Dinophyta
Clase : Dinophyceae
Orden : Prorocentrales
Familia : Prorocentraceae
Género : *Prorocentrum*
Especie : *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge. Aceptado taxonómicamente
Prorocentrum minimum (Pavillard) J. Schiller 1933

Descripción: Especie pequeña, de forma muy variable (Figura 4), casi siempre triangular o acorazonada, a veces oval oscuramente pentagonal. Margen anterior con ligera concavidad media, con una espinita o sin ella. Las características más importantes para distinguirla son: su pequeño tamaño y la superficie tecal densamente poblada por puntuaciones que el microscopio electrónico de barrido (MEB) revela, son de dos tipos: con poros y protuberancias diminutas y espiniformes. (Figura 4), sus dimensiones pueden ser: Largo menor de 20 μm generalmente 15-18 μm .

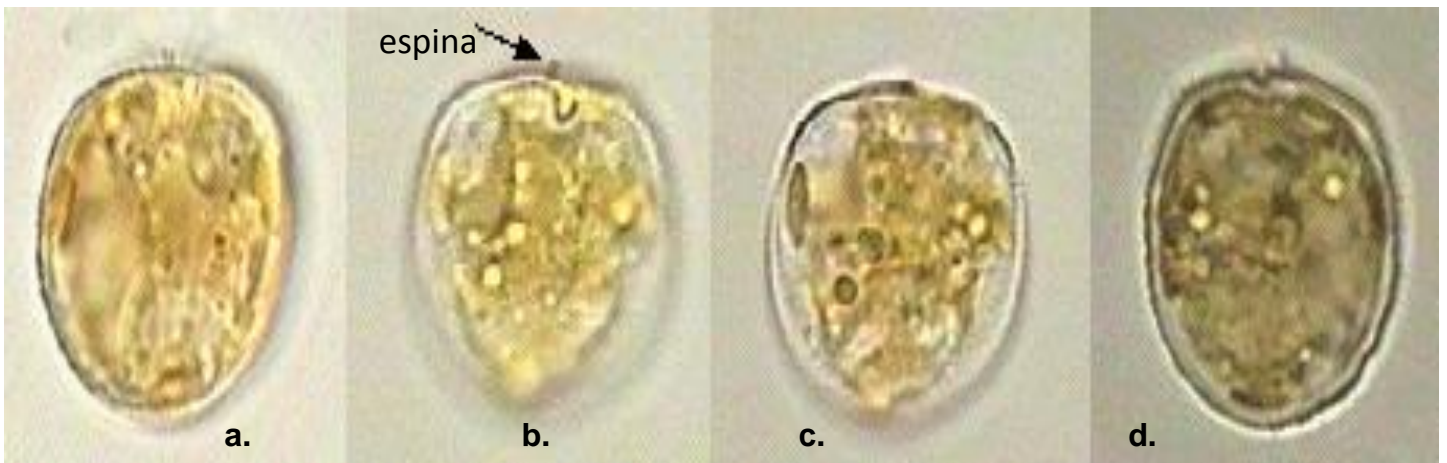


Figura 4. *Prorocentrum minimum*, a-d: Células vivas de diferentes planos focales vistas al microscopio binocular. b. espina apical. Foto. Culture Colección SCCAP.

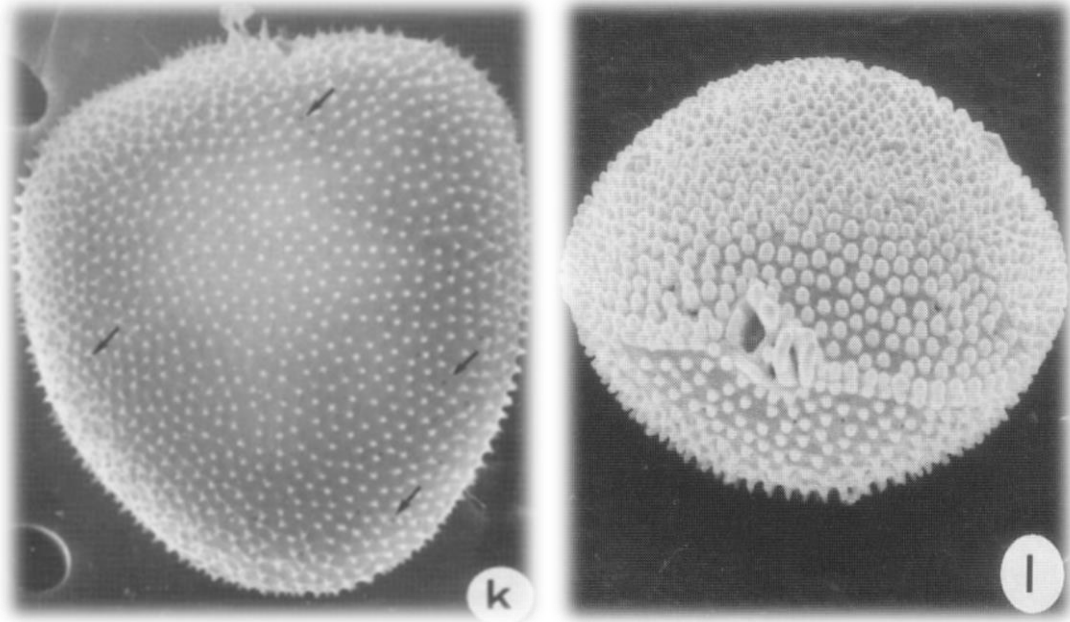


Figura 5. Microfotografías electrónica de la vista valvar de *Prorocentrum minimum*. K: Superficie espinosa y el poro de la diversas valvas, l: presentación una célula en vista valvar. Foto por G. Hansen.

Prorocentrum gracile. Schutt (1895).

Descripción: Es una especie cosmopolita, se encuentra en aguas tropicales y zonas templadas frías. Las células son pequeñas alargadas y lanceoladas, la parte anterior de la célula es ancha, redondeada con una fuerte espina apical y la posterior en forma de punta. La superficie de la válvula está cubierta con muchos poros poco profundos. (Figura 6). El área periflagelar es relativamente pequeña. La predominante espina apical se encuentra adyacente a la zona periflagelar.

Dimensión: Las células de tamaño mediano y pequeño, aproximadamente entre 45 – 55 μm de largo y 25- 30 μm de ancho. Dodge (1975).



Figura 6. *Prorocentrum gracile*. 1: Vista valvar, 2: válvula izquierda mostrando poros tricosistos (manchados) largo de 45-55 μm . Foto Hiroaki Inoue

2.3.3. Descripción de la Clase Dinophyceae

- ✓ Son microalgas unicelulares, flageladas, conocidas comúnmente como dinoflagelados.
- ✓ De color verde amarillento o pardo amarillento, otros pueden ser incoloro.
- ✓ Presentan pigmentos fotosintéticos como la clorofila a y clorofila b, carotenos y xantofilas
- ✓ Sintetizan como producto de reserva almidón y gotas de aceite.
- ✓ Pueden presentar flagelos o no
- ✓ Reproducción asexual, la sexual es la menos frecuente
- ✓ Los dinoflagelados habitan en los sistemas acuáticos principalmente como formas planctónicas.

2.3.4. Descripción Química del Orden Prorocentrales.

El Ácido Okadaico (AO) se aisló por primera vez en el año 1981 simultáneamente de dos esponjas, *Halicondria okadai*, esponja negra del Pacífico, y *Halicondria melanodocia*. Tachibana et al. (1981), esponja del Caribe. Sin embargo, fue posteriormente con el aislamiento de las Dinophysistoxinas (DTXs) cuando se observó que los organismos productores de este tipo de moléculas eran dinoflagelados de los géneros *Prorocentrum* Murakami et al. (1982) y *Dinophysis* (Yasumoto et al., 1985). Este grupo de toxinas son las responsables de las mareas rojas del tipo DSP, lo que ha supuesto a lo largo de estos últimos años un gran problema para el ecosistema y la industria pesquera. Esto se debe a que estas toxinas entran en la cadena trófica a través de los moluscos bivalvos que se alimentan de los dinoflagelados productores causando intoxicaciones en humanos a través del consumo de los mismos. Los síntomas más característicos de una intoxicación DSP son diarrea, náuseas, vómitos, cefaleas y dolor abdominal Daranas et al. (2001)

Por otro lado, este grupo de compuestos se caracteriza por su capacidad como inhibidores selectivos de las proteínas fosfatasa del tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A), por lo que el AO se ha utilizado en muchísimos trabajos publicados sobre el papel de las fosfatasas en los procesos celulares Fernández et al. (2001)

Los procesos de fosforilación están considerados como la modificación más importante después de la traducción de proteínas. Además ha sido demostrado que ocurre en una amplia variedad de organismos, desde bacterias a mamíferos, controlando y regulando múltiples funciones celulares como el crecimiento y muerte, diferenciación, metabolismo y señales de transducción. Las reacciones de fosforilación-defosforilación que tienen lugar en los procesos celulares dependen de dos tipos de enzimas: las proteínas kinasas (PKs), que catalizan la transferencia de grupos fosfatos del ATP a las proteínas y las proteínas fosfatasas (PPs) que catalizan la los grupos fosfatos de las proteínas fosforiladas.

Nos centraremos en las PPs, McCluskey et al. (2002) ya que son la diana del AO y algunos de sus derivados. Las PPs se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a su especificidad hacia los residuos de aminoácidos sobre las que actúa, PSPs específicas para la Serina-Treonina y PTPs para los residuos de Tirosina. Dentro de las PSPs nos podemos encontrar con dos grupos mayoritarios de proteínas, la PP1, específica para la subunidad β de las PKs y la PP2A, que presenta afinidad por la subunidad α .

Existen un gran número de enfermedades que están relacionadas con desajustes en el equilibrio de la actividad de fosforilación-defosforilación y dado que PP1 y PP2A regulan el 90% de las reacciones de las PSPs, los inhibidores selectivos de las mismas se han convertido en importantes herramientas farmacológicas para estudiar los procesos celulares regulados por estas proteínas. Entre otros se encuentran el ciclo celular, la muerte celular por apoptosis, el desarrollo de tumores, la contracción del músculo liso y ciertos desórdenes neurológicos, metabólicos y respiratorios.

El AO, es un inhibidor selectivo de PP1 y PP2A, de muchísima utilidad en el estudio de estos procesos ya que, a diferencia de los otros, presenta mayor selectividad frente a la PP2A. Boudreau et al. (2005). Los valores de las medidas de inhibición publicados para el AO pueden diferir de unos autores a otros, lo cual se puede deber a diferentes razones: al tipo de fuente de donde se extraiga la proteína, al ión o iones utilizados en los tampones y /o al sustrato empleado. Los valores de IC50 se encuentran entre 10-100 nM para la PP1 y entre 0.02-0.2 para la PP2A

2.3.5. Precedentes de las Floraciones Algales

Las microalgas tóxicas constituyen un riesgo para la salud pública y afectan seriamente a la explotación de los recursos alimenticios derivados de la acuicultura, siendo de importancia el estudio taxonómico, fisiológico, ecológico y el estudio genético que afectan a la morfología de las células y a la producción de toxinas que alteran el ecosistema marino.

El Instituto del Mar del Perú (IMARPE), registró eventos de Floraciones Algales. Entre el 22 de mayo y el 2 de junio de 2000 se observó la presencia de una floración algal nociva o “marea roja” causada por el dinoflagelado *Prorocentrum micans* en la Bahía de Pisco, que estuvo presente antes y durante el evento de mortandad y varazón de peces. Esta floración algal estuvo asociada a un ligero incremento de la temperatura, y generó altas concentraciones de oxígeno en toda la bahía, a excepción de la estación correspondiente a las plantas pesqueras. Cabello et al. (2002). La formación de una floración algal nociva o “marea roja” requiere de ciertas condiciones favorables para su proliferación: altas temperaturas, altos niveles de intensidad luminosa, estabilidad de la columna de agua y aporte de nutrientes (Margalef, 1986), condiciones que estuvieron presentes a fines de mayo.

En Pisco durante el periodo 2002 al 2008 en la Bahía Independencia, Lagunilla, Paracas, Playa Jaguay y zonas de producción de recursos bivalvos se han registrado 1,099 casos de mareas rojas recurrentes. En la Bahía de Paracas las mareas rojas totalizaron 876 casos, que equivalen al 80 % de los registros reportados en Pisco (Figura 7).

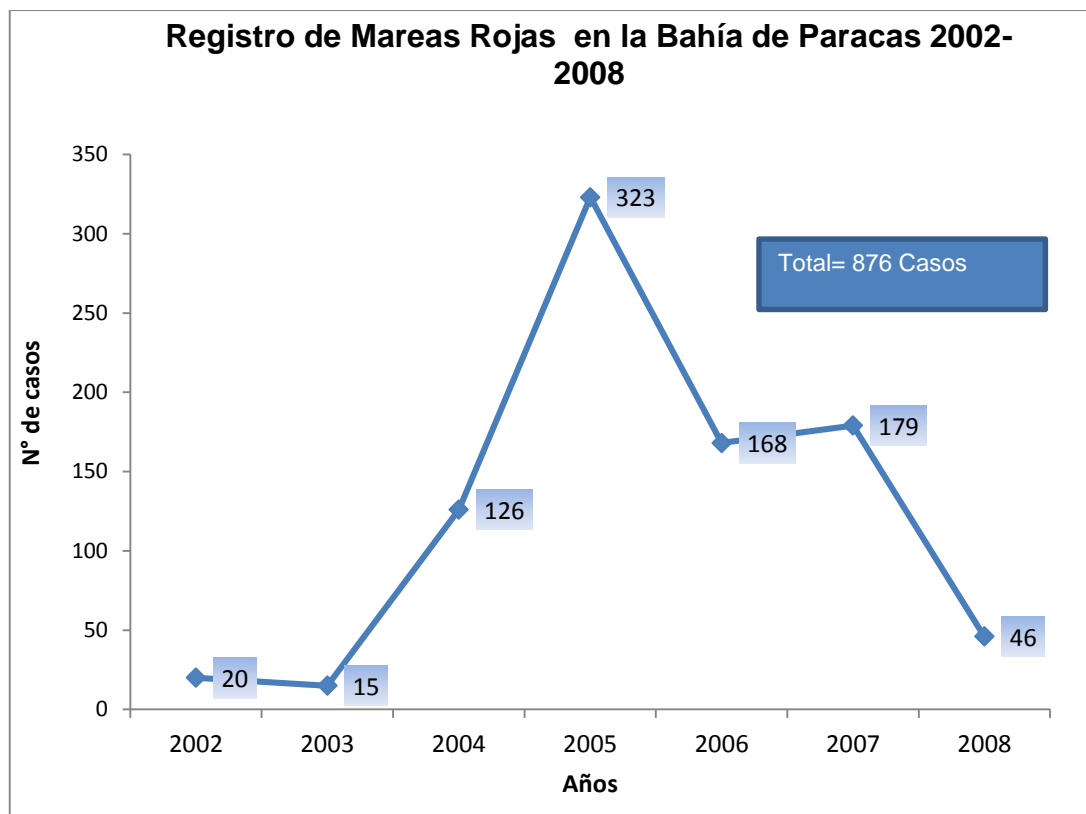


Figura 7. Registro de Mareas Rojas en la Bahía Paracas Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005- 2008)

Durante el monitoreo diario efectuado por el IMARPE en la Bahía de Paracas-Pisco, en alerta ambiental reportado el 11 de Febrero de 2005, se obtuvo concentraciones máximas de 35,740 cel/mL, del *Prorocentrum cf minimum*, creando anoxia (Concentración 0 de oxígeno disuelto) (Figura 7), sobre el fondo marino, frente a las costas de Pisco (Desde el Río Pisco a la zona industrial), originando una situación crítica para los organismos que la habitan, produciéndose una varazón de peces e invertebrados marinos. La Marea roja del día 12 de febrero de ese mismo año presentó concentraciones más pobres, con una máxima de 29 680 cel/mL frente al consorcio terminal (ex-Petro Perú). El día 13 la concentración de estos grupos de dinoflagelados disminuyó notablemente alcanzando un máximo de 3 108 cel/mL (Figura 8).

ALERTA AMBIENTAL EN LA BAHIA PARACAS
12 Febrero 2005

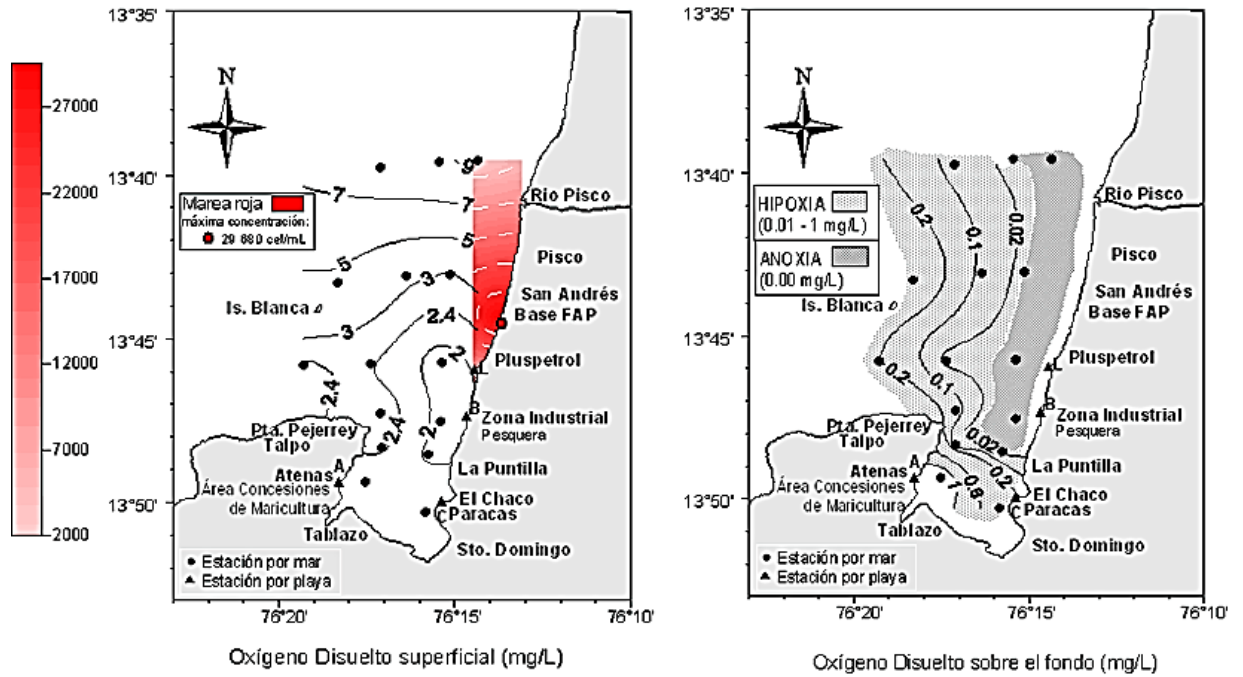


FIGURA 8. Mapas de Parámetros de calidad acuática. Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005).

ALERTA AMBIENTAL EN LA BAHIA PARACAS
13 Febrero 2005

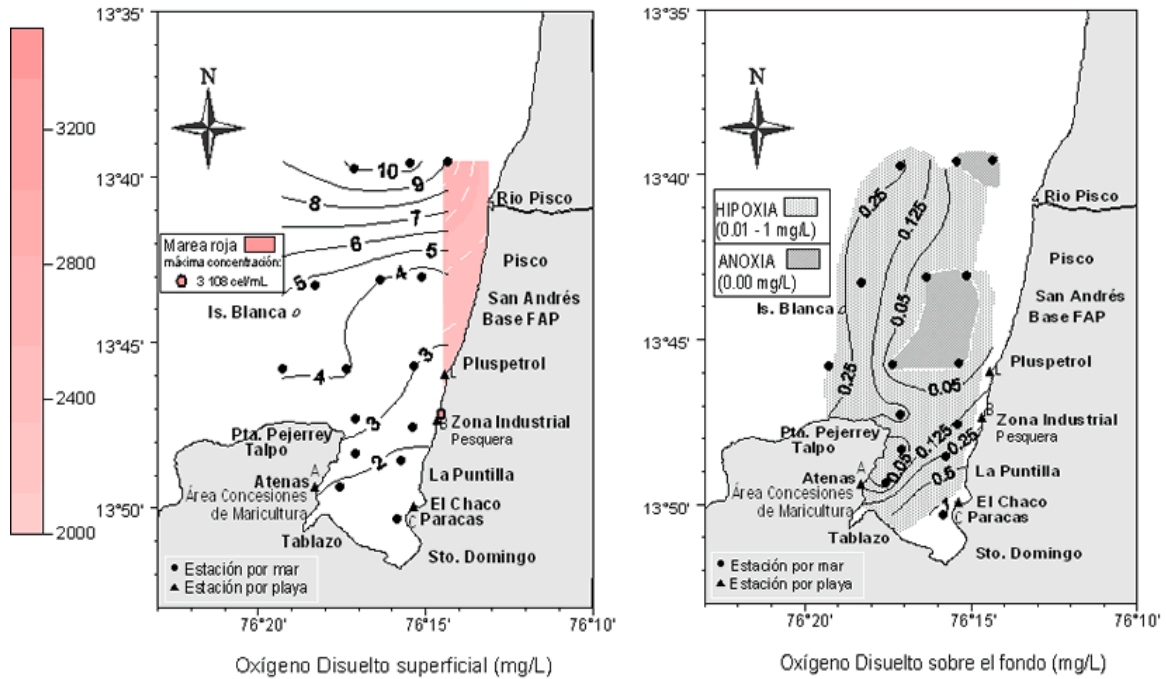


FIGURA 9. Mapas de Oxígeno Disuelto (mg/L) en calidad acuática.

El reporte del año 2007 del IMARPE de la última semana del mes de mayo e inicios de junio (07 junio) se registró de Chorrillos hasta la Isla San Lorenzo (Figura 9), una gran decoloración del agua de mar que va del rojizo a marrón oscuro. Los análisis de las muestras dan como organismo responsable al dinoflagelado *Prorocentrum minimum* que alcanzó densidades celulares de 21×10^6 cel/L asociado a la Temperatura Sobre el Nivel del Mar (TSM) de $18,5^\circ \text{C}$, salinidad de 35,067 ppm y oxígeno de 6,50 ml/L. Los registros de esta especie no son muy frecuentes en nuestra costa. Sánchez et al. (2007). A pesar de su amplia distribución geográfica *Prorocentrum minimum* es considerada como especie cosmopolita de ambientes fríos.

Entre los organismos responsables de las mareas rojas en la costa central del Callao se tiene a los dinoflagelados *Akashiwo sanguíneo*, *Noctiluca scintillans*, *Prorocentrum cf. minimum*, *Prorocentrum gracile*, *Ceratium furca*.

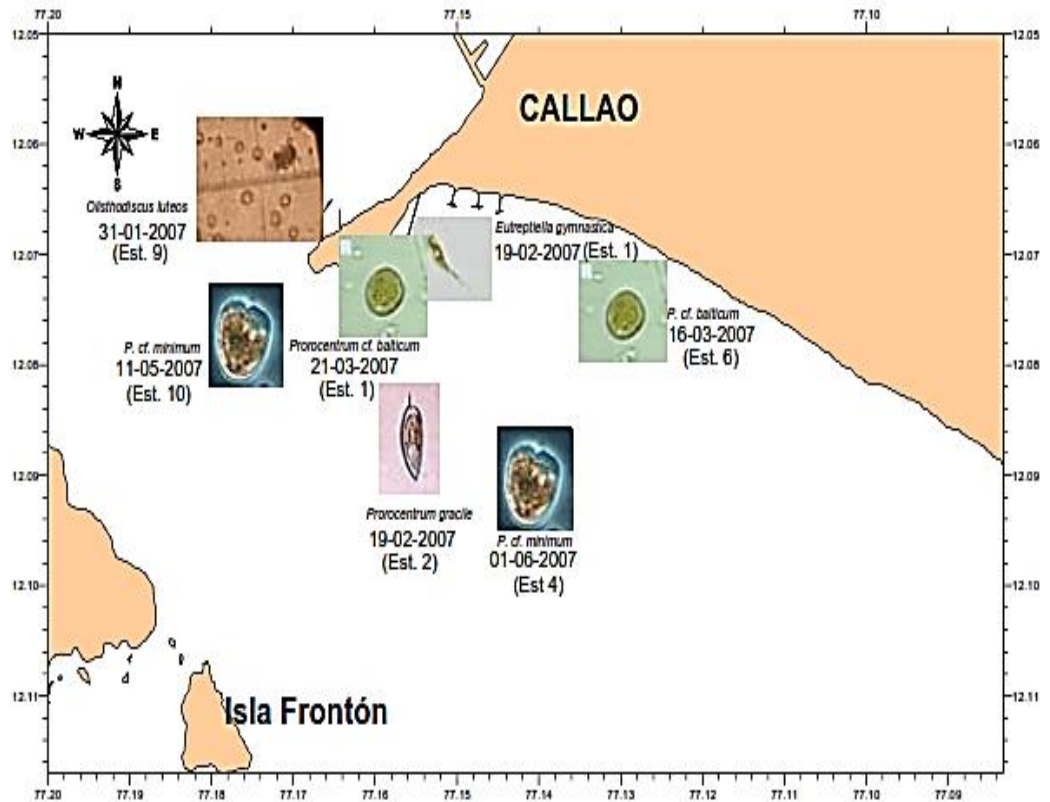


FIGURA 10. Mareas Rojas en la costa central del litoral peruano. Calla 2007. Fuente. Datos tomados por el IMARPE (2005)

De enero a diciembre de 2010 se realizaron 76 salidas a la mar, en las Bahías Independencia, Paracas, Lagunillas. En las evaluaciones quincenales se considerando la colecta de muestras en 7 estaciones hidrográficas, 148 muestras para análisis cuantitativos, 148 para análisis cualitativos y 148 para salinidad. El *Prorocentrum minimum*, registro eventos de mareas rojas en los meses de mayo, junio, setiembre, octubre y noviembre.

A inicios de abril de 2011 se registraron 7 especies potencialmente tóxicas, asociadas a un rango de Temperatura Superficial del Mar (TSM) que fluctuó entre 18,2 y 21,4 °C. Los dinoflagelados reportaron el mayor número de especies (5) con las máximas en playa Atenas, donde *Prorocentrum minimum* obtuvo 4 760 cel.L⁻¹.

A diferencia del verano de 2012, para el período de otoño (abril, mayo y junio) la frecuencia de floraciones algales (mareas rojas) se incrementó de manera considerable y principalmente en la zona norte y centro del mar peruano, siendo responsables mayormente los dinoflagelados entre los que destacaron *Alexandrium peruvianum* (especie perjudicial para la salud humana), *Akashiwo sanguinea*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum minimum*, *Ceratium fusus* y el ciliado *Mesodinium rubrum*. Mientras que en Pisco se presentó la marea roja de *Prorocentrum micans*, cuya densidad fue de $2,250 \times 10^3$ con TSM de 20,7 °C, finalmente este último organismo produjo otra floración algal en Chucchio (Bahía Independencia) alcanzando densidades máximas de $1,99 \times 10^6$ cel.L⁻¹ asociadas a TSM de 18,0 °C.

2.3.6. Aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica del Orden Prorocentrales

Recientemente las herramientas moleculares de diagnósticos, se han desarrollado para permitir una identificación más específica y sensible de estos organismos.

Lu Douding et al. (2005). Estudiaron la morfología de las muestras cultivadas de *Prorocentrum donghaiense*, se realizó la comparación taxonómica, entre *P. donghaiense* y otra especie relacionada *Prorocentrum spp.* Utilizaron la morfología y otros datos de información molecular publicada. No hubo diferencias morfológicas entre las características de las especies, estas fueron conservadoras. Se registró *Prorocentrum dentatum* de la floración formada en el Mar Oriental de China, que anteriormente se había registrado como es *Prorocentrum donghaiense* Lu. Las especies registradas en el Mar Oriental de China, Japón y Corea parecen ser de la misma especie. Los datos moleculares de *Prorocentrum dentatum* (CCMP1517) y *Prorocentrum donghaiense* fueron genéticamente idénticos.

Zhang Cheng et al. (2005). Amplificaron un fragmento del ADN ribosomal de la subunidad grande (LrDNA) de 12 cepas de las especies *Prorocentrum* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR fueron digeridos por endonucleasas de restricción (3 *Cfo* I, *Hae* III, y *Rsa* I) y revelados en geles de agarosa. Los resultados mostraron que las diferentes especies tenían diferentes patrones de RFLP, excepto para *Prorocentrum arcuatum* (ME 131), que tenía el mismo patrón a *P. micans* (ME160 y 04). Los mismos fragmentos de las 19 cepas del mismo género fueron amplificados y sometidos a desnaturalización en un gel con gradiente por electroforesis (DGGE). Resultaron 11 patrones diferentes. Los diferentes cultivos de una misma especie tuvieron el mismo patrón. Los resultados de RFLP y los análisis de DGGE mostraron que ocho especies de *Prorocentrum*, de los aislados epibentónicos eran diferentes

entre sí, a partir de otros cultivos examinados en este estudio. *Prorocentrum arcuatum* (ME132) no se diferenció de *Prorocentrum micans* (ME160 y 04), probablemente estuvo mal identificado, ya que son diferentes morfológicamente. El *Prorocentrum redfieldii* (ME138) resultó ser distinta del *Prorocentrum triestinum* (ME132).

Edvardsen, B. et al. (2003). Determinaron las secuencias de ADNr de las especies de *Dinophysis* encontradas en aguas Noruegas. Se secuenciaron nucleótidos de codificación de la subunidad pequeña SSU y de la subunidad LSU 5,8S. El espaciador interno transcrito ITS1 y del ITS2 del operón rRNA fueron amplificados mediante la PCR de las células de *Dinophysis* aisladas a partir de muestras de agua natural. Las tres especies fotosintéticas *D. acuminata*, *D. acuta* y *D. norvegica* difirieron de 5 a 8 de los 1800 pares de bases (pb) dentro del gen del SSU rRNA. En los análisis filogenéticos sobre la base de SSU rDNA, todas las especies de *Dinophysis* fueron agrupados en un clado, resultando divergencias dentro de la familia Dinophyta. Incluyendo 4 nuevos análisis filogenéticos de LSU y 11 secuencias de *Dinophysis*, identificaron dos grandes clados dentro de la especie fototróficas. Resultó poca variación genética intraespecífica encontrado en la región ITS1-ITS2 de las células individuales de *D. norvegica* y *D. acuminata* de Noruega.

Cohen-Fernández, E. et al. (2010). Realizaron un análisis filogenético de la especie *Prorocentrum* de 19 cultivos, que incluyó las secuencias de las grandes y pequeñas subunidades de ARN ribosomal de 13 de las 20 especies reportadas en la Costa del Pacífico de México, los resultados mostraron que *P. micans*, *P. gracile* y *P. mexicanum* fueron los más cercanas de las especies, planctónica puede ser más reciente que las especies epibentónicas y se sugirió que probablemente el ancestro del género *Prorocentrum* podría ser una célula redonda sin columna vertebral apical, tóxica y epibentónico.

Cortés-Altamirano et al. (2003). Las observaciones al Microscopio electrónica de barrido, mostraron marcadas diferencias en forma y microornamentación de las especies *Prorocentrum rhathymum* Loeblich III, Sherley y *P. mexicanum* en las dimensiones de poroides. La distribución desigual de tricocistos y la arquitectura en general de la región periflagelar están estrechamente relacionadas con *Prorocentrum caribbaeum* Fausto. Por otra parte, el número y la distribución de poros tricocistos en el área periflagelar es diferente entre las dos especies, situado en ambas válvulas de *Prorocentrum mexicanum* y *Prorocentrum rhathymum*. La evidencia demuestra que *Prorocentrum mexicanum* (planctónicas) y *Prorocentrum rhathymum* (epibenthic) son distintos y no son sinónimos.

Grzebyk et al. (1998). Secuenciaron genes 18S rRNA a partir de ocho especies de *Prorocentrum*. Las relaciones filogenéticas de los dinoflagelados *Gonyaulas*, *peridinioideo*, *gymnodinioideo* y *prorocentroideo* fueron inferidos a partir de las secuencias completas del ADNr 18S. Los *Prorocentrales* tuvieron un origen común, en dos grupos de *Prorocentrum spp.* El primer grupo incluyó especies bentónicas simétricas como: *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum arenarium*, *Prorocentrum maculosum* y *Prorocentrum concavum*. El segundo grupo contiene especies planctónicas y bento planctónicas como son: *Prorocentrum micans* Ehrenberg, *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum mexicanum* y *Prorocentrum panamensis*. Las distancias genéticas entre las especies de estos dos grupos fueron altas, sin embargo, la divergencia entre los dos grupos parecieron haber ocurrido tarde en la evolución del dinoflagelado *Prorocentrum emarginatum*, ya que presentó lejanía relacionado con ambos grupos. La interpretación morfológica de este análisis filogenético se hizo sobre la base de la estructura específica de la zona periflagelar. Los datos genéticos y observaciones morfológicas apoyaron la hipótesis el género *Prorocentrum* que es bastante heterogénea y que podrían considerarse varias especies para constituir géneros distintos.

Hoppenrath et al. (2010) realizaron una revisión de 29 especies bentónicas de *Prorocentrum*, los datos morfológicos del mismo taxón de diferentes sitios revelaron variabilidad morfológica inesperada. Muchos de ellos fueron variables fenotípicamente. Concluyeron que las siguientes características son constantes dentro de una especie: en asimetría o simetría de la teca en combinación con la forma de la zona periflagelar visible en la placa techal derecho, presentaron forma de arco, ancho y forma de V. Se observó, la forma de las células de algunas especies fue más variable que en otros. Se recalcó la incertidumbre de los límites de varias especies potencialmente productoras de toxinas, como son: *Prorocentrum hoffmannianum*, *Prorocentrum belizeanum*, *Prorocentrum maculosum*, y *Prorocentrum faustiae*. Algunas especies presentaron toxicidad variables, por ejemplo, *Prorocentrum belizeanum* y *Prorocentrum rhathymum*. Se determinó, que varias especies están genéticamente relacionadas y son especies crípticas (parecido en morfología, fisiología y comportamiento). De la misma manera, los datos moleculares les permitió evaluar la información genética molecular de algunas especies de *Prorocentrum* que son potencialmente tóxicos y que se incluyen en la actualidad en programas de monitoreo, para determinar la relación entre especies, la identificación de cepas y la producción de toxina.

2.3.7. Cultivos microalgales

Definición.

Conocido como cultivos de apoyo o cultivos anexos (considerando en esta definición también al cultivo de zooplancton) que es primordial en el desarrollo de los cultivos principales, esto es para los moluscos, durante todo su ciclo de vida los crustáceos y los peces en su etapa larval. Estas microalgas son las que contribuyen a la producción de biomasa en los océanos, estuarios, lagos y reservorios. Hoff & Snell (2001).

Sonsoles, G. et al. (1998). Estudiaron las fases del ciclo celular así como los puntos de restricción de los dinoflagelados marinos *Prorocentrum minimum*,

Prorocentrum triestinum, *Prorocentrum lima* y *Gimnodinium catenatum*. Se utilizaron cuatro técnicas de microfluorometría, citometría de flujo, espectrofluorimetría y cinética celular, los dinoflagelados mostraron un ciclo celular típicamente eucariótico con cuatro fases bien diferenciadas, G1, síntesis, G2 y mitosis, en diferentes condiciones de restricción a 4° y 35°C. Algunas especies tienen puntos de restricción en su ciclo celular en la fase G1 mientras que otras en la fase G2.

Garduño- Solorzano et al. (2011). Aislaron microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz, utilizando diferentes técnicas y medios de cultivo. Se determinaron taxonómicamente 6 taxa de *Pediastrum sensu latum*. La obtención del ADN total de *Monactinus simplex* y *Scenedesmus obliquus* se realizó mediante el Kit ADN easy Plant. Se amplificaron las regiones ITS 1, 5.8S e ITS2; rbc-L y del trn-L. Esta contribución incrementa el conocimiento de algunos géneros de microalgas dulce-acuícolas en México y constituye la primera descripción de la ultraestructura de poblaciones silvestres y en cultivo para *Monactinus simplex*.

Pertola (2006). Realizaron 10 años de evaluaciones de la especie *Prorocentrum minimum* (1993-2002) ocurrido en el Mar Báltico y el Golfo de Finlandia en altos parámetros de temperatura y salinidad fue positivamente relacionado con la presencia de nitrógeno orgánico y fósforo. Esto indicó que la especie fue favorecida por el aumento de nutrientes (orgánicos). Las micrografías electrónicas de barrido demostraron los finos detalles morfológicos del *Prorocentrum minimum*.

2.3.8. Identificación de Biotoxinas Marinas

Nascimento, S. et al. (2005). Aislaron *Prorocentrum lima* de la laguna costera Flota, Dorset, Reino Unido y establecieron cultivos clonales. Estas fueron analizadas por ácido Okadaico (OA), dinophysistoxin-1 (DTX-1), DTX-2, DTX-4 y ésteres diol a través de cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas. Ellos encontraron que las concentraciones de OA

variaron desde 0,4 hasta 17,1 pg de OA cel⁻¹ y DTX-1 de 0,4 a 11,3 pg de DTX-1 cel⁻¹. DTX-4 y una selección de DTX-4 ésteres diol se identificaron mediante seguimiento de iones seleccionados. Se verificó que no todas las cepas produjeron estos compuestos.

Paz, B. et al. (2008). Estudiaron las principales toxinas producidas por el dinoflagelado *Prorocentrum belizeanum* (Ácido Okadaico, DTX- 5c y 7-hidroximetil-2-metilen-octa- 4,7- dienil okadaato) fueron analizadas en un sistema de cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas (LC-MS), lo que determinó los tiempos de retención (t_R) respectivos y los patrones de fragmentación asociados. Como una muestra de la aplicabilidad de la metodología empleada, diversas muestras provenientes de los cultivos in vitro de *Prorocentrum belizeanum* fueron analizadas, tres toxinas mayoritarias fueron detectadas en los extractos celulares (extractos realizados empleando como disolventes acetona y metanol, mientras que en el medio de cultivo solo se detectó trazas de ácido Okadaico).

3. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de Muestreo.

La zona del estudio fue la Bahía del Callao, exactamente frente al muelle del Instituto del Mar del Perú a $77^{\circ}09'36''$ W y $12^{\circ}03'36''$ S. Comprende la provincia Constitucional del Callao (Figura 11).

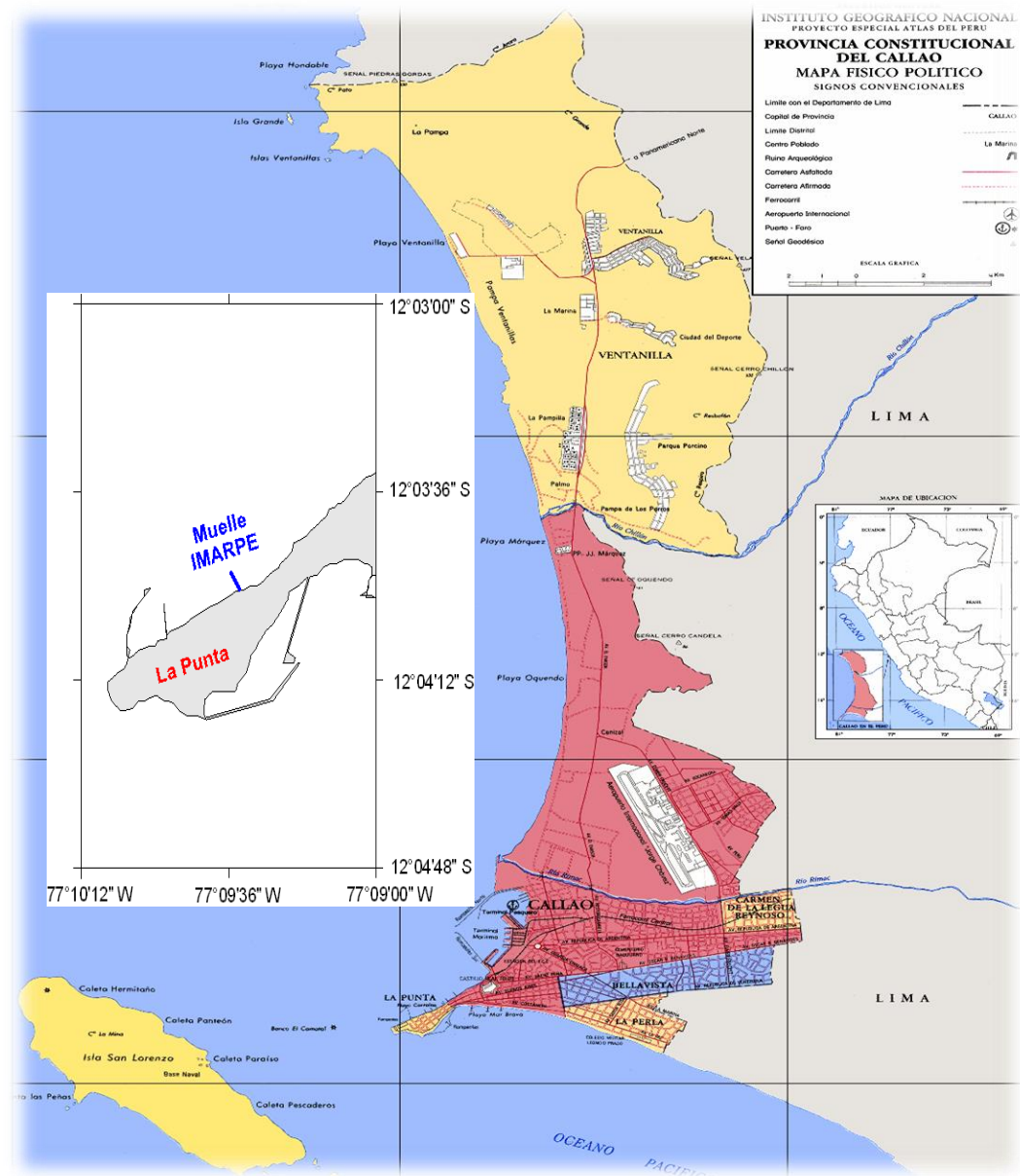


Figura 11. Cartografía del Muelle de IMARPE. Lugar de toma de muestreo.

3.2. Muestreo de Campo.

Se seleccionó el punto de muestreo, en base a las características hidrográficas del mar del Callao 77°09'36" W y 12°03'36" S. Para la toma de muestra se utilizó una red de fitoplancton de 20 µm de apertura de malla; tamiz de 100-150 µm con aro de sujeción y colector de PVC, mediante el cual se filtró 5 veces la muestra de agua de mar recepcionada en un balde de 5 L de capacidad y fue colectada en un frasco de plástico de 500 mL con tapa y se colocó dentro una caja térmica para ser procesada en laboratorio.

3.3. Aislamiento de la microalga.

Se trabajó dentro de una cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia. Sobre un porta objeto limpio, se depositó una gota de la muestra y se cubrió con el cubreobjetos, observándose al microscopio binocular en la fases de 10x y 40x. Se verificó la morfología y el movimiento natatorio de la microalga viva. Se observó la especie de interés.

3.4. Preparación de la solución nutriente.

Para iniciar un cultivo de microalgas primero se debe tener un medio de cultivo adecuado para la especie a cultivar, en esta oportunidad se utilizó el medio de cultivo F2 modificado Guillard (1973), por su contenido de nutrientes mayores como nitrógeno y fosforo que se encuentra en cantidades reducidas en comparación de otros medios.

Para la preparación de las soluciones stock se utilizó agua destilada autoclavada. En Anexo 1 se detalla los medios Stock para obtener el medio F2 modificado por Litro. Las soluciones se mantuvieron estériles y refrigeradas.

3.5. Preparación y esterilización del medio de cultivo.

El agua de mar captada pasó por un sistema de filtros de arena, filtro biológico, filtros de cartucho de 1 μ y 5 μ y el sistema de desinfección de UV, luego se almacenó en un tanque de polietileno de 100L. El agua para el cultivo de microalgas fue filtrado con un sistema de filtración y con una bomba para hacer vacío la que se le colocó un filtro de membrana circular de una porosidad de 20 μ que cubrió la base del embudo sin sobrepasarla. El agua filtrada fue colocada en una botella de Pyrex de 5 L y autoclavada a 121 °C x 15 Atm de presión. Se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar, a la botella de agua estéril fría se le adicionó 1 mL por L del Rx 1, Rx2, Rx 3 de las soluciones stock para preparar el medio F2 Guillard para el cultivo de *Prorocentrum minimum*. (Ver anexo 1).

3.6. Establecimiento de purificación unialgal

3.6.1. Aislamiento por pipeteo y lavados sucesivos.

Se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar estéril frente al mechero. Se utilizó esta técnica para obtener un cultivo unialgal por ser el *Prorocentrum minimum* mayor a 10 μ m.

Se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar estéril frente al mechero. Se utilizó esta técnica para obtener un cultivo unialgal (Figura 11), a los 11 orificios restantes se le añadió 1 mL de Medio F2 Guillard Modificado, luego con una pipeta Pasteur estéril se cogió un gota del primer pocillo transfiriendo al segundo pocillo agitándolo bien y así continuamente se les realizó los lavados sucesivos (Figura 12).



Figura 12. Adición de 1mL de Medio Guillar en la placa de multipocillos.



Figura 13. Técnica de lavado de células sucesivas.

Posteriormente se observó al microscopio binocular los campos de los orificios lavados y del campo que tenía menos células (1-2 microalgas), la placa multipocillos fue transferida a la cámara de flujo laminar (Figura14).



Figura 14. Placa multipocillos a la cámara de flujo laminar.

De igual manera, dentro de la cámara se preparó una gradilla con 13 tubos de ensayo de 15x150 mm con 10 mL de medio F2 Guillard modificado estéril, al cual se le transfirió con ayuda de la pipeta Pasteur todo el medio de los pocillos que contenía de 1-2 células microalgales, este mismo procedimiento se repitió con cada tubo de ensayo (Figura 14).



Figura 15. Tubos de ensayo con medio F2 Guillard con una célula microalgal.

Luego se incubaron los tubos de ensayos bajo condiciones de luz, 19 ± 2 °C de temperatura y 24 horas de fotoperiodo lo más próximo posible a las condiciones ambientales en la que se encontró el organismo. Se utilizó una cámara de cultivo acondicionada para su incubación (Figura15).

Los tubos incubados se agitaron todos los días a las 10:00am por un período de 30 días, se observó división celular y aumento del número de células algales de interés sin que se observen contaminantes.

Se seleccionó los tubos que tenían mayor densidad de coloración, se concentraron los 12 tubos en tres matraces de 100mL (40mL de inóculo de microalga + 60mL de medio F2 Guillard), en los mismos parámetros antes mencionados.

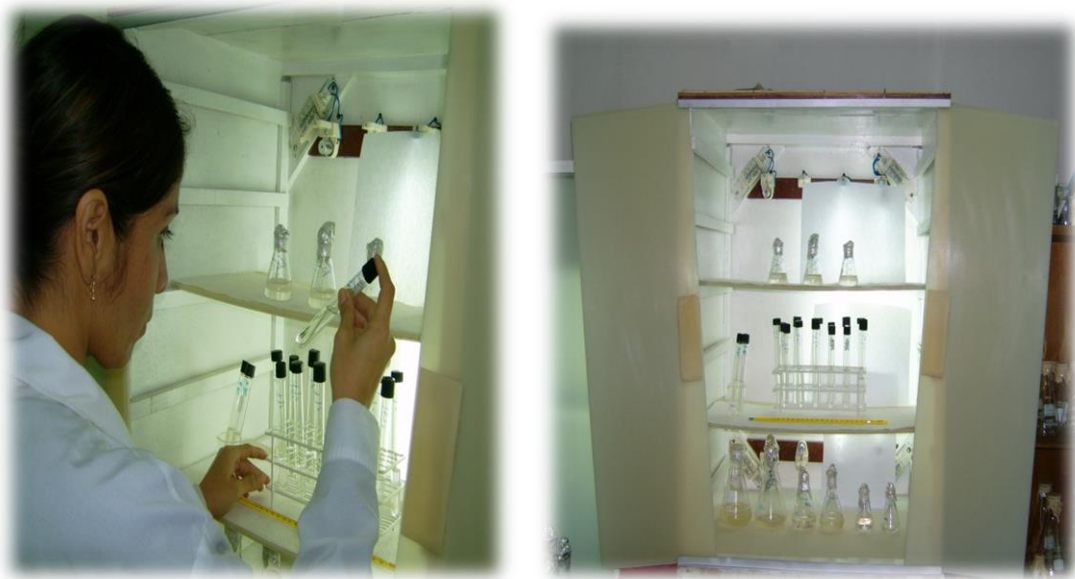


Figura 16. Cámara de Cultivo acondicionada para el cultivo de microalgas.

3.6.2. Curva de crecimiento de la microalga *Prorocentrum minimum*.

La cuantificación de la densidad del crecimiento de las microalgas fue estimado mediante el método de conteo directo de células con la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y con ayuda del microscopio compuesto binocular a 10X reportando la densidad celular (cel mL^{-1}) $\times 10^4$, este es un método eficaz para evaluar correctamente el proceso diario del cultivo, coincidiendo con lo descrito por Anderson (2005).

Se realizaron conteos celulares de *Prorocentrum minimum* diariamente por un período de 30 días, el ensayo se realizó de la siguiente manera: un control más tres replicas a 19 ± 2 °C (Figura 18) y el otro control con tres replicas a 21 ± 2 °C (Figura 17), la densidad de inóculo microalgal de *Prorocentrum minimum* fue de 0,5mL en un volumen de 99,5 mL de medio F2 Guillard estéril, para tener un volumen final de 100 mL por matraz. El objetivo de estos ensayos era observar cuantos días demoraba en concentrar la mayor densidad microalgal. A los matraces controles no se les sacó la muestra diaria para el conteo celular, solo se sacó muestras a los matraces por triplicado.



Figura 17. Cultivo de *Prorocentrum minimum* a 21 ± 2 °C



Figura 18. Cultivo de *Prorocentrum minimum* a 19 +/- 2 °C

3.6.3. Análisis estadístico

Se evaluó previamente la normalidad y la homogeneidad de varianza para el análisis del promedio simple de la Densidad celular (cel mL^{-1}) $\times 10^4$, se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA), y el test de Turkey de las temperaturas de cultivo y de los días de muestreo como factores. Se consideró un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas y se utilizaron los programas estadísticos Minitab 16 y Systat 13.

3.6.4. Concentración de *P. minimum* para análisis moleculares

De los matraces de la curva de crecimiento de *P. minimum* se obtuvo una muestra la cual se observó al microscopio binocular. Posteriormente, se transfirió un inóculo de 5 mL de la microalga más 95 mL del medio F2 Guillard en 8 matraces de 125 mL de capacidad. Fue incubado por 18 días en la cámara climática acondicionada a 21 °C con un fotoperiodo de luz y agitación manual dos veces al día, (Figura 18). Una vez concentrada la densidad microalgal fue

transferido con ayuda de la pipeta Pasteur a tubos de ensayo. Posteriormente, fue centrifugado a 5000 rpm x 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el sedimento formado fue transferido a un microtubo, ese procedimiento se realizó hasta concentrar sedimentos de todos los matraces. Finalmente, los paquetes celulares de microalgas fueron refrigeradas a 3°C.



Figura 19. Concentración de células de *P. minimum*

3.6.5. Concentración de *P. minimum* para análisis de toxinas

Se realizó el mismo procedimiento anterior, se esperó 18 días para concentrar la densidad microalgal en los matraces. Luego se procedió al sistema de filtración para bomba de vacío, el filtro que se utilizó fue de fibra de vidrio marca Whatman grado G/C (retención de partículas de 1,2 μm). Terminado el filtrado, con ayuda de la pinza se dobló en 4 el filtro y fue transferido a un tubo tipo Falcón de 50 mL y se resuspendió en metanol absoluto (100 %), hasta el procesamiento de la muestra. El análisis del extracto del cultivo monoalgal (o de células aisladas por micromanipulación) nos permitirá obtener un perfil de la toxina de la especie sospechosa ($\text{pg}^{-\text{cel}^{-1}}$)

3.7. 0. Filogenia Molecular de *Prorocentrum minimum*

Se procedió a realizar el análisis filogenético de los aislados obtenidos. Además, se utilizó una cepa control adquiridas de Provasoli- Guillard National Center of Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) USA. Finalmente se usaron secuencias de *Prorocentrum* obtenidas de las bases de datos del NCBI. Para el estudio filogenético se procedió de la siguiente manera:

3.7.1. Extracción del ADN microalgal.

Para la extracción del ADN se obtuvo de células frescas de microalgas proveniente de los cultivos. Se cosechó 1,5ml de cultivo en los tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y al *pellet* de las microalgas se le adicionó nitrógeno líquido y con ayuda de un macerador se les presionó para generar el rompimiento de las células. Se extrajo el ADN de las microalgas utilizando el Protocolo de Doyle & Doyle (1990) con algunas modificaciones. Se trabajó con 700 µL de CTAB +β-mercaptoetanol buffer y se homogenizó. Se adicionó 4 µL de RNAsa (10 mg/mL) por tubo de extracción. Los tubos se colocaron a 65 °C por 45 minutos en baño maría, mezclando 2-3 veces durante la incubación. Se adicionó un volumen de 700 µL de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), se invirtieron suavemente durante 10 minutos (o toda la noche). Se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm. Luego se transfirió el sobrenadante a otro microtubo, evitando recoger la interfase. Se adicionó un volumen de 700 µL de cloroformo alcohol isoamilico (24:1) nuevamente y se invirtió varias veces los tubos durante 5 minutos para asegurar la muestra. Los microtubos fueron centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm. Se recuperó el sobrenadante (no la interfase) y se le adicionó 700 µL de isopropanol frío. Se dejó reposar a -20 °C por una hora para precipitar el ADN. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. Se eliminó el isopropanol. Se lavó con 500 µL isopropanol frío y se centrifugó a 7000 rpm por 20 minutos. Se eliminó el

isopropanol, bajo campana de extracción y se colocó el microtubo con la boca invertida sobre un papel toalla para eliminar la mayor cantidad de alcohol posible. Se colocaron los tubos abiertos bajo la campana de extracción durante 3 horas. Se volvió a resuspender los tubos con 150 µL de Tris EDTA buffer (TE), pipeteando para disolver el ADN. Se colocaron los tubos a 65 °C en baño maría, durante 10 minutos para disolver completamente el ADN.

3.7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se realizó en un termociclador de la marca Eppendorf, empleándose los cebadores LSU-D1R y D2C y los cebadores Perk-ITS-SC y Perk-ITS-AS, señalados en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados en la amplificación y secuenciación del gen LSU rRNA y el fragmento genómico parcial del ITS 1- 5.8 S rRNA – ITS 2 de varias cepas de *Prorocentrum minimum*

Cebadores (5'-3')	nucleótidos	Referencia
Síntesis ADN		
LSU		
D1R	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	Scholin <i>et al</i> (1994)
D2C	CCTTGGTCCGTGTTCAAGA	Scholin <i>et al</i> (1994)
ITS 1-5.8 S- ITS 2		
Perk – ITS –S	CTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	Kotob <i>et al.</i> (1999)
Per- ITS- AS	GCTTACTTATATGCTTAAATTCAG	Kotob <i>et al.</i> (1999)

La PCR fue realizada en un volumen de 25 μL con 23 μL de Supermix PCR (Life Technologies), 0,5 μL de cada primer (10 μM) y 1 μL del DNA. Las condiciones de PCR para el cebador LSU fueron: 1 ciclo de denaturación a 94° C por 3 min, posteriormente por 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, el alineamiento a 55 °C por dos minutos, extensión a 72 °C por 3 minutos, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos. Para el otro set de cebadores, (Perk- ITS-S/Perk- ITS-AS), la condición de la temperatura fue idéntica a la descrita por Kotob *et al.*, 1999: 1 ciclo de denaturación a 94° C por 3 min, posteriormente por 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, el alineamiento a 55 °C por dos minutos y la extensión a 72 °C por 3 minutos, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos. (Figura 19).

Después de la amplificación, los productos de la PCR fueron tratados con la enzima Exonucleasa I por 1 hora a 37 °C y una incubación a 80 °C por 15 min, esto permitió la eliminación de los residuos de los cebadores, los productos extraños en el DNA producido por la PCR y los nucleótidos restantes de la mezcla de PCR.



Figura 20. Corrida del LSU de *Prorocentrum minimum* en el termociclador marca Eppendorf

3.7.3. Preparación del gel de Agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, al que se le adicionó 8 μ L de *Red Safe*, y se dejó secar el gel por 2 horas. Se utilizó 2 μ L del colorante marcador *Blue Orange 6x Loading Dye* (Promega), más 8 μ L de la muestra de ADN de *Prorocentrum minimum* en un volumen total de 10 μ L. Como marcador de peso molecular se utilizó 5 μ L del marcador de 100 pb (Promega). El gel de Agarosa se dejó correr a 100 voltios durante 1 hora.

3.7.4. Secuenciación de las Muestras de Microalgas

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y enviados para ser secuenciados a la Universidad de Vigo, España, Departamento de Genética Facultad de Ciencias Marinas. Se incluyeron los productos de PCR de la cepa obtenida en el presente estudio y cepa controles de *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum gracile*.

3.7.5. Alineamiento de Secuencias y construcción de árboles.

La alineación de secuencias de las especies de *Prorocentrum* se realizó utilizando el programa BioEdit (Hall *et al.*, 1999) que contiene el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994).

Para la construcción de los arboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA 5,05. Tamura *et al.* (2011) utilizando el algoritmo de Parsimonia y de Maximun Likelihood.

3.7.6. Secuencias provenientes del banco de secuencias del NCBI.

Las secuencias fueron seleccionadas considerando que era importante tener el acceso a su identidad taxonómica, de manera que se privilegiaron aquellas secuencias provenientes de cepas de la misma familia. Los números de acceso de *Prorocentrum minimum* utilizadas en el presente estudio fueron los siguientes: DQ 054539.1, FJ 939573.1, DQ 662402.1, AY 863005.1, DQ 884421, AF512886.1, AF463409.2. Los números de acceso de *P. gracile* utilizadas en el presente estudio fueron los siguientes: EF 517247.1, EF 517248.1, EF 517249.1, EF 517251.1, AY 259165.1 Como *outgroup* se usó la secuencia de *Scrippsiella trochoidea* (AY 421792). Finalmente se incluyeron las secuencias de las cepas compradas del Instituto Provasoli- Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (2811).

3.7.7. Evaluación de la capacidad toxigénica de *Prorocentrum minimum*

Para evaluar la capacidad toxigénica de *P. minimum* se siguió el protocolo establecido por Yasumoto et al. (1984). Para ello, se concentró 1,5 L de cultivo microalgal, todo el cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se obtuvo 15 mL de sedimento del cultivo de la microalga. Se trabajó a una temperatura entre 5 y 10 °C, de esta manera fue posible obtener una pastilla celular. Se utilizó 50 mL de acetona y homogenizó 2 -3 min. Se dejó sedimentar la fase sólida. Se filtró el sobrenadante a través de papel filtro, recogéndolo en un matraz colector adaptable al rotavapor. Se repitieron los mismos pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 mL de acetona en cada ocasión. Se combinaron los dos nuevos filtrados del mismo matraz colector. Se evaporó el extracto acetónico final en el rotavapor con baño de agua a una temperatura de 40 °C. No fue necesario evaporar totalmente el agua residual.

Posteriormente, se añadió al extracto residual un pequeño volumen de agua de manera que el volumen final del extracto sea aproximadamente 15 mL. Se traspasó el extracto a un embudo de decantación. Se arrastró los restos del residuo que pudieran permanecer en el matraz colector con 50 mL de éter dietílico y se combinó este extracto etéreo con el extracto acuoso del embudo de decantación. Se agitó suavemente invirtiendo varias veces el embudo (evitar agitación vigorosa y prevenir la formación de emulsiones). Posteriormente se dejó en reposo y se permitió la separación en dos fases, se separó la fracción acuosa y se reservó la fracción etérea. Se extrajo la fracción acuosa dos veces más con 50 mL de éter dietílico. Se combinaron las fracciones etéreas y se realizaron dos lavados adicionales del extracto etéreo con 15 mL de agua. Se evaporó el extracto etéreo completamente. Luego se combinaron las fracciones acuosas y se evaporó el extracto hidrosoluble. Finalmente se redisolviéron los residuos con una solución acuosa de Tween 60 al 1 %, previamente a una temperatura a aprox. 40 ° C.

3.7.8. Bioensayo en ratón:

Se inoculó 1 mL por vía intraperitoneal de la solución liposoluble del extracto de la microalga *Prorocentrum minimum* (Figura 20), a tres ratones de 19-21 g de peso y se les observó por 24 horas. El bioensayo se consideró positivo a la presencia de las toxinas OA, DTXs, PTXs, y YTXs cuando se llegara a producir la muerte de al menos 2 de los 3 ratones dentro de las 24 horas.

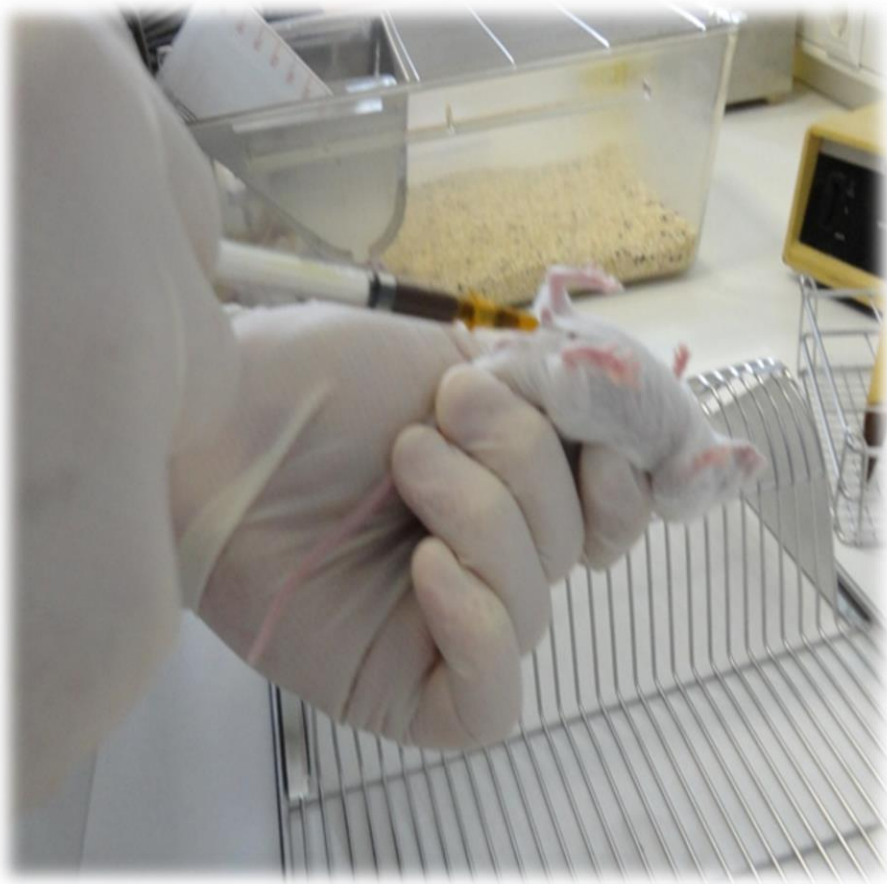


Figura 21. Inoculación de la biotoxina en el ratón

4. RESULTADOS

4.1. Lugar de muestro

El muestreo se realizó en el muelle del IMARPE – Callao, presentó las siguientes coordenadas geográficas 77°09'36" W y 12°03'36" S, la temperatura del mar fue de 16,38 °C y la salinidad fue de 37 ppm.

4.2. Muestreo de campo.

Se concentraron las microalgas con la red de fitoplancton de 20 µm. La colecta de la muestra se realizó el 31 de marzo y 28 de Abril de del año 2005 y el 06 Agosto de 2007.

4.3. Aislamiento de la microalga

Se logró el aislamiento de dos cepas de microalgas: *Prorocentrum minimum* aislada de la Playa Chucuito en la Bahía del Callao y *Prorocentrum gracile* aislada de la playa Carpayo también de la Bahía del Callao. La técnica de aislamiento facilitó el trabajo, puesto que, se obtuvieron cultivos puros a partir de una unidad algal. Se visualiza en la figura 22 y 23.

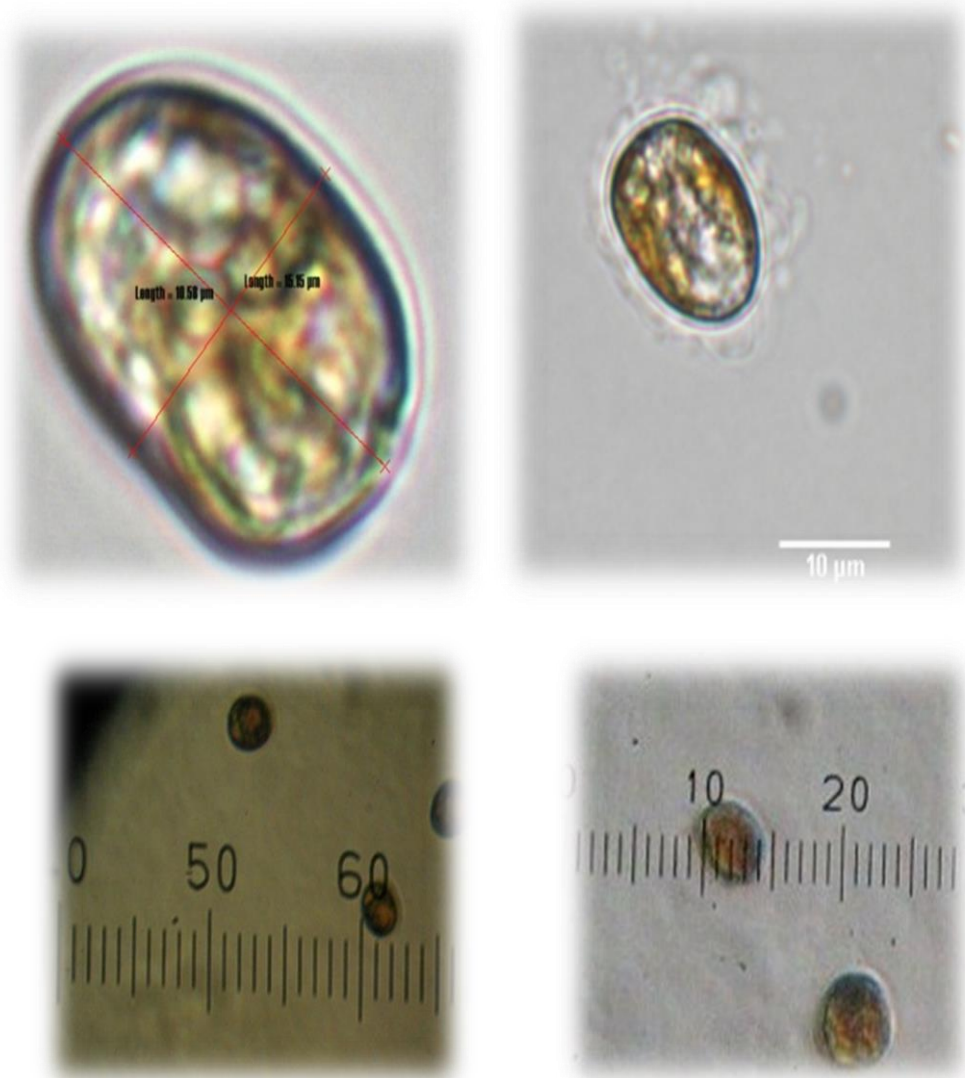


Figura 22. Células de *Prorocentrum minimum* observadas al microscopio binocular a 40x. Microfotografía por C.Ruiz.

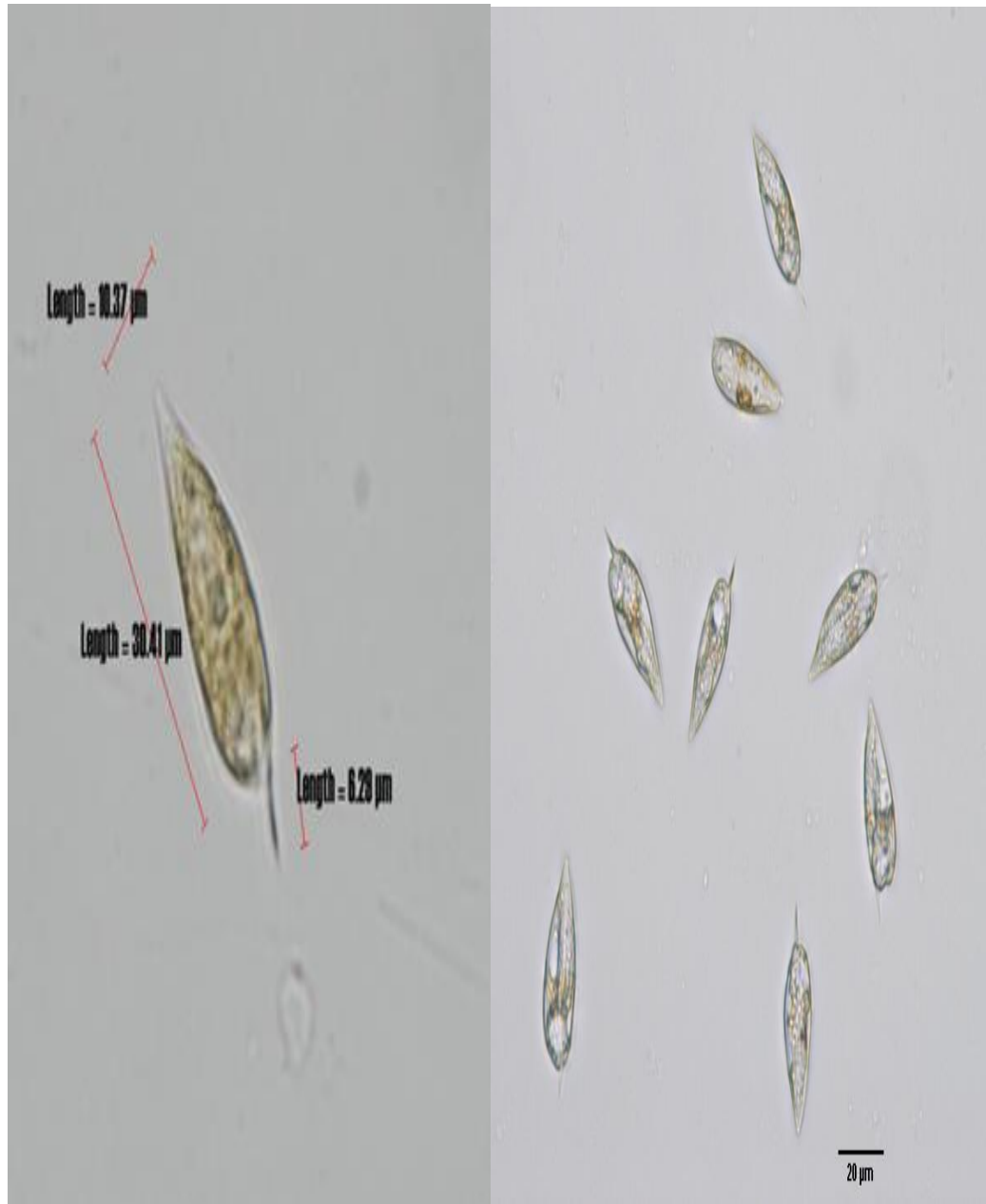


Figura 23. Morfología de *Prorocentrum gracile* Schutt 1895. Presenta células vivas. Microfotografía por C. Tenorio.

4.4. Preparación de solución nutriente y esterilización del medio de cultivo

Los reactivos 1, 2 y 3 estériles, nos sirvió como solución stock para preparar el F2 Guillard, donde cada frasco se almacenó en el refrigerador para su conservación.

4.5. Purificación por pipeteo, lavado de célula y clonación de células.

La técnica por pipeteo por capilar y lavado de células resultó ser una de las más precisas para la purificación de la microalga *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum gracile*. La purificación duro cerca de 3 meses, se pudo obtener células clonadas libres de contaminantes.

4.6. Curva de crecimiento de la microalga *Prorocentrum minimum*, a diferentes temperaturas de 19 y 21 °C en la cámara de cultivo.

El cultivo de *Prorocentrum minimum* presentó cuatro fases en su crecimiento las cuales fueron: Fase de inducción; demoró entre seis y ocho días a 21 y 19 °C pudo deberse al tamaño de la célula, y al estado del inoculó, a las nuevas condiciones de cultivo y a la adaptabilidad fisiológica coincidiendo lo descrito por el científico Morales & De Vetolli (1990); Becker (1994).

Fase exponencial: aquí las microalgas aumentaron rápidamente de manera geométrica exponencial, esta fase apareció al séptimo y noveno día después de agregado el inóculo al medio y se prolongó por varios días. En el cultivo a 19 °C la fase exponencial duro 11 días, mientras que en el cultivo a 21 °C la fase exponencial duro 16 días, dependiendo por el tipo de microalgas coincidiendo lo descrito por Morales & De Vetolli (1990) & Becker (1994).

Fase Estacionaria: En ambos cultivos de *Prorocentrum*, se observó un decrecimiento en la velocidad de reproducción de las células, debido al

agotamiento de nutrientes del medio ocasionado por el crecimiento del cultivo, ocurrió similar a lo obtenido en cultivo de microalgas citado por diferentes autores como es Paniagua *et al.* (1988); Morales & De Velotti, (1990); Becker (1994).

Fase de declive: se pudo observar en el cultivo a 19 °C fue notorio desde el día 25 hasta el día 30, mientras que el cultivo a 21 °C se percibió en el conteo celular del día 25 al 30. Descrito anteriormente por Morales & De Vetolli (1990); Becker (1994). Los investigadores Tango *et al.* (2005) confirmaron que la temperatura no es un factor limitante para el desarrollo y crecimiento de *Prorocentrum minimum*, ya que estas temperaturas fluctúan entre 12-22 °C y salinidades de 5-10 ppm. Como también, Grzebyk & Berland (1998). Manifiesta que en los meses de invierno en el Mar Mediterráneo puede predominar la especie a temperaturas de 4-28 °C. Confirmando que nuestra temperatura de crecimiento de *Prorocentrum minimum* se encontró dentro de los límites de desarrollo para la microalga.

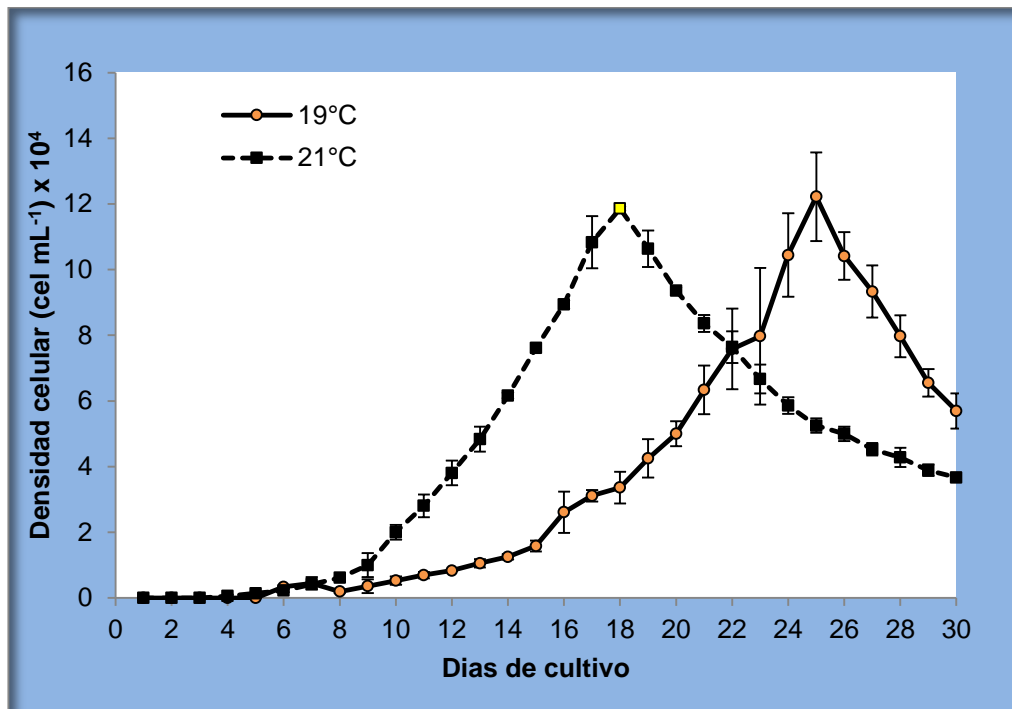


Figura 24. Curva de crecimiento de la densidad celular de la microalga *Prorocentrum minimum* a diferentes temperaturas de 19 y 21°C

4.7. Análisis estadísticos.

Las mayores densidades celulares de la microalga *Prorocentrum minimum*, se registraron en el cultivo a 19 °C (Figura. 23) alcanzando cifras de $12,2 \pm 0,44 \times 10^4$ cel.mL⁻¹ en el día 25. La densidad celular se incrementó paulatinamente con diferencias significativas ($P < 0.05$) hasta el día 24 y 26, para luego decrecer.

Los cultivos con 21 °C alcanzaron su densidad celular máxima a los 18 días ($11,86 \pm 0,44 \times 10^4$ cel. mL⁻¹), a partir del cual la densidad disminuyó, con diferencias significativas ($P < 0.05$) durante los días 17 y 19.

4.8. Concentración de *Prorocentrum minimum* para análisis de toxinas y análisis molecular.

El crecimiento y la densidad de las células de *Prorocentrum minimum* de determinó por la temperatura a 19 °C y 35 ppm de salinidad, motivo por el cual, facilitó concentrar muestras del cultivo de la microalga de *Prorocentrum minimum* para los dos diferentes análisis, la curva de crecimiento presentó densidades de $12,2 \times 10^4$ cel. mL⁻¹ en los matraces de cultivo, estas densidades fueron determinantes para la cantidad de flujo en litros de microalgas de *Prorocentrum minimum* utilizado por separado para los estudios respectivos de esta investigación.

4.9. Verificación de la calidad del ADN en el gel de agarosa

Se Logró verificar la calidad de extracción del ADN mediante la electroforesis se amplificaron los genes de *Prorocentrum minimum*, *Prorocentrum gracile* y cepa patrón 2811, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. (Figura 24).

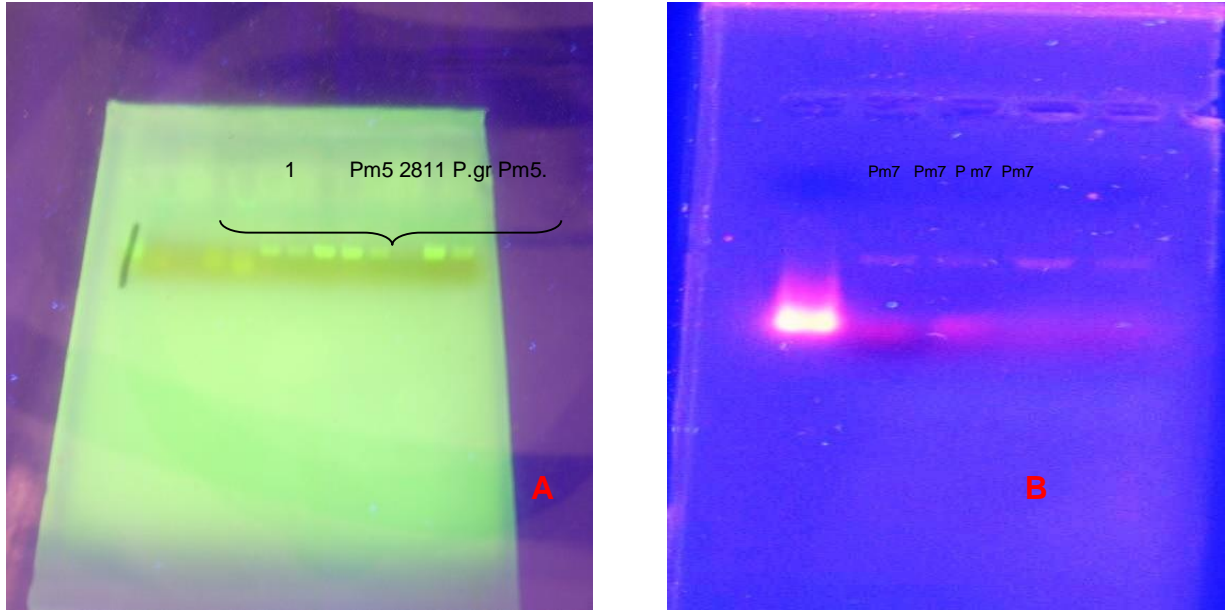


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril Foto A. 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2,3 y 5 Cepas de referencia, carril 4. *Prorocentrum gracile*. Foto B. Pm7 *Prorocentrum minimum*

4.9.1. Secuenciamiento de Productos de PCR

El resultado de la PCR, se obtuvo por las combinaciones de cebadores D1R/ D2C y Perk ITS- S y el Perk ITS- A (para los cultivos de *Prorocentrum*).

Las secuencias LSU obtenidas corresponden a las especies *Prorocentrum minimum* (2811) del Instituto Provasoli Guillard National Center of Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) y *Prorocentrum minimum* (Pm5; Pm 5.1 y Pm 7), *Prorocentrum gracile* (Pgr), aislado de la Bahía del Callao- Perú.

Cada cepa fue secuenciada con los cebadores D1R/ D2C aproximadamente en el par de base 420 pb obtenido desde el final de 5' y el extremo 3' del fragmento genómico. Se confirmó los resultados obtenidos con el gen LSU del fragmento parcial ITS 1-5.8 rRNA y el ITS2 sirvió para comparar las cepas *Prorocentrum minimum* (2811), Pm5 y *Prorocentrum gracile* (Pgr). Las secuencias del NCBI

con el número de acceso utilizadas fueron; *Prorocentrum minimum* DQ884421, *Prorocentrum minimum* EF517247.1, *Prorocentrum minimum* DQ054539.1, *Prorocentrum minimum* AF463409.2, *Prorocentrum minimum* AF512886.1, *Prorocentrum minimum* AF463409.2, *Prorocentrum minimum* FJ939573.1, *Prorocentrum minimum* DQ662402.1, *Prorocentrum minimum* AY863005.1, *Prorocentrum gracile* EF517251.1, *Prorocentrum gracile* EF517249.1, *Prorocentrum gracile* EF517248.1 *Prorocentrum gracile* AY259165.1

Tabla 2. Cultivos de *Prorocentrum* utilizadas para el secuenciamiento en el presente estudio

Especie	Cultivo	Localidad	Coordenadas	Región	Océano	Mar	Fecha	T°	Institución
<i>P. minimum</i>	2811	New Pass Bridge, Florida USA	27.33N 82.583W	América del Norte	Atlántico Norte	Golfo de México	24/08/2004	18-22	1
<i>P. minimum</i>	Pm5	Callao, Perú	S12°03'57.8", WO 77°09'30.4"	América del Sur	Pacífico Sur	Bahía del Callao	05/04/2005	21	2
<i>P. minimum</i>	Pm7	Callao, Perú	S12°03'57.8", WO 77°09'30.4"	América del Sur	Pacífico Sur	Bahía del Callao	06/08/2007	19	2
<i>P. gracile</i>	Pgr	Callao, Perú	S12°03'57.9", WO 77°09'30.5"	América del Sur	Pacífico Sur	Bahía del Callao	05/03/2011	18	2

1. Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP).
2. Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

4.9.2. Alineamiento de Secuencias y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas de las microalgas 2811, Pm5, y Pgr fueron alineadas y se construyeron árboles filogenéticos para establecer su identificación y localización filogenética, confirmándose la especie como *Prorocentrum minimum* (Fig. 26 y 27).

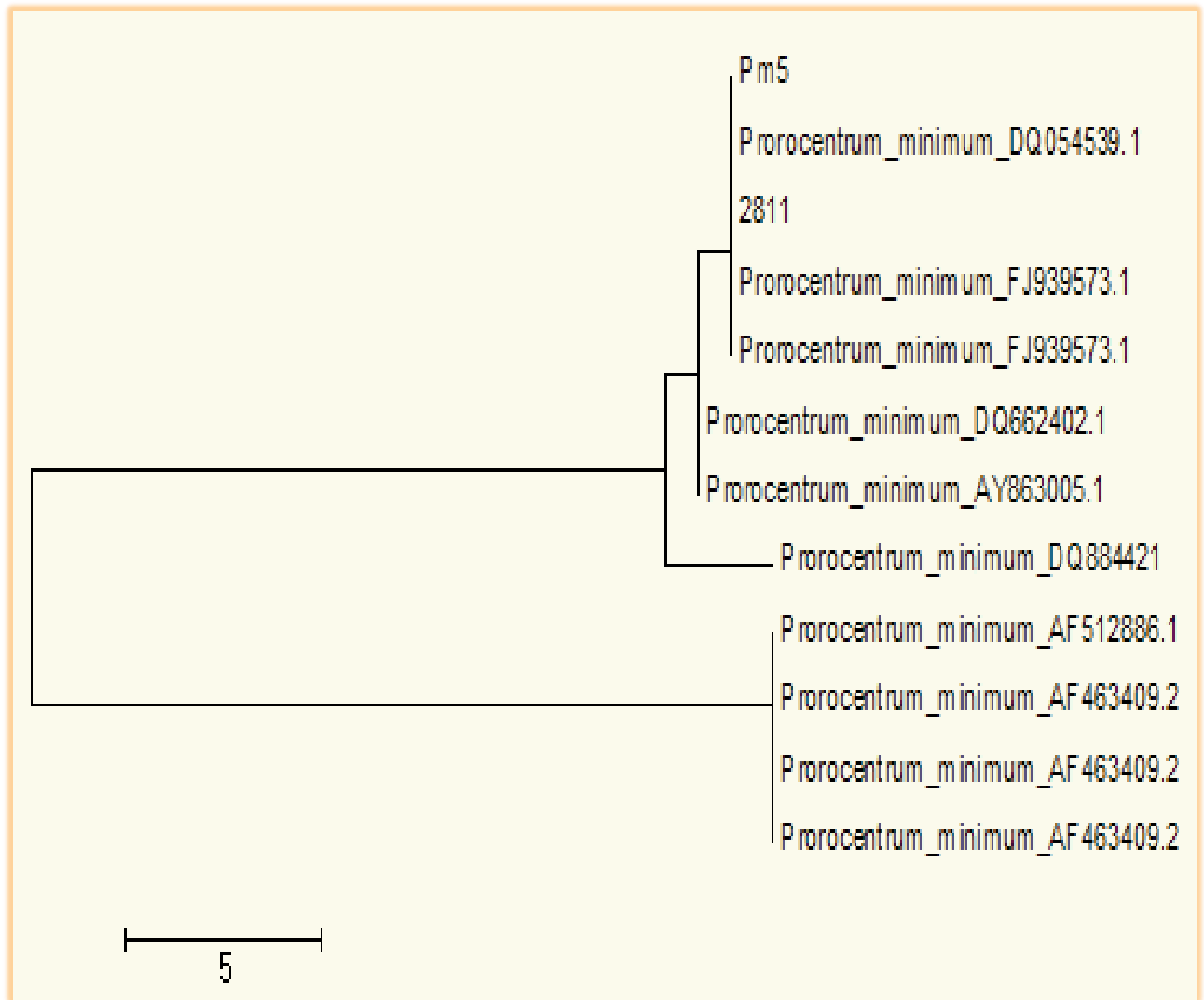


Figura 26. Arbol Filogenético Molecular por el método del árbol Maximum likelihood, basado en el análisis LSU rRNA de *Prorocentrum minimum*

4.10. Evaluación de la capacidad toxigénica de *Prorocentrum minimum*

No se detectó presencia de Ácido Okadaico en las muestras analizadas de la microalga *Prorocentrum minimum*

4.11. Resultados del análisis del bioensayo en ratón.

Los síntomas de los tres ratones después del inóculo de la microalga fueron; cabizbajos, con malestar, pelo erizado y postración. Después de 72 horas de observación no hubo muerte de los roedores. (Figura 27)

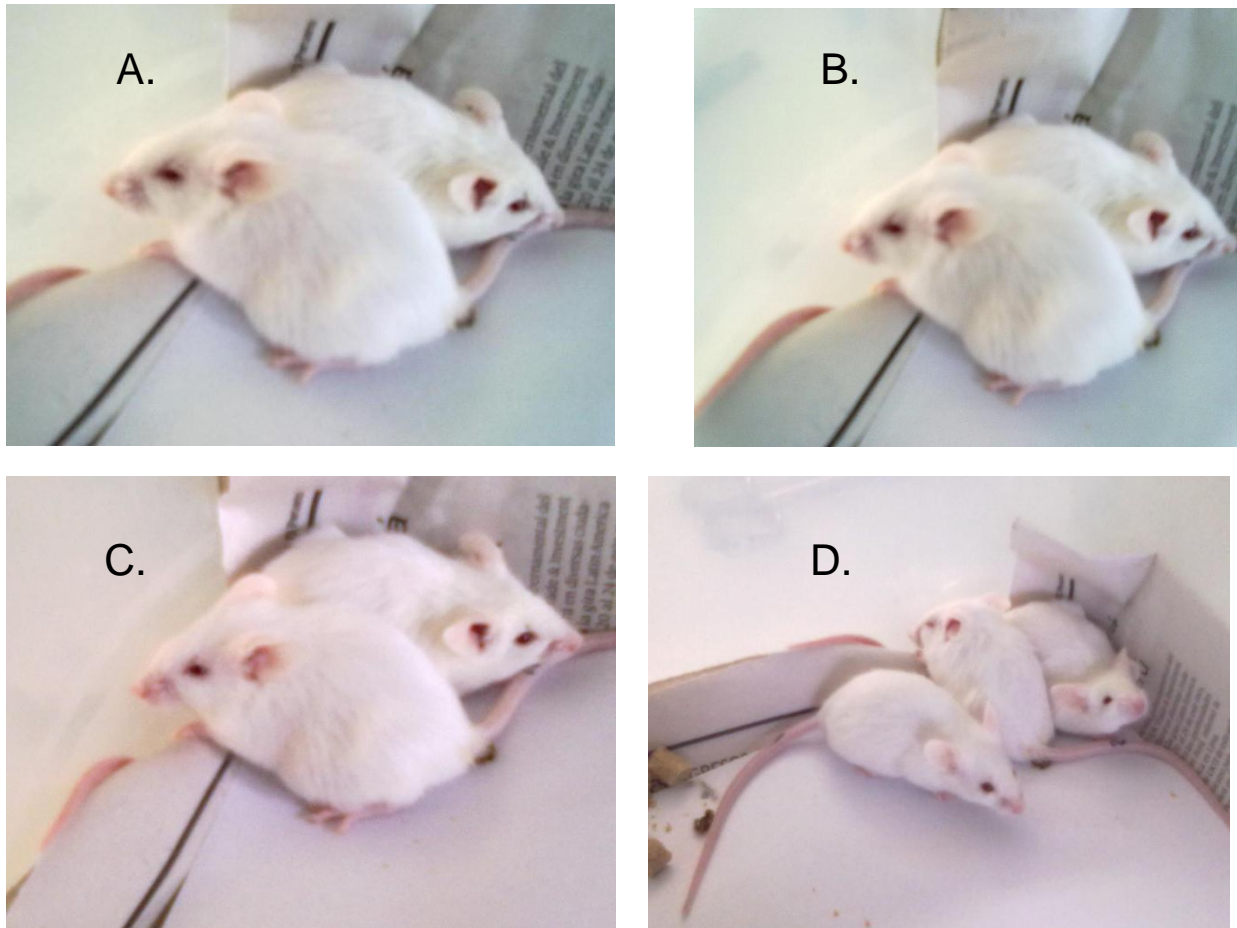


Figura 28. Bioensayo de Ratón: A, B, C y D se observó el pelo erizado, cabizbajo y con postración. D. pasado 72 horas no murieron pero uno de los ratones seguía con malestar.

5. DISCUSIÓN

La Provincia Constitucional del Callao, está situada en el centro oeste del Perú, abarca la costa central del litoral peruano. La Bahía del Callao pertenece a esta provincia siendo la más extensa de esta parte del continente y se considera la llave de la capital de la república debido a su importante puerto marítimo. El puerto del Callao se encuentra localizado a los 12°LS y posee una gran importancia pesquera en el Perú. Es considerada un área altamente contaminada Guillen et al. (1986) debido a la fuerte actividad antropogénica registrada bajo la forma de descargas de desechos urbanos e industriales que son introducidos en el ecosistema marino. Estudios realizados en la zona revelan valores altos de nutrientes, lo que nos indica una fuerte actividad biológica y niveles altos de contaminación llegando a una eutrofización. Dichos valores altos de nutrientes van a favorecer notablemente el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica, siendo algunas veces perjudicial para el ecosistema marino debido a la formación de mareas rojas Sánchez et al. (1996). Estas características parecen ser óptimas para el crecimiento de las floraciones algales nocivas. Siendo estas condiciones ambientales propicias como es el caso de *Prorocentrum minimum*. Durante la última década los estudios de las especies bentónicas de *Prorocentrum* han aumentado debido a que se ha demostrado que algunas especies son tóxicas Grzebyk et al. (1997).

En el Perú las especies de *Prorocentrum* deben ser consideradas como especies criptogénica (de origen desconocido) ya que tiene una distribución mundial y es causante de las mareas rojas en diferentes regiones del mundo como lo afirma Heil et al. (2005). La toma de muestra fue de importancia en la investigación porque nos ayudó a determinar el fitoplancton presente en la muestra de agua de mar, la frecuencia del muestreo se realizó en 2 fechas distintas en diferentes años, el 31 de marzo y el 28 de Abril del año 2005, un mes y medio después del evento de marea roja de *Prorocentrum minimum* en la bahía de Pisco y el día 06 agosto del 2007. Los muestreos coincidieron en la época de otoño- invierno,

presentaron salinidad de 37 ppm y una temperatura de 17 °C. La acentuada degradación de las condiciones ambientales de la zona marino costera, asociada con procesos de eutrofización (enriquecimiento del agua de mar por nutrientes), contaminación por la actividad antropogénica y con los cambios climáticos globales, favorecen el incremento del número de episodios algales nocivos con impactos drásticos sobre los recursos pesqueros, turísticos y la salud pública (GEOHAB, 2005).

La comunidad fitoplanctónica, se considera un indicador importante de estrés ambiental ya que puede manifestar, a nivel comunitario, cambios en su estructura y a nivel específico, la presencia o desaparición de especies sensibles y/o el desarrollo de especies nocivas y/o tóxicas, tal como lo describe Bonilla & Conde (2000) y Loza et al. (2003).

El volumen filtrado fue de 25 litros con una red de fitoplancton de 20 µm de apertura de malla; tamiz de 100-150 µm con aro de sujeción y colector en forma de frasco de vidrio al final en la red

Los resultados obtenidos en la curva de crecimiento de *Prorocentrum minimum*, se debió a la clonación de células microalgales en el medio F2 Guillard, que es un medio de enriquecimiento ideal para todas las microalgas proporcionándoles nutrientes necesarios para su crecimiento, guardando relación a lo descrito por Guillard (1975) y Navarro (1990). Los cultivos microalgales a pesar de los contratiempos de baja temperatura en el ambiente por la noche mantuvieron un desarrollo favorable de irradiación, fotoperiodo de luz en el medio de cultivo.

La extracción permitió obtener la mayor cantidad de ADN de las células provenientes del cultivo fresco de *Prorocentrum minimum* y de *Prorocentrum gracile*. Se consideró para la extracción de ADN el método de Doyle and Doyle (1990), en el que se realizó algunas modificaciones en la técnica de lavado lo cual nos resultó óptimo ya que visualizamos lo extraído en el gel de agarosa, apreciando suficiente cantidad y calidad en las bandas de ADN.

El resultado de la PCR, se obtuvo por las combinaciones de cebadores D1R/ D2C y Perk ITS- S y el Perk ITS- A (para los cultivos Pm5 y Pgr) se confirmó que estas especies pertenecen a la familias *Prorocentrales* y que mantienen regiones conservadas genéticamente. Ordas et al (2004) realizó una investigación con cepas de microalgas españolas para ver cuál de las microalgas presentaba toxina y probar la variabilidad genética entre ellas utilizando espaciadores inter ITS1 – ITS2 del gen de rRNA, resultando similar variabilidad entre las microalgas pero se detectaron algunas diferencias moleculares.

El árbol basado en el análisis LSU rRNA de *Prorocentrum minimum*, propone que las especies están relacionadas entre sí, donde incluye a Pm5 y el Pm2811, considerado como un complejo de la especie debido a su semejanza, tal como lo comenta Cohen-Fernández et al. (2010).

La extracción de toxinas mediante la técnica de Yasumoto *et al.*, (1984), se le realizó modificaciones, ya que se concentró la mayor cantidad de microalgas y a partir de ello se trabajó el protocolo de determinación indirecta del posible efecto de la toxina, resultó negativo pudiendo ser uno de los motivos la concentración microalgal muy baja de 10^4 cel. mL⁻¹ y el 1.5 L de volumen filtrados a esa densidad no fue la suficiente.

Muchos investigadores manifiestan que la mayoría de clones del cultivo de *Prorocentrum minimum* no son tóxicos. En sus investigaciones Grzebyk *et al.*, (1997) y Denardou-Queneherve et al. (1999), relacionaron ciertas toxinas a los clones aislados de Japón. Los ambientes costeros confirmaron el riesgo potencial para la salud humana asociados con *Prorocentrum minimum* y con las ocurrencias de los *Bloom* de esta especie. Hay una disyuntiva respecto con los componentes neurotóxicos aislados de los cultivos axénicos de los clones de *Prorocentrum minimum* aislados de las costas mediterráneas de Francia. Para Grzebyk et al. (1997), describe componentes hepatotóxicos completamente

diferente de los clones japoneses. El Resultado a 72 horas de la inoculación del extracto de la microalga *Prorocentrum minimum* en los ratón fueron de malestar, ratones cabizbajos, pelo erizado y postración, no se observó muerte de los roedores, resultando diferente a lo descrito por Denardou- Queneherve et al. (1999) y Grzebyk et al. (1997), donde los componentes tóxicos fueron solubles en agua y los bloqueadores de los canales de sodio produjeron síntomas neurotóxicos en los ratones como convulsiones, espasmos con palpitations pronunciadas y la muerte en cuestiones de minutos.

El presente estudio permitió el aislamiento, identificación clonación y análisis molecular de *Prorocentrum minimum* de la bahía del Callao, siendo esta primera tarea motivo de investigación de esta especie cosmopolita en nuestro país.

6. IMPACTO.

Uno de los principales inconvenientes en la sostenibilidad de la acuicultura es la presencia de mareas rojas por que pueden producir importantes impactos en los recursos marinos y provocar pérdidas económicas. Para hacer frente a este problema con esta tesis se contribuirá a brindar información necesaria para la filogenia molecular de la diversidad taxonómica de especie *Prorocentrum minimum* de la Familia Procentrales presentes en el mar peruano, que podrian derivar en un evento posible de floraciones algales.

El conocimiento molecular de la identificación de las especies de mareas rojas en la acuicultura no solo es de interés académico para la comunidad científica, es también de interés biotecnológico, porque el ácido Okadaico y la DTX1 extraídos de las diversas especies del Orden Procentrales y Dinophysiales son potentes inhibidores de la protein-fosfatasa, enzimas que intervienen en el control de proceso biológicos tales como la división y el crecimiento celular, organización estructural, metabolismo, control hormonal etc. Boudreau et al. (2004).

Existen un gran número de enfermedades que están relacionadas con desajustes en el equilibrio de la actividad de fosforilación-defosforilación y dado que la Protein fosfatas tipo 1 (PP1) y la protein fosfatasa tipo 2 (PP2A) regulan el 90% de las reacciones de las proteínas fosfatasas (PSPs), los inhibidores selectivos de las mismas se han convertido en importantes herramientas farmacológicas para estudiar los procesos celulares regulados por estas proteínas. Entre otros se encuentran el ciclo celular, la muerte celular por apoptosis (muerte celular que usan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas) , el desarrollo de tumores, la contracción del músculo liso y ciertos desórdenes neurológicos, metabólicos y respiratorios. Por lo tanto, gracias a las biotoxinas existentes en las Floraciones algales se puede obtener componentes químico de interes comercial a futuro, siendo sus principales usuarios el sector farmacéutico.

7. CONCLUSIONES

1. Se logró el aislamiento e identificación de *Prorocentrum minimum* de la bahía del Callao.
2. Se logró clonar células de *Prorocentrum minimum* a partir de cultivos unialgales
3. Se logró construir árboles a nivel molecular para establecer su identificación y localización filogenética, confirmándose la especie Pm5 como *Prorocentrum minimum* y Pg como *Prorocentrum gracile* aislada de la bahía del Callao.

8. RECOMENDACIONES

- ✓ Se requiere más estudios para estas las dos especies, *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum gracile*, como también diferentes técnicas a nivel molecular para evaluar la presencia de diversas poblaciones microalgales presentes en el mar peruano.
- ✓ Se demanda de mayor concentración de la solución liposoluble del extracto la microalga *Prorocentrum minimum* para futuro análisis que pueda alcanzar la determinación indirecta del posible efecto de la toxina.
- ✓ Se solicita estudios ambientales sobre los nutrientes que favorecen notablemente el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica, por ser perjudicial para el ecosistema marino debido al impacto acuícola que producen la formación de mareas rojas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aidar, E., Pereira, S., Sousa, E. & Brasil-Lima, G. (2002). Testes detoxicida de con microalgas. En: *Métodos em Ecotoxicología marinha: Áplicacoes no Brasil*.
2. Andersen, H.J., L. Schluter & G.A. Ertebjerg. (2006). Coastal Eutrophication: recent developments in definitions and implications for monitoring strategies. *J. Plank Res.* 28 (7): 621-628
3. Andersen, R.A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic California, USA.
4. Anderson, D.M. (1989). Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. In: *Red tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Proc. 1st Int. Symp. On Red Tides. Elsevier. 11-16 pp.
5. Álvarez, M. J., Aguilera, A., Franco, J. M., Fraga, S. & González, S. G. (1997). Efecto de diferentes Medios de Cultivo Sobre el Crecimiento de Dinoflagelados. *En: VI Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Centro Oceanográfico Vigo*. España. 271-280 p.
6. Bodreau, R.T., Hoskin, D.W. & Lin, T.J. (2004). Phosphatase inhibition potentiates IL-6 production by mast cells in response to Fcepsilon RI-mediated activation: involvement of p38 MAPK. *J Leukoc Biol.*; 76:1075–1081.
7. Bonilla, S., & Conde. D. (2000). El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las lagunas costeras de la Reserva Baños del Este. *Series Documentos de Trabajo. Probides, UNESCO*, 31, 63-70.

8. Brown, M.R., Jeffrey, S.W., VOLKMAN, J.K. & Dunstan G.A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquacul.* 151: 315-331.
9. Cabello, R., Tam, J. & Jacinto, M. E. (2002). Procesos naturales y antropogénicos asociados al evento de mortalidad de conchas de abanico ocurrido en la bahía de Paracas (Pisco, Perú) en junio del 2000. *Rev. peru. biol.* 9(2), 49 – 65.
10. Camino, M., Fraga, S., Franco, J., Ordas, A. & Figueras, A. (2004). Toxin and molecular analysis of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from Galicia (NW Spain) and Andalucía (S Spain). *J of Plank Res.* Vol. 26(3), 341-349.
11. Cortés-Altamirano, R. & Sierra-Beltrán., A. (2003). Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rathymum* (dinophyceae). *J. Phycol.* 39, 221–225.
12. Cohen-Fernández, E., Pedroche, F., Rodríguez,M., Álvarez,S. & Meave del Castillo,E.(2010). Molecular phylogeny of *Prorocentrum* (Dinoflagellata) from the Pacific Coast of Mexico based on the parsimony analysis of fragments of LSUrDNA and SSUrDNA. *J. Plant Physio and Biochem* 2(3), 29-37.
13. Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453-508.
14. Chomérat, N., Sellos, N., Zentz, F. & Nezan, E. (2010). Morphology and Molecular Phylogeny of *Prorocentrum consutum* sp. Nov. (Dinophyceae), a new benthic dinoflagellate from south Brittany & Northwestern France). *J. Phycol.* 46,183-194.

15. Daranas, A.H., Norte, M. & Fernandez, J. (2001). Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101–1132
16. De Lara-Isassi, G., Rodríguez-Palacio, M., Álvarez-Hernández., S. & Lozano Ramírez, C. (2006 en prensa). Tasas de crecimiento de dinoflagelados del género *Ceratium* Schrank, 1793, en tres medios de cultivo conocidos y uno alternativo. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*
17. Denardou-Queneherve, D., Grzebyk, D., Pouchus, Y.F., Sauviat, M.P., Alliot, E., Biard, J.F., Berland, B. & Verbist, J.F., (1999). Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. *Toxicon* 37, 1711–1719.
18. Dodge, J. D. (1975). The Prorocentrales (Dinophyceae). II. Revision of the taxonomy with in the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 71, 103-125.
19. Doyle, J. & Doyle, L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 2, 13-15.
20. Douding, L., Goebelb, J., Qic, Y., Zoud, J., Hand, X., Gaoe, Y. & Li, Y. (2005). Morphological and genetic study of *Prorocentrum donghaiense* Lu from the East China Sea, and comparison with some related *Prorocentrum* species. *Harmful Algae*, 4, 493–505
21. Edvardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Kjetill, S., Medlin, L., Dahl, E., Brubak, S. & Paasche, E. (2003). Genetic variability and molecular phylogeny of dinophysis species (dinophyceae) from norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.* 39, 395–408.
22. Faust, M. A. & Gullledge, R. A. (2002). Identifying harmful marine dinoflagellates. Contributions from the United States National Herbarium,

Department of Systematic Biology – Botany, *National Museum of Natural History, Smithsonian Institution*. 42, 1-141.

23. Faust, M.A., J. Larsen & O. Moestrup. (1999). ICES identification leaflet for plankton. (Ed.). Natural Environment Research Council Plymouth Marine Laboratory. Leaflet No. 84: 28 pp.
24. Fensome, R. A., Taylor, F. J. R., Norris, G., Sarjeant, W. A. S., Wharton, D.I. & Williams, G. L. (1993.a) classification of fossil and living dinoflagellates. *Micropaleontology Press. Special Publication*, 7, 1-351.
25. Fensome, R. A., Saldarriaga, J. F. & Taylor, F. J. (1999). Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. *Grana* 38, 66-80.
26. Ferrario, M.E., Sar, E.A. & Sala, S.E. (1995) Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds) Manual de métodos ficológicos: 1-23. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
27. Fernández, J.J., Souto, M.L., Trujillo, M.M. & Norte, M. (2002). Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr. Medic Chem.* 9, 229-262.
28. Garduño-Solórzano, G., Rodríguez-Palacio, M. C., Martínez-García, M., Quintanar-Zúñiga, R. E., Lozano-Ramírez, C., Campos-Contreras, J. E. & Monsalvo-Reyes, A. C. (2011). Cultivos de microalgas del Lago de Catemaco, Veracruz. *Rev Latinoam Biotec Amb Algal* 2(2), 67-80.
29. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms. GEOHAB (2005) An International Programme Sponsored by The Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) and The Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO. Pitcher, G., Moita, T.,

Trainer, V. Kudela, R., Figueiras, P., & Probyn, T. (Eds.) IOC and SCOR, Paris and Baltimore.82.

30. Grzebyk, D., Denardou, A., Berlan, B. & Pouchus, Y. (1997). Evidence of a new toxic in the red-tire dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. plank.*19 (8), 111-1124.
31. Grzebyk, D; Sako, Y; Berland, B. (1998). Phylogenetic analysis of nine species *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S Ribosomal DNA sequences, morphological comparisons and descriptions of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *J. Phycol*, 34, 1055-1068.
32. Guillard, R.L. (1973). Division rates. In Stein, J. R. (ed) *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Treatment*. University Press, Cambridge, London, pp. 128.
33. Guillar, R. (1975). Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. En *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Smith, W. & Chanley, M. (eds). *Plenum. Publ. Co.* New York.29-60.
34. Guillen, O., Aquino, R. & Jacinto, M. (1986). Distribución de trazas de metales en el puerto del Callao. *Bol. Inst. Mar del Perú-G OEA* 10(8): 188-210.
35. González, M. A., Parra, O. & Cifuentes, A. S. (1995). Técnicas de Cultivo de Microalgas en Laboratorio. En: K. Alveal; M. E. Ferrario; E.C. Oliveira y E. Stein (Eds.). *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. Chile. pp. 219-249.
36. Heil, C.A., Glibert, P.M. & Fan, C., (2005). *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae* 4, 449–470.

37. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids.Symp. Ser.* 41:95-98. About BioEdit version 7.0.9.0. (6/27/07).
38. Hallegraeff, G. M. & Lucas, I. A. N. (1988). The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *J. Phycol* 27, 25-42.
39. Hoff, F. & Snell, T. (2001). Plankton culture manual. Florida Aqua Farm, Inc. E.U.A. 1-162.
40. Hoppenrath, M., Chomérat, N., Horiguchi, T., Schweikert, M., Nagahama, Y., Murray, S. (2013). Taxonomy and phylogeny of the benthic *Prorocentrum* species (Dinophyceae). A proposal and review. *Harmful Algae* 875,1-28.
41. Kotob, S. I., McLaughlin, S. M., Van Berkum, P. & Faisal, M. (1999) Discrimination between two *Perkinsus* spp. isolated from the softshell clam, *Mya arenaria*, by sequence analysis of two internal transcribed spacer regions and the 5.8S ribosomal RNA gene. *J. Parasit*, 199, 363–368.
42. Grzebyk, D & Yoshihiko, S. (1988). Phylogenetic analysis of nine species of *prorocentrum* (dinophyceae) inferred from 18s ribosomal dna sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *J. Phycol.* 34, 1055–1068.
43. Loza, S., Barrios, K., Miravet. M. E., Lugioyo, M., Perigó, E., & Sánchez, M. (2003). Respuesta del Fitoplancton ante el estrés ambiental en los ecosistemas arrecifales. Protección del Hombre y la Naturaleza. *Cátedra de Educación Ambiental.* 8, 21-24.

44. Lawrence, J.E., Baude, A. G., Quilliam, M. A. & Cembella, A.D.(2000). Colonization and growth of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and associated fouling macroalgae on mussels in suspended culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 147-154.
45. Margalef, R. (1986). *Ecología*. Ed. Omega. España. 950 pp.
46. McCluskey, A., Sim A. T. R. & Sakoff, J. A. (2002a) Serine-Threonine Protein Phosphatase, Inhibitors: Development of Potential Therapeutic Strategies. *J. Med. Chem.* 45(6), 1151-1175.
47. Murray, S. M. F., Jorgensen, S., Ho, Y. W. D., Patterson, J & Jermiin, L. S. (2005). Improving the analysis of Dinoflagellate phylogeny based on rDNA. *Protist*, 156, 269-286.
48. Murakami, Y., Oshima, Y & Yasumoto, T. (1982): Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 48: 69-72.
49. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acceso: 15/08/2011.
50. Nascimento, S., Duncan, A. & Morris, S. (2005). Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicon* 45, 633–649.
51. Navarro, M. (1990). Características de los cultivos a pequeña escala de dinoflagelados marinos, su evaluación para la producción primaria en la acuicultura. Tesis universidad Complutense de Madrid. 197pp.
52. Nyholm, N. & Källqvist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18: 679-703.

53. Ordas, C., Fraga, S., Franco, J., Ordas, M. & Figueras A. (2004) Toxin and molecular analysis of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from Galicia (NW Spain) and Andalucía (S Spain). *J. plank res.*, 26:3. 341-349.
54. Paniagua, J. M., Bucle, L. F., Granados, C. & Loya, D. H. (1988). Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Segunda Edición. Voltolina, D. L., L. F. Bucle y E. R. Morales (Eds.). CICESE. Acuicultura. Ensenada Baja California, México. 67 pp.
55. Pavillard, J. (1916). Recherche sur les Pteridiniens du Golfe de Lion. Trav. Inst. bot. Univ. Montpellier. Series Mixte, 4:70-99.
56. Paz, B., Daranas, A., Cruz, P., Franco, J., Napolitano, J., Norte, M & Hernandez, J. (2008). Identificación por LC-MS de derivados del Ácido Okadaico en cultivos de *Prorocentrum belizeanum*. Acta IX Reunión Ibérica sobre Fitoplancton Tóxico y Biotoxinas. Gilabert, J. (Ed). *Cartagena* 7 -10 Mayo 2007.
57. Pertola, S. (2006). Diffusive and ship-mediated spread of dinoflagellates in the Baltic Sea with *Prorocentrum minimum* as a special case. Finnish Institute of Marine Research, Finland. Contributions No. 11.
58. Reynolds, C.S. (1983). Ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge, Cambridge University Press.
59. Prósperi, C. 2000. Uso de algas como indicadores de contaminación acuática. *Rev. Agua*, 128: 61 – 63.
60. Sánchez, S., Delgado, E., Villanueva, P., Chang, F., Bernales, A & Jacobo, N. (2007). Informe Anual. Área Fitoplancton y Producción Primaria. Instituto del Mar del Perú. 19-30.

61. Sánchez, S. & Delgado, E. (2007). Mareas rojas en el área del Callao (12°S) (1980-1985). Informe progresivo. Instituto del Mar del Perú. 6-8.
62. Sar, E., Ferrario, M. & Reguera, B. (2002). *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Inst. Esp. Oceanográfico Vigo (Spain), 311 pp. (ISBN 84-95877-01-5). A HAB Manual written by South American experts and freely distributed through the IOC Centers in Copenhagen and Vigo.
63. Scholin, C. A. & Anderson, D. M. (1994). Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) I. RFLP analysis of SSU rRNA genes. *J. Phycol.*30, 744-754.
64. Sonsoles, G., Aguilera, A., Fenoy, C., Aldujar, S., Lopez, V. & Costas, E. (1998). Ciclo de división celular y determinación de los puntos de restricción en dinoflagelados marinos. *Biol Mar y Ocea.*33,2, 265-275.
65. Garduño-Solórzano G., Rodríguez-Palacio M.C., Martínez-García M. *et al.* (2011). *Rev Latin. Biotec Amb Algal* 2(2):67-80.
66. Schiller, J. (1933). Dinoflagellata. In: *Rabenhorsts Krypt. Flora*, 10: 1-617.
67. Schütt, F. (1895). Die Peridineen der Plankton Expedition. *Ergeb. Plankton Expedition der Humboldt-Stiftung*, 4: 1-170.
68. Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Egen D.V., Clardy J., Gopichand & Schmitz F.J. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*;103: 2469–2471.
69. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G. & Nei, M; Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum

Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol and Evol.* 28, 2731-2739.

70. Terlizzi, D. E., Ferrier, M. D., Armbruster, E. A. & Anlauf, K. A. (2002). Inhibition of dinoflagellate growth by extracts of barley straw (*Hordeum vulgare*). *J. Appl. Phycol.*, 14:275-280.
71. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 11, 4673-80.
72. Voltolina, D., Nieves, M., Navarro, G., Oliva, T. y Peraza, D. (1998). The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacul Eng* 19 (1): 7-15.
73. Yasumoto, T. & M. Murata, (1993). Marine Toxins. *Chem. Rev.* 93: 1897-1909.
74. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G. & Clardy, J. (1985). *Diarrhetic Shellfish Toxins. Tetrahedron*, 41, 1019-1025.
75. Zhang Cheng, H., Battacharya, D & Lin, S. (2005). Phylogeny of Dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol*, 41,411-420.

10. ANEXOS

ANEXO 1. MEDIO F2 MODIFICADO (GUILLARD, 1973) PARA CULTIVO DE MICROALGAS MARINAS

Compuesto	gramos por Litro
Reactivo 1 (R1) Nitrato y Fosfato	
KNO ₃	75.00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	5.65g
Reactivo 2(R2) Traza de Metales (Quelantes)	
EDTANa ₂	4.360g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.150g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.010g
ZnSo ₄ ·7H ₂ O	0.022g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.180g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.006g
Reactivo 3 (R3) Mezcla de Vitaminas	
Cyanocobalamina	0.002g
Tiamina HCl	0.100g
Biotina	0.100g

ANEXO2: PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN MICROALGAL Doyle & Doyle. (1980)

1. Se concentró la mayor cantidad de pelet de microalga *P. minimum* a la mitad del microtubo de 1,5 µL.
2. Se le agregó nitrógeno líquido al microtubo de la muestra de microalga.
3. Se trabajó con 700 µL de CTAB +β-mercaptoetanol buffer y se homogenizó
4. Se adicionó 4 µL de RNAsa (10 mg/mL) por tubo de extracción.
5. Los tubos se colocó a 65 °C por 45 minutos en baño maría, mezclando de 2-3 veces durante la incubación.
6. Se adicionó un volumen de 700 µL de cloroformo alcohol -isoamilico (24:1), invertir suavemente durante 10 minutos (o toda la noche).
7. Se centrifugó por 10 minutos a 14 000 rpm en la microcentrífuga.
8. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo, evitando recoger la interfase.
9. Se adicionó un volumen de 700 µL de cloroformo isoamil alcohol (24:1) nuevamente y se invirtió varias veces los tubos durante 5 minutos para asegurar la muestra.
10. Los tubos microtubos se centrifugó por 5 minutos a 14 000rpm.
11. Se recuperó el sobrenadante (no la interfase), del CTAB 10x se le adicionó 50 µL más 700 µL cloroformo alcohol isoamilico helado.
12. Se dejó reposar a -20 °C por una hora para permitir precipitar el ADN.
13. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos.

14. Se vertió el Isopropanol. Note la formación de bolita.
15. Se lavó con 500 μ L isopropanol frío, el pelet se invirtió de un lado otro varias veces.
16. Se centrifugó a 14 000 rpm por 20 minutos.
17. Se vertió el isopropanol bajo una campana de extracción y sobre un papel toalla se colocó el microtubo con la boca invertido para eliminar la mayor cantidad de líquido posible.
18. Se colocó los tubos abiertos bajo la campana de extracción durante 3horas.
19. Se volvió a resuspender los tubos con 150 μ L de Tris EDTA buffer (TE), pipeteando para disolver el ADN, evitando que no rebasen el microtubo.

Se volvió a colocar los tubos a 65°C a baño maría, durante 10 minutos para disolver completamente el ADN.

ANEXO 3: PROTOCOLO PARA IDENTIFICACIÓN DE TOXINAS DSP O ASP (Adaptación para Microalgas) Yasumoto *et al.* (1984).

En el caso de observar síntomas de PSP o ASP en los ratones, se seguirá el siguiente procedimiento que se describe a continuación.

Extracción:

1. Muestreo de fitoplancton identificación de especies sospechosas
2. Aislamiento de microalgas sospechosas
3. Establecimiento de cultivo monoalgal
4. Producción masiva de cultivo monoalgal
5. Filtra la biomasa (membrana filtrante)
6. Añadir 50 mL de acetona y homogenizar durante 2 -3 min. Dejar sedimentar la fase sólida.
7. Filtrar el sobrenadante a través de papel filtro, recogéndolo en un matraz colector adaptable al rotavapor.
8. Repetir los mismos pasos de extracción dos veces más, utilizando 50 mL de acetona en cada ocasión.
9. Recoger los dos nuevos filtrados en el mismo matraz colector. Evaporar el extracto acetónico final en rotavapor con el baño de agua aprox. 40 ° C (nunca > 45° C). No es necesario evaporar totalmente el agua residual.
10. Añadir al extracto residual un pequeño volumen de agua de manera que el volumen final del extracto sea aprox. 15 mL. Trasvasar el extracto a un embudo de decantación.
11. Arrastrar los restos del residuo que pudieran permanecer en el matraz colector con 50 mL de éter dietílico y combinar este extracto etéreo con el extracto acuoso en el embudo de decantación.
12. Agitar suavemente invirtiendo varias veces el embudo (evitar agitación vigorosa para prevenir la formación de emulsiones).
13. Dejar en reposo para permitir la separación de las dos fases.

14. Separar la fracción acuosa y reservar la fracción etérea. Extraer la fracción acuosa dos veces más con 50 mL de éter dietílico.
15. Combinar las fracciones etéreas y realizar dos lavados adicionales del extracto etéreo con 15 mL de agua.
16. Evaporar el extracto etéreo a sequedad.
17. Combinar las fracciones acuosas y evaporar el extracto hidrosoluble a sequedad.
18. Redisolver los residuos con una solución acuosa de Tween 60 al 1 %, previamente atemperada a aprox. 40 ° C.

ANEXO 4: Bioensayo en ratón:

1. Inocular por vía intraperitoneal 1 mL de la solución a tres ratones de 19-21 g de peso y observar por 24 horas. (Inocular tanto el extracto hidrosoluble como el extracto liposoluble).

Interpretación de resultados:

2. El bioensayo se considera positivo a la presencia de OA, DTXs, PTXs, y YTXs cuando se produce la muerte de al menos 2 de los 3 ratones dentro de las 24 horas.

ANEXO 5: Secuencias obtenidas durante el presente estudio:

a) 2811

AGCTCAGCATGGAAATTGGGCCTTGAATTGTAGTCTGAGATGTATCGCCAA
CGGAGGCGCAGATGTAAGCCTCTTGGAAAGGAGCATCAACGAGGGAGAGT
CCCGTTTGTTCATCTGCAGTCCCCCGTGCAGGCATATTCTAAGAGTCGCGTT
CCTCGGAATTGGAGCGTAAATTGGGTGGTAAATTTTCATCTCAAGCTAAATAT
TGGTTCGAGACCGATAGCAAACCATGAGGGAAAGATGAAAAGGACTTTGAA
AAGAGAGTTAGTGCCTGATGCTGAAAGGGAAGCGAATGGAACCAAGTGTGC
TTGGCAGTGCATGTTGCCTTGTGTGTCAAGCCAGTTCGCGATCGAGGAAAA
CTCCAGGGGCTCGTCTACGGGTGAGTGAATAGCCTTGGCAGAACTCATTT
GCGGACTGTCTTTCGTGTCTGGTT GCGTCCTTGG CCTGGAACCTGG

b) Pm5

AGCTCAGCATGGAAATTGGGCCTTGAATTGTAGTCTGAGATGTATCGCCAA
CGGAGGCGCAGATGTAAGCCTCTTGGAAAGGAGCATCAACGAGGGAGAGT
CCCGTTTGTTCATCTGCAGTCCCCCGTGCAGGCATATTCTAAGAGTCGCGTT
CCTCGGAATTGGAGCGTAAATTGGGTGGTAAATTTTCATCTCAAGCTAAATAT
TGGTTCGAGACCGATAGCAAACCATGAGGGAAAGATGAAAAGGACTTTGAA
AAGAGAGTTAGTGCCTGATGCTGAAAGGGAAGCGAATGGAACCAAGTGTGC
TTGGCAGTGCATGTTGCCTTGTGTGTCAAGCCAGTTCGCGATCGAGGAAAA
CTCCAGGGGCTCGTCTACGGGTGAGTGAATAGCCTTGGCAGAACTCATTT
GCGGACTGTCTTTCGTGTCTGGTTGCGTCCTTGG CCTGGAACCT GG

c) Pgr

AGCTCAGCATGGAAATTGGGCCTTGAATTGTAGTCTGAGATGTATTGCCAC
GGAGGGCGCAGATGTAAGCCTCTTGGAAAAGAGCATCAACGAGGGAGAGTC
CCGTTTGTTCATCTGCAGACCCCCGTGCAGGCGTATTCCAAGAGTCGCGTC
CTCGGAATTGGAGCGTAAATTGGGTGGTAAATTTTCATCTGAAGCTAAATATT
GGTTCGAGACCGATAGCAAACCATGAGGGAAAGGTGAAAAGGACTTTGAA
AGAGAGTTAGTGCCTGATGCTGAAAGGGAAGCGAATGGAACCAAGTGCCT
TGGTGATGGCTTTTGCCTTGTGTGTCATGCCAGTTTTCGTTTCGAGGAAAAC
TCCAGGGGCCTGGCCCCGGCTGGGTGAATGTGTCTGGTAGAACTCATTTCG
CGTACTGTTTTCTGTGTCTGGTTGCCTGTGCCATTTGGGGGGAGA

Se seleccionó una parte de la secuencia obtenida y se buscó otras secuencias similares de *Prorocentrum minimum* y *Prorocentrum gracile* en el GEN BANK, se realizó un fichero el cual se abrió con el programa BIOEDIT.

