



INTERACCIÓN DE *PROROCENTRUM LIMA* CON LAS MACROALGAS *AGAROPHYTON CHILENSIS*, *ULVA SPP.* Y *CODIUM FRAGILE* Y SU EFECTO EN LA ESTIMULACIÓN DEL EPIFITISMO

INTERACTION OF *PROROCENTRUM LIMA* WITH THE MACROALGAE *AGAROPHYTON CHILENSIS*, *ULVA SPP.* AND *CODIUM FRAGILE* AND ITS EFFECT ON THE STIMULATION OF EPIPHYTISM

Roberto Pino Selles

Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Departamento de Biología Marina y Limnología, Panamá.

roberto.pino@up.ac.pa

<https://orcid.org/0000-0002-0782-2459>

Eduardo Uribe

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo, Chile.

euribe@ucn.cl

<https://orcid.org/0000-0003-4913-8038>

Gonzalo Álvarez

Universidad Católica del Norte, Facultad de Ciencias del Mar, Departamento de Acuicultura, Chile.

gmalvarez@unc.cl

<https://orcid.org/0000-0001-5812-1559>

Fecha de recepción: 10 de julio de 2023

Fecha de aceptación: 5 de octubre de 2023

DOI <https://doi.org/10.48204/j.tecno.v26n1.a4650>

RESUMEN

Prorocentrum lima ha presentado frecuentes estudios en el área acuícola, dentro del control de seguridad de moluscos bivalvos. Este dinoflagelado no ha sido cultivado a gran escala en un marco autotrófico con medios de cultivo inorgánicos. El presente estudio busca comprender su carácter epífito-bentónico y sus interacciones con algunas macroalgas para desarrollar nuevas tecnologías y cultivarlo a gran escala. La cepa de *P. lima* se aisló de *Codium fragile*, y en cultivo con medio inorgánico se obtuvo su máxima densidad celular ($20\,317\text{ células mL}^{-1}$) el día 24, con una tasa de crecimiento promedio de $0.0815 \pm 0.2027\text{ div día}^{-1}$. En una simulación de cultivo de mesocosmos en condiciones ambientales naturales y controladas, *P. lima* epifitó a las macroalgas *Agarophyton chilensis*, *Ulva* spp. y *C. fragile*, además de todas las estructuras inertes presentes en los estanques de cultivo. Sin embargo, presentó la mayor

densidad (80 053 células g⁻¹ FW) sobre *A. chilensis*, en condiciones controladas a los 13 días de cultivo. Las macroalgas estarían aportando nutrientes orgánicos específicos que estimularían el crecimiento de *P. lima*.

PALABRAS CLAVES

Prorocentrum lima, mesocosmos, macroalgas, nutrientes.

ABSTRACT

Prorocentrum lima has presented frequent studies in the aquaculture area, within security control of bivalve mollusks. This dinoflagellate has not been cultivated on a large scale in an autotrophic framework with inorganic culture media. The present study seeks to understand its epiphyte-benthic character and its interactions with some macroalgae to develop new technologies and cultivate it on a large scale. The *P. lima* strain was isolated from *Codium fragile*, and in culture with inorganic medium its maximum cell density (20 317 cells mL⁻¹) was obtained on day 24, with an average growth rate of 0.0815 ± 0.2027 div day⁻¹. In a mesocosm culture simulation under natural and controlled environmental conditions, *P. lima* epiphyted the macroalgae *Agarophyton chilensis*, *Ulva* spp. and *C. fragile*, in addition to all the inert structures present in the culture ponds. However, it presented the highest density (80 053 cells g⁻¹ FW) on *A. chilensis*, under controlled conditions at 13 days of culture. The macroalgae would be providing specific organic nutrients that would stimulate the growth of *P. lima*.

KEY WORDS

Prorocentrum lima, mesocosmos, macroalgae, nutrient.

INTRODUCCIÓN

Se han registrado floraciones algales nocivas (FAN) de dinoflagelados epífitos-bentónicos en todos los océanos, especialmente en aguas tropicales y subtropicales asociadas a la presencia de especies correspondientes a los géneros *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Amphidinium* (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Alikasi & Nikolaidis, 2008; David et al., 2018; Faust, 1991; Fukuyo, 1981; Fukuyo, 1995; Karafas et al., 2015; Laza-Martinez et al., 2011; Lewis et al., 2018; Mangialajo et al., 2011; Nagahama et al., 2011; Penna et al., 2005; Tawong et al., 2014). Algunas especies de *Prorocentrum*, que son asociadas a la síntesis de ácido okadaico (AO) y sus Dinophysistoxinas derivadas (DTXs) (Koike et al., 1998; Foden et al., 2005; Murakami et al., 1982; Nascimento et al., 2005; Paz et al., 2006), a menudo constituyen una parte importante de esta comunidad de microalgas (Carlson & Tindall, 1985).

Los programas de vigilancia para el registro de estos dinoflagelados epibentónicos tóxicos son altamente complejos y requieren un procedimiento de obtención de muestras diferente al de los organismos planctónicos causantes de las FAN (Berdalet et al., 2016; GEOHAB, 2012; . El método más utilizado consiste en la recolección de sustratos naturales, para luego separar y cuantificar la comunidad epibentónica presente (Litaker et al., 2010) obteniendo un gran número de muestras (Lobel et al., 1988), lo que dificulta su análisis (Tester et al., 2014).

Los dinoflagelados bentónicos pueden variar en composición y abundancia de células, lo cual depende de variables ambientales como la temperatura, salinidad, luz y nutrientes (Arbeláez et al., 2020 ; Bomber et al.,1988; Carlson & Tindall, 1985; Chinain et al., 1999; Hales et al., 1999; Kibler et al., 2015; Lartigue et al., 2009; Okolodrov et al., 2014; Pearce et al., 2001). Además su ocurrencia y abundancia depende de los sustratos, que pueden estar constituidos por diferentes especies de macroalgas, pastos marinos y corales (Fukuyo, 1981; Irola-Sansores et al., 2018; Lobel et al., 1988; Nakahara et al., 1996; Parsons & Preskitt, 2007; Parsons et al., 2011).

Actualmente, existe poco conocimiento sobre la relación de los dinoflagelados epífitos y los productos extracelulares liberados o exudados por las macroalgas, que pueden incrementar o inhibir su crecimiento (Bomber et al., 1989; Carlson et al., 1984; Rains & Parsons, 2015). Estos compuestos serían utilizados por los dinoflagelados en estrategias nutricionales como la mixotrofia y la heterotrofia, adquiriéndolos no sólo de las aguas circundantes, sino también de los sedimentos o de las superficies sobre las que viven (Litaker et al., 2010).

Algunas especies de dinoflagelados, como *P. lima* (Ehrenberg) F. Stein 1878, son especies epibentónicas que se extienden a aguas templadas no subtropicales (Lassus et al., 2016), tal aguas costeras del centro norte de Chile (Uribe et al., 2018). Durante las últimas décadas, esta especie han sido ampliamente estudiada por su capacidad para producir toxinas diarreicas, incluidas AO, DTX y otros análogos (Marr et al., 1992; Torgensen et al., 2008; Uchida et al., 2014; Lee et al., 2015; Hu et al., 2017; Yang et al., 2017; Wu et al., 2020), aunque la toxicidad de algunos aún es incierta (Hu et al., 2010).

Hasta la fecha, el cultivo masivo de *P. lima* se ha explorado con poco éxito con el uso de medios de cultivo inorgánicos (Bravo et al., 2001; Foden et al., 2005; Heredia-Tapia, 2005; Hou et al., 2015; Nascimento et al., 2016; Nascimento et al., 2005; Praptiwi, 2014; Vale et al., 2009; Vanucci et al., 2010; Varkitzi et al., 2010; Varkitzi et al., 2017;

Gu et al., 2019; Tarazona, 2019; Wang et al., 2015; Wu et al., 2020), enfocado principalmente al estudio de metabolitos tóxicos en laboratorio (Hu et al., 1992; Murakami et al., 1982). Además, se han utilizado dos sistemas para la producción de biomasa de *P. lima*, el cultivo semicontinuo (Varkitzi et al., 2017) y los fotobiorreactores (Wang et al., 2015), ambos casos están restringidos a condiciones autotróficas.

En el norte de Chile, se registra por primera vez un pequeño florecimiento de *P. lima* en Bahía Calderilla, que es una bahía semicerrada de aguas poco profundas, ubicada aproximadamente 5 km al norte de Bahía Inglesa, donde el cultivo industrial de vieiras (*Argopecten purpuratus*) mediante acuicultura, se lleva a cabo. Durante este florecimiento se encontraron células distribuidas en la columna de agua, arena, rocas y macroalgas (*C. fragile*, *A. chilensis* y *Ulva* spp.) del entorno (Uribe et al., 2018). Con *P. lima* se brinda la oportunidad de realizar un estudio para entender la interacción residente-huésped. Por lo tanto, se utilizan sustratos vivos (macroalgas) dentro de un sistema de cultivo de mesocosmos en un ambiente controlado y natural, con el propósito de conocer si los sustratos brindan estimulación o inhibición al crecimiento de *P. lima*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta, aislamiento y cultivo de cepas de *P. lima*

Las muestras biológicas fueron recolectadas en diciembre de 2017 en el sector costero de Bahía Calderilla, Región de Atacama, Chile (27°5'16.25" S y 70°51'21.07" O). Estas muestras tomadas entre 0.2 a 0.4 m de profundidad estuvieron conformadas por las macroalgas dominantes *Agarophyton chilensis*, *Ulva* spp. y *Codium fragile*.

De cada una de ellas se tomaron seis muestras de 300 g, las cuales se pusieron en una bolsa plástica con 500 mL de agua de mar. Posteriormente, se almacenaron en una caja térmica y se trasladaron al Laboratorio de Producción Primaria y Fitoplancton de la Universidad Católica del Norte para su análisis.

En el laboratorio, las muestras fueron agitadas vigorosamente para desprender los epifitos. Posteriormente, el agua fue filtrada utilizando un filtro de 20 µm, para concentrar las microalgas y retener el perifiton. Cada célula microalgal fue observada utilizando un microscopio fotónico invertido Olympus CKX41 en búsqueda del dinoflagelado *P. lima*.

Una vez identificado y con el propósito de establecer cultivos clonales, células de *P. lima* fueron aisladas utilizando la técnica de micropipeteo y lavado consecutivo (Stein, 1973).

Los cultivos fueron desarrollados en placas de cultivo celular estériles de 24 pocillos, por lo que cada célula aislada fue depositada individualmente en un pocillo de 2 mL con 1 mL de medio de cultivo L1 sin silicato (L1-Si) (Guillard & Hargraves, 1993). Cada placa de cultivo se incubó en ambiente controlado a una temperatura de 20 °C, bajo una irradiación de 80 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz/oscuridad).

Luego de 60 días, cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada de 1 000 células mL^{-1} se inocularon por triplicado 30 mL en matraces de vidrio de 250 mL con 100 mL del medio (L1-Si) con densidades celulares entre 500 y 1 000 células mL^{-1} , y se cultivaron en ambiente controlado con las condiciones previamente señaladas, luego se determinó el crecimiento poblacional de los cultivos registrando las densidades celulares cada tres días con una cámara de recuento celular Sedgwick-Rafter y expresando los resultados en células mL^{-1} , siguiendo la metodología establecida por LeGresley & McDermott, 2010.

También de cada cultivo se estimaron las tasas de crecimiento diario experimentales (día^{-1}), según el protocolo señalado por Levasseur et al., (1993).

Adicionalmente, con los valores de las densidades celulares experimentales se estimaron las tasas de crecimiento máximas y las concentraciones celulares máximas, mediante un modelo matemático de crecimiento exponencial con saturación, a partir de la observación inicial (día 0), para estandarizar las tasas de crecimiento y las respectivas curvas de crecimiento de la cepa.

El modelado numérico de los datos de crecimiento se realizó con el método de mínimos cuadrados no lineales del macro "Solver" de la hoja de cálculo de Microsoft Excel y el error asociado a las estimaciones de los parámetros (como intervalos de confianza) se calculó y evaluó mediante la prueba t de Student y se determinó la curva de crecimiento.

Preparación de mesocosmos marino

Se prepararon dos estanques cilíndricos de fibra de vidrio transparente con capacidad de 500 L. El estanque N° 1 para realizar un cultivo mesocosmos en ambiente natural y el N° 2 para un cultivo en ambiente controlado.

A ambos estanques, se les agregó arena limpia de playa, cuatro rocas pequeñas, lisas, planas y limpias de la zona intermareal. Además, se agregaron 400 gramos de cada macroalga (*A. chilensis*, *Ulva* spp. y *C. fragile*), ancladas en la arena. Finalmente, se agregaron 100 L de agua de mar microfiltrada (1 μm) sin nutrientes y se les suministró aire a través de mangueras transparentes y piedras difusoras.

Posteriormente, cada estanque fue inoculado con dos litros de cultivo de la cepa de *P. lima*, alcanzando una densidad de 880 células mL^{-1} para el estanque N° 1 y 651 células mL^{-1} para el estanque N° 2. El estanque N° 1 fue ubicado en un patio de luz exterior con un fotoperiodo estival, donde la irradiancia ($\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$) fue registrada cada hora durante 19 días, con un sensor LiCor Li200X y la temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$), diariamente y cada dos horas durante el día, con un termómetro electrónico Checktemp 1 Hanna. El estanque N° 2 se ubicó en un laboratorio de ambiente controlado a 16 $^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 12 h: 12 h (luz/oscuridad) y con una intensidad de irradiación (I_0) de 80 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$, para los 19 días.

En ambos estanques, cada tres días se recolectaron muestras de 20 g de las tres macroalgas por triplicado. Estas muestras fueron colocadas en bolsas plásticas con 100 mL de agua de mar microfiltrada (0.45 μm) y se agitaron vigorosamente durante tres minutos para separar las células de *P. lima* de la superficie de las algas. Este procedimiento se repitió tres veces con el propósito de asegurar el completo desprendimiento de las células. Posteriormente, se determinó la densidad celular usando una cámara de recuento Sedgwick-Rafter. Para expresar la cantidad de células g^{-1} respecto al peso húmedo (P_m) de cada macroalga, se usó el procedimiento descrito por Reguera et al., (2011).

Los valores obtenidos fueron empleados para generar las curvas de crecimiento en el programa Excel, comparando las densidades celulares obtenidas sobre las tres especies macroalgales. Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza unidireccional ANOVA y realizando la prueba post-hoc de Fisher, para evaluar la variabilidad del máximo número de células de *P. lima* en ambos mesocosmos y entre las mismas macroalgas en los dos estanques. Todos los análisis se desarrollaron utilizando el programa estadístico Statistic 7 (V.7).

RESULTADOS

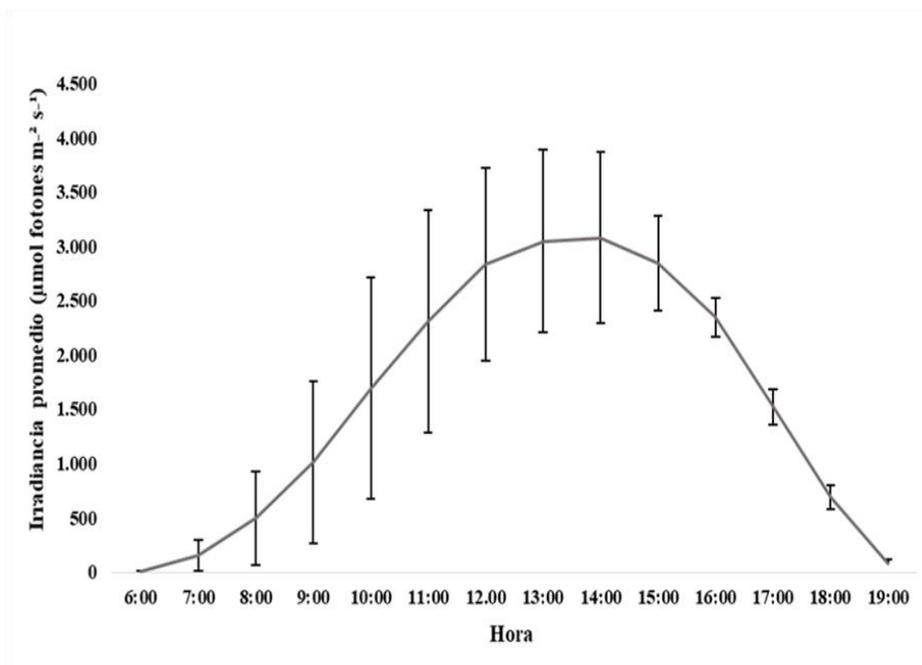
Colecta, aislamiento y cultivo de cepas de *P. lima*

De las tres especies de macroalgas muestreadas, sólo en *C. fragile* se encontraron

células del dinoflagelado *P. lima*. Al cultivarla, esta cepa creció rápidamente, alcanzando la densidad celular máxima experimental de $20\,317 \pm 1\,377$ células mL^{-1} el día 24, mientras que la densidad celular máxima teórica fue de $19\,422 \pm 382$ células mL^{-1} ($R^2 > 0.9723$). Posteriormente la densidad empezó a disminuir, llegando a los valores ($18\,117 \pm 2\,153$ células mL^{-1}) el día 39 (Figura 1).

Figura 1.

Crecimiento experimental (línea con marcadores) y su ajuste de crecimiento teórico (marcadores) de la cepa D008-2 de Prorocentrum lima en 100 mL de LI-Si



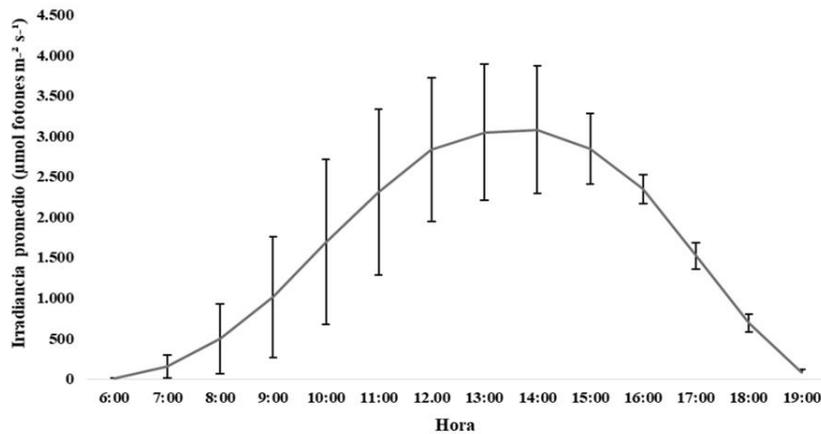
Esta cepa obtuvo una tasa de duplicación experimental de 0.2115 ± 0.2975 día⁻¹ hasta los 15 días de cultivo. Además, su tasa de crecimiento máxima teórica fue de 0.1544 ± 0.0253 día⁻¹.

Mesocosmos marino

El mesocosmos en el patio de luz exterior (ambiente estival) recibió una irradiancia de entre 31 - 420 µmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a las 7:00 horas, alcanzando la irradiación más alta a las 14:00 horas con 1 508 – 3 638 µmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que a las 19:00 horas se obtuvo entre 27 y 741 µmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2), observándose mayor estabilidad en la irradiación después de las 16:00 horas.

Figura 2.

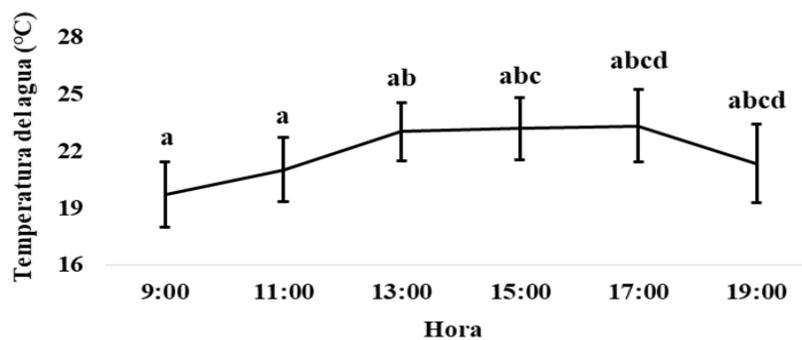
Irradiación promedio diaria en el estanque correspondiente al mesocosmos de verano (febrero a marzo de 2019)



El registro de la temperatura del agua del estanque en los 19 días del estudio presentó durante el día una temperatura promedio diaria de 21.9 ± 1.4 °C, estabilizándose entre las 13 y 17 horas con variaciones promedio entre 23.0 y 23.3 °C (Figura 3.). Esta temperatura estuvo por debajo de 21.3 ± 2.0 °C en las noches y luego del amanecer volvía a aumentar. El máximo promedio obtenido fue de 23.5 ± 0.7 °C, mientras que el mínimo fue de 19.8 ± 1.3 °C.

Figura 3.

Temperatura promedio diaria del agua en el estanque mesocosmos en condiciones naturales, durante febrero y marzo de 2019



En este estanque con ambiente estival la mayor densidad celular de *P. lima* correspondiente a $30\,267 \pm 2\,203$ células g^{-1} Pm (peso húmedo) se registró el día 16 sobre *A. chilensis*. Las máximas densidades sobre *A. chilensis* durante el estudio fueron significativamente mayores a las de las otras dos macroalgas ($p < 0.05$). Sobre *C. fragile* la máxima densidad celular correspondiente a $17\,700 \pm 2\,100$ células g^{-1} Pm fue registrada a los 13 días, mientras que en *Ulva* spp., fue de $15\,733 \pm 7\,943$ células g^{-1} Pm en el mismo periodo de tiempo (Figura 4; Tabla 1). A partir de los 13 días empezaron a disminuir las densidades celulares sobre *Ulva* spp. y *C. fragile*, mientras que sobre *A. chilensis* ocurrió desde el día 16. Sobre todas las macroalgas hubo un perfil de epifitación errático durante todas las curvas, pero en *Ulva* spp. y *C. fragile* se observó de manera más pronunciada al final de sus curvas de crecimiento.

Figura 4.

Densidades celulares de P. lima epifitando a A. chilensis, C. fragile y Ulva spp., dentro del mesocosmos en ambiente natural. Las letras diferentes indican diferencias entre las máximas densidades sobre las otras macroalgas ($p < 0,05$).

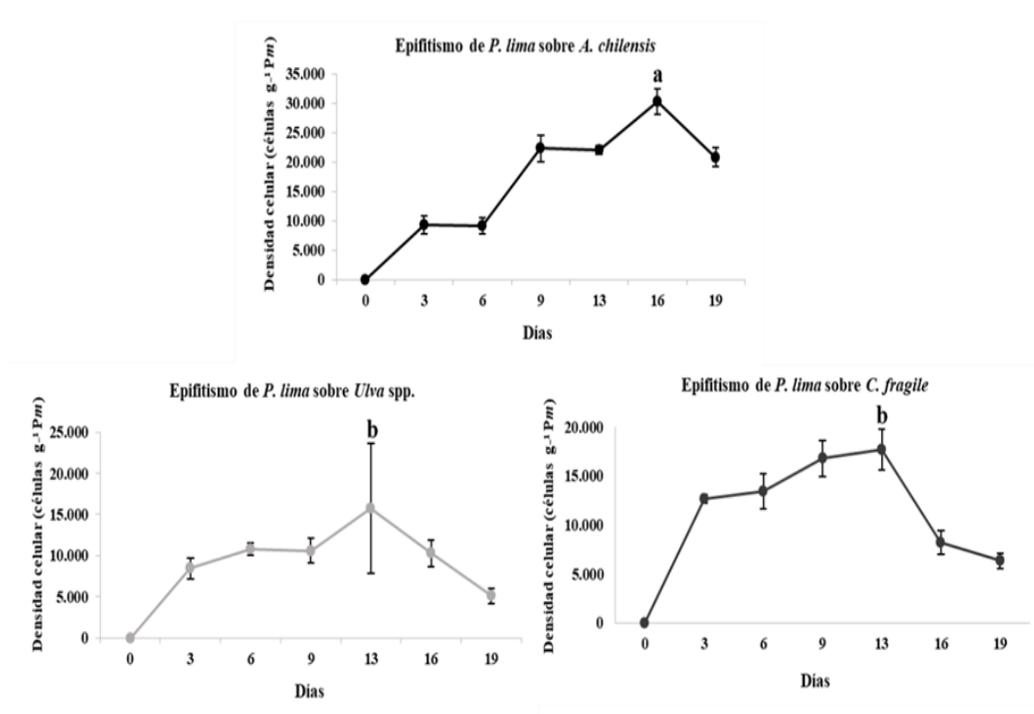


Tabla 1.

Máximas densidades celulares de *P. lima* [células g⁻¹ Pm (peso húmedo)] epifitando a *A. chilensis*, *C. fragile* y *Ulva* spp., dentro del mesocosmos bajo condiciones naturales (temporada estival) y condicionales controladas de laboratorio. Las letras diferentes indican diferencias entre las máximas densidades celulares sobre las otras macroalgas ($p < 0,05$)

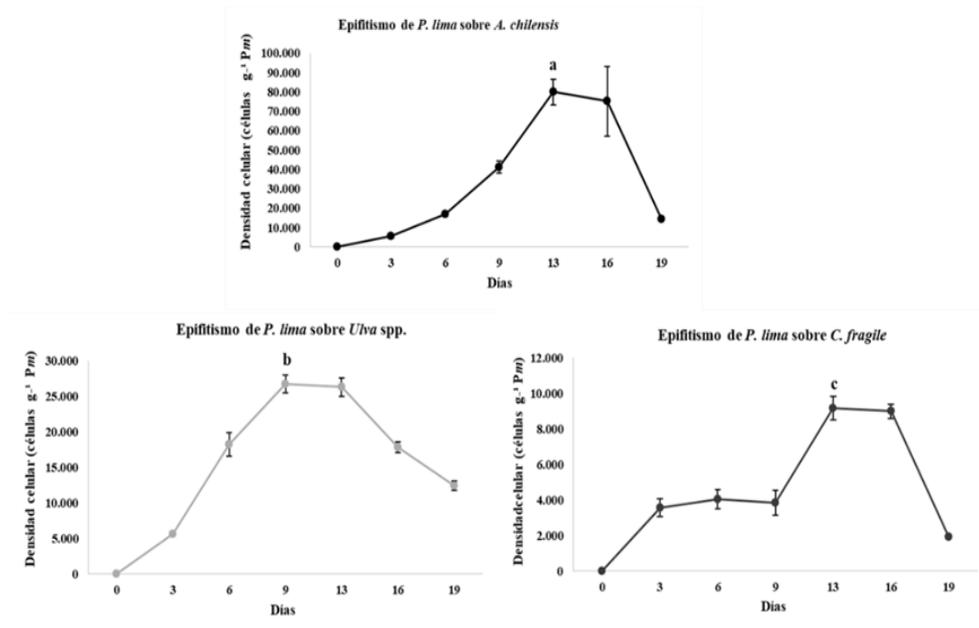
Mesocosmos	Sustrato macroalgal	Máxima densidad celular (células g ⁻¹ Pm)
Ambiente natural	<i>Agarophyton chilensis</i>	30.266 ± 2.203 ^a
	<i>Ulva</i> spp.	15.733 ± 7.943 ^b
	<i>Codium fragile</i>	17.700 ± 2.100 ^b
Ambiente controlado	<i>Agarophyton chilensis</i>	80.053 ± 6.617 ^a
	<i>Ulva</i> spp.	26.760 ± 1.124 ^b
	<i>Codium fragile</i>	9.165 ± 665 ^c

En el mesocosmos en ambiente controlado, el día 13 se registró una alta densidad celular de *P. lima* correspondiente a 80 053 ± 6 617 células g⁻¹ Pm epifitando a *A. chilensis*. En *Ulva* spp. se cuantificaron 26 760 ± 1 224 células g⁻¹ Pm en el día 9, mientras que en *C. fragile* se registraron 9 165 ± 665 células g⁻¹ Pm también el día 13 del estudio. Las densidades celulares empezaron a disminuir desde el día 13 sobre todos los sustratos macroalgales. Después del tercer día de la prueba, *C fragile* tuvo un perfil de epifitación muy errático en su curva de crecimiento.

Los datos estadísticos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre las máximas densidades sobre las tres macroalgas durante el estudio (Figura 5; Tabla 1), obteniendo *A. chilensis* la mayor epifitación de *P. lima*, y *C. fragile*, la menor.

Figura 5.

Densidades celulares de *P. lima* epifitando a *A. chilensis*, *C. fragile* y *Ulva spp.*, dentro del mesocosmos bajo condiciones controladas de laboratorio. Las letras diferentes indican diferencias entre las máximas densidades celulares sobre las otras macroalgas ($p < 0,05$)



Las máximas densidades celulares de *P. lima* obtenidas sobre *C. fragile* durante todo el estudio presentaron diferencias ($p < 0.05$) entre sí, entre ambos mesocosmos, obteniéndose las mayores densidades celulares en el estanque en ambiente estival. De igual forma ocurrió entre las máximas densidades celulares obtenidas sobre *A. chilensis*, aunque las mayores densidades celulares se obtuvieron en el estanque en ambiente controlado. Sobre *Ulva spp.* también se obtuvo diferencias ($p < 0.05$) entre las mayores densidades celulares entre ambos estanques, pero en el estanque en ambiente controlado se reportó mayor densidad (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Colecta, aislamiento y cultivo de cepas de *P. lima*

En diciembre de 2017, durante una floración detectada en el sector costero de Bahía Calderilla, en el Norte de Chile, se encontró la cepa D008-2 de *P. lima* epifitando a la macroalga *C. fragile*. Este evento fue similar al reportado por Uribe et al., (2018) en

ese mismo lugar, quienes en febrero de 2016 encontraron a *P. lima* sobre la superficie de diferentes macroalgas como *C. fragile*, *A. chilensis* y *Ulva* spp. Estos resultados señalan la selectividad de este dinoflagelado sobre varios sustratos macroalgales, y aunque en el presente estudio se encontró sólo sobre *C. fragile*, estas células pueden ser halladas en otras macroalgas que sean similares en su preferencia (Tester *et al.*, 2014).

La capacidad de *P. lima* de crecer sobre estos sustratos vivos ha sido descrita por Parsons & Preskitt, (2007); Tester *et al.*, (2014); Nishimura *et al.*, (2020), asociados a macroalgas como *Ulva*, *Gracilaria*, *Enteromorpha flexuosa* y *Gelidium pusillum*. Del mismo modo, otros dinoflagelados bentónicos pueden coexistir con macroalgas, como ha sido reportado por Bomber & Aikman, (1989), Faust, (1991) o Moreira-González *et al.*, (2018), quienes señalan que diversos dinoflagelados como *Amphidinium*, *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* habitan comúnmente en macroalgas como *Ulva*, *Heterosiphonia* y *Codium* en diversos hábitats marinos costeros, aunque también puede habitar sobre sustratos inertes y/o epifitando moluscos bivalvos.

Los valores de las mayores densidades celulares de *P. lima* al ser cultivada ($20\,317 \pm 1\,377$ células mL⁻¹), fueron similares a los reportados por Wang *et al.*, (2015) ($16\,000 - 25\,000$ células mL⁻¹) y a los de Varkitzi *et al.*, (2017) ($20\,690$ células mL⁻¹). No obstante, fueron superiores a los reportados por Bravo *et al.*, (2001) ($7\,000 - 15\,000$ células mL⁻¹) y a los de Aquino-Cruz *et al.*, (2018) ($600 - 11\,500$ células mL⁻¹) en similares condiciones de cultivo, lo cual demuestra que este dinoflagelado suele desarrollar variabilidades en su crecimiento (Bravo *et al.*, 2001). Por otra parte, la extensa fase estacionaria de 24 días obtenida, es señalada como muy característica de esta especie bentónica, ya que Nascimento *et al.*, (2005) registraron un tiempo similar de 20 días, con una fase exponencial de 25 días y una densidad celular máxima de 48.300 células mL⁻¹.

Mesocosmos marino

En el mesocosmos en ambiente natural, que registró altas variaciones en las irradiaciones (0 a $3\,000$ μmol fotones m⁻²s⁻¹) y temperatura del agua (18.3 a 25.0°C), obtuvo un crecimiento limitado de *P. lima* en las tres macroalgas (*A. chilensis*, *Ulva* spp y *C. fragile*), no superando las $31\,000$ células g⁻¹ Pm. En cambio, en el estanque con ambiente controlado la irradiación (80 μmol fotones m⁻²s⁻¹) y la temperatura (16 ± 1 °C), se mantuvieron constantes durante todo el estudio, permitiendo un mayor epifitismo de $26\,760$ y $80\,053$ células g⁻¹ Pm sobre *Ulva* spp. y *A. chilensis*, respectivamente.

La estabilidad ambiental en el estanque con condiciones controladas fue favorable para el crecimiento de esta especie epífita. El desarrollo de esta especie de dinoflagelado en similares condiciones ha sido reportado por David et al., (2018), quienes al cultivar en matraces con 50 mL de f/2 a irradiaciones de 80 y 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, lograron una alta tasa de crecimiento (0.23 día^{-1}) en su cepa de *P. lima*. La alta irradiación que recibe el cultivo en mesocosmos en ambiente natural a medio día, pudo fotoinhibir el aparato fotosintético de estas células, reduciendo las densidades celulares de *P. lima*, al no estar aclimatadas a la alta irradiación (David et al., 2018; López-Rosales et al., 2013; Praptiwi, 2014).

Por otra parte, *P. lima* logró desarrollarse entre los 16 a 25 °C de temperatura, sugiriendo una amplia tolerancia térmica de este dinoflagelado. En efecto, estas cepas en condiciones naturales han sido reportadas en áreas tropicales y subtropicales con temperaturas entre 19 y 33 °C (Aligizaki et al., 2009; Nagahama et al., 2011), 21 °C en este estudio, e incluso en regiones templadas o frías creciendo con temperaturas entre 5 y 25 °C (Morton et al., 1992). Estos resultados son también consistentes con las observaciones en laboratorio hechas por (Aquino-Cruz et al., 2018; López-Rosales et al., 2013; McLachlan et al., 1994; Varkitzi et al., 2017), quienes desarrollaron cultivos de esta especie y lograron crecimientos a temperaturas entre 20 y 30 °C. Del mismo modo, (Aquino-Cruz et al., 2018; McLachlan et al., 1994), demostraron que *P. lima* puede ser cultivada a temperaturas más bajas (15 °C), similar al cultivo desarrollado en ambiente controlado para la cepa (D008-2). Estos resultados indican que, para conseguir una alta densidad celular de esta especie, se debe cultivar bajo condiciones ambientales controladas, eligiendo las variables ambientales de acuerdo con el origen de la cepa a cultivar.

Sin embargo, también hay que considerar el sustrato para esta especie epífita, ya que el mesocosmos en ambiente natural, como en ambiente controlado presentó una preferencia al epifitismo sobre *A. chilensis*, seguido de *Ulva* spp. y finalmente en *C. fragile*.

En general, algunas investigaciones señalan que las relaciones simbióticas entre *P. lima* con macroalgas rodófitas en ambiente natural suelen ser comunes, reportando su interacción con *Acanthophora spicifera* (Morton & Faust, 1997), *Gelidiella* spp., *Gelidiopsis variabilis*, *G. salicornia* (Parsons & Preskitt, 2007), *Gracilaria gracilis* (Hachani et al., 2018), *Amphiroa* spp. (Irola-Sansores et al., 2018), *Gracilariopsis* spp. y *Gracilaria* spp. (Catuto-Magallan, 2019) y *Laurencia* spp. (Tarazona-Janampa et al., 2020), entre otras. Bravo et al., (2020) también reportaron la preferencia de

Prorocentrum spp. en diferentes macroalgas ramificadas como las rodófitas *Spyridea*, *Lophocladia* y *Asparagopsis*, y en la feófito *Halopteris*, observándose que las arquitecturas filamentosas y enredadas de estos talos, tienen una influencia en la abundancia de estos dinoflagelados. En el presente estudio ocurrió de manera similar con la estructura filamentosas y ramificada de *A. chilensis*.

Las rodófitas como *A. chilensis*, se caracterizan por tener polisacáridos estructurales conformados por agarosa, galactosa o ácido pirúvico (Matsuhira & Urzúa 1990; Chandia, 2020). En este contexto, es posible que *P. lima* en su condición de mixótrofo (Faust, 1998) tenga la capacidad de nutrirse de estos azúcares mediante una simple difusión, desdoblándolos a través de una rápida acción enzimática o utilizándolos como moléculas más pequeñas producidas por la acción enzimática bacteriana, incrementando su densidad celular.

El epifitismo de *P. lima* sobre *A. chilensis* tanto en ambiente natural, como controlado fue mayor que en *Ulva* spp. y *C. fragile*. Estas dos últimas macroalgas sintetizan polisacáridos altamente sulfatados que poseen un amplio espectro de actividad biológica, incluyendo la actividad antiproliferativa (Wang et al., 2014; Aumeerun et al., 2019) e inhibición de crecimiento, combatiendo a microalgas marinas como *Rhodorus magnei*, *Neorhodella cyanea* y *Prymnesium calathiferum* (Águila-Ramírez et al., 2012), por lo que esta actividad biológica pudo influir en la proliferación de *P. lima* sobre *Ulva* spp. y *C. fragile*.

CONCLUSIONES

Del perifiton obtenido, *P. lima* fue aislado únicamente en *C. fragile*, aunque puede ser encontrado en otras macroalgas. Este dinoflagelado suele desarrollar amplia tolerancia a diferentes irradiaciones y temperaturas, facilitando su proliferación sobre diversos hábitats. Al cultivarse en los mesocosmos, tanto en ambiente natural como controlado, epifitó a todas las macroalgas, pero presentando una mayor afinidad con *A. chilensis*. Además, también logró crecer sobre todas las estructuras inertes presentes en ambos estanques. El crecimiento de este dinoflagelado en un sistema de cultivo sin adición de nutrientes podría indicar que se estaría alimentando de los componentes liberados por los sustratos macroalgales.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Águila-Ramírez, R., Arenas-González, A., Hernández-Guerrero, C., González-Acosta, B., Borges-Souza, J., Véron, B., & Hellio, C. (2012). Antimicrobial and antifouling activities achieved by extracts of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiologica*, 22(1), 8–15.
- Aligizaki, K., & Nikolaidis, G. (2006). The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae*, 5(6), 717–730
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.005>
- Aligizaki, K., & Nikolaidis, G. (2008). Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea. *Journal of Biological Research*, 9, 75–82.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., Katikou, P., Baxevanis, A., & Abatzopoulos, T. (2009). Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters. *Harmful Algae*, 8(2), 299–311.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.07.002>
- Aquino-Cruz, A., Purdie, D., & Morris, S. (2018). Effect of increasing sea water temperature on the growth and toxin production of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Hydrobiologia*, 813(1), 103–122.
<https://doi.org/10.1007/s10750-018-3512-4>
- Arbeláez, N., Mancera-Pineda, J., & Reguera, B. (2020). Structural variation of potentially toxic epiphytic dinoflagellates on *Thalassia testudinum* from two coastal systems of Colombian Caribbean. *Harmful Algae*, 92(January), 101738.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101738>
- Aumeerun, S., Soulange-Govinden, J., Driver, M., Rao, A., Ravishankar, G., & Neetoo, H. (2019). Macroalgae and Microalgae. In *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals* (p. 207).
- Berdalet, E., Fleming, L., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L., Moore, S., Hoagland, P. & Enevoldsen, H. (2016). Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 61–91.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0025315415001733>

- Bomber, J., & Aikman, K. (1989). The Ciguatera Dinoflagellates. *Biological Oceanography*, 6, 291–311.
- Bomber, J., Guillard, R., & Nelson, W. (1988). Roles of temperature, salinity, and light in seasonality, growth, and toxicity of ciguatera-causing *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo (Dinophyceae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 115, 53–65.
- Bomber, J., Rubio, M., & Norris, D. (1989). Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera: substrate specificity and nutrition. *Phycologia*, 28(3), 360–368.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-28-3-360.1>
- Bravo, I., Fernández, M. L., Ramilo, I., & Martínez, A. (2001). Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain). *Toxicon*, 39(10), 1537–1545.
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00126-X)
- Bravo, I., Rodríguez, F., Ramilo, I., & Afonso-Carrillo, J. (2020). Epibenthic Harmful Marine Dinoflagellates from Fuerteventura (Canary Islands), with Special Reference to the Ciguatoxin-Producing *Gambierdiscus*. *J. Mar. Sci. Eng.*, 8, 0909.
- Carlson, R., Morey-Gaines, G., Tindall, D., & Dickey, R. (1984). Ecology of Toxic Dinoflagellates from the Caribbean Sea Effects of Macroalgal Extracts on Growth in Culture. *Sea Food Toxins*, 24, 271–287.
<https://doi.org/doi:10.1021/bk-1984-0262.ch024>
- Catuto-Magallan, R. (2019). *Composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos asociados a macroalgas en dos playas de la Provincia de Santa Elena*. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Chandia, P. (2020). Valor agregado a macroalgas chilenas de exportación: caracterización de ficocoloides, denominación de origen y diversificación comercial. *Proyecto BBPP 18BPE-93853*.
- Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S., & Legrand, A. (1999). Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology*, 135, 259–267. <https://doi.org/doi: 10.1007/s002270050623>

- David, H., Laza-Martínez, A., Kromkamp, J. C., & Orive, E. (2018). Physiological response of *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) to varying light intensities. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix166>
- Faust, M. (1995). Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal Phycol.*, 42, 154–159.
- Faust, M. A. (1998). Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. In: Reguera, B., Blanco, J. Fernandez, L., Wyatt, T. (Eds.) *Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, Pp 390-393.*
- Faust, M., & Gualledge, R. (2004). Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. *Journal of Applied Phycology*, 16(1), 79. <https://doi.org/10.1023/b:japh.0000019147.40273.1b>
- Faust, M. A. (1991). Morphology of Ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.*, 27, 642–648.
- Foden, J., Purdie, D., Morris, S., & Nascimento, S. (2005). Epiphytic abundance and toxicity of *Prorocentrum lima* populations in the Fleet Lagoon, UK. *Harmful Algae*, 4, 1063–1074. <https://doi.org/https://10.1016/j.hal.2005.03.004>
- Fukuyo, Y. (1981). Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47(8), 967–978.
- GEOHAB. (2012). Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in Benthic Systems. In A. Berdalet, E., Tester, P., Zingone (Ed.), *Organization*. IOC of UNESCO and SCOR, Paris and Newark.
- Gu, S., Xiao, S., Zheng, J., Li, H., Liu, J., & Yang, W. (2019). ABC Transporters in *Prorocentrum lima* and Their Expression Under Different Environmental Conditions Including Okadaic Acid Production. *Marine Drugs*, 17(259), 1–16.

- Guillard, R. R. L., & Hargraves, P. E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, 32(3), 234–236. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1>
- Hachani, M. A., Dhib, A., Fathalli, A., Ziadi, B., Turki, S., & Aleya, L. (2018). Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis. *Harmful Algae*, 77(June), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.006>
- Hales, S., Weinstein, P., & Woodward, A. (1999). Ciguatera (Fish Poisoning), El Niño, and Pacific Sea Surface Temperatures. *Ecosystem Health*, 5, 20–25. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1526-0992.1999.09903.x>
- Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B., Nuñez-Vázquez, E., Yasumoto, T., Yasuda, M., & Ochoa, J. (2002). Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon* 4, 40, 1121–1127.
- Hou, D., Liang, J., Zou, C., Li, H., Liu, J., & Yang, W. (2015). MRP functional activity and character in the dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1667–1676. <https://doi.org/https://10.1007/s10811-015-0679-1>
- Hu, Tingmo, LeBlanc, P., Burton, I. W., Walter, J. A., McCarron, P., Melanson, J. E., Strangman, W., & Wright, J. L. C. (2017). Sulfated diesters of okadaic acid and DTX-1: Self-protective precursors of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins. *Harmful Algae*, 63, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.012>
- Hu, W., Xu, J., Sinkkonen, J., & Wu, J. (2010). Polyketides from Marine Dinoflagellates of the Genus *Prorocentrum*, Biosynthetic Origin and Bioactivity of Their Okadaic Acid Analogues. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 51–61. <https://doi.org/10.2174/138955710791112541>
- Irola-Sansores, E. D., Delgado-Pech, B., García-Mendoza, E., Núñez-Vázquez, E. J., Olivos-Ortiz, A., & Almazán-Becerril, A. (2018). Population dynamics of benthic-epiphytic dinoflagellates on two macroalgae from coral reef systems of the northern Mexican Caribbean. *Frontiers in Marine Science*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00487>

- Karafas, S., York, R., & Tomas, C. (2015). Morphological and genetic analysis of the *Coolia monotis* species complex with the introduction of two new species, *Coolia santacroce* sp. nov. and *Coolia palmyrensis* sp. nov. (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 46, 18–33.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.002>
- Kibler, S. R., Tester, P. A., Kunkel, K. E., Moore, S. K., & Litaker, R. W. (2015). Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Ecological Modelling*, 316, 194–210.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.08.020>
- Lartigue, J., Jester, E. L. E., Dickey, R. W., & Villareal, T. A. (2009). Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae*, 8, 781–791.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.05.006>
- Lassus, P., Chomerat, N., Hess, P., & Nezan, E. (2016). Microalgues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. *COI Manuels et Guides*, 68 / *Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean. IOC Manuals and Guides*, 68.
- Laza-Martinez, A., Orive, E., & Miguel, I. (2011). Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology*, 46(1), 45–65.
<https://doi.org/10.1080/09670262.2010.550387>
- Lee, S., Hwang, B., Kim, H., Yih, W., & Jeong, E. (2015). A New Diol Ester Derivative of Dinophysistoxin-1 from Cultures of *Prorocentrum lima* Collected in South Korea. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 395–398.
<https://doi.org/10.1002/bkcs.10031>
- LeGresley, M., & McDermott, G. (2010). Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In *Microscopic and molecular methods for Quantitative phytoplankton analysis*, 25–30.
- Levasseur, M., Thompson, P., & Harrison, P. (1993). Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol.*, 29, 587–595.

- Lewis, N., Wolny, J., Achenbach, J., Ellis, L., Pitula, J., Rafuse, C., Rosales, D. & McCarron, P. (2018). Identification, growth and toxicity assessment of *Coolia meunier* (Dinophyceae) from Nova Scotia, Canada. *Harmful Algae*, 75, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.04.001>
- Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., Chinain, M., Holmes, M., & Tester, P. A. (2010). Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*, 56(5), 711–730. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.017>
- Lobel, P., Anderson, D., & Durand-Clement, M. (1988). Assessment of Ciguatera Dinoflagellate Populations: Sample Variability and Algal Substrate Selection. *The Biological Bulletin*, 175(1), 94–101. <https://doi.org/10.2307/1541896>
- López-Rosales, L., Gallardo-Rodríguez, J. J., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. del C., Belarbi, E. H., García-Camacho, F., & Molina-Grima, E. (2013). Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Toxins*, 6(1), 229–253. <https://doi.org/10.3390/toxins6010229>
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Chavanon, F., Chiantore, M., Coahu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A., Sala, M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., & Lemée, R. (2011). Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon*, 57(3), 408–420. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.11.019>
- Marr, J., Hu, T., Pleasance, S., Quilliam, M., & Wright, J. (1992). Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, 30(12), 1621–1630.
- Matsuhiro, B., & Urzúa, C. (1990). Agars from *Gracilaria chilensis* (Gracilariales). *Journal of Applied Phycology*, 2(3), 273–279. <https://doi.org/https://10.1007/BF02179785>

- McLachlan, J. L., Marr, J. C., Conlon-Keily, A., & Adamson, A. (1994). Effects of nitrogen concentration and cold temperature on DSP-toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (prorocentrales, dinophyceae). *Natural Toxins*, 2(5), 263–270.
<https://doi.org/10.1002/nt.2620020504>
- Moreira-González, A. R., Fernandes, L. F., Uchida, H., Uesugi, A., Suzuki, T., Chomérat, N., Bilién, G., & Mafra, L. L. (2018). Variations in morphology, growth, and toxicity among strains of the *Prorocentrum lima* species complex isolated from Cuba and Brazil. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 519–532.
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1587-y>
- Morton, S., & Faust, M. (1997). Survey of Toxic Epiphytic Dinoflagellates from the Belizean Barrier Reef Ecosystem. *Bulletin of Marine Science -Miami*, 61(3), 899–906.
- Morton, S., Norris, D., & Bomber, J. (1992). Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 157, 79–90.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90076-M](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90076-M)
- Murakami, Y., Oshima, Y., & Yasumoto, T. (1982). Identification of Okadaic Acid As a Toxic Component of a Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48(1), 69–72. <https://doi.org/https://10.2331/suisan.48.69>
- Nagahama, Y., Murray, S., Tomaru, A., & Fukuyo, Y. (2011). Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters. *Journal of Phycology*, 47(1), 178–189.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00939.x>
- Nakahara, H., Sakami, T., Chinain, M., & Ishida, Y. (1996). The role of macroalgae in epiphytism of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Phycological Research*, 44(2), 113–117. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00385.x>
- Nascimento, S. M., Purdie, D. A., & Morris, S. (2005). Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicon*, 45(5), 633–649.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.023>

- Nascimento, S. M., Salgueiro, F., Menezes, M., Oliveira, F. de A., Magalhães, V. C. P., De Paula, J. C., & Morris, S. (2016). *Prorocentrum lima* from the South Atlantic: Morphological, molecular and toxicological characterization. *Harmful Algae*, 57, 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.006>
- Nishimura, T., Uchida, H., Noguchi, R., Oikawa, H., Suzuki, T., Funaki, H., Hara, C., Hagino, K., Arimitsu, S., Tanii, Y., Abe, S., Hashimoto, K., Mimura, K., Tanaka, K., Yanagida, & I. Adachi, M. (2020). Abundance of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum* and the diversity, distribution, and diarrhetic shellfish toxin production of *Prorocentrum lima* complex and *P. caipirignum* in Japan. *Harmful Algae*, 96, 101687.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101687>
- Okolodrov, Y., Merino-Virgilio, F., Aké-Castillo, J., Aguilar-Trujillo, A., Espinoza-Matías, S., & Herrera-Silveira, J. (2014). Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the Northern coast of the Yucatan peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 107, 121–151.
- Parsons, M., & Preskitt, L. (2007). A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. *Harmful Algae*, 6(5), 658–669.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.01.001>
- Parsons, M., Settlemier, C., & Ballauer, J. (2011). An examination of the epiphytic nature of *Gambierdiscus toxicus*, a dinoflagellate involved in ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae*, 10(6), 598–605.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.011>
- Paz, B., Vázquez, J., Riobó, P., & Franco, J. (2006). Study of the effect of temperature, irradiance and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. *Marine Environmental Research*, 62(4), 286–300.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.04.066>
- Pearce, I., Marshall, J., & Hallegraeff, G. (2001). No Title. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Hobart, Tasmania*, 54–57.

- Penna, A., Garcés, E., Vila, M., Giacobbe, M. G., Fraga, S., Lugliè, A., Lugliè, A., Bravo, I., Bertozzini, & E. Vernesi, C. (2005). *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology*, 148(1), 13–23.
<https://doi.org/10.1007/s00227-005-0067-5>
- Praptiwi, R. A. (2014). *Optimisation of high value metabolite production from benthic marine dinoflagellate Prorocentrum lima*. (Robert Gordon University).
<https://doi.org/10.1177/0266242610391936>
- Rains, L. K., & Parsons, M. L. (2015). *Gambierdiscus* species exhibit different epiphytic behaviors toward a variety of macroalgal hosts. *Harmful Algae*, 49, 29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.005>
- Reguera, B., Alonso, R., Moreira, Á., & Silvia, M. (2011). Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. *Manuales y Guías COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena. Manuales y Guías de La COI*, 59, 1–49.
- Stein, J. (1973). *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* (Cambridge).
- Tarazona-Janampa, U. (2019). *Effect of associated bacteria on growth and toxigenicity in cultured isolates of the dinoflagellate Prorocentrum lima from Mexico* *Effect of associated bacteria on growth and toxigenicity in cultured isolates of the dinoflagellate Prorocentrum lima from Me* (Universidad Veracruzana, Mexico).
<https://doi.org/https://10.13140/RG.2.2.12826.90567>
- Tarazona-Janampa, U., Cembella, A., Pelayo-Zárate, M., Pajares, S., Márquez-Valdelamar, L., Okolodkov, Y., Tebben, J., Krock, B., & Durán-Riveroll, L. (2020). Associated Bacteria and Their Effects on Growth and Toxigenicity of the Dinoflagellate *Prorocentrum lima* Species Complex From Epibenthic Substrates Along Mexican Coasts. *Frontiers in Marine Science* /, 7(569), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00569>

- Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (2014). Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand. *Harmful Algae*, 37, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.003>
- Tester, P. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandersea, M. W., Leaw, C. P., Mohammad-Noor, N., Faust, M., & Litaker, R. W. (2014). Sampling harmful benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae*, 39, 8–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.009>
- Torgensen, T., Miles, C., Rundberget, T., & Wilkins, A. (2008). New Esters of Okadaic Acid in Seawater and Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *J. Agric. Food Chem*, 56, 9628–9635.
- Uchida, H., Watanabe, R., Matsushina, R., Uchida, N., Nagai, H., Kamio, M., Murata, M., Yasumoto, T., & Suzuki, T. (2014). A Convenient HPLC Method for Detection of Okadaic Acid Analogs as 9-Anthrylmethyl Esters with Automated Sample Cleanup by Column Switching. *Journal of Aoac International*, 97(2), 391–397. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEUchida>
- Vale, P., Veloso, V., & Amorim, A. (2009). Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coast. *Toxicon*, 54(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.026>
- Vanucci, S., Guerrini, F., Milandri, A., & Pistocchi, R. (2010). Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield , okadaic acid , DTX-1 , protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Harmful Algae*, 9(6), 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.04.009>
- Varkitzi, I., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., Pagou, K., Granelí, E., Pavlidou, A., Montesanto, B., & Economou-Amilli, A. (2010). Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. *Harmful Algae*, 9, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.12.001>

- Varkitzi, I., Pagou, K., Pyrgaki, C., & Hatzianestis, I. (2017). A Biomass Upscale System for the Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima* and the Production of Bioactive Lipophilic Toxins. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(4), 479–485. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i4.18561>
- Wang, L., Wang, X., Wu, H., & Liu, R. (2014). Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. In *Marine Drugs* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3390/md12094984>
- Wang, S., Chen, J., Li, Z., Wang, Y., Fu, B., Han, X., & Zheng, L. (2015). Cultivation of the benthic microalga *Prorocentrum lima* for the production of diarrhetic shellfish poisoning toxins in a vertical flat photobioreactor. *Bioresource Technology*, 179, 243–248. <https://doi.org/https://10.1016/j.biortech.2014.12.019>
- Wu, H., Chen, J., Peng, J., Zhong, Y., Guo, M., Tan, Z., Tan, Z., Zhai, Y., & Lu, S. (2020). Nontarget screening and toxicity evaluation of diol esters of okadaic acid and dinophysistoxins reveal intraspecies difference of *Prorocentrum lima*. *Environmental Science & Technology*, 1–40. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03691>
- Yang, A., Lee, S., Du Yoo, Y., Seop Kim, H., Ju Jeong, E., & Rho, J. (2017). Limaol: A Polyketide from the Benthic Marine Dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Natural Products*, 80, 1688–1692. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00127>