

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TRABAJO DE DIPLOMA

Composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos
potencialmente tóxicos en la región sur central de Cuba

Autor: Gabriel Liván Rojas Abrahantes

Tutor: Ms. C. Lisbet Díaz Asencio

Santa Clara, Junio, 2018
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



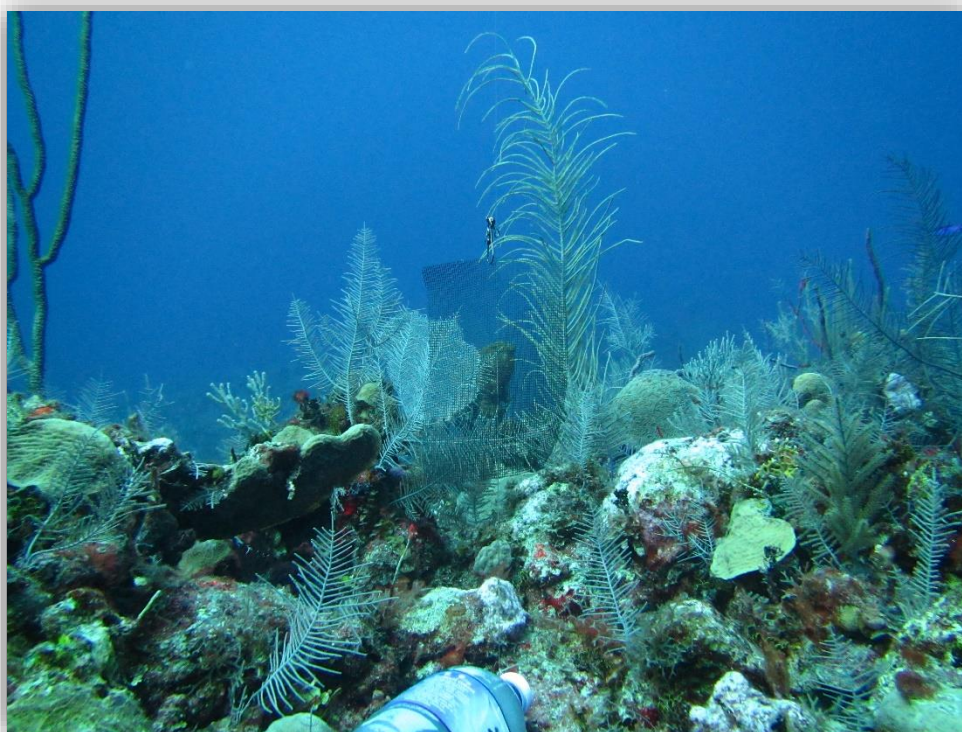
Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

**Composición y abundancia de dinoflagelados
epibentónicos potencialmente tóxicos en la región
sur central de Cuba**



Autor: Gabriel Liván Rojas Abrahantes

Tutor: Ms. C. Lisbet Díaz Asencio

Santa Clara

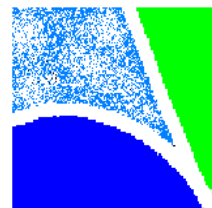
2018



Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



TESIS DE DIPLOMA

Composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos potencialmente tóxicos en la región sur central de Cuba

Autor: Gabriel Liván Rojas Abrahantes

Tutor: Ms. C. Lisbet Díaz Asencio¹

¹Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC). Apartado Postal 5, Código Postal 59350. Ciudad Nuclear, Cienfuegos, Cuba. E-mail: ceac@ceac.cu

A MIS PADRES

Agradecimientos:

Quisiera agradecer a todos aquellos que me brindaron apoyo y que tanto directa como indirectamente fueron determinantes para el desarrollo de este documento.

En primer lugar a mi tutora Lisbet Díaz Asencio (Lisbe) por luchar codo a codo conmigo durante este período tan difícil, pero también lleno de maravillosos momentos y recuerdos que nunca olvidaré.

A todos los trabajadores del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) que siempre mostraron su preocupación por cómo iban las cosas y cada vez que necesité ayuda nunca dudaron en dar el paso al frente.

A mis profesores de la Universidad, por poner a mi disposición sus conocimientos y entrenarme para insertarme en la vida profesional como una persona capacitada y preparada ante los nuevos retos que esta impone.

A todos mis compañeros de aula, con quienes compartí y atravesé aventuras y momentos inolvidables.

Un agradecimiento especial a David, Erisbel, Fidel, Julio, Félix, Ariandy y Leo, pues juntos atravesamos los momentos más difíciles y compartimos las mayores alegrías.

A Yoyi, que gracias a su inagotable ayuda y disposición muchas cosas se hicieron más fáciles y sobre todo más relajadas (Relájate, todo va a salir bien).

A toda mi familia, en especial a mis padres, que en estos renglones me es imposible proyectar lo importantes que han sido para poder hacer realidad cada objetivo que me he planteado. Tenerlos como ejemplo a seguir es la mejor enseñanza que he recibido en mi vida.

A mi hermano, pues juntos formamos una pareja invencible, si no que le pregunten a nuestros padres.

Un agradecimiento muy especial a Eliza, mi “monita”, con quien también me quedo corto agradeciéndole, pues con ella he atravesado los mejores años de mi vida, y juntos hemos logrado lo que pocos.

RESUMEN

Globalmente, la ciguatera es la principal enfermedad no bacteriana relacionada con la ingestión de pescado. Las toxinas relacionadas con esta enfermedad son producidas por dinoflagelados bentónicos del género *Gambierdiscus*. En este estudio se caracterizó la composición y abundancia de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos de la región sur central de Cuba y se determinó la diversidad de especies del género *Gambierdiscus*. El muestreo se realizó en diciembre de 2016 en dos áreas que comprendieron los alrededores de Cayo Guano del Este y parte de la costa de Cienfuegos. Para la identificación y la determinación de la abundancia de los principales géneros de dinoflagelados tóxicos, se desplegaron sustratos artificiales y se colectaron muestras de las macrófitas más representativas. La identificación de especies de *Gambierdiscus* se determinó mediante ensayos semi-cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR). Se identificaron tres géneros de dinoflagelados bentónicos tóxicos: *Ostreopsis*, *Prorocentrum* y *Gambierdiscus*, siendo *Ostreopsis* y *Prorocentrum* los más abundantes en comparación con el género *Gambierdiscus*. Mediante las técnicas moleculares se identificaron seis de las siete especies reportadas en el Caribe: *G. caribaeus*, *G. carpenteri*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. ruetzleri* y *G. silvae*; estas especies excepto *G. caribaeus* fueron registradas por primera vez en Cuba. La identificación del género *Gambierdiscus* en la región sur central de Cuba así como la elevada diversidad de especies detectada pudiera explicar la captura de peces tóxicos y la existencia de brotes de ciguatera en el área.

Palabras clave: *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, ciguatera, Cienfuegos

ABSTRACT

Globally, ciguatera fish poisoning is the main non-bacterial disease related to the seafood ingestion. The toxins related to this disease are produced by benthic dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus*. In this study, the composition and abundance of potentially toxic benthic dinoflagellates from the south central region of Cuba were characterized and the diversity of species of the genus *Gambierdiscus* was determined. The sampling was realized in December 2016 in two areas that included the surroundings of Cayo Guano del Este and part of the Cienfuegos coast. For the identification and determination of the abundance of the main genera of toxic dinoflagellates, artificial substrates were deployed and samples of the most representative macrophytes were collected. The identification of *Gambierdiscus* species was determined by semi-quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays. Three genera of toxic benthic dinoflagellates were identified: *Ostreopsis*, *Prorocentrum* and *Gambierdiscus*, with *Ostreopsis* and *Prorocentrum* being the most abundant in comparison with the genus *Gambierdiscus*. Through molecular techniques, six of the seven species reported in the Caribbean were identified: *G. caribaeus*, *G. carpenteri*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. ruetzleri* and *G. silvae*; these species except *G. caribaeus* were recorded for first time in Cuba. The identification of the genus *Gambierdiscus* in the south central region of Cuba as well as the high diversity of species detected could explain the capture of toxic fishes and the existence of ciguatera fish poisoning in the area.

Keywords: *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, ciguatera fish poisoning, Cienfuegos

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Floraciones Algales Nocivas	4
2.2 Dinoflagelados bentónicos tecados potencialmente tóxicos y sus efectos	5
2.2.1 Género <i>Gambierdiscus</i>	6
2.2.2 Género <i>Ostreopsis</i>	8
2.2.3 Género <i>Prorocentrum</i>	10
2.3 Métodos de muestreo para la cuantificación de la abundancia de dinoflagelados epibentónicos.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos	17
3.1.1 Abundancia determinada con sustratos artificiales.....	18
3.1.2 Abundancia determinada con sustratos naturales	20
3.2 Determinación de la diversidad de especies de <i>Gambierdiscus</i> spp.	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos	23
4.1.1 Abundancia determinada con sustratos artificiales.....	23
4.1.2 Abundancia determinada con sustratos naturales	28
4.2 Determinación de la diversidad de especies de <i>Gambierdiscus</i> sp.	29
5. DISCUSIÓN	33
5.1 Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos	33
5.2 Determinación de la diversidad de especies de <i>Gambierdiscus</i> sp.	35

6. CONCLUSIONES.....	41
7. RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS.....	43

1. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados representan un grupo exitoso de protistas unicelulares que combinan estrategias fotosintéticas, heterotróficas e incluso parásitas. Su gran diversidad de formas, historias de vida y mecanismos de dispersión les han permitido colonizar la mayoría de los ambientes acuáticos. Así, se pueden encontrar tanto en ambientes dulceacuícolas como marinos, formando parte del medio pelágico o bentónico. Como parte del bentos, los dinoflagelados son un componente muy importante en los ecosistemas marinos donde suelen formar asociaciones con una gran variedad de macroalgas y pastos marinos (Taylor, 1987).

Los dinoflagelados fotosintéticos se consideran los principales productores primarios del medio acuático (Taylor, 2006). Algunas especies no limitan su hábitat al medio bentónico, sino que pueden ser habitantes comunes del plancton, lo que sugiere que desempeñan diferentes funciones ecológicas. Sus ciclos de vida altamente diversos son un reflejo de la importancia biológica de este gran grupo de protistas (Meier *et al.*, 2007).

Estos dinoflagelados han sido relacionados con las floraciones algales nocivas, un evento tóxico natural vinculado con el incremento de biomasa del fitoplancton y que representa una potencial amenaza para la salud pública y/o los ecosistemas acuáticos. Estas floraciones están asociadas a cambios ambientales en la columna de agua, aunque se conoce muy poco el proceso que facilita el incremento de las poblaciones de estas especies (García-Portela *et al.*, 2016).

Algunos de los impactos negativos de estas floraciones se evidencian en la alteración de las condiciones físico-químicas del medio, ya sea por causar anoxia, cambiar la viscosidad del agua o descender su pH. Si las microalgas que proliferan son productoras de toxinas, pueden ocurrir trastornos al ser ingeridas por diferentes organismos de la cadena trófica, que actúan como bioacumuladores de las toxinas, y como vectores que las transfieren a niveles superiores de la cadena (Peraza y Moreira, 2012).

Uno de los principales motivos que originaron el estudio de estos organismos fue su relación con la producción de toxinas involucradas con el síndrome de la ciguatera (Yasumoto *et al.*, 1980), donde se identificó al principal agente productor de ciguatoxinas, perteneciente al género *Gambierdiscus*. En estudios posteriores fue demostrado que la producción de

diferentes tipos de toxinas se extendía a otras especies bentónicas que incluía los géneros *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Amphidinium* (Yasumoto *et al.*, 1987).

La distribución mundial de estos dinoflagelados se encuentra actualmente en expansión. Factores tales como el enriquecimiento orgánico antropogénico, las introducciones de aguas de lastre, el aumento de la acuicultura y, más recientemente, el cambio climático global se incluyen entre las muchas y variadas explicaciones a estas tendencias (García-Portela *et al.*, 2016).

Países como Puerto Rico, Estados Unidos y Cuba, en aras de proteger al consumidor y la salud pública, tienen dentro de sus legislaciones disposiciones que prohíben la captura y comercialización de un grupo de peces demostrados como potencialmente tóxicos o de alto riesgo. Aun así la ciguatera en el Caribe sigue constituyendo un problema de salud pública y de impacto económico grave, sobre todo para países del área que no disponen de un sistema médico bien estructurado y orientado hacia este tipo de intoxicación alimentaria (Arencibia Carballo, 2009).

Existen en Cuba estudios epidemiológicos provenientes de la región sur central que relacionan brotes de intoxicaciones alimentarias con la ingestión de peces, principalmente de la especie *Caranx latus* Agassiz (Rojas Valladares *et al.*, 1986). Específicamente en esta región se han reportado casos más recientes de intoxicación por ciguatera por la ingestión de peces ciguatos (Alonso Cordero *et al.*, 2006; Arencibia Carballo, 2009). Además en estudios que lleva a cabo el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) se han detectado peces con concentraciones de ciguatoxinas significativas en este mismo territorio.

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados surge la necesidad de obtener información sobre la composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos potencialmente tóxicos en la región sur central de Cuba. Para esta investigación se plantea la siguiente hipótesis:

La existencia de brotes de ciguatera y la detección de peces con concentraciones de ciguatoxinas significativas en la región sur central de Cuba suponen la presencia de especies tóxicas perteneciente al género *Gambierdiscus*.

Objetivo general:

Caracterizar la composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos potencialmente tóxicos en la región sur central de Cuba

Objetivos específicos:

1. Determinar la abundancia de dinoflagelados epibentónicos tóxicos mediante microscopía de luz
2. Determinar la diversidad de especies de *Gambierdiscus* mediante técnicas moleculares

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Floraciones Algales Nocivas

Dentro de los ecosistemas acuáticos existen organismos fotosintéticos como macrófitas, microalgas y cianobacterias que realizan funciones de gran importancia, dentro de las que se destacan la fijación del carbono y la producción de oxígeno, además de constituir la base de la cadena trófica. Bajo ciertas circunstancias la abundancia de algunos grupos alcanza niveles que pueden causar daño a humanos y otros organismos. Estas proliferaciones generalmente son referidas como “Floraciones Algales Nocivas” (FANs), un término que incluye una variedad de consecuencias adversas para los ecosistemas acuáticos y la salud pública (Berdalet *et al.*, 2016).

En sentido amplio el término “Floraciones algales nocivas (FANs)” (en inglés Harmful Algal Blooms) ha sido resaltado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO para denominar las apariciones de un conjunto de microorganismos que tienen efectos adversos en la salud humana, la acuicultura, el turismo y el ambiente. Las Floraciones de algas bentónicas nocivas (BHABs, por su siglas en inglés) se refiere a la proliferación de microalgas bentónicas, las cuales pueden representar una seria amenaza para otros organismos (incluyendo humanos) y para el ambiente (Giussani *et al.*, 2017).

En la mayoría de los casos las mareas rojas (expresión atribuida a las FANs) se forman por microalgas inocuas y no constituyen ningún peligro para los ecosistemas si ocurren en áreas abiertas donde exista una renovación de agua intensa. Sin embargo, pueden ser perjudiciales si se forman en bahías o ensenadas estrechas con poca circulación de agua (Reguera *et al.*, 2016).

Los dinoflagelados son uno de los grupos formadores de “blooms” más relevantes y, con frecuencia, especies tóxicas están involucradas con este fenómeno (García-Portela *et al.*, 2016). La causa del incremento en las poblaciones de estos dinoflagelados se desconoce, pero se sabe que las floraciones de dinoflagelados están relacionadas con cambios ambientales en la columna de agua (Pitcher *et al.*, 2010).

Algunos de los impactos negativos de estas floraciones se evidencian en la alteración de las condiciones físico-químicas del medio, ya sea por causar anoxia, cambiar la viscosidad del agua o descender su pH. Si las microalgas que proliferan son productoras de toxinas,

pueden ocurrir trastornos al ser ingeridas por diferentes organismos de la cadena trófica, que actúan como bioacumuladores de las toxinas, y como vectores que las transfieren a niveles superiores de la cadena (Peraza y Moreira, 2012).

Según Sar *et al.* (2002) los síndromes más conocidos causados por microalgas son la “Intoxicación Paralizante por Marisco” (PSP, por sus siglas en inglés), la “Intoxicación Diarreica por Marisco” (DSP, por sus siglas en inglés), la “Intoxicación Amnésica por Marisco” (ASP, por sus siglas en inglés), la “Intoxicación Neurotóxica por Marisco” (NSP, por sus siglas en inglés) y la “Intoxicación Ciguatérica de Pescado” (CFP, por sus siglas en inglés). Esta última es la forma más común de intoxicación derivada de las floraciones algales nocivas (Parsons *et al.*, 2017).

En las últimas décadas se ha evidenciado un incremento aparente en intensidad, duración y distribución geográfica de las FANs y según algunos autores esta tendencia debe intensificarse con el cambio climático (Shears y Ross, 2009). Debemos deducir que el incremento es “aparente”, pues para probar con rigor científico que es real, se requieren series históricas de datos de fitoplancton y de condiciones ambientales de las que se dispone en muy pocas partes del mundo. Esta situación ha provocado un aumento de las investigaciones en este campo del conocimiento, lo que ha traído como consecuencia que se tome conciencia en la necesidad de establecer una mayor cantidad de programas de monitoreo de microalgas tóxicas y ficotoxinas (Sar *et al.*, 2002).

2.2 Dinoflagelados bentónicos tecados potencialmente tóxicos y sus efectos

Los dinoflagelados representan un grupo exitoso de protistas unicelulares que combinan estrategias fotosintéticas, heterotróficas e incluso parásitas. Su gran diversidad de formas, estilos de vida y mecanismos de dispersión les han permitido colonizar la mayoría de los ambientes acuáticos. Así, se pueden encontrar tanto en ambientes dulceacuícolas como marinos, formando parte del medio pelágico o bentónico. El grupo comprende especies con una pared celular celulósica de múltiples placas denominada teca, pertenecientes a los órdenes Prorocentrales, Dinophysiales y Gonyaulacales, mientras que los órdenes Gymnodiniales y Noctilucales son atecados o desnudos (Taylor, 1987).

Dentro de los criterios fundamentales que se utilizan para la descripción de los dinoflagelados están el tamaño y forma celular, ornamentación de la superficie (poros, espinas, hendiduras), presencia o no de teca, punto de origen del flagelo (dinoconta,

cuando un flagelo parte del lado ventral; desmoconta, cuando ambos flagelos parten del terminal anterior), posición del surco transversal, entre otros. Es frecuente el uso de la terminología orientacional. La región que queda delante, indicando el rumbo del movimiento del organismo se denomina polo apical, la región opuesta es el polo antapical (Hallegraeff *et al.*, 2004).

Los principales géneros tecados epibentónicos productores de toxinas son *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* (Taylor *et al.*, 2004).

2.2.1 Género *Gambierdiscus*

Las especies del género *Gambierdiscus* son exclusivamente marinas y presentan una distribución pantropical entre 34°S y 35°N encontrándose en todo el Caribe, las Islas Hawaianas, la Polinesia Francesa, Australia y en el Océano Índico. Además *Gambierdiscus* ha sido encontrando en el Golfo de México de Texas y en Carolina del Norte (Litaker *et al.*, 2009). Desde el punto de vista morfológico son aplanadas anteroposteriormente, de forma lenticular, el poro apical es pequeño y en forma de gancho (Fraga *et al.*, 2011).

El criterio principal usado para diferenciar entre especies *Gambierdiscus* es su morfología tecal específica, pues los detalles de las placas constituyen una útil, conservada y esencial evidencia para la identificación de especies. Sin embargo el reconocimiento de especies basado en su morfología es complicado debido al parecido morfológico de las células dentro de este género. La combinación de análisis morfológicos y moleculares basados en genes de ARN ribosomal (ARNr) son más efectivos para la distinción entre las especies de *Gambierdiscus* (Zhang *et al.*, 2016).

Hasta la fecha se han descrito 16 especies de *Gambierdiscus* (Berdalet *et al.*, 2017). Comparaciones de secuencias ribosomales permitieron a Litaker *et al.* (2009) esclarecer las relaciones filogenéticas entre *G. australes* Chinain & Faust, *G. belizeanus* Faust, *G. caribaeus* Litaker *et al.*, *G. carolinianus* Litaker *et al.*, *G. carpenteri* Litaker *et al.*, *G. pacificus* Chinain & Faust, *G. polynesiensis* Chinain & Faust, *G. ruetzleri* Litaker *et al.*, *G. toxicus* Adachi & Fukuyo, *G. yasumotoi* Holmes, y dos ribotipos (1 y 2), los cuales pueden representar nuevas especies. Desde entonces, seis especies adicionales han sido descritas: *G. excentricus* Fraga, *G. silvae* Fraga & Rodríguez (*G.* ribotipo 1) (Fraga *et al.*, 2011; Fraga y Rodríguez, 2014), *G. scabrosus* Nishimura *et al.* (Nishimura *et al.*, 2014), *G. balechii* (Fraga *et al.*, 2016) *G. cheloniae* Smith (Smith *et al.*, 2016), *G. lapillus* Kretzschmar

(Kretzschmar *et al.*, 2017). Recientemente, especies globulares fueron transferidas a un nuevo género, *Fukuyoa*, que ahora incluye las anteriores especies *G. ruetzleri*, y *G. yasumotoi*, más una nueva especie, *F. paulensis* (Gómez *et al.*, 2015).

Las especies *G. ruetzleri*, *G. carolinianus*, *G. excentricus* y *G. belizeanus* se encuentran distribuidas en el Océano Atlántico, mientras que *G. polynesiensis*, *G. toxicus*, *G. yasumotoi*, *G. pacificus* y *G. australes* son endémicos del Pacífico. Por otro lado *G. carpenteri* y *G. caribeaus* pueden encontrarse en ambos océanos (Litaker *et al.*, 2010). Teniendo en consideración que la distribución global de estos microorganismos se encuentra actualmente en expansión, es probable que en futuras investigaciones sean descubiertas especies endémicas de un lugar en otras regiones.

Los dinoflagelados del género *Gambierdiscus* producen potentes neurotoxinas conocidas como ciguatoxinas y maitotoxinas (Holland *et al.*, 2013; Friedman *et al.*, 2017). La ciguatoxina (CTX) es lipofílica y se bioacumula en la cadena trófica causando CFP, lo cual es, globalmente, la causa más común de envenenamiento no bacteriano asociado a la ingestión de pescado (Fraga *et al.*, 2011; Fraga y Rodríguez, 2014; Friedman *et al.*, 2017), afectando al menos de 50 000 a 500 000 personas anualmente y constituyendo el mayor problema de salud en muchas regiones tropicales (Litaker *et al.*, 2009). Algunas investigaciones han mostrado que la ciguatoxina causa interrupciones en las funciones gastrointestinal, cardiovascular y neurológicas, con síntomas que van desde ligeros a severos y ocasionalmente resultando en la muerte (Friedman *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Las maitotoxinas (MTX) son solubles en agua y se encuentran entre los compuestos naturales más tóxicos conocidos. Las MTX no se consideraban relacionadas con la CFP, sin embargo evidencias experimentales recientes sugieren que las MTX pueden acumularse en la carne de pescado, al menos transitoriamente, por lo que el rol de las MTX en la causa de CFP debería ser reexaminado (Holland *et al.*, 2013; Friedman *et al.*, 2017).

La ocurrencia de CFP es espacial y temporalmente impredecible. La razón de esta variabilidad no es bien entendida (Litaker *et al.*, 2009), sin embargo existen evidencias que sugieren que los incidentes de CFP incrementan cuando los sistemas arrecifales han sido perturbados por huracanes o después de una elevación significativa en la temperatura del agua (Kohler y Kohler, 1992; Hales *et al.*, 1999; Chateau-Degat *et al.*, 2005). Se cree que este aumento de registros de ciguatera está relacionado con el incremento de la abundancia total de especies tóxicas del género *Gambierdiscus*, debido a disturbios naturales y/o

antropogénicos que alteran la estructura de las comunidades bentónicas (Holland *et al.*, 2013).

Algunos estudios recientes plantean que las condiciones de temperatura y salinidad óptimas y tolerables varían entre las diferentes especies de *Gambierdiscus*, y consideran que las interacciones temperatura-salinidad pueden jugar un papel importante en la dinámica del florecimiento y distribución de especies de *Gambierdiscus* (Yoshimatsu *et al.*, 2014).

2.2.2 Género *Ostreopsis*

Ostreopsis es uno de los dos géneros (el otro género es *Coolia*) de la familia Ostropsidaceae. Hasta la fecha el género comprende nueve especies. La especie tipo, *Ostreopsis siamensis* Schmidt, fue descrita por primera vez en el Golfo de Siam (Tailandia) en 1901, pero fue grandemente pasada por alto hasta los 1970s y 1980s, desde entonces el género ha sido encontrado ampliamente distribuido, con más reportes de florecimientos en nuevos lugares (Rhodes, 2011).

Debido a la alta variabilidad morfológica de los especímenes, la identificación de especies por microscopía óptica es extremadamente difícil, por lo que varios estudios han usado datos moleculares en combinación con información morfométrica para esclarecer la determinación de especies de *Ostreopsis* (Tawong *et al.*, 2014). Actualmente, la taxonomía de *Ostreopsis* spp. se basa primariamente en el tamaño y forma de la célula, el largo de la placa Po, el tamaño de los poros de la teca y la forma de la placa 1p. (Selina y Orlova, 2010).

La taxonomía de *Ostreopsis* requiere mayor revisión, debido a la falta de caracterización genética y a que la alta variabilidad de la morfología de las especies no es bien entendida.

Algunas especies tóxicas reconocidas son; *Ostreopsis heptagona* Norris; *Ostreopsis labens* Faust & Morton; *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo; *Ostreopsis siamensis* Schmidt; *Ostreopsis mascarenensis* Quod; *Ostreopsis ovata* Fukuyo. Existen otras especies de las que se desconoce actualmente su toxicidad; *Ostreopsis belizeanus* Faust; *Ostreopsis caribbeanus* Faust y *Ostreopsis marinus* Faust (Rhodes, 2011; Berdalet *et al.*, 2017). Recientemente se ha identificado la nueva especie *Ostreopsis fattorussoi* Accoroni a partir aislados obtenidos en la costa de Lévano (Accoroni *et al.*, 2016).

Las especies del género *Ostreopsis* son componentes de la microflora epífita/bentónica (Rhodes, 2011), y son generalmente conocidas por vivir adheridas a sustratos bentónicos como macroalgas, rocas y/o sedimentos blandos. Frecuentemente coexiste con los géneros *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Prorocentrum*, y/o *Amphidinium*. El género ha sido registrado en áreas tropicales y subtropicales, pero la distribución mundial del mismo se ha expandido marcadamente en la última década y esta tendencia es probable que continúe; recientemente se ha registrado a *Ostreopsis* en regiones templadas (Tawong *et al.*, 2014).

Las especies de *Ostreopsis* han sido consideradas especies nocivas, las cuales pueden producir palytoxinas (PLTX), uno de los compuestos marinos más tóxicos conocidos (Ciminiello *et al.*, 2014). Los florecimientos más intensivos de *Ostreopsis* han ocurrido esporádicamente alrededor del mar Mediterráneo, causando irritaciones en la piel y los ojos, enfermedades respiratorias y contaminación de mariscos (Tawong *et al.*, 2014). Estos florecimientos son causas de preocupación económica, ambiental y de salud, particularmente cuando afectan especies comestibles de relevancia comercial que, adicionalmente, juegan un papel ecológico clave, con efecto cascada a través de todo el ecosistema (Privitera *et al.*, 2012).

La PLTX es un compuesto tóxico marino cuya función biológica principal está relacionada con la Na^+/K^+ -ATPasa, una bomba de la membrana plasmática involucrada en el mantenimiento de los gradientes iónicos transmembranales de células animales, esencial para el desarrollo de la función celular. Las intoxicaciones humanas pueden ser por contacto directo (dermatitis), por inhalación de gotas de agua que contienen células de *Ostreopsis* y/o respiración directa de la toxina (Privitera *et al.*, 2012).

Las PLTX pueden ser extraídas de mariscos y de peces pequeños y han sido vinculadas al clupeotoxismo, una enfermedad que puede llegar a ser fatal para el humano (Shears y Ross, 2009). Este envenenamiento es causado por el consumo de peces de la familia *Clupeidae*, entre los que se encuentran sardinas y arenques o anchoas (familia *Engraulidae*) (Randall, 2005).

Se plantea que el primer síntoma de envenenamiento por clupeotoxismo es un sabor metálico sostenido, el cual se presenta inmediatamente después de la ingestión del pez. Esto es seguido por náuseas, sequedad de la boca, vómitos, malestar, dolor abdominal y diarreas. La alteración gastro-intestinal puede estar acompañado por taquicardia, escalofríos, piel viscosa, vértigo, cianosis y otras evidencias de colapso vascular. Dentro de

un periodo corto de tiempo una variedad de disturbios neurológicos suceden rápidamente como nerviosismo, dilatación de las pupilas, fuertes dolores de cabeza, entumecimiento, hipersalivación, calambres y progresiva parálisis muscular, convulsiones, coma y termina en la muerte (Randall, 2005).

Ostreopsis es uno de los cinco géneros de dinoflagelados epibentónicos que han sido encontrado en regiones ciguatéricas tropicales, coexistiendo con el género *Gambierdiscus*, por lo que algunos autores hasta hace poco lo implicaron además con la intoxicación ciguatérica de pescado (Shears y Ross, 2009; Selina y Orlova, 2010).

2.2.3 Género *Prorocentrum*

Los dinoflagelados del género *Prorocentrum* difieren distintivamente en la morfología de otros géneros de la clase Dinophyceae. Ellos poseen una teca compuesta por dos placas grandes que se unen en una sutura sagital, y un pequeño grupo apical de 8 a 14 plaquetas periflagelares. *Prorocentrum* pertenece a la subclase Prorocentrophycideae, orden Prorocentrales, Familia Prorocentraceae, la cual comprende otros géneros como *Haplodinium* y *Mesoporos* (Chomerat et al., 2011).

El género *Prorocentrum* es el más grande de la familia y comprende cerca de 60 especies plantónicas, bentónicas o epibentónicas. En contraste con otros dinoflagelados bentónicos y/o epífitos, como *Gambierdiscus* y *Ostreopsis*, que están confinados a aguas tropicales, subtropicales y templadas (Litaker et al., 2009; Tawong et al., 2014), las especies de *Prorocentrum* parecen ser cosmopolitas (Aligizaki et al., 2009).

La identificación morfológica de especies bentónicas de *Prorocentrum* es una tarea difícil, generalmente requiere de microscopía electrónica para un examen detallado de las placas y de la ultraestructura de la célula. Algunas de las características examinadas en detalle a través de la microscopía electrónica son el número, forma, disposición y superficie de las placas, el número y disposición de las plaquetas periflagelares y la presencia o no de prominencias (Aligizaki et al., 2009).

Algunas especies de *Ostreopsis* se han relacionado además con la producción de toxinas como ácido okadaico (AO), dinophysistoxinas (DST), borbotoxinas y otras toxinas de acción rápida no caracterizadas hasta el momento (Aligizaki et al., 2009; Chomerat et al., 2011). Debido a esta producción de AO junto con DSTs, especies de *Prorocentrum* como *P. lima* inducen síntomas diarreicos por la acción de una potente enzima fosfatasa inhibidora de

procesos metabólicos. La exposición crónica a estas toxinas se cree que estimula tumores gastrointestinales (Giussani *et al.*, 2017).

La diversidad conocida de las especies bentónicas de *Prorocentrum* se ha incrementado considerablemente durante los últimos veinte años, en particular en áreas tropicales donde varias especies nuevas fueron descritas en hábitats bentónicos. Hasta hace poco el género *Prorocentrum* era raramente mencionado en estudios que comprendieran especies bentónicas, y *Prorocentrum lima* Ehrenberg era la única especie reportada (Aligizaki *et al.*, 2009; Chomerat *et al.*, 2011; Mangialajo *et al.*, 2017). Recientemente más estudios han descrito otras especies bentónicas como *Prorocentrum glenanicum* Chomerat & Nézan, *Prorocentrum pseudopanamense* Chomerat & Nézan, *Prorocentrum clipeus* Hoppenrath, *Prorocentrum tsawwassenense* Hoppenrath & Leander y *Prorocentrum consutum* Chomerat & Nézan (Chomerat *et al.*, 2011).

2.3 Métodos de muestreo para la cuantificación de la abundancia de dinoflagelados epibentónicos

Las alarmantes floraciones de algas bentónicas nocivas se están incrementando en la medida que nuevas especies han sido identificadas en nuevas áreas. Esto conlleva a que aumente también la necesidad de implementar actividades de monitoreo. Sin embargo, siguen sin determinarse acuerdos generales de estrategias apropiadas a seguir (Giussani *et al.*, 2017).

En lugares donde estas floraciones son más intensas, como en el Mediterráneo, se ha incrementado el monitoreo de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos siendo hasta ahora, la toma de muestras de agua y la colecta de macrófitas (esta última para cuantificar la abundancia de las microalgas), las estrategias más comúnmente aplicadas (Giussani *et al.*, 2017). Debido a que la cuantificación de microalgas bentónicas es más difícil de estandarizar por las escalas de variabilidad espacial y temporal de los sistemas bentónicos, diferentes métodos de muestreo están siendo analizados (Geohab, 2012; Tester *et al.*, 2014; Jauzein *et al.*, 2016). La falta de un método de muestreo apropiado y estandarizado puede provocar problemas de mediciones incorrectas de abundancia y en comparaciones entre diferentes lugares (Giussani *et al.*, 2017).

Tradicionalmente la abundancia de dinoflagelados bentónicos ha sido cuantificada a través de la colecta de macrófitas. La abundancia usando este método se expresa en células g⁻¹

de macroalga húmeda. Sin embargo en varios estudios se han reportado preferencias de células de dinoflagelados bentónicos tóxicos por alguna especie o grupo de macroalgas (Okolodkov *et al.*, 2007; Parsons y Preskitt, 2007; Totti *et al.*, 2010).

Por otro lado los sustratos colectados generalmente poseen morfologías complejas con un amplio rango de superficie en proporción a la masa, lo que provoca imprecisiones al realizar comparaciones en la abundancia de células entre diferentes sustratos y desiguales sitios de estudio. Según Tester *et al.*, (2014) desde hace ya varios años se ha identificado la necesidad de normalizar la abundancia de estas células a superficie de alga (células/cm²) preferible a masa de alga (células/g de alga húmeda), aunque medir el área de las macrófitas resulta realmente difícil y por lo general muy poco práctico. Esto se evidencia en el estudio realizado por Lobel *et al.*, (1988), donde reporta que las densidades de *Gambierdiscus* fueron aproximadamente 1.5 veces mayor en feofitas que en rodofitas cuando las calculó como células g⁻¹ de macroalga húmeda, sin embargo fueron aproximadamente un 40% menor en feofitas cuando calculó la densidad basada en la superficie de alga células cm⁻² de alga.

La colecta de macrófitas trae consigo también problemas de destrucción de hábitats. Otro inconveniente inherente a este método consiste en la distribución de macroalgas en tiempo y espacio, lo que puede limitar este tipo de estudio en algunos sitios debido a la escasez de macroalgas. A estas contrariedades se añade que peces y otros invertebrados herbívoros pueden remover más células de unas macrófitas con respecto a otras, debido a posibles preferencias alimentarias (Parsons *et al.*, 2017).

Como alternativa al método de macrófitas recientemente algunos investigadores han comenzado a usar sustratos artificiales para determinar la abundancia de dinoflagelados epibentónicos (Geohab, 2012; Tester *et al.*, 2014; Jauzein *et al.*, 2016). El uso de sustratos artificiales como un potencial método de muestreo se basa en observaciones de campo, que muestran que especies de dinoflagelados epibentónicos migran en la columna de agua y colonizan nuevos sustratos en distancias cortas (Geohab, 2012).

El uso de sustratos artificiales para estimar la abundancia de dinoflagelados epibentónicos presenta numerosas ventajas, dentro de las que se destacan el uso de una unidad de medida estandarizada para normalizar la densidad de dinoflagelados de forma global y en hábitats variados, la eliminación del muestreo destructivo de macrófitas, la obtención de muestras más limpias lo que facilita el conteo de células y los análisis moleculares

posteriores, y se eliminan dificultades asociadas con la distribución discontinua y variabilidad de especies de macrófitas, hecho relacionado además con el pastoreo por los peces u otro tipo de fauna. Por otra parte el uso de sustratos neutros elimina, de existir, la preferencia de los dinoflagelados por las macroalgas (Tester *et al.*, 2014).

En contraposición, la principal desventaja que presenta este novedoso método es que el sitio de muestreo debe ser visitado dos veces, una para colocar los sustratos y otra para retirarlos (Tester *et al.*, 2014). Además existen algunas reservas debido a que este método colecta células de microalgas suspendidas, fuera del contacto directo con las poblaciones bentónicas. Sin embargo en el caso particular de las floraciones de *Ostreopsis*, varios estudios reportan significantes correlaciones positivas entre concentraciones de células de *Ostreopsis* spp. en la columna de agua y en macrófitas (Vila *et al.*, 2001; Aligizaki y Nikolaidis, 2006; Mangialajo *et al.*, 2011).

Varios tipos de materiales (utilizados como sustrato artificial) han sido probados para el monitoreo de BHABs (Fig. 1). El estudio de Tester *et al.* (2014) describe un dispositivo con el uso de mallas de fibra de vidrio que permite una fácil y precisa estandarización de la abundancia de células a un área previamente conocida. Mediante la implementación de piezas de mallas de fibra de vidrio en la columna de agua, se puede coleccionar eficientemente células de dinoflagelados bentónicos tóxicos después de 24 horas de incubación, debido a que en este tiempo, se alcanza un equilibrio entre las tasas de inmigración y emigración (Jauzein *et al.*, 2016).

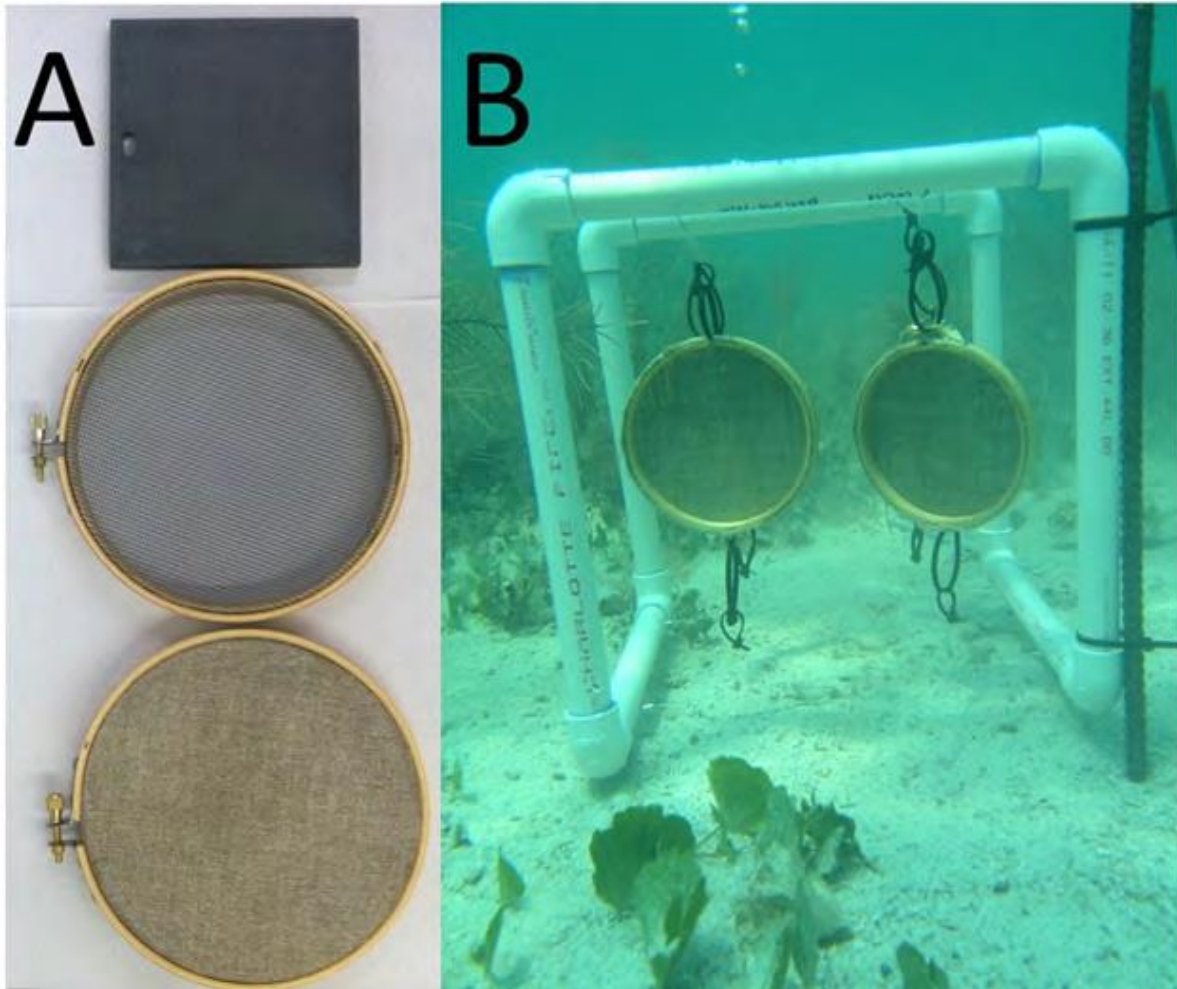


Figura 1. Imágenes de sustratos artificiales empleados para la cuantificación de abundancia de dinoflagelados bentónicos, (A) baldosa, malla, tela (de arriba hacia a abajo), (B) dispositivo fabricado para el despliegue de sustratos artificiales. Tomado de (Parsons *et al.*, 2017).

Recientemente, en el estudio de Jauzein *et al.* (2016) se han definido algunas optimizaciones sustanciales al protocolo definido por Tester *et al.* (2014), dentro de las cuales está el uso de mallas más pequeñas (en casos del monitoreo de un BHAB, pues donde hay bajas concentraciones de microalgas es preferible mallas grandes), la fijación de las mallas por ambos lados y la utilización de un marco rígido (Fig. 2). Según Jauzein *et al.* (2016) de esta forma se evita cualquier disturbio físico durante la incubación, reduciéndose el riesgo de perder células durante este período. Además con la utilización de un marco rígido se mantiene el sustrato artificial perpendicular al flujo de agua y no moviéndose libremente, lo que ayuda a que la colecta de células sea más eficiente.

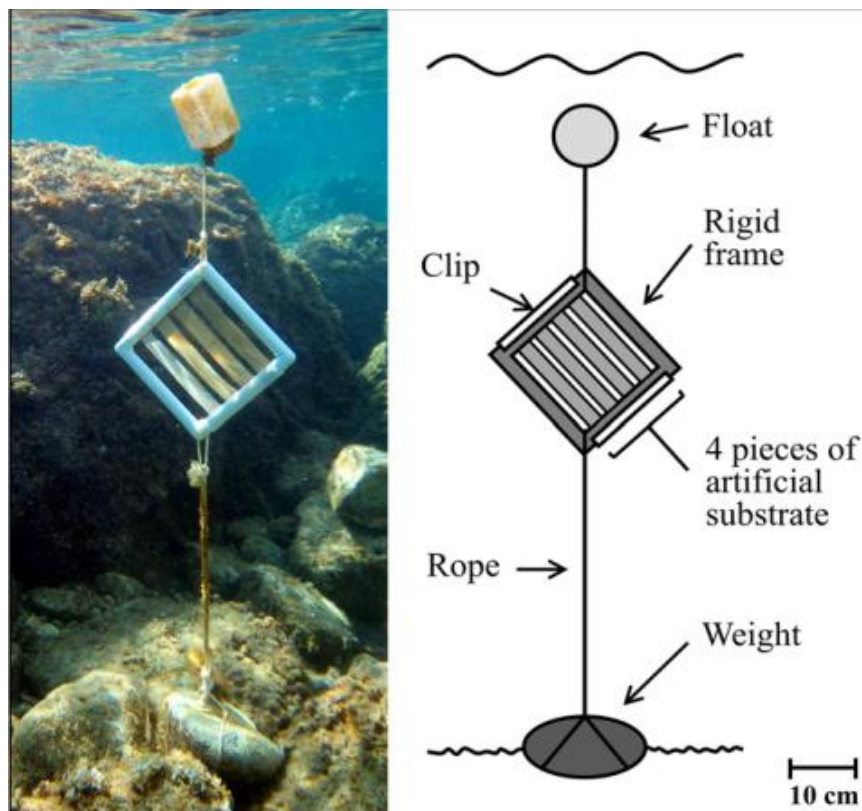


Figura 2. Descripción del mecanismo (optimizado) usado para la implementación de sustratos artificiales en el campo (Jauzein *et al.*, 2016).

Algunos experimentos realizados han probado la influencia del tamaño de los poros de las mallas de fibra de vidrio, definiendo una porosidad óptima que varía de 1mm a 3mm. Una porosidad inferior puede representar un obstáculo para el flujo de agua que puede rodear la malla, en lugar de atravesarla, limitando la potencialidad de la colecta de células de microalgas (Jauzein *et al.*, 2016).

En el estudio realizado por Parsons *et al.*, (2017) se plantea que el despliegue de sustratos artificiales presenta debilidades inherentes que impiden su uso efectivo a gran escala. Los autores concluyen que la densidad de células de *Gambierdiscus* en sustratos artificiales no se correlaciona consecuentemente con la densidad de células en macrófitas, limitando la utilidad de sustratos artificiales para propósitos de cuantificación. Los autores recomiendan evaluar uno de los sustratos artificiales en un sitio específico para determinar si es posible una relación significativa con una o varias macrófitas. Aun así, alertan que se debe tener extremo cuidado en la interpretación de los datos recogidos del despliegue de sustratos artificiales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Los sitios escogidos para realizar el estudio se localizaron en zonas costeras de la región sur central de Cuba (Fig. 3). El área lo compone puntos específicos de la cayería sur perteneciente a La Isla de la Juventud y Matanzas (Cayo Largo del Sur, Cayo Guano del este, y Cayo Trabuco) y de la costa sur de Cienfuegos (ensenada Guajimico y Mangles Altos) (Tabla I). Se seleccionaron estos sitios respondiendo a estudios previos donde se capturaron peces con concentraciones de ciguatoxinas significativas y por informes de brotes de ciguatera según informaciones locales. Los muestreos se realizaron durante el mes de diciembre del 2016.

Tabla I. Coordenadas de los puntos de muestreo seleccionados para la cuantificación de la abundancia de dinoflagelados béntonicos potencialmente tóxicos. Región sur central de Cuba.

Puntos de Muestreo	Coordenadas
Puntalón 20m	N21°34.865' W80°52.800'
Puntalón 10m	N21°38.229' W81°00.996'
Cayo Guano 10m	N21°39.325' W81°02.335'
Cayo Trabuco 20m	N21°37.487' W81°04.718'
Cayo Guano 5m	N21°40.220' W81°02.315'
Cayo Largo Manglar	N21°37.000' W81°35.000'
Mangles Altos	N22°3.000' W80°30.000'
Guajimico	N21°55.000' W80°18.000'

En la cayería sur se establecieron seis puntos de muestreo: cuatro en los alrededores de Cayo Guano del Este (Puntalón 20m, Puntalón 10m, Cayo Guano 10m y Cayo Guano 5m), uno en Cayo Trabuco (Cayo Trabuco 20m) y uno en Cayo Largo del Sur (Cayo Largo Manglar). En el punto Puntalón 20m fue característico la presencia de camellones de 4m de ancho por 2m de altura. En el fondo marino predominaron corales y gorgonias, con gran abundancia de macroalgas. El punto Cayo Trabuco 20m fue un sitio con características muy similares a Puntalón 20m. Los puntos Cayo Guano 10m y Puntalón 10m eran de fondo rocoso, con menos relieve que los puntos Puntalón 20m y Cayo Trabuco 20m, predominio de macroalgas como *Dictyota* sp. y *Sargassum* sp., y presencia también de corales y

gorgonias. En el punto Cayo Guano 10m la cobertura de macroalgas fue superior y abundante la presencia de peces herbívoros. El punto Cayo Guano 5m se caracterizó por ser un sitio plano (poco relieve), poco profundo y altamente energético, con presencia de corales aislados y gorgonias pequeñas.



Figura 3. Región sur central de Cuba. Puntos de muestreo seleccionados para la cuantificación de la abundancia de dinoflagelados bénticos potencialmente tóxicos

Los puntos de la costa cienfueguera fueron la ensenada Guajimico y un punto costero perteneciente a la ensenada Mangles Altos. El punto Guajimico tenía una profundidad de 3 m y era característico el fondo de arrecife con relieve calcáreo muy heterogéneo, con macroalgas predominantes de los géneros *Lobophora* y *Dictyota*. El punto Mangles Altos era de fondo arrecifal con relieve calcáreo de distinta morfología, las macroalgas que más predominaban eran de los géneros *Lobophora*, *Halimeda* y *Dictyota*.

3.1. Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos

Para la obtención y el procesamiento de las muestras se utilizó la metodología planteada por Tester *et al.* (2014). En cada punto de muestreo de la cayería sur y en el punto Mangles

Altos se desplegaron cuatro piezas de malla de fibra de vidrio (utilizadas como sustrato artificial), de 17 cm de largo y 11 cm de ancho (fig. 4). Las mallas se ubicaron sobre el placer de macroalgas, separadas entre 1.5 – 2.0 m aproximadamente. De los puntos Puntalón 20m, Puntalón 10m, Cayo Trabuco 20m y Cayo Guano 10m se extrajo además una muestra de macroalga (colectada en un área inmediatamente adyacente a los sustratos artificiales desplegados), para la determinación de la abundancia en sustrato natural.

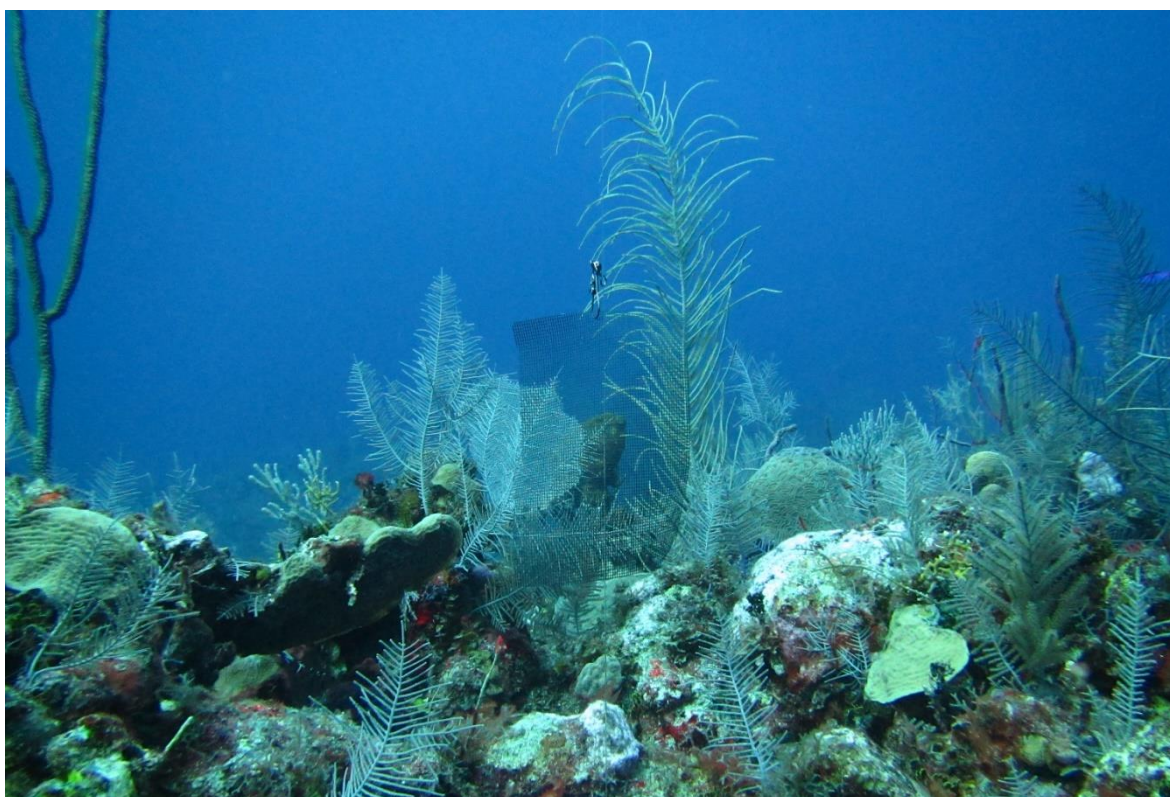


Figura 4. Malla de fibra de vidrio utilizada como sustrato artificial para la cuantificación de dinoflagelados bentónicos tóxicos.

3.1.1 Abundancia determinada con sustratos artificiales

Cada malla se ató a un nylon de pesca y se colocó en la columna de agua a unos 20 cm aproximadamente del fondo marino. Para mantenerlas a esa distancia se ataron a un peso muerto por un extremo del nylon y por el otro a una boya, usados para evitar disturbios en la malla (Fig. 5a). Las mallas se colocaron durante un periodo de 24 horas para luego ser recogidas en frascos de cristal.

El área de superficie de las mallas (Fig. 5b) se estimó usando el número de filamentos por los que está compuesto la malla en las direcciones X y Y, y el área de superficie de cada filamento, a través de la expresión $A_{\text{malla}} = A_x N_x + A_y N_y - N_x N_y 16r^2$, donde A_x es el área de cada filamento en la dirección X, A_y es el área de cada filamento en la dirección Y, y N_x y N_y son el número de filamentos en las direcciones X y Y respectivamente. La expresión $N_x N_y 16r^2$ representa el área de superficie de intersecciones de los filamentos (Tester *et al.*, 2014). El área de los filamentos se calculó como el área de un cilindro con la fórmula $2\pi rL$, donde r representa el radio del filamento y L su longitud.

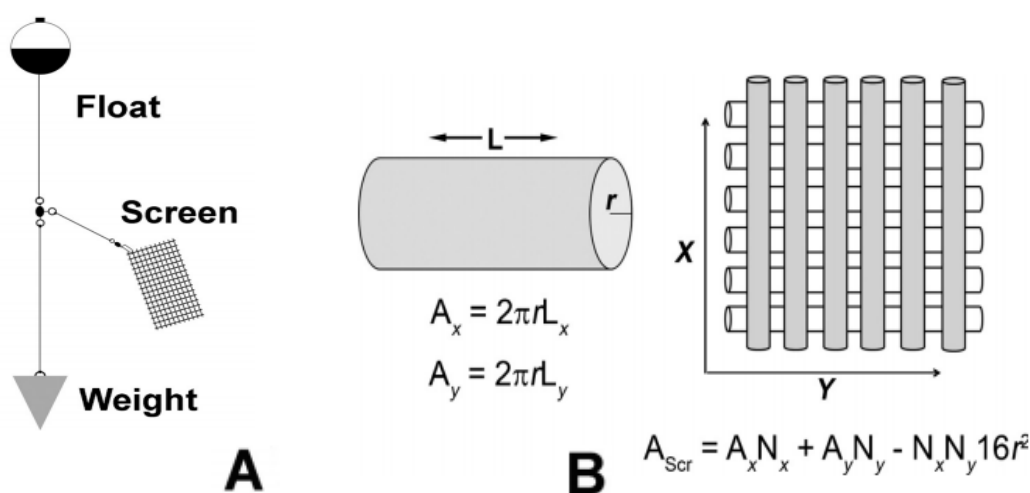


Figura 5. Materiales usados para la cuantificación de la abundancia de microalgas bentónicas usando sustratos artificiales (Tester *et al.*, 2014). (A) Ensamblaje para el muestreo con mallas de fibra de vidrio, construido con una boya, un peso muerto y un nylon de pesca. (B) Esquema del material de la malla para la determinación del área de superficie. El área de superficie es determinada considerando los filamentos de la malla con radio r , la longitud en las direcciones X (L_x) y Y (L_y), el número de filamentos N_x y N_y respectivamente y las áreas de los filamentos (A_x y A_y).

Las mallas se extrajeron del medio en frascos de cristal de forma rápida y sin movimientos bruscos para evitar el desprendimiento de los dinoflagelados. Las muestras se mantuvieron en un lugar oscuro a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio.

Procesamiento de las muestras

Se extrajo aproximadamente un 20% del contenido del agua de mar de los frascos donde se encontraban las mallas colectadas (este volumen no se desechó), se agitó el recipiente

de cristal vigorosamente (10 a 15 segundos) para permitir el desprendimiento de los dinoflagelados asociados a las mallas. Posteriormente las mallas se separaron y desecharon. Toda el agua de mar colectada de cada frasco se filtró a través de una malla de 180 μm a un cilindro graduado y se anotaron sus volúmenes. De esta forma se eliminaron los sedimentos gruesos u otros materiales grandes de la muestra.

Para colectar las células de dinoflagelados las muestras de agua de mar filtradas se re-homogenizaron y se filtraron a través de una malla de nylon de 47 mm de diámetro con poros de 20 μm , usando una bomba de mano. Se anotó el volumen filtrado en los casos en que la malla fue insuficiente para filtrar toda la muestra. La malla se transfirió a un tubo de 40 mL de agua de mar filtrada conteniendo aproximadamente 5-7 gotas de lugol para fijar la muestra.

La identificación de género y conteo de los dinoflagelados se realizó usando el microscopio invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Cada muestra fijada se agitó para homogenizar las células suspendidas y una alícuota de 1 mL se transfirió a una cámara de conteo de Sedgwick Rafter. Este proceso se realizó tres veces para cada réplica.

Para determinar la densidad de dinoflagelados en cada género, se calculó la media del número de células contadas en cada réplica y se procedió a determinar la densidad multiplicando el resultado de la media de células contadas en 1mL por el volumen de la muestra en el tubo. Este resultado se multiplicó por la razón entre el volumen total de la muestra y el volumen filtrado y posteriormente se dividió entre el área de la malla usada como sustrato (previamente calculada). El resultado final se expresó en células 100 cm^{-2} .

3.1.2 Abundancia determinada con sustratos naturales

De los puntos Puntalón 20m, Puntalón 10m, Cayo Trabuco 20m y Cayo Guano 10m se extrajo una muestra de macroalga para determinar la abundancia en células g^{-1} de macrófita húmeda. Las macrófitas se extrajeron del medio en frascos de cristal de forma rápida y sin movimientos bruscos para evitar el desprendimiento de los dinoflagelados. Las muestras se mantuvieron en un lugar oscuro a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio.

Procesamiento de las muestras:

La metodología para el procesamiento de las muestras colectadas en las macrófitas es similar que con los sustratos artificiales, excepto que en el cálculo de la densidad se divide

entre la masa de la macrófita húmeda (determinada anteriormente) en lugar de dividirlo por el área de la malla. De esta forma el resultado final es la estimación del número de células g^{-1} de macrófita húmeda.

3.2 Determinación de la diversidad de especies de *Gambierdiscus* spp.

En la ensenada Guajimico se desplegaron seis mallas con las mismas dimensiones y usando la misma metodología que en los puntos de la cayería sur. Las muestras tomadas a partir de estas mallas junto con submuestras fijadas (10 mL) de la cayería sur, fueron utilizadas para la identificación y cuantificación de las especies de *Gambierdiscus* en esos sitios.

Todas estas muestras fueron procesadas para su análisis molecular en “The National Oceanic and Atmospheric Administration, National Centers for Coastal Ocean Science Laboratory in Beaufort, NC USA”, usando los métodos descritos por Vandersea *et al.* (2012). De cada una de las muestras se filtraron 10 mL con filtros de policarbonato Nucleopore™ de 47 mm de diámetro y tamaño de poro 8 μm (Whatman, Clifton, NJ, USA). El ADN se extrajo de cada filtro utilizando el Kit de Aislamiento Mo Bio Laboratories Power Soil DNA (Mo Bio Laboratories Solana Beach, CA, USA) atendiendo al protocolo del fabricante, excepto que se procesaron 350 μL de lisado celular en lugar de los 450 μL descritos en el protocolo. Los extractos de ADN fueron eluidos desde las mini columnas usando 50 μL de buffer de elución y se preservaron a 4°C hasta su posterior amplificación.

El ADN fue analizado para la presencia de *Gambierdiscus belizeanus*, *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, *G. carpenteri*, *G. silvae*, *G. excentricus* y *G. sp.* ribotipo 2 (especies identificadas para la región del Caribe), usando el ensayo semicuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) descrito en Vandersea *et al.* (2012) y que utiliza primers específicos para cada especie. La construcción de las curvas estándar, el set de primers de qPCR, reactivos y las condiciones de amplificación fueron idénticos a lo descrito en dicho artículo.

Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas en la abundancia de células de dinoflagelados entre los géneros y en cada sitio se realizó un análisis ANOVA por rangos de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Para comparar la diversidad de especies de *Gambierdiscus* entre los sitios se

creó un mapa de localizaciones de especies utilizando el software ArcGIS (v.10.1, Esri, Inc. Redlands, California, USA). Se efectuó una prueba de la U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para detectar si existían diferencias entre la abundancia determinada por microscopía de luz y la abundancia determinada por ensayos de qPCR. El análisis estadístico se realizó utilizando el software STATISTICA v12.001.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos

Se identificaron tres géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos en todos los sitios de estudios: *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, tanto en sustratos naturales como artificiales.

4.1.1 Abundancia determinada con sustratos artificiales

Los géneros *Ostreopsis* y *Prorocentrum* presentaron una abundancia superior al género *Gambierdiscus*, que mostró valores de abundancia muy bajos en todos los puntos (Tabla II).

Tabla II. Medias de las abundancias estimadas de los géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos identificados en la región sur central de Cuba.

Puntos de Muestreo	Abundancia (cel.100cm ⁻²)		
	<i>Gambierdiscus</i>	<i>Prorocentrum</i>	<i>Ostreopsis</i>
Puntalón 20m	16	365	167
Puntalón 10m	12	2231	4960
Cayo Guano 10m	54	5568	1697
Cayo Trabuco 20m	32	375	6707
Cayo Guano 5m	141	3358	2106
Cayo Largo Manglar	70	1201	112
Mangles Altos	13	4093	973

El análisis por rangos de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre las abundancias de los géneros ($p=0.00$). *Prorocentrum* fue el género más abundante con una media de 2437 cel.100 cm⁻², seguido de *Ostreopsis* con una media de 2284 cel.100 cm⁻² y *Gambierdiscus* con media de 47 cel.100 cm⁻² (Fig. 6).

Los valores más bajos de abundancia lo mostró el punto Puntalón 20m con valores entre 465 y 626 cel.100cm⁻², mientras que los valores más elevados se observaron en los puntos Puntalón 10m, Cayo Guano 10m y Cayo Trabuco 20m con valores entre 4000 y 12675

cel.100cm⁻². La media de abundancia más alta fue de 7319 cel.100cm⁻² y se observó en el punto Cayo Guano 10m (Fig. 7). El análisis por rangos de Kruskal-Wallis y la comparación de medias a posteriori mostraron diferencias significativas entre las abundancias de los puntos Puntalón 10m, Cayo Guano 10m y Cayo Trabuco 20m con respecto a los puntos Puntalón 20m y Cayo Largo Manglar ($p=0.0149$).

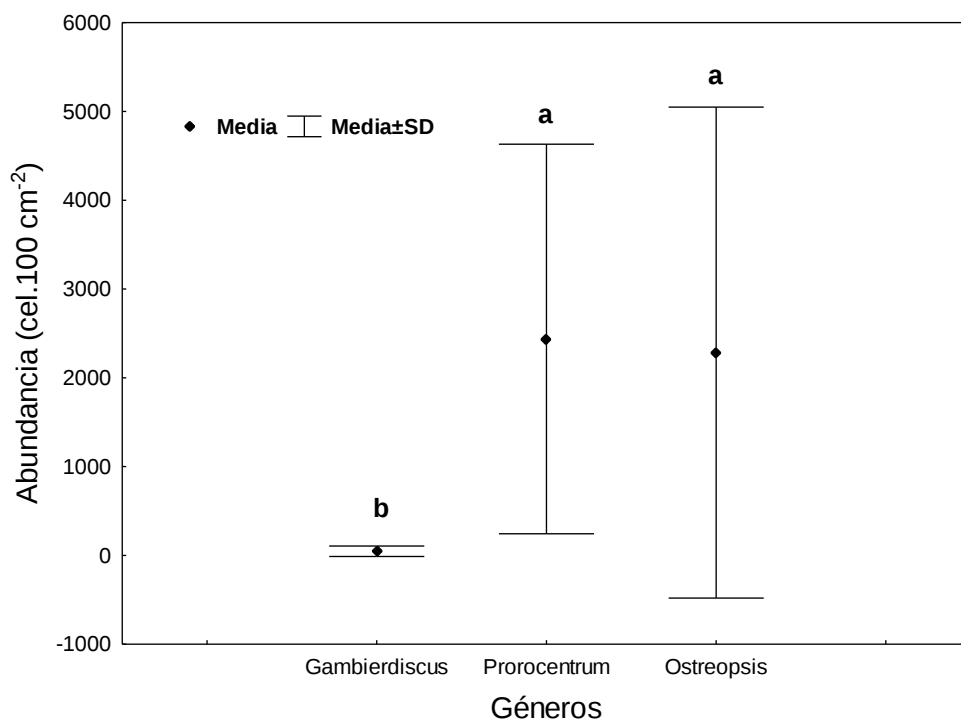


Figura 6. Abundancia de los géneros *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis* asociadas a las mallas (sustrato artificial) desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en Mangles Altos. Letras desiguales difieren según las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación de medias a posteriori, $p<0.05$.

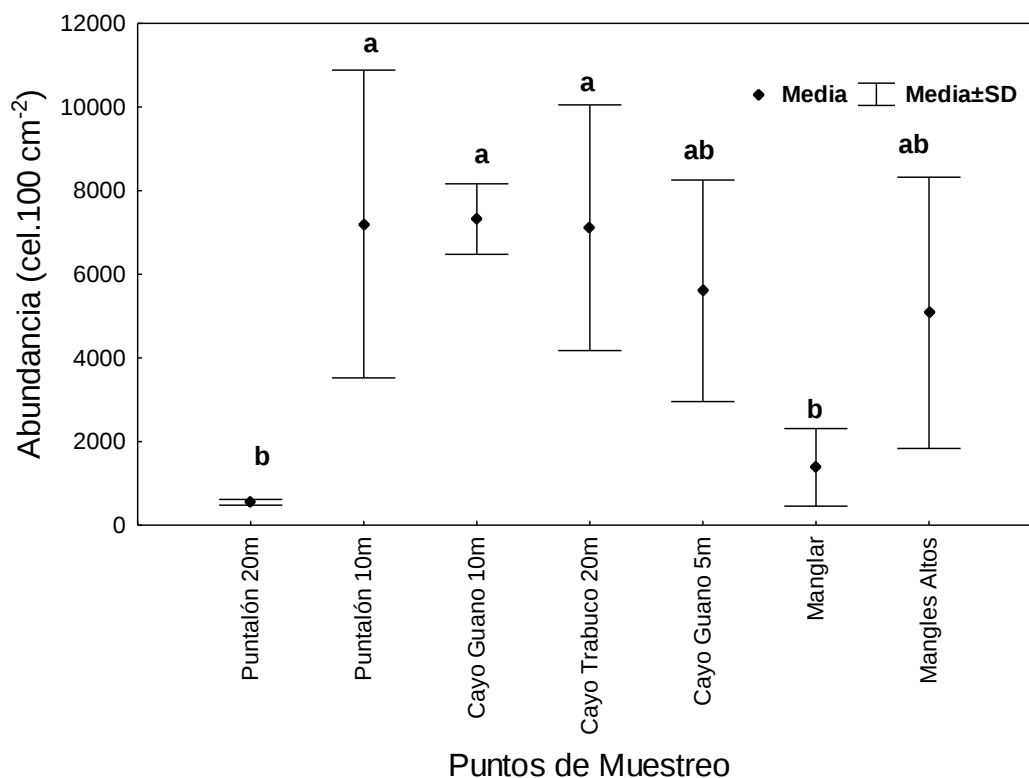


Figura 7. Abundancia estimada de células de los dinoflagelados bentónicos tóxicos asociadas a las mallas (sustrato artificial) desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en Mangles Altos. Letras desiguales difieren según las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación de medias a posteriori, $p < 0.05$.

La abundancia estimada del género *Gambierdiscus* no presentó diferencias significativas entre los puntos de muestreo ($p = 0.1299$), manteniéndose muy baja. La media de abundancia más elevada fue observada en el punto Cayo Guano 5m con un valor de 141 cel.100cm⁻², con un amplio intervalo de desviación estándar de la media de 19 a 270 cel.100cm⁻² (Fig. 8).

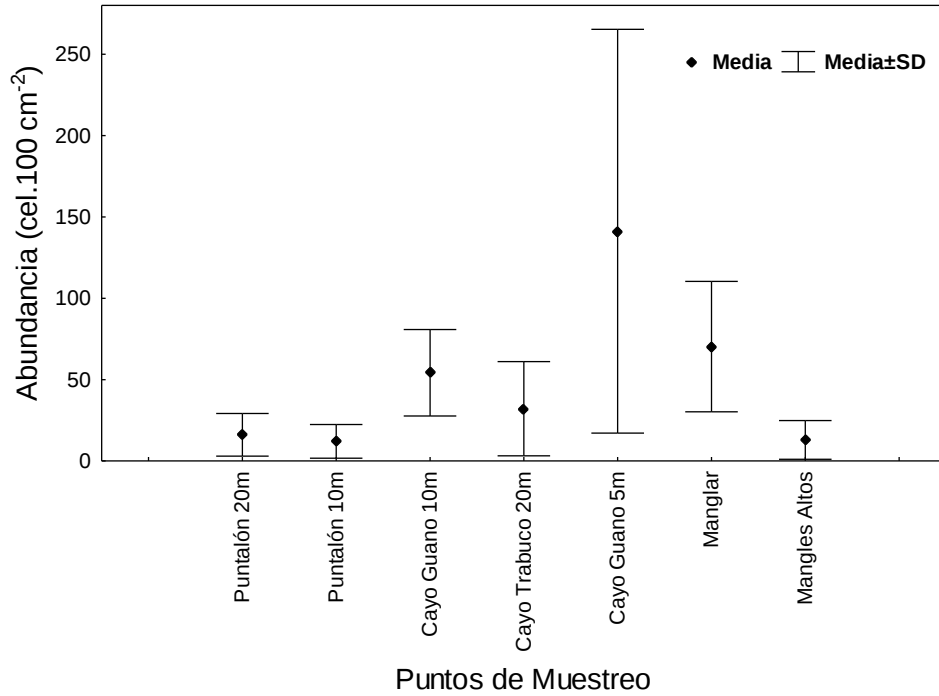


Figura 8. Abundancia de células del género *Gambierdiscus* asociadas a las mallas desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en Mangles Altos. No se encontraron diferencias significativas según las pruebas de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$.

En el caso del género *Prorocentrum* se encontraron marcadas diferencias de abundancia entre los puntos Cayo Guano 10m y Puntalón 20m, con un valor de $p = 0.0045$. Los puntos Cayo Trabuco 20m y Puntalón 20m mostraron las menores abundancias con valores que oscilaron entre 297 y 465 cel.100cm⁻², mientras que el punto Cayo Guano 10m presentó valores de abundancia superiores de 4016 a 7060 cel.100cm⁻², con una media de 5568 cel.100cm⁻² (Fig. 9).

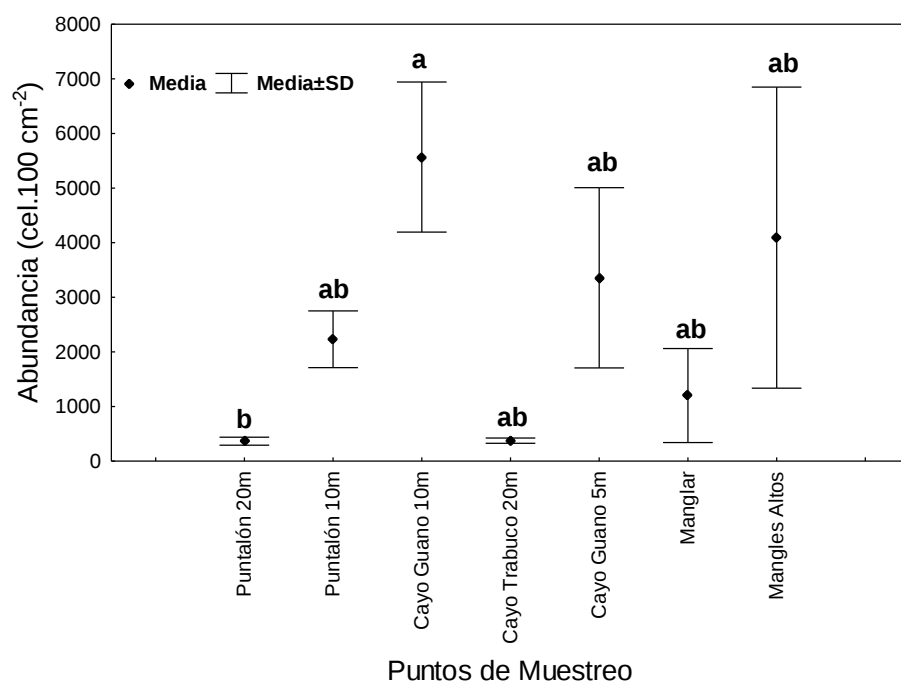


Figura 9. Abundancia de células del género *Prorocentrum* asociadas a las mallas desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en “Mangles Altos”. Letras desiguales difieren según las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación de medias a posteriori, $p < 0.05$.

Según los análisis de Kruskal-Wallis y la comparación de medias a posteriori, la abundancia calculada para el género *Ostreopsis* presentó diferencias significativas entre los puntos Puntalón 10m y Cayo Trabuco 20m, respecto a los puntos Puntalón 20m y Cayo Largo Manglar ($p=0.0013$). Estos últimos presentaron los menores valores de abundancia, entre 88 y 232 cel.100cm⁻². Este género se vio más representado en el punto Cayo Trabuco 20m con media de 6707 cel.100cm⁻² y valores entre 3518 y 9469 cel.100cm⁻² (Fig. 10).

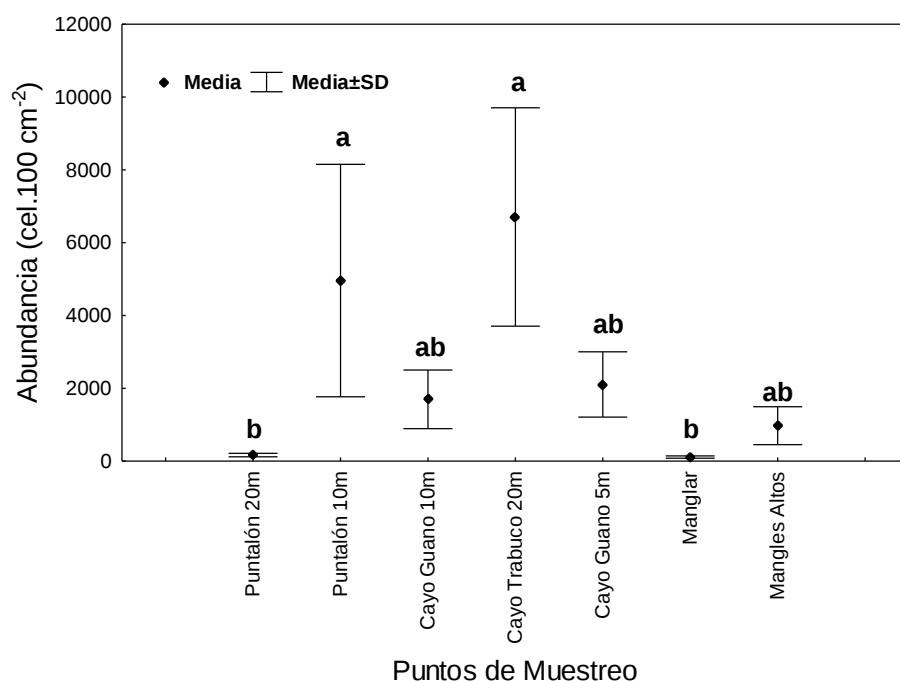


Figura 10. Abundancia de células del género *Ostreopsis* asociadas a las mallas desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en “Mangles Altos”. Letras desiguales difieren según las pruebas de Kruskal-Wallis y comparación de medias a posteriori, $p < 0.05$.

4.1.2 Abundancia determinada con sustratos naturales

Las macrofitas extraídas en los puntos Puntalón 10m, Puntalón 20m, Cayo Guano 10m y Cayo Trabuco 20m fueron macroalgas del género *Dictyota*. En este tipo de sustrato se identificaron los tres géneros identificados en los sustratos artificiales. El género *Ostreopsis* fue el más abundante, mientras que *Gambierdiscus* sp. fue el menos representado, lo que concuerda con los resultados obtenidos en sustratos artificiales para esos puntos de muestreo. Los valores de abundancia determinados en las macroalgas mostraron que el sitio Puntalón 20m es el que menos presencia de dinoflagelados muestra, con un valor de 214 cel.g⁻¹ de macroalga húmeda. El punto Puntalón 10m presentó el mayor valor de abundancia con 9733 cel.g⁻¹ de macroalga húmeda (Tabla III).

Tabla III. Abundancia de células de los géneros *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, asociadas a las muestras de macroalgas que fueron colectadas en cuatro puntos de la cayería sur (región sur central de Cuba).

Puntos de Muestreo	Densidad (cel.g ⁻¹ de macroalga húmeda)			
	<i>Gambierdiscus</i>	<i>Prorocentrum</i>	<i>Ostreopsis</i>	Total
Puntalón 20m	25	175	15	214
Puntalón 10m	28	552	9153	9733
Cayo Guano 10m	0	190	259	448
Cayo Trabuco 20m	56	447	5173	5675

4.2 Determinación de la diversidad de especies de *Gambierdiscus* sp.

Seis especies de *Gambierdiscus* fueron halladas en los sitios de estudio usando ensayos de qPCR. *Gambierdiscus caribaeus* y *Gambierdiscus ruetzleri* fueron encontrados en la cayería sur y en la costa sur de Cienfuegos. *Gambierdiscus belizeanus*, *Gambierdiscus carpenteri*, *Gambierdiscus silvae* y *Gambierdiscus carolinianus* fueron encontrados solamente en los puntos de la cayería sur. (Tabla IV).

Gambierdiscus carolinianus fue la especie de distribución más amplia en el área, detectada en seis de los ocho puntos de muestreo (Fig. 11). En el punto Mangles Altos esta especie fue detectada a partir de aislados realizados por científicos del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos para investigaciones actualmente en curso. La especie *G. silvae* fue detectada únicamente en una macrófita colectada en el punto Puntalón 20m. El ensayo de PCR realizado no fue cuantitativo para esta especie. Todas las muestras fueron negativas para *Gambierdiscus* ribotipo 2 y *Gambierdiscus excentricus*.

Tabla IV. Especies de *Gambierdiscus* reportadas para la región sur central de Cuba.

Punto Muestreo	G. <i>caribaeus</i>	G. <i>belizeanus</i>	G. <i>carpenteri</i>	G. <i>carolinianus</i>	G. <i>ruetzleri</i>	G. <i>silvae</i>
Guajimico	x				x	
Puntalón 20m	x	x	x	x	x	x
Puntalón 10m		x	x	x		
Cayo Guano 10m			x	x		
Cayo Trabuco 20m		x	x	x		
Cayo Guano 5m		x		x		
Cayo Largo Manglar	x					

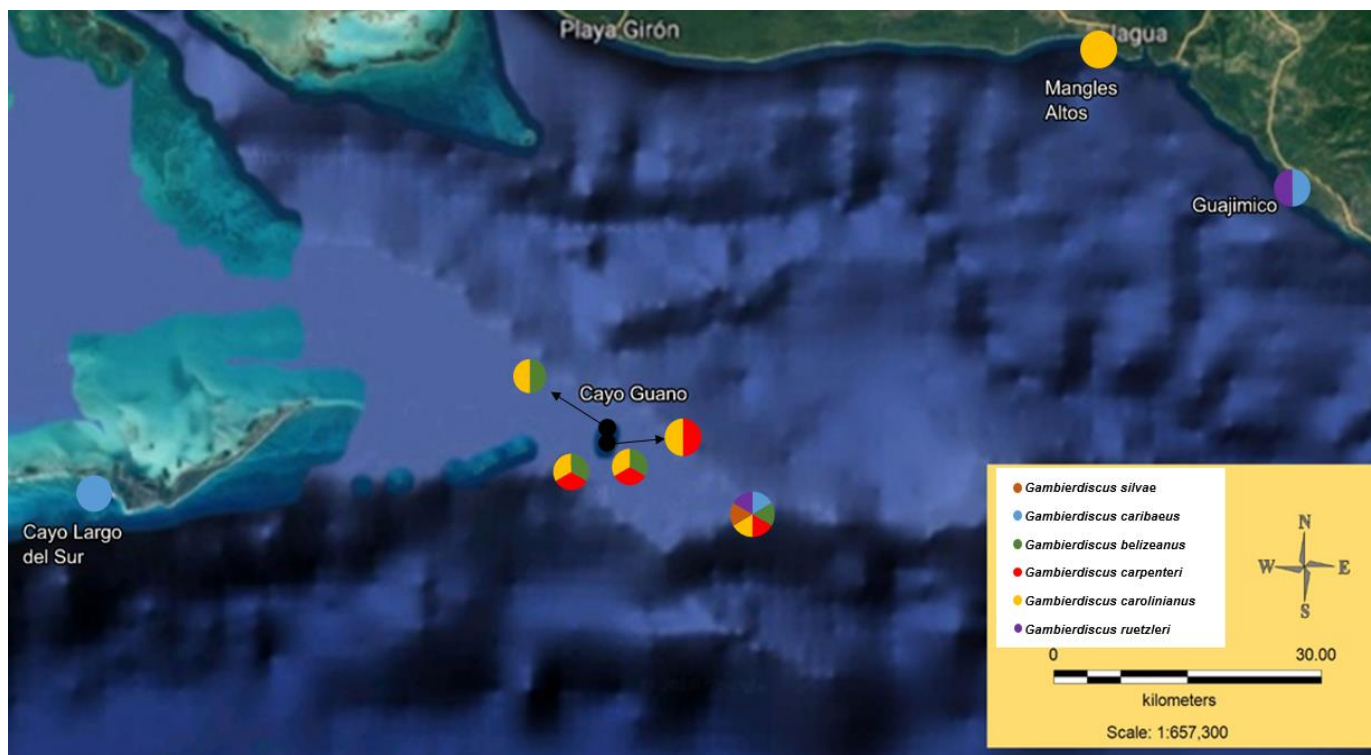


Figura 11. Distribución de especies de *Gambierdiscus*. Región sur central de Cuba.

Utilizando sustratos artificiales, *Gambierdiscus ruetzleri* fue la especie observada con menor frecuencia, detectada en una sola muestra de la ensenada Guajimico. *Gambierdiscus caribaeus* y *Gambierdiscus carpenteri* fueron las especies más frecuentes, presentes en 11 de las 28 mallas desplegadas en los sitios (Tabla V).

Tabla V. Frecuencia de especies de *Gambierdiscus* en la región sur central de Cuba utilizando sustratos artificiales

Especies de <i>Gambierdiscus</i>	Ensenada Guajimico Mallas n=6	Cayería Sur Mallas n=22	Total de sitios Mallas n=28
<i>G. caribaeus</i>	6/6	5/22	11/28
<i>G. belizeanus</i>	0/6	3/22	3/28
<i>G. carpenteri</i>	0/6	11/22	11/28
<i>G. carolinianus</i>	0/6	5/22	5/28
<i>G. ruetzleri</i>	1/6	0/22	1/28

Las estimaciones de abundancia en las mallas para las especies del género *Gambierdiscus* mediante técnicas moleculares (qPCR) mostraron que la especie más abundante fue *G. caribaeus* con una media aproximada de 952 cel.100 cm⁻², esta especie fue principalmente abundante en la ensenada Guajimico donde presentó valores elevados en todas las muestras de ese sitio, con una media de 4434.73 cel.100 cm⁻². La media de abundancia menor fue de *G. belizeanus* de aproximadamente 1.08 cel.100 cm⁻² (Tabla VI).

Tabla VI. Medias de abundancia de células de especies del género *Gambierdiscus* (determinadas a partir de ensayos de qPCR), asociadas a las mallas desplegadas en los puntos de muestreo de la cayería sur y en la ensenada Guajimico.

Punto de Muestreo	Medias de abundancia (cel.100 cm⁻²)				
	<i>G. caribaeus</i>	<i>G. belizeanus</i>	<i>G. carpenteri</i>	<i>G. carolinianus</i>	<i>G. ruetzleri</i>
Guajimico	4434.73	0.00	0.00	0.00	5.11
Puntalón 20m	9.09	0.66	0.97	3.46	0.00
Puntalón 10m	0.00	0.00	3.46	2.21	0.00
Cayo Guano 10m	0.00	0.00	6.93	2.10	0.00
Cayo Trabuco 20m	0.00	9.19	8.29	3.41	0.00
Cayo Guano 5m	0.00	0.00	0.00	8.22	0.00
Cayo Largo Manglar	2.69	0.00	0.00	0.00	0.00
Abundancia general	951.98	1.08	2.21	2.36	1.28

Los ensayos de qPCR, en las muestras provenientes de las macroalgas colectadas en los puntos Puntalón 20m, Puntalón 10m, Cayo Guano 10m y Cayo Trabuco 20m, mostraron

que la especie más abundante fue *Gambierdiscus ruetzleri* con un valor máximo de 61 cel.g⁻¹ (Tabla VII).

Tabla VII. Abundancia de especies de *Gambierdiscus* (determinadas a partir de ensayos de qPCR) asociadas a las macroalgas colectadas en cuatro puntos de la cayería sur.

Puntos de Muestreo	Abundancia (cel.g ⁻¹ de macroalga húmeda)			
	<i>G. belizeanus</i>	<i>G. carpenteri</i>	<i>G. carolinianus</i>	<i>G. ruetzleri</i>
Puntalón 20m	0.04	0.24	0.89	60.92
Puntalón 10m	0.27	0.65	13.15	0.00
Cayo Guano 10m	0.00	0.00	0.00	0.00
Cayo Trabuco 20m	0.00	2.52	9.05	0.00
Media de abundancia	0.08	0.85	5.77	15.23

Las concentraciones de *Gambierdiscus* fueron bajas, tanto las determinadas por qPCR como las obtenidas por conteo directo de células mediante microscopía de luz, sin embargo la prueba de la U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre estos métodos ($p < 0.05$). La media de las células contadas por microscopía de luz fue de 92 cel.40 mL⁻¹, superior a la media de células detectadas por ensayos de qPCR que fue de 16 cel.40 mL⁻¹ (Fig.12).

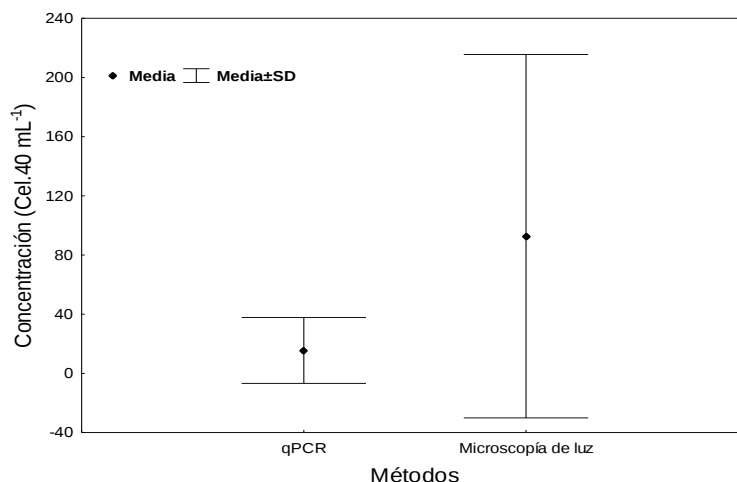


Figura 12. Concentración (cel. 40 mL⁻¹) de células de *Gambierdiscus* determinada por conteo directo mediante microscopía de luz y por ensayos de qPCR.

5. DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la composición y abundancia de géneros de dinoflagelados epibentónicos

En el estudio se encontraron coexistiendo tres géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos: *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, lo que concuerda con estudios anteriores que demostraron que estos géneros (y otros como *Coolia* y *Amphidinium*) pueden convivir en una misma área adheridos a sustratos bentónicos como macroalgas, rocas y sedimentos blandos (Parsons y Preskitt, 2007; Faust, 2009). Estos resultados son consecuentes con estudios similares en el Caribe (Belize, América Central) donde se reportan los géneros *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, detectados en sustratos artificiales (mallas de fibra de vidrio) (Tester *et al.*, 2014).

Los valores de abundancia encontrados para el género *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis* son similares a los valores reportados por Tester *et al.*, (2014) en Belize. La variabilidad de abundancias observada en este estudio concuerda con trabajos anteriores que muestran que los organismos bentónicos exhiben distribuciones parcheadas. Debido a este hecho es necesario utilizar tamaños de muestra muy grandes para estimar medias de abundancia con intervalos de confianza razonables (Mavrič *et al.*, 2013).

En esta investigación se observaron diferencias entre las profundidades de los puntos de muestreo, siendo los puntos más someros los que presentaron mayor abundancia en el caso del género *Gambierdiscus*. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Xu *et al.* (2014) y por Carlson y Tindall (1985), quienes reportaron altos valores de abundancia en sitios poco profundos y con intensidad luminosa elevada. Sin embargo no existe un consenso general sobre las preferencias o tolerancias de *Gambierdiscus* a los niveles de luz.

El método de sustratos artificiales utilizado en este estudio presenta numerosas ventajas y puede ser efectivo en numerosos hábitats. Sin embargo, puede ser optimizado para especies de interés y para el rango de abundancia encontrado. Tester *et al.* (2014) plantearon que en ambientes con bajos niveles de abundancia (<100 cel.100 cm⁻²), el número de células que se cuentan en la muestra resultante puede ser demasiado pequeño para permitir una precisión razonable. Debido a los valores bajos de abundancia reportados en este estudio para el género *Gambierdiscus*, es recomendable determinar la abundancia

de este género en el área con algunas modificaciones de la metodología aquí empleada. Concentrar la muestra y/o realizar un mayor número de conteos son opciones que se pueden considerar para lograr una mayor exactitud en las estimaciones de abundancia. Otras opciones podrían ser utilizar mallas con dimensiones mayores, lo cual permitiría un mayor reclutamiento de células, conjuntamente con la realización de un filtrado intermedio con una malla de 150 μm , para eliminar detritos o partículas grandes que hayan permanecido en la muestra luego del primer filtrado.

Se ha demostrado que estos géneros de dinoflagelados son predominantemente epífitos. Sin embargo se ha reportado la preferencia de los mismos por ciertas algas hospederas (Cruz-Rivera y Villareal, 2006). Aunque la naturaleza de esta preferencia es desconocida, algunos investigadores han sugerido que esta conducta es debido a diversos factores como el área de superficie, clase de alga (Rodophyta, Chlorophyta, etc.), estructura del alga y/o compuestos estimulantes. Además algunas células pueden desprenderse del hospedero cuando hay disturbios (Parsons *et al.*, 2012). Mientras que estas preferencias han sido documentadas a nivel de género, existen muchos ejemplos de resultados en conflicto que aluden a diferentes preferencias interespecíficas (Bomber *et al.*, 1988; Cruz-Rivera y Villareal, 2006; Rhodes *et al.*, 2010).

En el presente estudio se escogieron macroalgas del género *Dictyota* como sustrato natural, debido a que fue el género dominante en los puntos de muestreo; además es conocido que *Dictyota* spp. es comúnmente utilizado por investigadores para realizar estudios de abundancia de dinoflagelados bentónicos (Parsons *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos pudieran estar influenciados por las preferencias de algunas especies a este tipo de macrófita, por lo que sería recomendable tener en cuenta otros géneros comunes en el área (*Halimeda*, *Lobophora*, *Thalassia*, etc.) para futuras investigaciones de esta índole.

Los géneros *Gambierdiscus*, *Ostreopsis* y *Prorocentrum* identificados en sustratos artificiales fueron encontrados también en los sustratos naturales colectados, lo que coincide con lo registrado en estudios previos en otras partes del Caribe (Tester *et al.*, 2014). Otros trabajos realizados en el Caribe confirman la presencia de estos géneros a partir de la colecta de diferentes macrófitas (Almazán-Becerril *et al.*, 2015; Arbelaez M. *et al.*, 2017). Los valores de abundancia obtenidos a partir de las macrófitas colectadas en

este estudio fueron similares a los obtenidos por Tester *et al.* (2014) en Belice, mediante la colecta de macroalgas de los géneros *Padina* y *Dictyota*.

En los sustratos naturales la menor abundancia de dinoflagelados se registró en el punto “Puntalón 20m”, lo cual coincide con los resultados obtenidos mediante sustratos artificiales. Por ambos métodos se corroboró además que para los puntos Puntalón 20m, Puntalón 10m, Cayo Guano 10m y Cayo Trabuco 20m, el género menos abundante fue *Gambierdiscus*, mientras que *Ostreopsis* fue el de mayor abundancia. Aunque no fue demostrado estadísticamente, esta relación positiva en los resultados de ambos métodos refuerza el uso de sustratos artificiales como método para la cuantificación de la abundancia de dinoflagelados béntonicos tóxicos.

5.2 Determinación de la diversidad de especies de *Gambierdiscus* sp.

Estudios anteriores han encontrado marcadas diferencias en la distribución de especies de *Gambierdiscus* entre el Atlántico y el Pacífico, donde las especies endémicas de cada región tienden a estar ampliamente dispersas. Las dos especies reportadas con distribución cosmopolita son *G. caribaeus* y *G. carpenteri* (Litaker *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2013). Dada la distribución global de la mayoría de los microorganismos es probable que, con muestreos adicionales, especies designadas actualmente para el Atlántico o el Pacífico sean eventualmente descubiertas en ambas regiones.

En este estudio se identificaron seis de las siete especies de *Gambierdiscus* reportadas para el Caribe. La alta diversidad de especies de *Gambierdiscus* es un indicador de condiciones favorables de crecimiento (temperatura, salinidad y luz) en el área de estudio.

Las seis especies encontradas en este estudio han sido demostradas como tóxicas aunque en bajos niveles (Chinain *et al.*, 2010; Litaker *et al.*, 2017). De forma general estas especies tuvieron una distribución relativamente amplia en el área estudiada, excepto *Gambierdiscus ruetzleri*. Este hecho pudiera explicar la toxicidad demostrada en las capturas de peces realizadas por pescadores de la zona e investigadores del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC). Por otra parte en la mayoría de las especies de *Gambierdiscus* reportadas para el Caribe se ha demostrado la producción de maitotoxinas. Aunque las MTXs no se consideran relacionadas con la ciguatera, evidencias experimentales recientes sugieren que las MTX pueden acumularse en la carne de pescado, al menos

transitoriamente, por lo que el papel de las MTX en la causa de CFP debería ser reexaminado (Holland *et al.*, 2013; Friedman *et al.*, 2017).

Gambierdiscus caribaeus fue reportada por Peraza y Moreira (2012) en la ensenada Guajimico durante los meses de mayo de 2011 a marzo de 2012, mientras que *Gambierdiscus ruetzleri* es reportada por primera vez para Cuba. El hecho de encontrar a *G. ruetzleri* en aguas poco profundas de la ensenada Guajimico concuerda con estudios que reportan a esta especie en aguas someras (Kibler *et al.*, 2012). *G. belizeanus*, *G. carpenteri*, *G. silvae* y *G. carolinianus* se reportan también por primera vez en Cuba. Estas cuatro especies y *G. ruetzleri* fueron reportadas por Tester *et al.*, (2013) a profundidades mayores de 30 m al norte del Golfo de México.

En el presente estudio *Gambierdiscus carolinianus* fue la especie de distribución más amplia, mientras que *G. ruetzleri* fue la especie menos dispersa. Este resultado concuerda con estudios similares de distribución de especies de *Gambierdiscus* realizados en el Caribe (Litaker *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2013) (Fig.13).

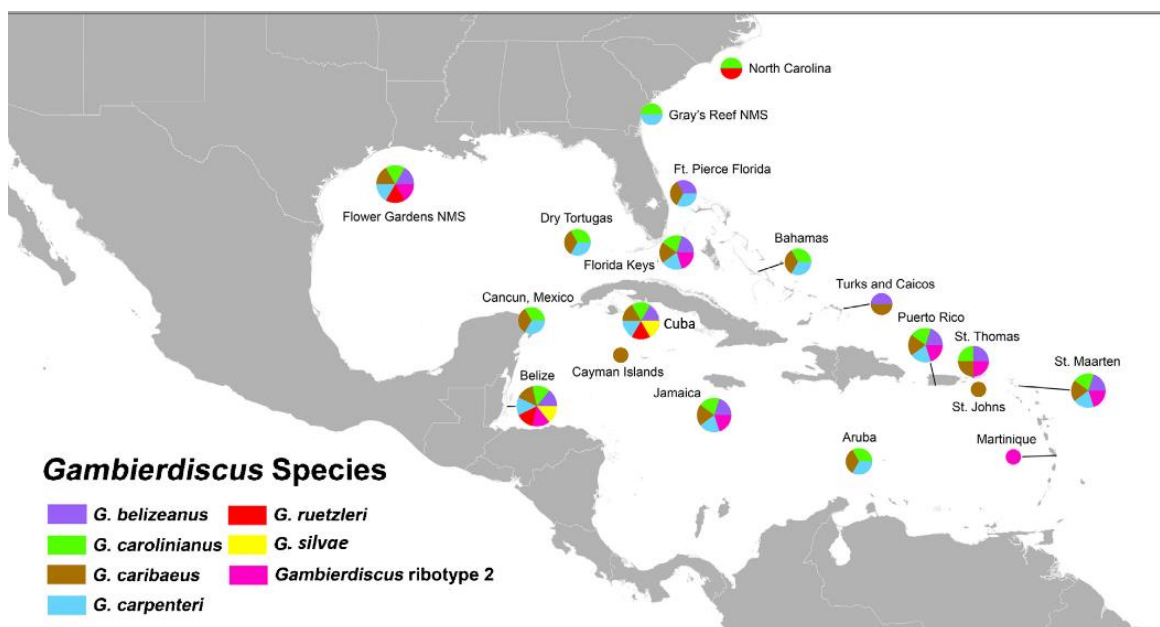


Figura 13. Diversidad de *Gambierdiscus* en el Caribe. Los datos de especies de *Gambierdiscus* están presentados como gráficos de pastel, donde el tamaño es proporcional al número de especies observadas en cada sitio. Modificado de Tester *et al.* (2013)

Gambierdiscus caribaeus y *Gambierdiscus carpenteri* fueron las especies más frecuentes en el área de estudio, presentes en 11 de las 28 mallas desplegadas. Esta dominancia puede deberse a que los puntos de muestreo presentaban condiciones ventajosas de crecimiento para estas especies con respecto a las otras. Estas especies son las únicas encontradas tanto en el océano Atlántico como en el Pacífico. Los factores que explican esta extensa distribución aún no se han determinado, pero puede estar relacionado con una inusual tolerancia a la temperatura en comparación con otras especies de *Gambierdiscus* (Tester *et al.*, 2010).

Kibler *et al.* (2012) reportaron un rango de temperatura óptima para *Gambierdiscus caribaeus* de 29.2 a 32.4 °C, con una temperatura de máximo crecimiento de 31.1 °C, sin embargo según ese estudio el rango de temperatura tolerable para esta especie fue de 16.8 °C hasta 33.6 °C. *G. caribaeus* es la especie de la que más comúnmente se obtienen aislados, tanto en el Pacífico como en el Atlántico (Litaker *et al.*, 2009). Los rangos de tolerancia de temperatura de *G. carpenteri* aún no se han establecido, pero están actualmente siendo analizados (Litaker *et al.*, 2010).

El papel de la temperatura ha sido estudiado por varios investigadores con resultados en conflicto; algunos autores han encontrado rangos de crecimiento variado entre diferentes especies de *Gambierdiscus* (Tester *et al.*, 2010). En varios estudios se ha evaluado la acción de otros factores (salinidad, luz, nutrientes) en los patrones de crecimiento de células de este género. Las especies de *Gambierdiscus* prefieren un rango de salinidad de 28-35 (Bomber *et al.*, 1988; Morton *et al.*, 1992; Hokama *et al.*, 1996). Parsons *et al.* (2010) reportaron que las preferencias por la salinidad difieren entre especies de este género. Por otro lado existen datos que sugieren que puede haber diferentes respuestas fisiológicas a los cambios de luz entre las especies de *Gambierdiscus* (Parsons *et al.*, 2012).

Se cree además que la influencia de nutrientes estimula el crecimiento de células de *Gambierdiscus*, aunque existen pocos estudios de campo que relacionen la concentración de nutrientes y la abundancia para este género (Parsons *et al.*, 2012). De modo general, *Gambierdiscus* prefiere ambientes estables (Grzebyk *et al.*, 1994; Parsons *et al.*, 2012), aunque queda poco claro si la turbulencia tiene el mismo efecto en todas las especies de *Gambierdiscus*, o si algunas poseen preferencias/tolerancia por los ambientes turbulentos, mientras que otras prefieren aguas estáticas.

Los altos valores de abundancia mostrados en este estudio para la especie *Gambierdiscus caribaeus* en la ensenada Guajimico de la costa sur de Cienfuegos, pudieran deberse a que este es un sitio con baja energía, característica que es distintiva con respecto a los siete puntos de muestreo restantes. Este hecho puede permitir una adhesión más efectiva de las células a las mallas desplegadas y evitar el desprendimiento de las mismas, explicándose así los valores de abundancia reportados. Hábitats protegidos como interiores de barreras arrecifales o lagunas han mostrado altas abundancias de dinoflagelados bentónicos tóxicos, mientras que hábitats turbulentos que experimentan fuertes vientos y corrientes, generalmente sostienen bajas abundancias (Tindall y Morton, 1998; Faust, 2009; Richlen y Lobel, 2011).

La ensenada Guajimico es un sitio con características ideales para la realización de estudios de cuantificación de la abundancia de dinoflagelados epibentónicos tóxicos. Además de una hidrodinámica baja y estable presenta valores de salinidad poco variables durante casi todo el año (Peraza y Moreira, 2012). Estas características son muy beneficiosas para el reclutamiento de células mediante sustratos artificiales, permitiendo estudios de experimentación más precisos.

Por otro lado, otros factores como la intensidad de la luz, temperatura y la disponibilidad de nutrientes, pudieron haber jugado un papel esencial, haciendo a *G. caribaeus* una especie dominante en la ensenada Guajimico. Es por ello que es recomendable realizar estudios posteriores donde se tengan en cuenta estas variables.

La alta dinámica observada en los puntos de la cayería sur pudiera explicar los bajos valores de abundancia encontrados en las mallas. Sin embargo, la elevada diversidad de especies de *Gambierdiscus* así como la presencia de peces confirmados como tóxicos en esta misma área, demuestran que es una zona de interés para futuros estudios de riesgo relacionados con la ciguatera.

En una extensiva revisión de la literatura realizada por Litaker *et al.* (2010) concluyeron que aproximadamente de 1000 a 10000 cel.g⁻¹ representan niveles de alarma con relación a eventos potenciales de ciguatera. A pesar del amplio rango de abundancia de células de dinoflagelados bentónicos y la alta variabilidad de muestras entre los sitios en estudios de este tipo, Tester *et al.* (2014) lograron encontrar una fuerte relación lineal entre la abundancia de células de BHAB obtenidas a partir de sustratos naturales y artificiales,

permitiendo establecer que el rango planteado por Litaker *et al.* (2010) equivale aproximadamente a 5000-53000 cel.100 cm⁻².

En el presente estudio se obtuvieron valores de abundancia cercanos a 5000 cel.100 cm⁻² en la ensenada Guajimico que equivaldrían, según Tester *et al.* (2014), al límite inferior del rango propuesto por Litaker *et al.* (2010). Si a esto se le suma el hecho de que el presente estudio fue realizado en diciembre y no durante los meses más cálidos del año, cuando la temperatura del agua sobrepasa los 30°C, resulta lógico pensar que este podría ser considerado un sitio potencial para la ocurrencia de blooms significativos de *Gambierdiscus* con los consiguientes brotes de ciguatera. Muchas de las especies de *Gambierdiscus* reportadas en el Caribe presentan un crecimiento óptimo en cultivo por encima de 29°C (Tester *et al.*, 2010), lo cual reafirma la hipótesis anterior. Estudios previos en este sitio reportaron valores de hasta 5000 células cel.g⁻¹ en julio de 2015 (Díaz-Asencio, comunicación personal).

El alcance del presente estudio impidió determinar fluctuaciones temporales en la abundancia de estos géneros, necesarias para establecer un rango de las densidades de células en el tiempo en la región sur central de Cuba. Teniendo en cuenta esto y los resultados obtenidos en experimentos como el de Tester *et al.* (2010), sería recomendable realizar estudios de cuantificación de abundancia de dinoflagelados béntonicos tóxicos durante todo el año y al menos con una frecuencia mensual, tanto en Guajimico como en los puntos de la cayería sur, con énfasis en los meses de verano.

En este estudio las concentraciones de *Gambierdiscus* fueron bajas, tanto las determinadas por qPCR como las obtenidas por conteo directo de células mediante microscopía de luz. Sin embargo, se encontraron diferencias entre las concentraciones mostradas por ambos métodos, siendo superior el número de células contadas directamente que las detectadas por qPCR. Esto concuerda con los resultados mostrados por Vandersea *et al.* (2012) en la costa este de La Florida, donde obtuvieron un rango de 3-70 cel.50 mL⁻¹ por conteo directo, mientras que por qPCR obtuvieron un rango de 0-20 cel.50 mL⁻¹.

Estos autores determinaron un límite de cuantificación por qPCR para cada especie de aproximadamente 10 células. Teniendo en cuenta que en este estudio se detectaron bajas abundancias de *Gambierdiscus* y que en cada muestra se identificaron generalmente dos o más especies diferentes, se podría explicar la sub-estimación de las concentraciones de células en los ensayos de qPCR con respecto al conteo directo por microscopía de luz, ya

que en la concentración determinada por este último, no se diferencia entre especies de *Gambierdiscus*.

Otros factores que pudieron haber jugado un papel esencial en estos resultados pudieron ser la inhibición del PCR, lo cual puede suceder en casos de muestras muy sucias, por otro lado, una baja eficiencia en la extracción del ADN. Otra explicación sería los pequeños errores que pudieron haberse cometido durante el conteo de células por microscopía de luz. El submuestreo realizado pudo conducir fácilmente a discrepancias entre las concentraciones estimadas por conteo de células y por ensayos de qPCR. Debe tenerse mucho cuidado para mantener las muestras de campo bien mezcladas antes de realizar un submuestreo.

A pesar de las diferencias observadas, los ensayos de qPCR permiten la identificación de especies, lo cual es importante para el desarrollo de sistemas de monitoreo efectivos de CFP, pues se ha demostrado que la producción de toxinas varía entre especies de *Gambierdiscus* (Litaker *et al.*, 2017). Informaciones equivalentes no pueden ser obtenidas usando microscopía de luz, debido a que las similitudes morfológicas entre estas especies hace la identificación imposible (Litaker *et al.*, 2009).

Este estudio sirve como información básica y proporciona elementos importantes para la evaluación de riesgos relacionada con los efectos tóxicos o perjudiciales causados por dinoflagelados epibentónicos en Cuba. Cinco especies productoras de ciguatoxinas son reportadas por primera vez en el país, demostrándose así que la existencia de brotes de ciguatera y la detección de peces tóxicos en la región sur central, es debido a la presencia de especies tóxicas perteneciente al género *Gambierdiscus*. Por otro lado, la identificación de los géneros tóxicos *Ostreopsis* y *Prorocentrum*, así como las abundancias detectadas relativamente elevadas, abren puertas para futuras investigaciones de evaluación de los posibles impactos de estos géneros en los ecosistemas marinos y/o la salud pública en el país.

6. CONCLUSIONES

1. Se identificaron tres géneros de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos en la región sur central de Cuba: *Gambierdiscus*, *Prorocentrum* y *Ostreopsis*, los cuales se observaron en muestras de todos los sitios estudiados. *Ostreopsis* y *Prorocentrum* fueron los géneros de mayor abundancia, mientras que *Gambierdiscus* presentó valores de abundancia muy bajos en el área de estudio.
2. Se identificaron seis de las siete especies reportadas para el Caribe: *G. caribaeus*, *G. carpenteri*, *G. belizeanus*, *G. ruetzleri*, *G. carolinianus* y *G. silvae*. Estas especies excepto *G. caribaeus* son registradas por primera vez en Cuba.
3. El uso de sustratos artificiales constituye una herramienta eficiente para estudios de cuantificación de abundancia de dinoflagelados bentónicos tóxicos, aun así debe tenerse extremo cuidado en la interpretación de los datos recogidos mediante este método.

7. RECOMENDACIONES

1. Incrementar el tamaño de muestra, utilizar mallas con dimensiones mayores y realizar un filtrado intermedio con una malla de 150 μm en sitios con bajas abundancias. Esto permite estimar medias de abundancia con intervalos de confianza razonables, un mayor reclutamiento de células y obtener muestras más limpias para el conteo celular y análisis moleculares posteriores.
2. Realizar estudios posteriores de abundancia de dinoflagelados bentónicos en sustratos naturales donde se tengan en cuenta diferentes géneros de macrófitas además de *Dictyota*, como *Halimeda*, *Lobophora* y *Sargassum*, para disminuir posibles errores debido a las preferencias de los dinoflagelados por las macrófitas.
3. Realizar estudios de diversidad y abundancia de especies de *Gambierdiscus* en diferentes épocas del año en el área, y donde se tenga en cuenta la acción de diferentes factores como la temperatura, salinidad, intensidad de la luz y la disponibilidad de nutrientes.

REFERENCIAS

Accoroni, S., Romagnoli, T., Penna, A., Capellacci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Abboud-Abi Saab, M., Giussani, V., Asnaghi, V., Chiantore, M. y Totti, C. (2016) «*Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea», *Journal of Phycology*. 52(6): p. 1064-1084. doi: 10.1111/jpy.12464.

Aligizaki, K. y Nikolaidis, G. (2006) «The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece», *Harmful Algae*. 5(6): p. 717-730. doi: 10.1016/j.hal.2006.02.005.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., Katikou, P., Baxevas, A. D. y Abatzopoulos, T. J. (2009) «Potentially toxic epiphytic *Prorocentrum* (Dinophyceae) species in Greek coastal waters», *Harmful Algae*. 8(2): p. 299-311. doi: 10.1016/j.hal.2008.07.002.

Almazán-Becerril, A., Escobar-Morales, S., Rosiles-González, G. y Valadez, F. (2015) «Benthic-epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System», *Botanica Marina*. 58(2): p. 115-128. doi: 10.1515/bot-2014-0093.

Alonso Cordero, M. E., Hernández Gómez, L., Esquivel Rodríguez, D. y Rodríguez Carrasco, B. (2006) «Caracterización de un brote de Ciguatera», *Revista de Ciencias Médicas de la Habana*. 12(1).

Arbelaez M., N., Mancera Pineda, J. E. y Reguera, B. (2017) «Dinoflagelados epífitos de *Thalassia testudinum* en dos sistemas costeros del Caribe colombiano», *Bulletin of Marine and Coastal Research*. 46(2). doi: 10.25268/bimc.invemar.2017.46.2.725.

Arencibia Carballo, G. (2009) «Aspectos de interés sobre la ciguatera en Cuba», *Revista Electrónica de Veterinaria*. 10: p. 1-6.

Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., Moore, S. K., Hoagland, P. y 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*. 2015(01): p. 61-91. doi: 10.1017/S0025315415001733.

Berdalet, E., Tester, P. A., Chinain, M., Fraga, S., Lemée, R., Litaker, W., Penna, A., Usup, G., Vila, M. y Zingone, A. (2017) «Harmful algal blooms in benthic system: Recent progress

and future research», *Oceanography*. 30(1): p. 36-45. doi: <https://doi.org/10.5670/oceanog.2017.108>.

Bomber, J. W., Morton, S. L., Babinchak, J. A., Norris, D. R. y Morton, J. G. (1988) «Epiphytic dinoflagellates of drift algae - another toxigenic community in the ciguatera food chain», *Bulletin of Marine Science*. 43(2): p. 204-214.

Carlson, R. D. y Tindall, D. R. (1985) «Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands», en *Toxic Dinoflagellates*. p. 171-176.

Chateau-Degat, M. L., Chinain, M., Cerf, N., Gingras, S., Hubert, B. y Dewailly, É. (2005) «Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia», *Harmful Algae*. 4(6): p. 1053-1062. doi: 10.1016/j.hal.2005.03.003.

Chinain, M., Darius, H. T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D. y Pauillac, S. (2010) «Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture», *Toxicon*. 56(5): p. 739-750. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.013.

Chomerat, N., Zentz, F., Boulben, S., Bilien, G., Van Wormhoudt, A. y Nezan, E. (2011) «*Prorocentrum glenanicum* sp nov and *Prorocentrum pseudopanamense* sp nov (Prorocentrales, Dinophyceae), two new benthic dinoflagellate species from South Brittany (northwestern France)», *Phycologia*. 50(2): p. 202-214. doi: 10.2216/10-12.1.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. Dello, Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., Casabianca, S. y Penna, A. (2014) «First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols», *Environmental Science and Technology*. 48(6): p. 3532-3540. doi: 10.1021/es405617d.

Cruz-Rivera, E. y Villareal, T. A. (2006) «Macroalgal palatability and the flux of ciguatera toxins through marine food webs», *Harmful Algae*. 5(5): p. 497-525. doi: 10.1016/j.hal.2005.09.003.

Faust, M. A. (2009) «Ciguatera-causing dinoflagellates in a coral-reef mangrove ecosystem, Belize», *Atoll Research Bulletin*. (569): p. 1-32. doi: 10.5479/si.00775630.569.1.

Fraga, S. y Rodríguez, F. (2014) «Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with Description of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a New Potentially Toxic Epiphytic

Benthic Dinoflagellate», *Protist.* 165(6): p. 839-853. doi: 10.1016/j.protis.2014.09.003.

Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N. y Zapata, M. (2011) «*Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean)», *Harmful Algae.* 11: p. 10-22. doi: 10.1016/j.hal.2011.06.013.

Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P. y Bravo, I. (2016) «*Gambierdiscus balechii* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean)», *Harmful Algae.* 58: p. 93-105. doi: 10.1016/j.hal.2016.06.004.

Friedman, M. A., Fernandez, M., Backer, L. C., Dickey, R. W., Bernstein, J., Schrank, K., Kibler, S., Stephan, W., Gribble, M. O., Bienfang, P., Bowen, R. E., Degrasse, S., Quintana, H. A. F., Loeffler, C. R., Weisman, R., Blythe, D., Berdalet, E., Ayyar, R., Clarkson-Townsend, D., *et al.* (2017) «An updated review of ciguatera fish poisoning: Clinical, epidemiological, environmental, and public health management», *Marine Drugs.* . doi: 10.3390/md15030072.

Friedman, M. A., Fleming, L. E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M. Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R. y Reich, A. (2008) «Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management», *Marine Drugs.* 6(3): p. 456-479. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/md20080022>.

García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J. M., Bañuelos, R. M. y Rodríguez, F. (2016) «Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*», *Harmful Algae.* 60: p. 57-69. doi: 10.1016/j.hal.2016.10.007.

Geohab (2012) «GEOHAB CORE RESEARCH PROJECT: HABs IN BENTHIC SYSTEMS», en *Organization.* p. 64.

Giussani, V., Asnaghi, V., Pedroncini, A. y Chiantore, M. (2017) «Management of harmful benthic dinoflagellates requires targeted sampling methods and alarm thresholds», *Harmful Algae.* 68: p. 97-104. doi: 10.1016/j.hal.2017.07.010.

Gómez, F., Qiu, D., Lopes, R. M. y Lin, S. (2015) «*Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae)», *PLoS ONE.* 10(4). doi: 10.1371/journal.pone.0119676.

Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin, B. A., Bosi, C. y Arnoux, A. (1994) «Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (S.W. Indian Ocean)», *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 178(1): p. 51-66. doi: 10.1016/0022-0981(94)90224-0.

Hales, S., Weinstein, P. y Woodward, A. (1999) «Ciguatera (fish poisoning), El Niño, and Pacific sea surface temperatures», *Ecosystem Health*. 5(1): p. 20-25. doi: 10.1046/j.1526-0992.1999.09903.x.

Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. y Cembella, A. D. (2004) *Manual of Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology*. Paris: UNESCO Publishing.

Hokama, Y., Ebesu, J. S. M., Nishimura, K., Oishi, S., Mizuo, B., Stiles, M., Sakamoto, B., Takenaka, W. y Nagai, H. (1996) «Human intoxications from Hawaiian reef fishes associated with diverse marine toxins», *Journal of Natural Toxins*. 5(2): p. 235-247.

Holland, W. C., Litaker, R. W., Tomas, C. R., Kibler, S. R., Place, A. R., Davenport, E. D. y Tester, P. A. (2013) «Differences in the toxicity of six Gambierdiscus (Dinophyceae) species measured using an in vitro human erythrocyte lysis assay», *Toxicon*. 65: p. 15-33. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.12.016.

Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L. y Lemée, R. (2016) «Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: Optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms», *Marine Pollution Bulletin*. 107(1): p. 300-304. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.047.

Kibler, S. R., Litaker, R. W., Holland, W. C., Vandersea, M. W. y Tester, P. A. (2012) «Growth of eight Gambierdiscus (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance», *Harmful Algae*. 19: p. 1-14. doi: 10.1016/j.hal.2012.04.007.

Kohler, S. T. y Kohler, C. C. (1992) «Dead bleached coral provides new surfaces for dinoflagellates implicated in ciguatera fish poisonings», *Environmental Biology of Fishes*. 35(4): p. 413-416. doi: 10.1007/BF00004993.

Kretzschmar, A. L., Verma, A., Harwood, T., Hoppenrath, M. y Murray, S. (2017) «Characterization of Gambierdiscus lapillus sp. nov. (Gonyaulacales, Dinophyceae): a new toxic dinoflagellate from the Great Barrier Reef (Australia)», *Journal of Phycology*. 53(2): p. 283-297. doi: 10.1111/jpy.12496.

Litaker, R. W., Holland, W. C., Hardison, D. R., Pisapia, F., Hess, P., Kibler, S. R. y Tester, P. A. (2017) «Ciguatotoxicity of Gambierdiscus and Fukuyoa species from the Caribbean and Gulf of Mexico», *PLoS ONE*. 12(10). doi: 10.1371/journal.pone.0185776.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Chinain, M., Holmes, M. J., Holland, W. C. y Tester, P. A. (2009) «Taxonomy of Gambierdiscus including four new species, Gambierdiscus caribaeus, Gambierdiscus carolinianus, Gambierdiscus carpenteri and Gambierdiscus ruetzleri (Gonyaulacales, Dinophyceae)», *Phycologia*. 48(5): p. 344-390. doi: 10.2216/07-15.1.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Nau, A. W., Holland, W. C., Chinain, M., Holmes, M. J. y Tester, P. A. (2010) «Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus Gambierdiscus», *Toxicon*. 56(5): p. 711-730. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.05.017.

Lobel, P. S., Anderson, D. M. y Durand-Clement, M. (1988) «Assessment of Ciguatera Dinoflagellate Populations: Sample Variability and Algal Substrate Selection», *The Biological Bulletin*. 175(1): p. 94-101. doi: 10.2307/1541896.

Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C. y Lemee, R. (2017) «Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms», *Harmful Algae*. 64: p. 1-10. doi: 10.1016/j.hal.2017.03.002.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A. M., Sala, M. M., Thibaut, T., et al. (2011) «Trends in Ostreopsis proliferation along the Northern Mediterranean coasts», *Toxicon*. 57(3): p. 408-420. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.11.019.

Mavrič, B., Urbanič, G., Lipej, L. y Simboura, N. (2013) «Influence of sample size on ecological status assessment using marine benthic invertebrate-based indices», *Marine Ecology*. 34(1): p. 72-79. doi: 10.1111/j.1439-0485.2012.00526.x.

Meier, K. J. S., Young, J. R., Kirsch, M. y Feist-Burkhardt, S. (2007) «Evolution of different life-cycle strategies in oceanic calcareous dinoflagellates», *European Journal of Phycology*. 42(1): p. 81-89. doi: 10.1080/09670260600937833.

Morton, S. L., Norris, D. R. y Bomber, J. W. (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(1): p. 79-90. doi: 10.1016/0022-0981(92)90076-M.

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H. y Adachi, M. (2014) «Morphology of *Gambierdiscus scabrosus* sp. nov. (Gonyaulacales): A new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan», *Journal of Phycology*. 514: p. 506-514. doi: 10.1111/jpy.12175.

Okolodkov, Y. B., Campos-Bautista, G., Gárate-Lizárraga, I., González-González, J. A. G., Hoppenrath, M. y Arenas, V. (2007) «Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico», *Aquatic Microbial Ecology*. 47(3): p. 223-237. doi: 10.3354/ame047223.

Parsons, M. L., Aligizaki, K., Bottein, M. Y. D., Fraga, S., Morton, S. L., Penna, A. y Rhodes, L. (2012) «*Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology», *Harmful Algae*. 14: p. 107-129. doi: 10.1016/j.hal.2011.10.017.

Parsons, M. L., Brandt, A. L., Ellsworth, A., Leynse, A. K., Rains, L. K. y Anderson, D. M. (2017) «Assessing the use of artificial substrates to monitor *Gambierdiscus* populations in the Florida Keys», *Harmful Algae*. Elsevier B.V.68: p. 52-66. doi: 10.1016/j.hal.2017.07.007.

Parsons, M. L. y Preskitt, L. B. (2007) «A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i», *Harmful Algae*. 6(5): p. 658-669. doi: 10.1016/j.hal.2007.01.001.

Parsons, M. L., Settlemier, C. J. y Bienfang, P. K. (2010) «A simple model capable of simulating the population dynamics of *Gambierdiscus*, the benthic dinoflagellate responsible for ciguatera fish poisoning», *Harmful Algae*. 10(1): p. 71-80. doi: 10.1016/j.hal.2010.07.002.

Peraza, R. y Moreira, Á. R. (2012) «Composición y abundancia de dinoflagelados epibentónicos tecados potencialmente tóxicos de la Ensenada Guajimico , región Centro-Sur de Cuba», *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*. 29: p. 59-66.

Pitcher, G. C., Figueiras, F. G., Hickey, B. M. y Moita, M. T. (2010) «The physical oceanography of upwelling systems and the development of harmful algal blooms», *Progress in Oceanography*. 85(1-2): p. 5-32. doi: 10.1016/j.pocean.2010.02.002.

Privitera, D., Giussani, V., Isola, G., Faimali, M., Piazza, V., Garaventa, F., Asnaghi, V.,

Cantamessa, E., Cattaneo-Vietti, R. y Chiantore, M. (2012) «Toxic effects of *Ostreopsis ovata* on larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*», *Harmful Algae*. 18: p. 16-23. doi: 10.1016/j.hal.2012.03.009.

Randall, J. E. (2005) «Review of clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of clupeoid fishes», *Pacific Science*. 59(1): p. 73-77. doi: 10.1353/psc.2005.0013.

Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S. y Dechraoui-Bottein, M. (2016) *Guide for designing and implementing a plan to monitor toxin-producing microalgae*. 2da Ed.

Rhodes, L. (2011) «World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt», *Toxicon*. 57(3): p. 400-407. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.05.010.

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Munday, R., Selwood, A. I., McNabb, P. S., Holland, P. T. y Bottein, M. Y. (2010) «Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands», *Toxicon*. 56(5): p. 751-758. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.05.017.

Richlen, M. L. y Lobel, P. S. (2011) «Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean», *Marine Ecology Progress Series*. 421: p. 51-66. doi: 10.3354/meps08854.

Rojas Valladares, R., Puig Lustono, J. O., Díaz Sidron, L., Lefran Gómez, M. E., Espinosa Brito, A. y Enrique Garrido, D. M. (1986) «Brotos de ciguatera originados por jurel de la costa sur de Cuba», *Rev. cuba. Hig. Epidemiología*. 24(1): p. 78-85.

Sar, E. A., Ferrario, M. E. y Beatriz, R. (2002) *FLORACIONES ALGALES NOCIVAS EN EL CONO SUR AMERICANO*.

Selina, M. S. y Orlova, T. Y. (2010) «First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan», *Botanica Marina*. 53(3): p. 243-249. doi: 10.1515/BOT.2010.033.

Shears, N. T. y Ross, P. M. (2009) «Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide», *Harmful Algae*. 8(6): p. 916-925. doi: 10.1016/j.hal.2009.05.003.

Smith, K. F., Rhodes, L., Verma, A., Curley, B. G., Harwood, D. T., Kohli, G. S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R. y Murray, S. A. (2016) «A new *Gambierdiscus* species (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands: *Gambierdiscus cheloniae* sp. nov», *Harmful Algae*. 60: p. 45-56. doi: 10.1016/j.hal.2016.10.006.

Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H. y Adachi, M. (2014) «Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand», *Harmful Algae*. 37: p. 160-171. doi: 10.1016/j.hal.2014.06.003.

Taylor, F. (2006) «Dinoflagellates.», *Radiology*. 239: p. 632-49. doi: 10.1038/npg.els.0001977.

Taylor, F., Fukuyo, Y., Larsen, J. y Hallegraeff, G. (2004) «Taxonomy of harmful dinoflagellates», en *Manual of Harmful Marine Microalgae*. . Paris.UNESCO Publishingp. 389-432.

Taylor, F. J. R. (1987) *The Biology of dinoflagellates*.Blackwell: Oxford.

Tester, P. A., Feldman, R. L., Nau, A. W., Kibler, S. R. y Litaker, R. W. (2010) «Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies», *Toxicon*. 56(5): p. 698-710. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.026.

Tester, P. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandersea, M. W., Leaw, C. P., Teen, L. P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M. A. y Litaker, R. W. (2014) «Sampling harmful benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods», *Harmful Algae*. 39: p. 8-25. doi: 10.1016/j.hal.2014.06.009.

Tester, P. A., Vandersea, M. W., Buckel, C. A., Kibler, S. R., Holland, W. C., Davenport, E. D., Clark, R. D., Edwards, K. F., Taylor, J. C., Pluym, J. L. Vander, Hickerson, E. L. y Litaker, R. W. (2013) «*Gambierdiscus* (Dinophyceae) species diversity in the flower garden banks national marine sanctuary, Northern Gulf of Mexico, USA», *Harmful Algae*. 29: p. 1-9. doi: 10.1016/j.hal.2013.07.001.

Tindall, D. R. y Morton, S. L. (1998) «Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera», en *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. p. 293-313.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E. y Romagnoli, T. (2010) «*Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata», *Harmful Algae*. 9(2): p. 233-239. doi: 10.1016/j.hal.2009.10.006.

Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Holland, W. C., Tester, P. A., Schultz, T. F., Faust, M. A., Holmes, M. J., Chinain, M. y Wayne Litaker, R. (2012) «Development of semi-quantitative pcr assays for the detection and enumeration of *gambierdiscus* species (gonyaulacales,

dinophyceae)», *Journal of Phycology*. 48(4): p. 902-915. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01146.x.

Vila, M., Garcés, E. y Masó, M. (2001) «Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean», *Aquatic Microbial Ecology*. 26(1): p. 51-60. doi: 10.3354/ame026051.

Xu, Y., Richlen, M. L., Morton, S. L., Mak, Y. L., Chan, L. L., Tekiau, A. y Anderson, D. M. (2014) «Distribution, abundance and diversity of Gambierdiscus spp. from a ciguatera-endemic area in Marakei, Republic of Kiribati», *Harmful Algae*. 34: p. 56-68. doi: 10.1016/j.hal.2014.02.007.

Yasumoto, T., Inoue, A., Ochi, T., Fujimoto, K., Oshima, Y., Fukuyo, Y., Adachi, R. y Bagnis, R. (1980) «Environmental studies on a toxic dinoflagellate responsible for Ciguatera», *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 46(11): p. 1397-1404. doi: 10.2331/suisan.46.1397.

YASUMOTO, T., SEINO, N., MURAKAMI, Y. y MURATA, M. (1987) «TOXINS PRODUCED BY BENTHIC DINOFLAGELLATES», *The Biological Bulletin*. 172(1): p. 128-131. doi: 10.2307/1541612.

Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T. y Adachi, M. (2014) «Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese Gambierdiscus spp. (Dinophyceae)», *Harmful Algae*. 35: p. 29-37. doi: 10.1016/j.hal.2014.03.007.

Zhang, H., Wu, Z., Cen, J., Li, Y., Wang, H. y Lu, S. (2016) «First report of three benthic dinoflagellates, Gambierdiscus pacificus, G. australes and G. caribaeus (Dinophyceae), from Hainan Island, South China Sea», *Phycological Research*. 64(4): p. 259-273. doi: 10.1111/pre.12137.