

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Crecimiento en condiciones controladas de tres especies del género
Gambierdiscus

Autor: Gleisy Pérez Avilleira

Tutores: Dr. C. Carlos M. Alonso Hernández

MSc. Lisbet Días 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

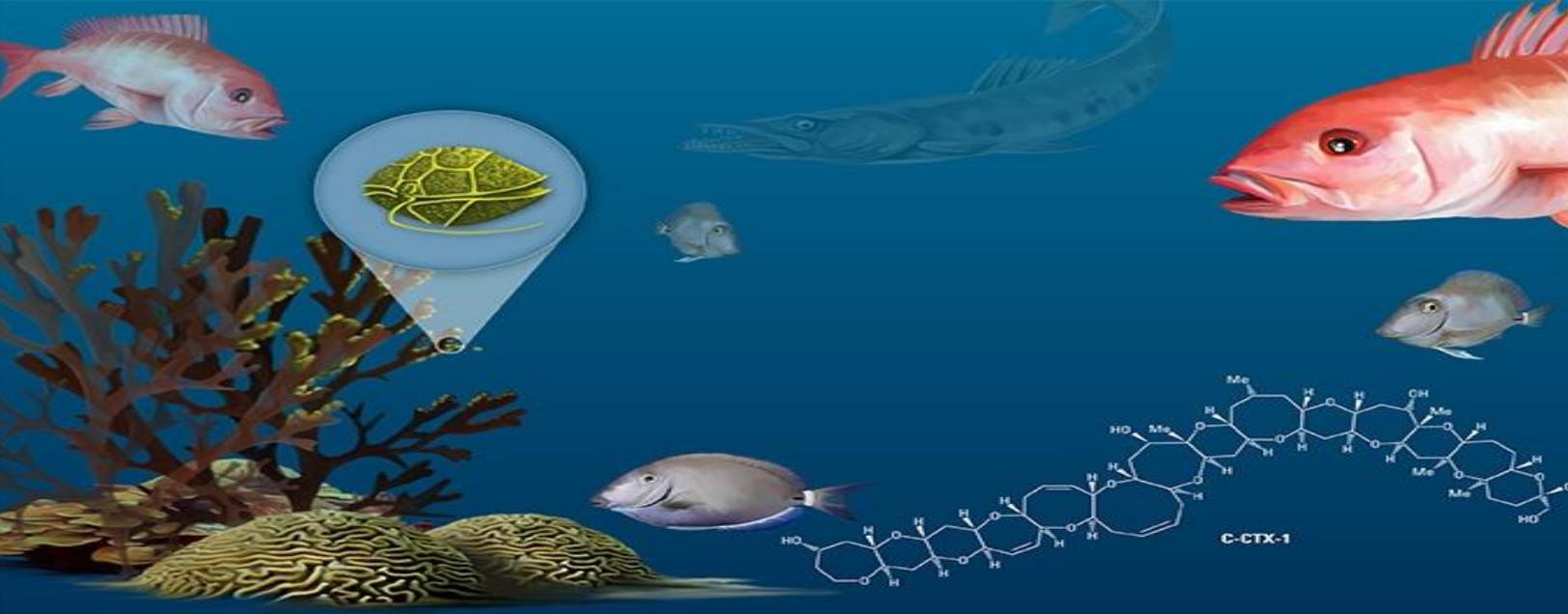


Para cualquier información contacte con:

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

Crecimiento en condiciones controladas de tres especies del género
Gambierdiscus

Tesis de Diploma

Autora: Gleisy Pérez Avilleira

Santa Clara
2018



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Tesis de Diploma

Crecimiento en condiciones controladas de tres especies del género

Gambierdiscus

Autora: Gleisy Pérez Avilleira

Tutores: Dr. C. Carlos Alonso Hernández

MSc. Lisbet Díaz Asencio

Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos. Carretera a Castillo de Jagua km 1 ½, Ciudad Nuclear, Cienfuegos

carlos@ceac.cu; lisbet@ceac.cu

Santa Clara

2018

Pensamiento

*“Equipado con sus cinco sentidos, el Hombre explora el Universo
que lo rodea y a sus aventuras las llama Ciencia.”*

Edwin Powell Hubble

Dedicatoria

A mis abuelos, a mis padres y mi hermano por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo

Agradecimientos

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Gracias, de corazón, a mis tutora la máster en ciencias Lisbet Días Asencio por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Ha hecho fácil lo difícil, también a mi tutor el doctor en ciencias Carlos Alonso Hernández. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Muchas gracias al doctor en ciencias Ángel Moreira González por su gran apoyo y ayuda en la obtención de los resultados de la tesis.

Todas las personas del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos, en especial Donaida Chamero, Yusmila Helguera, Miguel Batista y Lissett Abreu muchas gracias por su atención y amabilidad en todo lo referente a mi vida como estudiante.

A mis profesores por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A mis padres, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto se lo debo a ustedes.

Mis abuelos por criarme y dedicarme toda su vida, por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

A mi hermano, por estar conmigo y apoyarme siempre, te quiero mucho.

A Mercedes por siempre apoyarme y estar al pendiente de mí, gracias por todo.

A mis compañeros y amigos, estén donde estén sin excepción de ninguno, gracias por su tiempo y apoyo, por todos los buenos y malos ratos que compartimos juntos, por aguantarme y escucharme, gracias por estar ahí.

Un especial agradecimiento para Cely, Ariannndy, Sarah, Yeliany, por estar siempre a mi lado.

A mis compañeras de cuarto por todo lo que vivimos durante estos cinco años de universidad, por todos esos momentos de tristeza, de alegría, por todos esos karaokes que cantamos juntas, por todas las noches que nos quedamos despiertas hasta altas horas de la madrugada, por todas nuestras salidas. Chicas muchas gracias por todo.

Gracias a Luis Ángel y a Gabriel por su apoyo en todo este proceso, por todos esos momentos de estrés y de alegría que compartimos juntos.

La vida es como un viaje en autobús algunos comienzan el viaje junto a ti, otros se montan a mitad del camino, muchos se bajan antes de que llegues al final de tu viaje y muy pocos permanecen junto a ti hasta el final, muchas gracias a todas esas personas que me apoyaron y estuvieron presentes de una forma u otra.

A todos muchas gracias.

Resumen

Resumen

En la presente investigación se estudió el crecimiento de tres especies del género *Gambierdiscus* recientemente aisladas en Cuba: *G. caribaeus*, *G. carolinianus* y *G. belizeanus*; bajo condiciones controladas de laboratorio (temperatura 26 °C, salinidad 32, fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad, 200 mL medio cultivo f10K). Se determinó la tasa de crecimiento y la productividad de cultivo de cada especie mediante el análisis de curvas de crecimiento. El tiempo para el cual se alcanzó el máximo crecimiento fue de aproximadamente 30 días para las tres especies. La tasa de crecimiento específica se mantuvo entre 0,14 y 0,17 días⁻¹ y fueron menores a las reportadas por otros autores. El cultivo de mayor productividad fue *G. belizeanus* de 648 400 células, para *G. carolinianus* fue de 310 800 células y para *G. caribaeus* fue de 146 200 células. Se realizó además un análisis morfométrico que coincidió con la variabilidad de las medidas descritas en la literatura. Adicionalmente se adecuó una clave dicotómica basada en caracteres morfológicos (forma de la célula, forma de la placa 2''', forma de la placa 2' y posición de la placa del poro apical) detectables mediante microscopía de luz a las ocho especies de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* reportados hasta la fecha para el área geográfica del Océano Atlántico, incluyendo el Golfo de México y el Mar Caribe: *G. belizeanus*, *G. excentricus*, *G. silvae*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus*, *G. carpenteri*, *G. australes* y *F. ruetzleri*.

Palabras claves: Cuba, tasas de crecimiento, productividad en cultivo, análisis morfométrico, clave dicotómica, Océano Atlántico y Mar Caribe.

Abstract

Abstract

In the present investigation the growth of three recently isolated species of the genus *Gambierdiscus* in Cuba was studied: *G. caribaeus*, *G. carolinianus* and *G. belizeanus*; under controlled laboratory conditions (temperature 26 °C, salinity 32, photoperiod 12h light / 12h dark, 200 mL medium culture f10K). The growth rate and culture productivity of each species were determined by analyzing growth curves. The time for which the maximum growth was reached was approximately 30 days for the three species. The specific growth rates were between 0,14 and 0,17 days⁻¹ and were lower than those reported by other authors. The most productive culture was *G. belizeanus* with 648 400 cells, for *G. carolinianus* it was 310 800 cells and for *G. caribaeus* it was 146 200 cells. A morphometric analysis was also performed and agreed with the variability of the measures described in the literature. Additionally, a dichotomous key based on morphological characters (cell shape, shape of plate 2''', shape of plate 2' and position of the apical pore plate) detectable by light microscopy was constructed to the eight species of the genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* reported to date for the geographic area of the Atlantic Ocean, including the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea: *G. belizeanus*, *G. excentricus*, *G. silvae*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus*, *G. carpenteri*, *G. australes* and *F. ruetzleri*.

Key words: Cuba, growth rates, culture productivity, morphometric analysis, dichotomous key, Atlantic Ocean and Caribbean Sea.

Índice

1	Introducción	1
2	Revisión Bibliográfica	5
2.1	Floraciones algales nocivas.....	5
2.1.1	Ciguatera.....	6
2.2	Generalidades de los dinoflagelados epibentónicos tecdos potencialmente tóxicos.....	8
2.2.1	Aspectos generales de los dinoflagelados.....	8
2.3	Taxonomía del género <i>Gambierdiscus</i> / <i>Fukuyoa</i>	9
2.3.1	<i>Gambierdiscus belizeanus</i>	10
2.3.2	<i>Gambierdiscus caribaeus</i>	10
2.3.3	<i>Gambierdiscus carolinianus</i>	11
2.4	Ecología del género <i>Gambierdiscus</i>	11
2.5	Cultivo de microalgas.....	12
2.5.1	Medios de cultivos de microalgas.....	12
2.5.2	Factores de impacto en el crecimiento de microalgas.....	13
2.6	Cinética de crecimiento de las microalgas.....	17
3	Materiales y Métodos	20
3.1	Determinación de las tasas de crecimiento específica, productividad en cultivo y morfometría de las especies <i>G. carolinianus</i> , <i>G. caribaeus</i> y <i>G. belizeanus</i>	20
3.1.1	Preparación el medio de cultivo f10K.....	20
3.1.2	Toma de muestras.....	20
3.1.3	Conteo y estimación de células de <i>Gambierdiscus</i>	21
3.1.4	Obtención de las curvas de crecimiento.....	21
3.1.5	Morfometría de las especies de <i>Gambierdiscus</i> en cultivo.....	21

3.2	Clave dicotómica para la identificación de las especies de <i>Gambierdiscus</i> existentes en la región del Caribe.	22
4	Resultados	24
4.1	Tasas de crecimiento y productividad de cultivo de las especies <i>G. carolinianus</i> , <i>G. caribaeus</i> y <i>G. belizeanus</i>	24
4.1.1	Morfometría de las especies de <i>Gambierdiscus</i> en cultivo.....	25
4.2	Clave dicotómica para la identificación de las especies de <i>Gambierdiscus</i> existentes en la región del Caribe.	26
5	Discusión	32
5.1	Tasas de crecimiento específica, productividad en cultivo y morfometría de las especies <i>G. carolinianus</i> , <i>G. caribaeus</i> y <i>G. belizeanus</i>	32
5.1.1	Tasa de crecimiento y productividad en cultivo	32
5.1.2	Morfometría de las especies de <i>Gambierdiscus</i> en cultivo.....	35
5.2	Clave dicotómica para la identificación de las especies de <i>Gambierdiscus</i> existentes en la región del Caribe.	36
6	Conclusiones	37
7	Recomendaciones	38
8	Referencias Bibliográficas	39

Introducción

1 Introducción

Desde hace algunos años se conoce que muchas especies de microalgas producen toxinas. En los medios marinos y salobres, la mayoría de las especies toxígenas son dinoflagelados pertenecientes a la familia *Dinophyceae* (Moreira, 2009).

Existen diversos síndromes tóxicos asociados a estas microalgas productoras de toxinas. Uno de los más conocidos es la ciguatera, enfermedad endémica de regiones tropicales y subtropicales, causado por microalgas que viven asociadas a los arrecifes de coral y se transmiten a través de pequeños peces herbívoros a peces comestibles de mayor tamaño (Reguera *et al.*, 2016).

Los principales agentes causantes de esta enfermedad son un grupo dinoflagelados bentónicos tecados dentro del cual se encuentra el género *Gambierdiscus* (Riobó y Franco, 2011). La primera especie identificada fue *G. toxicus* en el año 1977 por Adachi y Fukuyo en Islas Gambier, luego se fueron añadiendo otras especies: *G. australes* Faust *et* Chinain (1999); *G. belizeanus* Faust (1995); *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea *et* Tester (2009); *G. pacificus* Chinain *et* Faust (1999); *G. polynesiensis* Chinain *et* Faust (1999); *G. ruetzleri* Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. yasumotoi* Holmes (1998) (Litaker *et al.*, 2009; Litaker *et al.*, 2010); *G. excentricus* Fraga (2011); *G. silvae* S. Fraga y F. Rodríguez (2014); *G. scabrosus* T. Nishimura, Shinya Sato y M. Adachi (2014); *G. balechii* S. Fraga, F. Rodríguez y I. Bravo (2016); *G. cheloniae* K.F. Smith, L. Rhodes y S. A. Murray (2016); *G. honu* L. Rhodes, K. F. Smith, A. Verna *et al.* (2016); *G. lapillus* Kretzschmar, Hoppenrath Murray *et al.* (2017) y seis ribotipos (*Gambierdiscus* ribotipo 2 Litaker, Vandersea, Faust *et al.* (2010); *G. sp. tipo 2* S. Kuno, R. Kamikawa, Yoshimatsu *et al.* (2010); *G. sp. tipo3* T. Nishimura, S. Sato, W. Tawong *et al.* (2013); *sp. tipo4, 5 y 6* Y. Xu, M. L. Richlen, S. L. Morton *et al.* (2014)) (Smith *et al.*, 2017). En el año 2015 Fernando Gómez describió una nueva especie *Fukuyoa paulensis* F. Gómez, D. X. Qiu, R. M. Lopes y Senjie Lin (2015), dando lugar a un nuevo género de dinoflagelados por lo que las especies de *Gambierdiscus* que tienen forma globular en vez de aplanadas pasan a formar parte de un nuevo género *Fukuyoa*. Las especies del género *Gambierdiscus* descritas que presentan forma globular son *G. ruetzleri* Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland *et* Tester (2009) y *G. yasumotoi* Holmes (1998), pasando a ser *Fukuyoa ruetzleri* y *F. yasumotoi* (Gómez *et al.*, 2015).

Las toxinas (ciguatoxinas) son transferidas a peces carnívoros a través de la cadena trófica, el pescado que ha adquirido las toxinas no se ve afectado en aspecto, color, sabor, textura y comportamiento, siendo imposible su detección por análisis organolépticos de ahí su peligrosidad.

Las toxinas se acumulan fundamentalmente en la cabeza, vísceras y huevas, pero también en el músculo y son extremadamente estables por lo que procesos de calor, congelación, deshidratación, salado, ahumado u otros no las eliminan ni disminuyen su efecto (Pis Ramírez, 2008).

A nivel mundial, se estima que entre 50 000 y 200 000 personas cada año se ven afectadas (Larsson *et al.*, 2018). En Cuba se han realizado estudios desde el punto de vista epidemiológico de esta enfermedad, entre los más destacados se encuentran los reportados por Valladares *et al.* (1986), que estudiaron los brotes originados en la costa sur de Cuba; Vallejo *et al.* (1991), con el estudio de 13 brotes desde 1986 hasta 1989, afectando a 81 personas donde estuvo involucrada fundamentalmente el consumo de jurel *Caranx fallax* Cuvier (1833); Alonso *et al.* (2006), con el estudio de un brote de ciguatera en Güines por consumo de morena; Maya *et al.* (2007), donde se estudiaron 227 pacientes durante el período de 1999 - 2005. De forma general, la enfermedad fue producida al consumir pescados adquiridos a pescadores particulares y por el desconocimiento de qué tipo de pescado ingerían (Pis Ramírez, 2008).

El gobierno cubano adoptó una serie de medidas para controlar los brotes ciguatera (Pis Ramírez, 2008):

- La implantación de la Resolución 497 y el decreto ley 154, para regular las capturas, procesamiento y comercialización de especies tóxicas;
- La creación de una Oficina de Inspección Pesquera como vía de controlar la captura de los pescadores particulares y deportivos;
- La realización de campañas de información a la población sobre el tema de las especies tóxicas;
- La implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en la industria procesadora de pescado lo cual ha ayudado a la disminución de los brotes en el país en la actualidad.

En Cuba, los estudios de dinoflagelados epibentónicos tóxicos se han realizado principalmente en la costa norte, concentrados cerca de la capital del país. Popowski *et al.* (2001) realizaron estudios de distribución y abundancia de *Gambierdiscus toxicus* en el litoral norte habanero, cuando se pensaba que esta especie era la única integrante del género. Especies de los géneros *Ostreopsis* y *Prorocentrum* también han sido observados en este litoral (Delgado *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2006). Pombo (2000); Moreira (2009); Peraza y Moreira (2012) determinaron

distribución y abundancia de dinoflagelados epibentónicos tóxicos en la Bahía de Cienfuegos y en Guajimico.

En los últimos años un programa regional de investigación sobre la ciguatera se desarrolla con el soporte del Organismo Internacional de Energía Atómica en los países del Caribe. El diseño e implementación de un Sistema de Alerta Temprana para la ciguatera y otros florecimientos de algas nocivas es el principal objetivo de este proyecto, contribuyendo a la disminución de los riesgos asociados a estas enfermedades (Reguera *et al.*, 2016).

Con el desarrollo de estas investigaciones particularmente en Cuba se desea identificar con técnicas morfológicas y moleculares las especies presentes, conocer el grado toxicidad y los perfiles de toxinas de cada una de ellas. La principal limitante para superar estos vacíos es disponer de suficiente biomasa para satisfacer las demandas de las tecnologías de avanzadas a utilizar. Por lo que el establecimiento de cultivos de *Gambierdiscus* constituye una prioridad dentro del proyecto internacional RLA7020 que implementa el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos en colaboración con 12 países de la región del Caribe (Reguera *et al.*, 2016).

En el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos se implementa actualmente una metodología para el aislamiento y mantenimiento de especies de este género. Hasta el momento varios aislados de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus* han sido obtenidos; sin embargo, para mantener el crecimiento de estos cultivos de forma estable se necesita conocer cómo ocurre su proceso de crecimiento en condiciones controladas de laboratorio que permitan la obtención de biomasa necesaria para el desarrollo de futuras investigaciones sobre estas especies. Así, la ausencia en Cuba de estudios para el mantenimiento de cultivos e identificación de especies del género *Gambierdiscus* constituye el problema científico a resolver en nuestra investigación.

De aquí que como hipótesis general de trabajo se plantea que:

Hipótesis

La caracterización del crecimiento en condiciones controladas de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus* permitirá obtener cultivos estables que garanticen suficiente biomasa para estudios de identificación y toxicidad mediante técnicas avanzadas.

Objetivo General

1. Caracterizar el crecimiento en condiciones controladas de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus*.

Objetivos Específicos

1. Determinar la tasa de crecimiento específica, productividad en cultivo y morfometría de las especies en estudio.
2. Adecuar una clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* existentes en la región del Caribe.

Revisión Bibliográfica

2 Revisión Bibliográfica

2.1 Floraciones algales nocivas

Las microalgas pigmentadas del fitoplancton son los principales productores primarios y constituyen la base de las redes tróficas marinas. Las floraciones, o crecimiento explosivo del fitoplancton, son un fenómeno natural que contribuye a sostener la producción de bivalvos y de pequeños peces pelágicos. Mediante la fotosíntesis, el fitoplancton sintetiza materia orgánica a partir de la energía solar, macronutrientes y oligoelementos (metales traza, vitaminas); mientras liberan O₂ al ambiente (Peraza y Moreira, 2012). De esta forma, el crecimiento del fitoplancton actúa como una «bomba biológica de carbono» que ayuda a mitigar el efecto invernadero; además de excretar a la atmósfera dimetil-sulfuro, gas que favorece la formación de núcleos de condensación de agua que dan lugar a las nubes y por tanto contrarrestan el exceso de radiación solar (Reguera *et al.*, 2016).

Las Floraciones Algales Nocivas (FAN, en inglés *HAB = Harmful Algal Blooms*) es un término adoptado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO (FAO, 2004) y aceptado internacionalmente para denominar cualquier proliferación de microalgas (independientemente de su concentración) percibida como un daño por su impacto negativo en la salud pública, la acuicultura, el medio ambiente y las actividades recreativas (Reguera *et al.*, 2012).

Entre los efectos que estas floraciones pueden provocar se encuentra la alteración de las condiciones físico-químicas de medio, ya sea por causar anoxia, descender el pH del agua por la emisión de anhídrido carbónico, o cambiar la viscosidad (Peraza y Moreira, 2012). 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 (Reguera *et al.*, 2016).

Las biotoxinas son responsables de los síndromes de intoxicación desde las latitudes tropicales a las polares (Tabla I). Debido a su heterogeneidad estructural, afectan directamente a gran variedad de receptores y procesos metabólicos (Laurent *et al.*, 2005). Aunque no se sabe con exactitud por qué algunas especies de microalgas producen toxinas, se puede plantear la posibilidad de que los organismos que las sintetizan lo hagan para competir por espacio, luchar contra la depredación, o como mecanismo de defensa ante el sobre crecimiento de otros organismos. Las toxinas producidas por microorganismos marinos son de interés global por los daños que ocasionan en animales, especialmente en humanos, que se afectan tanto en la salud, como en la economía (Peraza y Moreira, 2012).

Tabla I. Clasificación de los tipos de intoxicaciones de acuerdo al efecto biológico en los seres humanos (Berdalet *et al.*, 2016).

Efectos	Dinoflagelado causante (ej.)	Principales toxinas	Principales especies
Intoxicación Amnésica por Marisco	<i>Amphora coffeaeformis</i> , <i>Nitzschia navis-varingica</i>	Ácido domoico	Mejillones, vieiras, almejas, cangrejos, peces
Intoxicación Paralítica por Marisco	<i>Alexandrium catenella</i> , <i>A. cohorticula</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i>	Saxitoxinas (STXs)	Almejas, mejillones, ostras, gasterópodos, langostas, copépodos
Intoxicación Diarreica por Marisco	<i>Dinophysis acuta</i> , <i>Prorocentrum lima</i> , <i>Coolia sp</i>	Ácido Okadaico, dinophysistoxinas, yesotoxinas y pectenotoxinas	Mejillones, vieiras, almejas, gasterópodos
Intoxicación Ciguatérica o Ciguatera	<i>Gambierdiscus toxicus</i> , <i>Prorocentrum spp.</i> , <i>Ostreopsis spp.</i>	Ciguatoxinas, maitotoxinas, palytoxinas y gambierol	Peces, caracoles, gambas, cangrejos
Intoxicación Neurotóxica por Marisco	<i>Karenia brevis</i> , <i>Prorocentrum borbonicum</i>	Brevetoxinas	Ostras, almejas, mejillones, berberechos, buccinos
Intoxicación por Azaspirácidos en Marisco	<i>Protoperinium crassipes</i>	Azaspirácidos	Mejillones, ostras

2.1.1 Ciguatera

La ciguatera es una intoxicación alimentaria causada por el consumo de peces marinos que han acumulado en sus tejidos biotoxinas (ciguatoxina-1, maitotoxina, escaritoxina, palitoxina, entre otras) inicialmente producidas por especies de género *Gambierdiscus*, microalgas que habitan en diferentes ecosistemas como arrecifes, macroalgas, y pastos marinos (Laurent *et al.*, 2005). Otro ejemplo de FANs bentónicas son las floraciones de *Ostreopsis spp.*, cuyas toxinas, liberadas al agua de mar, pasan al aerosol marino y causan irritaciones de la vías respiratorias y la piel de los

bañistas. Algunas especies del género *Prorocentrum* producen toxinas diarreicas que provocan desórdenes gastrointestinales en habitantes de aguas tropicales y templadas (Sar *et al.*, 2002).

Limitada originalmente a los trópicos y subtrópicos, en un cinturón entre las latitudes 35° L.N y 35° L.S (Pottier *et al.*, 2001), la ciguatera se ha expandido a otras regiones, debido al desarrollo de la transportación marítima, el turismo, y la importación de pescado desde los trópicos. Es una enfermedad que afecta a más de 50 000 y 200 000 personas cada año (Larsson *et al.*, 2018).

Las toxinas llegan al humano a través de la cadena alimentaria. Las microalgas productoras son ingeridas por peces herbívoros que adquieren de esta forma las ciguatoxinas, las cuales son concentradas y transformadas en el hígado, cerebro y gónadas de los peces carnívoros que consumen a los herbívoros (Laurent *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que algunas biotoxinas como las amnésicas y paralizantes, que al parecer no afectan a los peces, pasan con mayor concentración a eslabones más altos en las cadenas tróficas, causando problemas a seres humanos, mamíferos, aves, reptiles, anfibios e insectos, no obstante, aún no hay evidencia que muestre lo mismo para las toxinas ciguatéricas (Laurent *et al.*, 2005).

Alrededor de 400 especies de peces marinos pertenecientes a 60 familias han sido reportadas por acumular ciguatoxinas (Tester *et al.*, 2010). Los principales vectores para la enfermedad son los peces pelágicos y los que habitan en los arrecifes coralinos; entre ellos se encuentran la aguja, pez vela, barracuda, dorado, peto, coronado, cubera, algunos pargos (pargo del Golfo, jocú, rabonegro, cubera), el medregal, el carite, algunos meros (el Americano, pintarroja), chernas (criolla, pintada, aleta amarilla), el pez perro, entre otros (Laurent *et al.*, 2005). En el pacifico se han realizado estudios donde demuestran que consumidores primarios, incluyendo peces e invertebrados herbívoros pueden también causar ciguatera (Rongo y van Woesik, 2013).

Los síntomas de la intoxicación por ciguatoxinas se manifiestan poco después de ser ingeridas (Laurent *et al.*, 2005). Estos síntomas pueden ser muy diversos y se clasifican en: gastrointestinales, neurológicos o cardíacos, entre los que se encuentran diarrea, vómitos, dolor abdominal, sudoraciones, alteraciones en el olfato, reducción de la presión sanguínea, parálisis, parestesias en labios y extremidades, inversión de la temperatura (los objetos fríos dan sensación de estar calientes y los calientes se perciben como fríos), ritmo cardíaco irregular, entre otros (Friedman *et al.*, 2008).

Existe un numeroso grupo de biotoxinas que han sido identificadas y asociadas con la ciguatera, entre las que se pueden citar maitotoxinas (MTX), dinifisitoxina, (DTX - 1, 2, 4), dinifisitoxina-2 (DTX-2), cooliatoxina, ostreoxina (palitoxina) y gambierol (Caillaud *et al.*, 2011).

Las ciguatoxinas o CTX son compuestos clasificados como poliéteres liposolubles y están constituidos por agrupaciones de 13 o 14 anillos con una estructura muy estable. La molécula que origina las CTX es la gambiertoxina 4B (GTX- 4B), de ella se deriva el resto de las variaciones o transformaciones oxidativas que ocurren cuando transitan a través de la cadena trófica(Riobó y Franco, 2011). Así la CTX-1 que es la principal de todas, se ha encontrado en los peces carnívoros, cuyos especímenes son los de mayor captura y comercialización, constituyéndose en un peligroso riesgo para la salud pública (Laurent *et al.*, 2005). Se han identificado y caracterizado tres familias de ciguatoxinas: ciguatoxinas del Pacífico (P-CTX), ciguatoxinas del Caribe (C-CTX), y ciguatoxinas del Océano Índico (ICTX) (Hamilton *et al.*, 2010) siendo la P-CTX-1 es la más abundante y ciguatérica (Laurent *et al.*, 2005).

Estas biotoxinas presentan diferentes formas de actuar, pueden afectar numerosas funciones del cuerpo humano, hasta inclusive ocasionar la muerte. Algunas, como las maitotoxinas, son excretadas y causan problemas solo si se consumen los intestinos de peces infectados (Riobó y Franco, 2011). Por el contrario, la CTX que es una molécula muy estable y extremadamente potente, tiende a acumularse en varios tejidos incluyendo músculos y órganos internos generando un bloqueo de los canales de sodio en el cuerpo humano (Laurent *et al.*, 2005).

2.2 Generalidades de los dinoflagelados epibentónicos tecados potencialmente tóxicos

2.2.1 Aspectos generales de los dinoflagelados

Son animales microscópicos, casi siempre unicelulares. Tienen flagelos, los cuales le permiten la locomoción y la alimentación. Los dinoflagelados corresponden a un grupo del fitoplancton marino de carácter cosmopolita (Rhodes *et al.*, 2017). Las características morfológicas y requerimientos nutritivos los hacen exitosos desde el punto de vista reproductivo y de crecimiento en aguas tropicales, donde la estabilidad en la columna de agua es mayor y la concentración de nutrientes más baja. Ocupan un lugar secundario, respecto de las diatomeas (Llorente y Cereceda, 2001).

El tamaño de los dinoflagelados fluctúa entre 50 y 500 μm , por lo que se les ubica dentro del microplancton, y pueden ser divididos en dos grandes grupos diferenciados por la presencia o ausencia de placas de naturaleza celulósica en la pared celular, de acuerdo a esta característica se les denomina tecados o atecados respectivamente (Rhodes *et al.*, 2017).

Algunos dinoflagelados son fotosintéticos y de vida libre, otros son autotróficos y/o simbióticos fundamentalmente con protozoos y animales marinos, otros son depredadores, y algunos parásitos (Rhodes *et al.*, 2017). Constituyen el segundo grupo en importancia del fitoplancton, responsable de la producción de energía en la cadena alimentaria oceánica (Llorente y Cereceda, 2001).

Existe una gran variedad de dinoflagelados epibentónicos tecaados productores de toxinas, dentro los cuales se encuentran especies de diferentes géneros como: *Pyrodinium*, *Alexandrium*, *Coolia*, *Prorocentrum*, *Ostreopsis*, *Fukuyoa*, *Gonyaulax* y *Gambierdiscus* (Guiry y Guiry, 2018).

2.3 Taxonomía del género *Gambierdiscus*/*Fukuyoa*

Las especies son aplanadas anteroposteriormente, de forma lenticular, con una tabulación similar a *Pyrodinium* y *Alexandrium*, aunque lucen morfológicamente diferentes (Fraga *et al.*, 2011). La placa de poro apical es oval a elipsoidal con un poro característico en forma de anzuelo. El cíngulo es estrecho y profundamente impresionado, mediano y ligeramente desplazado. El sulcus está restringido al hiposoma, amplio, que no se extiende al antapex. Los flagelos transversal y longitudinal se ubican en el cíngulo y el sulcus, respectivamente. Cloroplastos numerosos, de color amarillo verdoso a amarillo pardo. Núcleo del tipo dinocarion, en forma de herradura a v, mediana dorsalmente ubicada (Guiry y Guiry, 2018).

Inicialmente fue descrita *Gambierdiscus toxicus* en el año 1977 por Adachi y Fukuyo en Islas Gambier, luego se fueron añadiendo otras especies: *G. australes* Faust *et* Chinain (1999); *G. belizeanus* Faust (1995); *G. caribaeus* Vandersea, Litaker, Faust, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. carolinianus* Litaker, Vandersea, Faust, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. carpenteri* Kibler, Litaker, Faust, Holland, Vandersea *et* Tester (2009); *G. pacificus* Chinain *et* Faust (1999); *G. polynesiensis* Chinain *et* Faust (1999); *G. ruetzleri* Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland *et* Tester (2009); *G. yasumotoi* Holmes (1998) (Litaker *et al.*, 2009; Litaker *et al.*, 2010); *G. excentricus* Fraga (2011); *G. silvae* S. Fraga y F. Rodríguez (2014); *G. scabrosus* T. Nishimura, Shinya Sato y M. Adachi (2014); *G. balechii* S. Fraga, F. Rodríguez y I. Bravo (2016); *G. cheloniae* K. F. Smith, L. Rhodes y S. A. Murray (2016); *G. honu* L. Rhodes, K. F. Smith, A. Verna *et al.* (2016); *G. lapillus* Kretzschmar, Hoppenrathy Murray *et al.* (2017) y seis ribotipos (*Gambierdiscus* ribotipo 2 Litaker, Vandersea, Faust *et al.* (2010); *G. sp.* tipo 2 S. Kuno, R. Kamikawa, Yoshimatsu *et al.* (2010); *G. sp.* tipo 3 T. Nishimura, S. Sato, W. Tawong *et al.* (2013); *sp.* tipos 4, 5 y 6 Y. Xu, M.L. Richlen, S.L. Morton *et al.* (2014)) (Smith *et al.*, 2017). En el año 2015 Fernando Gómez describió una nueva especie *Fukuyoa paulensis* F. Gómez, D. X. Qiu, R. M. Lopes y Senjie Lin (2015), dando lugar a un nuevo género de dinoflagelados por lo que las

especies de *Gambierdiscus* que tienen forma globular en vez de aplanadas pasan a formar parte de un nuevo género *Fukuyoa*. Las especies del género *Gambierdiscus* descritas que presentan forma globular son *G. ruetzleri* Faust, Litaker, Vandersea, Kibler, Holland *et* Tester (2009) y *G. yasumotoi* Holmes (1998), pasando a ser *Fukuyoa ruetzleri* y *F. yasumotoi* (Gómez *et al.*, 2015).

Taxonomía del género *Gambierdiscus*

Imperio: Eucariota

Reino: Chromista

Phylum: Miozoa

Clase: Dinophyceae

Orden: Gonyaulacales

Familia: *Ostreopsidaceae*

Género: *Gambierdiscus*

2.3.1 *Gambierdiscus belizeanus*

Las células de *G. belizeanus* son fotosintéticas comprimidas anteroposteriormente, con una profundidad media de 61.7 - 63.1 μm (rango 55.9 - 66.2 μm), ancho 60.0 - 64.5 μm (rango 54.2 - 67.3 μm) y una longitud de 48.1 - 64.2 μm (rango 41.7 - 55.3 μm). Es una especie redonda en vista apical o antapical con una relación promedio de profundidad / ancho de 1.03. Las células son ligeramente asimétricas y ligeramente comprimidas en vista ventral con una relación de longitud media a ancho de 0.80, presenta una placa 2^{'''} estrecha, una superficie celular fuertemente areolada, placa de 2' moderadamente en forma de hacha (promedio de 2'/ 2" a 2'/ 4" relación de longitud de sutura 50.64) y una placa 3' pentagonal distintiva (Litaker *et al.*, 2009).

2.3.2 *Gambierdiscus caribaeus*

Las células de *G. caribaeus* son fotosintéticas comprimidas anteroposteriormente con una profundidad $82.2 \pm 7.6 \mu\text{m}$, ancho $81.9 \pm 67.9 \mu\text{m}$ y largo $60.0 \pm 66.2 \mu\text{m}$. Son células lenticulares, redondeadas en vista apical. Los poros de la teca son numerosos, presenta dos flagelos, la fórmula de la placa es Po, 3', 7", 6C, 6S, 5^{'''}, 1p y 2^{'''}. La placa apical 2' es la más grande de las tres placas es rectangular y simétrica, 3' es mediana y la 1' es la más pequeña. Placas 3" y 4" son grandes; 2", 5" y 6" son intermedias; 1" y 7" son placas pequeñas adyacentes a la del sulcus y por debajo de la placa 1' y la placa 4" simétrica. La placa del poro apical es elíptica, con poros y un gran anzuelo. El cingulum es angosto, profundamente excavado. El sulcus es profundo y parecido a una bolsa. Las placas 1^{'''} y 5^{'''} son más pequeñas, la 2^{'''} y 3^{'''} son placas intermedias y la placa

4''' es más grande, las placas 1''' y 2''' son pequeñas y forman crestas engrosadas a lo largo de la unión con el sulcus. La placa 1p es larga, ancha y pentagonal. El núcleo se encuentra situado en la hipoteca (Litaker *et al.*, 2009).

2.3.3 *Gambierdiscus carolinianus*

Las células de *G. carolinianus* son fotosintéticas, comprimidas anteroposteriormente con profundidad $78.2 \pm 64.8 \mu\text{m}$, ancho $87.1 \pm 67.1 \mu\text{m}$ y longitud $51,4 \pm 65,2 \mu\text{m}$. Las células son lenticulares, ligeramente oblongas en vista apical y más ancha que profundas. La teca presenta poros numerosos y redondos con un borde liso. Presenta dos flagelos, fórmula de la placa Po, 3', 7'', 6C, 6S, 5''', 1p, y 2''', placa apical 2' es la más grande, larga y en forma de hacha. Las placas 1' y 3' son aproximadamente igual en tamaño y más pequeñas en relación con la placa 2'. Las placas precingulares varían en tamaño, 3'' y 4'' son más grandes; 2'', 5'' y 6'' son intermedias; 1'' y 7'' son pequeñas se encuentran adyacentes al sulcus y por debajo de la placa 1', la 4'' es asimétrica. La placa del poro apical es en forma de lágrima con una abertura apical en forma de anzuelo. Cingulum angosto y profundamente excavado. El sulcus es profundo y como una bolsa. Las placas 1''' y 5''' son más pequeñas, 3''' es intermedia y desplazada dorsalmente. Placas 2''' y 4''' son más grandes. Las placas 1'''' y 2'''' son pequeñas y con engrosadas crestas a lo largo de la unión con el sulcus. La placa 1p es amplia y pentagonal. El núcleo está situado en la hipoteca (Litaker *et al.*, 2009).

2.4 Ecología del género *Gambierdiscus*

Las especies de este género habitan en aguas poco profundas (<50 m), con temperatura media anual entre 21 y 31 °C, con abundantes macrófitas (donde las células puedan adherirse), el grado de turbulencia es bajo o moderado, la salinidad es alta y estable, la luz con niveles de incidencia <10%. Además son favorecidas por concentraciones de nutrientes elevadas, que pueden ser directamente obtenidos de las macrófitas sustrato (Peraza y Moreira, 2012).

Las especies del género *Gambierdiscus* son exclusivamente marinas. Las especies *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. silvae* se distribuyen en el Océano Atlántico; mientras que *G. australes*, *G. pacificus*, *G. polynesiensis*, *G. toxicus*, *G. scabrosus*, *G. balechii*, *G. cheloniae*, *G. honu*, *G. lapillus*, se encuentran en el Pacífico. *G. caribaeus* y *G. carpenteri* se hallan dispersos en ambos océanos (Litaker *et al.*, 2010; Fraga y Rodríguez, 2014; Nishimura *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016; Kretzschmar *et al.*, 2017; Rhodes *et al.*, 2017), y *G. excentricus*, en el Atlántico (Fraga *et al.*, 2011).

Algunos factores naturales y/o antropogénicos alteran la estructura de las comunidades bentónicas, y permiten el desarrollo de macroalgas donde las especies de *Gambierdiscus* crecen en número. Si el disturbio favorece el incremento de suficientes células tóxicas, existe mayor probabilidad de un brote de ciguatera (Briggs, 2009). En muchas ocasiones los cambios en el hábitat coinciden con períodos de altas temperaturas del agua o disponibilidad de nutrientes, que pueden interactuar sinérgicamente en el incremento de estas microalgas. La magnitud de la población resultante depende de la intensidad, tiempo de duración y escala de disturbio (Peraza y Moreira, 2012).

La densidad celular con la cual se comienzan a depositar niveles de toxinas significantes en la cadena alimentaria, depende de factores en interacción poco estudiados (Litaker *et al.*, 2009). Entre estos factores se incluyen: la toxicidad innata de las especies o de los clones, la regulación de la toxicidad por condiciones ambientales, la estructura de la comunidad de macroalgas sustrato, y lo apetecibles que estas sean (Litaker *et al.*, 2010).

2.5 Cultivo de microalgas

Para el establecimiento de un proceso de producción de microalgas para la obtención de un compuesto de interés, es de crucial importancia la selección de la microalga más idónea para el fin propuesto atendiendo a factores como la elevada productividad, tolerancia a temperatura, pH e irradiancia, elevado rendimiento en el compuesto de interés y facilidad de recolección. Igualmente es necesario definir las condiciones de operación y el sistema de cultivo (García, 2012).

Atendiendo a la fuente de energía y de carbono las microalgas se pueden cultivar en distintos modos:

Autotrófico: Utiliza luz, natural o artificial, como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.

Heterotrófico: La energía y el carbono se obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofia. Los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados pero el control del proceso es máximo rindiendo elevadas productividades.

Mixotrófico: Las microalgas realizan la fotosíntesis pero en presencia de una fuente de carbono orgánico.

2.5.1 Medios de cultivos de microalgas

Una de las variables más complejas en el sistema productivo es la composición del medio de cultivo la cual se encuentra íntimamente relacionada con otras variables (Mohammad *et al.*, 2015).

Del mismo modo, el conocimiento de estos factores posibilita su modulación para conseguir una composición celular determinada y con ello, redirigir el metabolismo del microorganismo hacia la producción del compuesto o proceso deseado (Abreu y De Armas, 2017).

Todos los organismos vivos incluyendo las microalgas requieren de un medio de cultivo que contenga todos los nutrientes esenciales que necesiten para su desarrollo (Edberg, 2010). En la Tabla II se reportan algunos valores de los requerimientos físicos y químicos que generalmente deben presentar los cultivos de microalgas, aunque estos sean particulares de la especie que se vaya a cultivar en las condiciones concretas de cultivo (Rodríguez, 2015).

Tabla II. Requerimientos físicos y químicos que deben presentar un cultivo de microalgas (Rodríguez, 2015).

	Requerimientos	Compuestos químicos	Valores
Físicos	Luz	-	. 2,000 – 4,000 lux
	Temperatura	-	15 – 22 °C
	Salinidad	-	20-35
	pH	-	7 – 9
	C	CO ₂ CO ₃	g/100 mL
Nutritivos	O, H	O ₂ H ₂ O	g/100 mL
	N	N ₂ NH ₄ + NO ₃	g/100 mL
	P	PO ₄	g/100 mL
	S	SO ₄	g/100 mL
	Na ¹⁺ , K ¹⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Sales	g/100 mL
	Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , B ³⁻ , Br ¹⁻ , Si ⁴⁻	Sales	mg/100 mL
	Cu ¹⁺ , Co ²⁺ , Cl ¹⁻ , I ¹⁻ , Sr ²⁺ , Rb ¹⁺ , Al ³⁺	Sales	mg/100 mL
	Vitaminas	B ₁₂ , tiamina, biotina	mg/100 mL

2.5.2 Factores de impacto en el crecimiento de microalgas

➤ Luz

Como organismos fotosintéticos, las microalgas dependen completamente de la luz que reciban(Assemany *et al.*, 2015). Su crecimiento es proporcional a la intensidad de luz que recibe,

siempre y cuando esta intensidad se sitúe por debajo de un valor límite conocido como intensidad óptima. Por encima de este valor los organismos se ven dañados y por tanto el proceso de fotosíntesis se inhibe, proceso conocido como fotoinhibición (Lores, 2015) (Fig. 1).

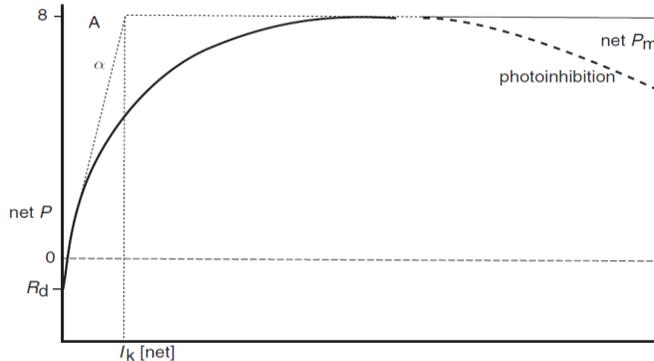


Figura 1: Efecto de la intensidad lumínica sobre la actividad fotosintética (Lores, 2015).

Los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las principales horas del día debido a la alta intensidad lumínica la cual decrece con el aumento de la turbidez (Contrera-Flores, 2003; Markou, 2011). En cultivos de microalgas la penetración de la luz se dificulta por el autosombreado y por la absorción de la luz. En el primer caso, las mismas algas se “eclipsan” unas a otras dificultando la posibilidad de que todas estén expuestas a una misma intensidad de luz. En el segundo, las algas, a través de sus pigmentos (principalmente las clorofilas) absorben parte de la radiación recibida (Abreu y De Armas, 2017).

A la hora de diseñar los sistemas de cultivo, hay que tener en cuenta que la luz debe llegar a la mayor cantidad de células posibles por lo que es imprescindible considerar tanto la profundidad de los recipientes como la concentración a la que se trabajará (Ferreiro, 2011). Una profundidad elevada permite el almacenamiento de un mayor volumen, pero la luz no será capaz de llegar a las zonas más interiores (Lores, 2015).

Existen diferentes métodos de aplicación de la luz en referencia al tiempo de iluminación (Ferreiro, 2011). Muchos estudios atribuyen las posibles mejoras de la utilización de ciclos respecto a la iluminación continua a que los tiempos de oscuridad potencian la actividad química que tiene lugar en la fase oscura de la fotosíntesis (Lores, 2015).

➤ Temperatura

El efecto de la temperatura en las reacciones bioquímicas es también uno de los factores más relevantes que influyen tanto en la composición como en la actividad de las microalgas (Lores, 2015). La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar el valor

óptimo para cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28 y 35 °C (Abreu y De Armas, 2017). De acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento; para el género *Gambierdiscus* se encuentra entre 25 y 26 °C (Kibler *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016).

En un sistema de cultivo cerrado la temperatura se puede controlar por varios mecanismos tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero (Abreu y De Armas, 2017). Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es muy difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos transparentes (Hernández-Pérez, 2014). Se ha demostrado que en el caso de que el dióxido de carbono o la luz sean limitantes en el cultivo, la temperatura no ejerce una influencia significativa (Abreu y De Armas, 2017).

➤ pH

El pH es un parámetro que puede afectar a numerosos procesos, esencialmente porque marca la biodisponibilidad en el medio de compuestos como nutrientes o metales en función de sus constantes de equilibrio ácido-base. El caso más representativo de este equilibrio son los compuestos de carbono: $CO_2 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-}$ (Lores, 2015).

Las microalgas tienen su rango óptimo de desarrollo entre valores de pH de 7 y 9 (Xu *et al.*, 2014; Lores, 2015) con un óptimo entre 8,2–8,7 (Ruiz, 2011). Si el medio se aleja de estos límites se altera notablemente su capacidad de crecimiento (Xu *et al.*, 2014). El control de pH se consigue mediante aireación o adición de CO_2 , en este caso la fijación de CO_2 provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH^- , lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por 'stripping' a la atmósfera y eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos (Abreu y De Armas, 2017).

➤ Salinidad

La salinidad del medio afecta esencialmente a la capacidad de intercambio de sustancias a través de las paredes celulares de los microorganismos, que se rigen por procesos de ósmosis, y consiguientemente la producción de lípidos, la adquisición de nutrientes y la excreción de sustancias de rechazo (Abreu y De Armas, 2017). Para cada especie los efectos se presentarán de manera diferente, afectando en última instancia a la capacidad de creación de biomasa y de eliminación de nutrientes (Assemany *et al.*, 2015). La salinidad óptima para un cultivo de

Gambierdiscus debe encontrarse entre 32-33 para evitar la pérdida del cultivo por un aumento o disminución de la misma (Tester *et al.*, 2013).

➤ Nutrientes

Fósforo

Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- (Hernández-Pérez, 2014). El fósforo es un componente esencial de los ácidos nucleicos que determinan la síntesis de proteínas de los microorganismos, así como componente del adenosín-fosfato, responsable del correcto funcionamiento del transporte intracelular (Lores, 2015). En condiciones normales tienen la capacidad de almacenar intracelularmente una cierta cantidad de fósforo denominada *mínimum cell quota* (q_0) cuyo valor se sitúa entre el 0,2% y el 0,4% de su peso en seco. Sin embargo bajo ciertas condiciones las mismas microalgas pueden aumentar este porcentaje hasta llegar a más del 3 %, lo que supone que las microalgas son capaces de almacenar hasta 16 veces su q_0 . Este efecto es conocido como *luxury uptake* (Abreu y De Armas, 2017).

El proceso de toma de fósforo puede verse sensiblemente afectado por la ausencia en el medio de otros iones como potasio, sodio o magnesio, o incluso por valores de pH inadecuados, excesivamente altos o bajos (Lores, 2015). Cabe destacar que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO_2 disponibles (Rodolfi, 2009; Ruiz, 2011).

Nitrógeno

El nitrógeno es el otro elemento esencial cuya escasez relativa en el medio afecta directamente y de manera negativa el crecimiento de las microalgas. Es el constituyente de aminoácidos y de todas las proteínas sintetizadas a partir de éstos (Lores, 2015). El contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, y depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. En general, las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO_x) en algunos casos (Assemany *et al.*, 2015).

Las algas mixotróficas pueden utilizar el nitrógeno orgánico en condiciones de baja iluminación, ya que en esta situación suele predominar el metabolismo heterótrofo respecto al autótrofo (Abreu y De Armas, 2017). Este tipo de algas únicamente utilizan sus funciones heterótrofas en las

condiciones excepcionales, sabiendo que cuando se restablecen las condiciones favorables vuelven a nutrirse de manera autótrofa (Lores, 2015).

➤ Micronutrientes

En complementación a los macronutrientes, otros elementos están presentes en la estructura citológica o participan en funciones relacionadas con ella (Catalá, 2013). Generalmente estos elementos se encuentran en abundancia en el medio por lo que no limitan la actividad celular por la reducida cantidad que se necesita de ellos, por este motivo son conocidos como “elementos traza” o “micronutrientes”. En este grupo se hallan el Na, K, Ca, Mg y Cl como los más representativos (Lores, 2015).

2.6 Cinética de crecimiento de las microalgas

En condiciones controladas, en el laboratorio, se puede seguir la evolución del número de células a lo largo del tiempo de un cultivo de microalgas en un sistema cerrado. Si representamos los resultados obtenidos obtendremos la denominada curva de crecimiento que comprende cuatro etapas, aunque también se puede obtener esta misma curva de crecimiento en seis fases: 1. Fase de adaptación, 2. Fase de aceleramiento, 3. Fase exponencial, 4. Fase de desaceleración del crecimiento, 5. Fase estacionaria y 6. Fase de muerte (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007) (Fig. 2).

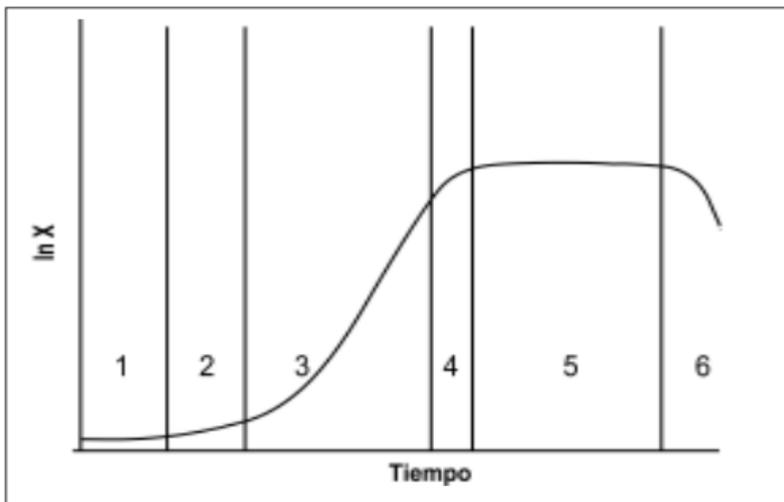


Figura 2. Fases del desarrollo de un cultivo de microalgas: 1. Fase de adaptación, 2. Fase de aceleramiento, 3. Fase exponencial, 4. Fase de desaceleración del crecimiento, 5. Fase estacionaria y 6. Fase de muerte, ln: logaritmo natural (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

Durante la fase de adaptación el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del

inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo del crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

En la fase de aceleración, diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el ARN (ácido ribonucleico), seguido de las proteínas y del peso individual. La concentración celular es generalmente la última que muestra este incremento (Abreu y De Armas, 2017).

En la fase exponencial el cultivo se ha adaptado a las condiciones de crecimiento. Aquí las células se duplican de manera acelerada en intervalos iguales de tiempo y en un cultivo, sin luz y con nutrientes limitados, el incremento de biomasa de la microalga por unidad de tiempo, es proporcional a la biomasa inicial del cultivo (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007). Esto se expresa por la ecuación característica (1) correspondiente a la tasa de crecimiento específico:

$$\mu = \frac{\ln(N_2/N_1)}{t_2 - t_1} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde: N medida de la biomasa o número de células, μ tasa de crecimiento específica para cada organismo y medio de cultivo, t tiempo.

El tiempo de duplicación o tiempo de generación es el inverso de la tasa de crecimiento específica, expresado como el lapso entre dos duplicaciones sucesivas. Es decir:

$$T_2 = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ec. 1.2}$$

También se puede determinar las divisiones de células por días, mediante el recíproco del tiempo de duplicación (T_2). Es decir:

$$K = \frac{\mu}{\ln 2} \quad \text{Ec. 1.3}$$

Intuitivamente puede parecer que una división por día sería equivalente a una tasa de crecimiento de 1.0 d^{-1} , sin embargo, esto no es verdad. La naturaleza continua del crecimiento exponencial significa que un cultivo que crece a una tasa, k, de una división por día tiene un tiempo de duplicación, T_2 , de 1 día y una tasa de crecimiento, μ , de 0.69 d^{-1} (Andersen, 2005).

El crecimiento continúa hasta la cuarta fase donde se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de

cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de división celular disminuye aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor. En este periodo la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera opuesta a la mencionada para la fase de aceleración (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

En la quinta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (efecto de autosombreado). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

Durante la última fase las células mueren liberando materia orgánica, es decir, la tasa de mortalidad supera la tasa de multiplicación celular $d > \mu$. Esta fase es causada por las condiciones desfavorables del ambiente, sobre el cultivo y el limitado suplemento de luz y nutrientes o la contaminación por otros microorganismos, este tipo de crecimiento ocurre en sistemas cerrados. Dicho crecimiento se expresa como el incremento de la función del tiempo de la biomasa o número de células dentro del cultivo (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Determinación de las tasas de crecimiento específica, productividad en cultivo y morfometría de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus*.

3.1.1 Preparación el medio de cultivo f10K

Para preparar el medio de cultivo se filtró y se esterilizó el agua de mar. Se midió la salinidad de la misma para verificar que estuviera a una salinidad de 32 óptima para el cultivo de *Gambierdiscus*. Una vez realizado este procedimiento se le añadieron a un 1L de la misma diferentes componentes como: nitrato de sodio, fósforo, hierro, metales trazas y vitaminas.

Tabla III. Compuestos utilizados para la preparación del medio de cultivo f10k

Componentes	Concentración final (M)
NaNO ₃	3,53×10 ⁻⁵
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1,45×10 ⁻⁶
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,33×10 ⁻⁶
Na ₂ EDTA	2,33×10 ⁻⁵
CuSO ₄ ·5H ₂ O	8,8×10 ⁻⁹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,53×10 ⁻⁸
CoCl ₂ ·6H ₂ O	9,43×10 ⁻⁹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,82×10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5,2×10 ⁻⁹
H ₂ SeO ₃	1×10 ⁻⁸
Tiamina HCl	2,96×10 ⁻⁷
Biotina	2,05×10 ⁻⁹
Cianocobalamina	3,96×10 ⁻¹⁰

3.1.2 Toma de muestras

La tasa específica de crecimiento y la productividad se evaluó en tres cultivos establecidos correspondientes a las especies *G. belizeanus*, *G. carolinianus* y *G. caribaeus*.

Por cada cultivo se tomaron tres réplicas, para ello se utilizaron un total de nueve erlenmeyers de 500 mL, a los cuales le añadieron 200 mL de medio de cultivo con un total aproximado de 50 células mL⁻¹ de inóculo inicial.

Los erlenmeyers se colocaron en una cámara de cultivo (EGCS 301, EQUITEC) a una temperatura óptima de 26 °C. Debido a la no disponibilidad de un luxómetro para medir la intensidad luminosa comúnmente reportada como $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, las condiciones de iluminación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante. Se utilizaron tres bombillos

fluorescentes (Sylvania-grolux) a una distancia de 40 cm, se mantuvieron en un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad óptimo para experimentos de cultivos del género *Gambierdiscus*.

3.1.3 Conteo y estimación de células de *Gambierdiscus*

Para el conteo de células de cada réplica por cultivo se realizaron diluciones apropiadas (1/5, 1/10 y 1/20) en dependencia de la densidad celular utilizando agua de mar filtrada con lugol para fijar la muestra. Este procedimiento se realizó en una cabina de seguridad biológica (Class II, AC2-4E1, ESCO), donde los cultivos fueron previamente homogenizados para tomar las alícuotas representativas correspondientes.

Los conteos se realizaron cada tres o cuatro días durante todo el proceso de crecimiento debido al tiempo de duplicación de células de este género que es de aproximadamente 3 días, utilizando una cámara de conteo Sedgwick Rafter y un microscopio invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss) con magnificación de 100x. De cada dilución se tomaron 3 alícuotas de 1 mL cada una para realizar el recuento de células, una vez obtenidos los datos de los conteos de cada réplica por día se le determinó la media de cada uno, la misma fue multiplicada por el factores de dilución utilizados (1/5, 1/10 y 1/20) para obtener la densidad celular por mililitro.

3.1.4 Obtención de las curvas de crecimiento

Para la obtención de las curvas de crecimiento de cada réplica por cultivo y para la curva de crecimiento de los tres cultivos se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 7. Para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre los parámetros obtenidos a partir de las curvas de crecimiento (tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación, divisiones por día, máxima densidad celular) por cada cultivo se realizó un ANOVA simple (Unifactorial; $p < 0.05$). Para realizar el ANOVA anteriormente se emplearon pruebas de homogeneidad de varianza y normalidad de datos, como premisas para la realización de pruebas paramétricas y no paramétricas. Así como, el empleo de pruebas de comparación múltiple de medias *a posteriori*.

La productividad de cada cultivo fue determinada a partir de la máxima densidad celular obtenida para cada especie y el volumen de medio de cultivo utilizado (200 mL).

3.1.5 Morfometría de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo.

Para las mediciones de células se tomó una muestra de 10 mL de cada cultivo en fase exponencial y se fijó con lugol ácido. Las muestras fueron observadas con el objetivo 40x en un microscopio de luz (Leitz Laborlux 5). Se realizaron mediciones de los ejes dorsoventral (longitud) y antero-posterior (transdiámetro) a un total de 30 células al azar por cada cultivo. Se calcularon

los valores medios y la desviación estándar de estos parámetros así como la proporción longitud/transdiámetro con fines comparativos.

3.2 Clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* existentes en la región del Caribe.

Para la propuesta de una clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* existentes en la región del Caribe nos apoyamos en la clave dicotómica descrita por Litaker en el año 2009, a la cual se añadieron las especies reportadas hasta la actualidad en el área del Caribe y el Océano Atlántico y descartaron aquellas especies con distribución restringida al Océano Pacífico. Además, solo se incluyeron aquellos caracteres morfológicos que pueden ser observados con microscopía de luz.

La clave dicotómica se realizó siguiendo el sistema de tabulación de Kofoid modificado, descrito por Besada *et al.* (1982) y siguiendo las recomendaciones de Fraga *et al.* (2011), para nombrar las placas de la teca empleando la fórmula tecal Po, 4', 6'', 5''', 2'''''. Según este sistema las placas apicales correspondientes a la epiteca se enumeran utilizando la simbología ', la placa donde se localiza el poro apical como Po, las placas precingulares con la simbología ''; en la hipoteca las placas postcingulares como ''', las antapicales con '''' y la sulcal posterior como S.p. (Fig 3).

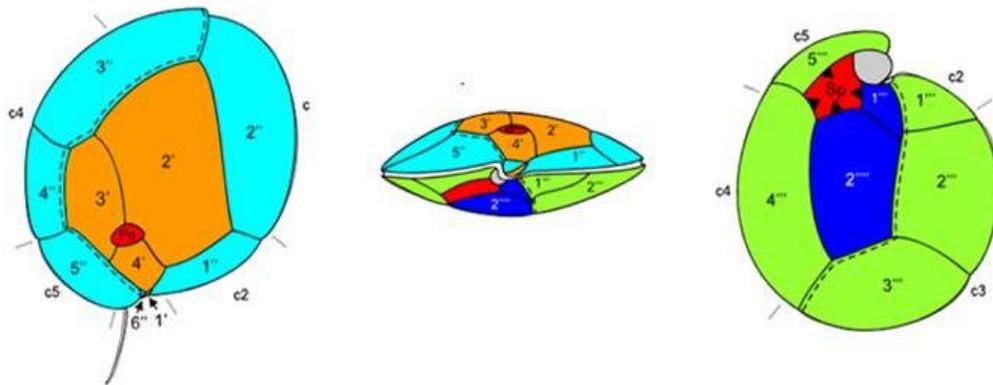


Figura 3. Sistema de tabulación de Kofoid modificado para la identificación de las placas de *Gambierdiscus*. Tomado de Fraga *et al.* (2011).

Para una mejor observación de las placas de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo se realizó una limpieza de las mismas para ello se utilizó hipoclorito al 1%, agua destilada, agua de mar filtrada y formol para conservar la muestra. Se tomó primeramente una muestra de 15 mL de cada cultivo a las cuales se le añadieron 10 mL de hipoclorito para desprender el protoplasma de la célula. Una vez realizado este procedimiento, se realizó un lavado de la muestra con agua destilada y se preservó en agua de mar filtrada con unas gotas de formol. Las placas de cada una

de las especies fueron observadas en un microscopio de luz (Leitz Laborlux 5) con el objetivo de 40x.

Resultados

4 Resultados

4.1 Tasas de crecimiento y productividad de cultivo de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus*.

En la Figura 4 se muestran las curvas de crecimiento promediadas por réplica para los cultivos de las especies estudiadas. Los resultados demostraron que el cultivo de mayor crecimiento fue *G. belizeanus* para el cual se observa un crecimiento más acelerado alcanzando un pico de crecimiento mucho mayor que *G. carolinianus* y *G. caribaeus*. La especie *G. caribaeus* fue la que menos creció obteniéndose un pico de crecimiento muy por debajo de las otras dos especies en cultivo.

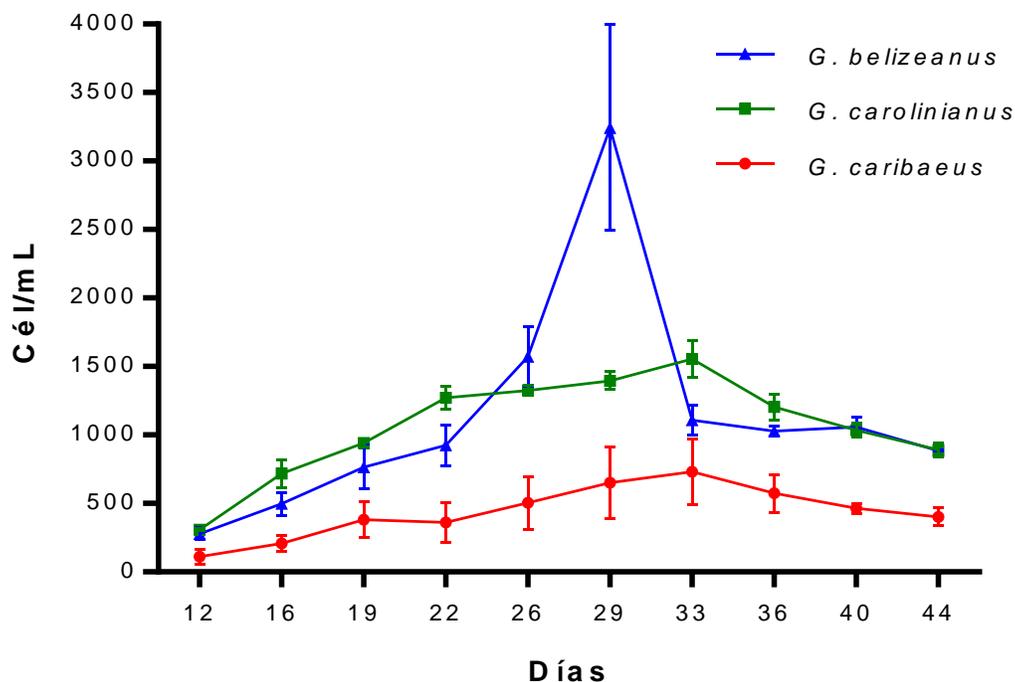


Figura 4. Curvas de crecimiento obtenidas para las tres especies de *Gambierdiscus* en cultivo.

La Tabla IV muestra los parámetros obtenidos (Tasa de crecimiento específico, Tiempo de duplicación, Divisiones celulares por día, Máxima densidad celular) para cada cultivo durante la fase de crecimiento exponencial. Al realizar un ANOVA simple (Unifactorial; $p < 0.05$) para comparar las tasas de crecimiento específico entre las especies de *Gambierdiscus* en cultivo no se observaron diferencias significativas ($p = 0.0803$, $F = 4.3546$) entre ellas, no siendo así con la máxima densidad celular donde sí existieron diferencias significativas ($p = 0.0240$, $F = 8.6093$).

Tabla IV. Parámetros calculados a partir del análisis de la fase exponencial de las curvas de crecimiento (Tasa de crecimiento específico, Tiempo de duplicación, Divisiones celulares por días, Máxima densidad celular) de las especies en cultivo.

Especies	*Tasa de crec. (días⁻¹) ± ES	Tiempo de dupl. (días)	Divisiones cel. por día	**Máx. densidad celular (cél/mL)
<i>G. caribaeus</i>	0,17 ± 0,05	3.9	0.25	731
<i>G. carolinianus</i>	0,14 ± 0,006	4.9	0.20	1554
<i>G. belizeanus</i>	0,14 ± 0,02	4.8	0.21	3242

* ANOVA simple (Unifactorial) (p=0.0803, F=4.3546)

** ANOVA simple (Unifactorial) (p=0.0240, F=8.6093)

Cél/mL= células por mililitros

ES = error estándar

Tabla V. Productividad obtenida para las tres especies de *Gambierdiscus* en cultivo.

Especies	Productividad (células)
<i>G. caribaeus</i>	146 200
<i>G. carolinianus</i>	310 800
<i>G. belizeanus</i>	648 400

4.1.1 Morfometría de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo

En la **Tabla VI** se muestran los valores medios, máximo (MAX), mínimo (MIN), desviación estándar (DS) y la proporción longitud/ diámetro de las mediciones obtenidas para cada cultivo. *G. carolinianus* y *G. caribaeus* presentan dimensiones bastante similares y notablemente mayores que *G. belizeanus*.

Tabla VI. Variables (Media, Máximo (MAX), Mínimo (MIN), Desviación estándar (DS) y la proporción longitud/ diámetro) obtenidas de las mediciones de longitud y diámetro de las células de *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus* y *Gambierdiscus belizeanus* en cultivo.

Especies	<i>G. caribaeus</i>		<i>G. carolinianus</i>		<i>G. belizeanus</i>	
	Longitud (μm)	Diámetro (μm)	Longitud (μm)	Diámetro (μm)	Longitud (μm)	Diámetro (μm)
Variables						
Media	89	92	90	93	68	71
MAX	100	103	100	103	75	78
MIN	81	84	84	86	61	64
DS	5.71	5.73	5.40	5.40	3.50	3.50
Long/Diámetro	0.97		0.96		0.96	

μm = micrómetros

4.2 Clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* existentes en la región del Caribe.

La clave comprende las 8 especies reportadas hasta la fecha para el área geográfica del Océano Atlántico (*F. ruetzleri*, *G. australes*, *G. belizeanus*, *G. excentricus*, *G. silvae*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus*, *G. carpenteri*), incluyendo el Golfo de México y el Mar Caribe. Aun cuando los reportes más frecuentes para *G. australes* provienen de sitios del Pacífico (Chinain *et al.*, 1999a; Fraga y Rodríguez, 2014), su inclusión se debió a que ya fue reportada para el Atlántico oriental, específicamente en Islas Canarias (Fraga y Rodríguez, 2014). Se incluyeron 7 caracteres morfológicos visibles al microscopio óptico convencional entre estos la forma de la célula, la forma de las placas 2'''' y 2' y la posición de la placa del poro apical (Po) (Fig. 5). La Figura 6 muestra imágenes de la epiteca y la hipoteca de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo.

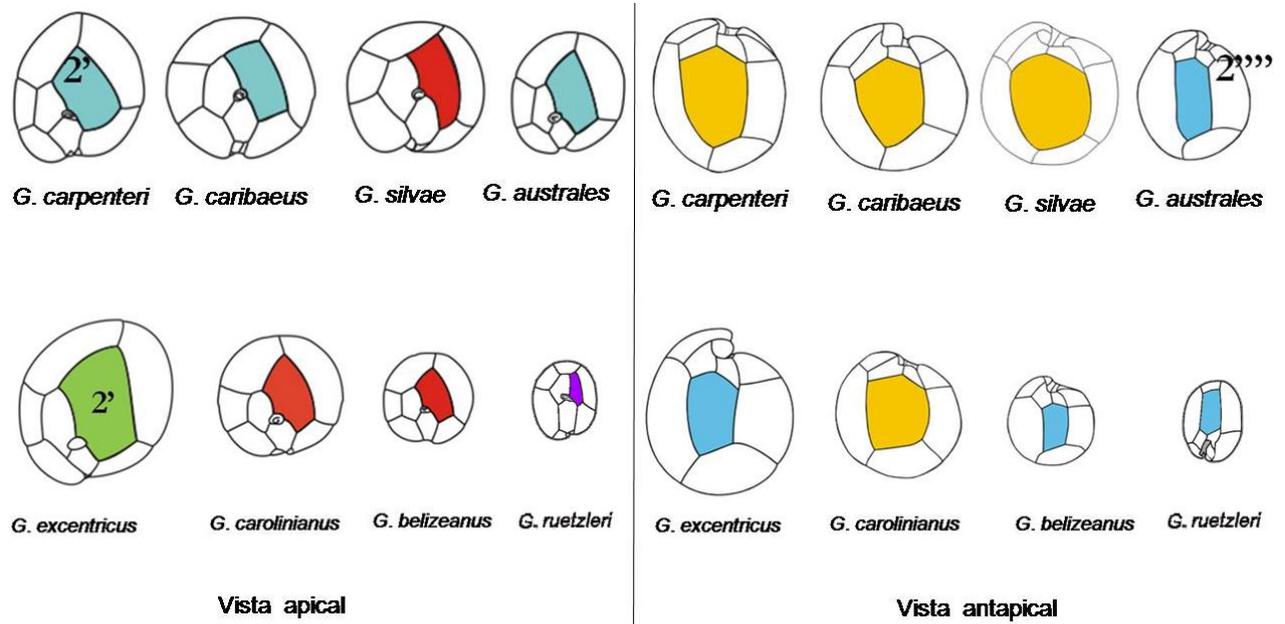


Figura 5. Diferencias de las placas 2' y 2''' entre las especies de *Gambierdiscus* según el sistema de Kofoid modificado (Litaker *et al.*, 2009; Fraga *et al.*, 2011).

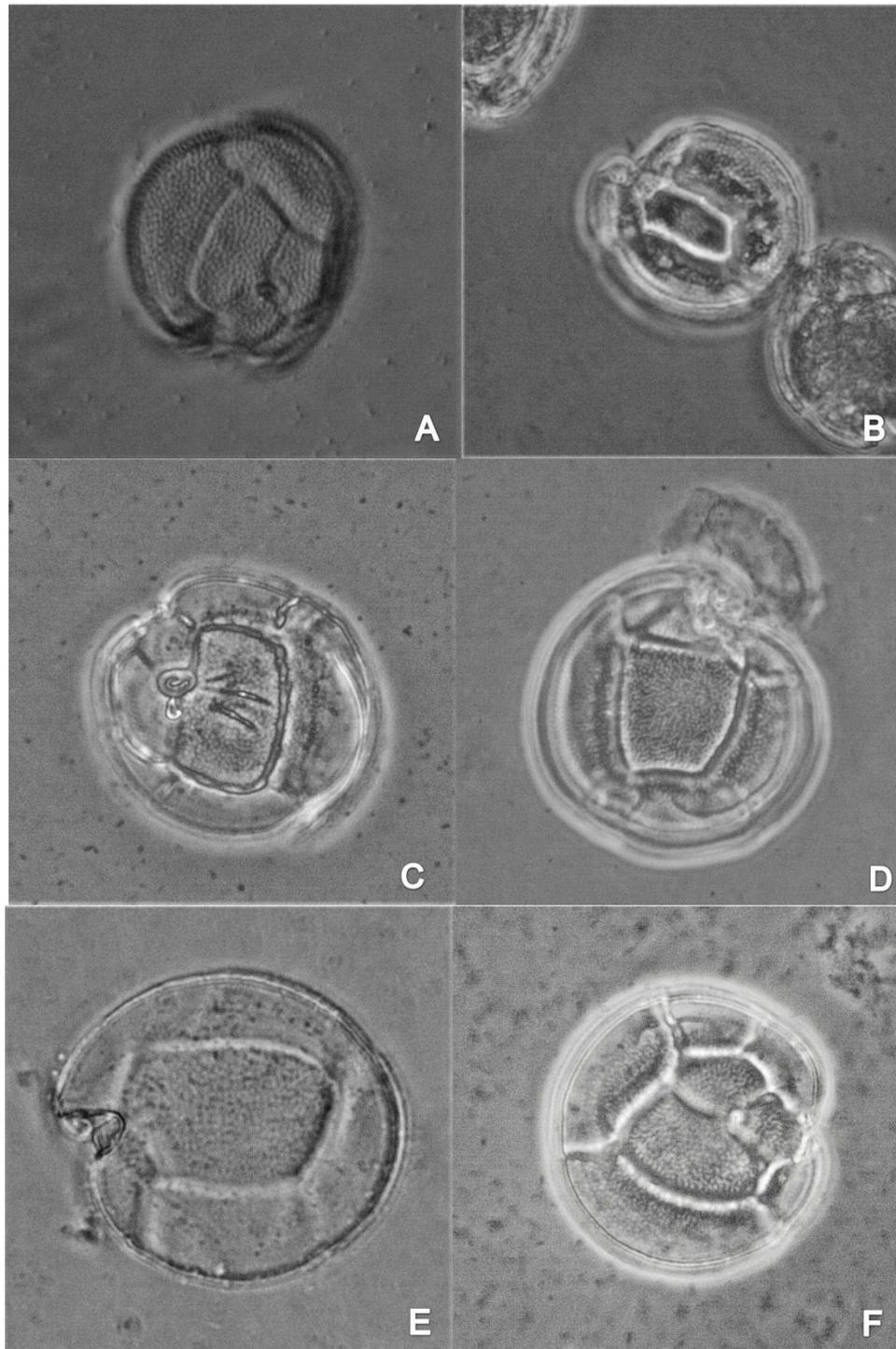


Figura 6. Vista apical y antapical de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo: *G. belizeanus* (A: vista apical, B: vista antapical), *G. caribaeus* (C: vista apical, D: vista antapical), *G. carolinianus* (E: vista antapical, F: vista apical).

Clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus/ Fukuyoa* existentes en la región del Caribe

1	Célula globular.....	<i>F. ruetzleri</i>
1	Célula antero-posteriormente comprimida.....	2
2	Placa 2 ^{'''} estrecha.....	3
2	Placa 2 ^{'''} ancha.....	4
3	Placa 2' en forma de hacha.....	5
3	Placa 2' rectangular.....	<i>G. australes</i>
4	Placa 2' en forma de hacha.....	6
4	Placa 2' rectangular.....	7
5	Placa del poro apical en posición centrada.....	<i>G. belizeanus</i>
5	Placa del poro apical desplazada ventralmente.....	<i>G. excentricus</i>
6	Fisuras 2'/2'' y 2'/1'' describen una línea curva.....	<i>G. silvae</i>
6	Fisuras 2'/2'' y 2'/1'' describen un ángulo.....	<i>G. carolinianus</i>
7	Forma redondeada en vista apical.....	<i>G. caribaeus</i>
7	Forma elíptica en vista apical.....	<i>G. carpenteri</i>

La clave se representó en forma de árbol dicotómico para su mejor comprensión (Fig. 7)

Otros caracteres como el tamaño de la placa 2^{'''}, la forma de la placa 3'', la textura de las placas así como la proporción ancho/profundidad en la forma de la célula, también visibles al microscopio óptico convencional, pueden ser utilizados para corroborar la identificación obtenida con la clave dicotómica.

La diferencia morfológica más notable entre estas especies es la forma de la célula, que difiere entre las formas globulares y las antero-posteriormente comprimidas. Para las formas globulares se ha propuesto el nuevo género *Fukuyoa* (Gómez *et al.*, 2015) que, para el caso del Atlántico comprende, hasta el momento, a las especies *F. ruetzleri* y *F. paulensis* (Gómez *et al.*, 2015). Las formas globulares pueden ser distinguidas adicionalmente de las antero-posteriormente comprimidas sobre la base del tamaño y forma de las placas 1' y 2'. En las especies globulares la placa 1' es la placa más grande de la epiteca a diferencia de las formas antero-posteriormente comprimidas donde la placa 2' es la de mayor tamaño. La placa 2' en las formas globulares son pequeñas, largas y estrechas, siendo rectangulares o en forma de hacha en las antero-posteriormente comprimidas. Adicionalmente la placa del Po en las especies globulares es más elongada que su par en las antero-posteriormente comprimidas.

Las especies de *Gambierdiscus* con forma antero-posteriormente comprimidas se dividen en dos grupos teniendo en cuenta la forma estrecha o ancha de la placa 2'''. *G. belizeanus*, *G. australes* y *G. excentricus* presentan placas 2''' estrechas y entre ellas, a su vez, se diferencian en la forma de la placa 2'. *G. australes* presenta una placa 2' rectangular a diferencia de *G. belizeanus* y *G. excentricus* que la presentan en forma de hacha. *G. belizeanus* presenta una placa del Po en posición centrada mientras que *G. excentricus* la presenta desplazada ventralmente. *G. excentricus* puede ser adicionalmente distinguido de *G. belizeanus* por presentar un tamaño mucho mayor. Por otra parte, *G. belizeanus* puede ser distinguido de *G. excentricus* por presentar una superficie celular densamente cubierta de poros profundos, aunque este carácter no siempre es fácilmente observable al microscopio de luz.

Por su parte *G. silvae*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. carpenteri* presentan placas 2''' anchas. La forma de la placa 2' permite separarlas en dos grupos. *G. silvae* y *G. carolinianus* presentan una placa 2' en forma de hacha mientras que *G. caribaeus* y *G. carpenteri* la presentan rectangular. A su vez *G. silvae* y *G. carolinianus* se diferencian atendiendo a la forma que describen las fisuras 2'/2'' y 2'/1'' que, en el caso de *G. silvae*, describe una línea curva mientras que en *G. carolinianus* describen un ángulo. *G. silvae* puede ser adicionalmente distinguido de *G. carolinianus* por presentar una superficie celular con dos texturas; *G. carolinianus* presenta una superficie celular más homogénea. Además *G. carolinianus* es la única especie de *Gambierdiscus* como promedio más ancho (diámetro) que profunda (longitud dorsoventral).

Por su parte *G. caribaeus* y *G. carpenteri* se diferencian en cuanto a la forma de la célula, redondeada en vista apical en *G. caribaeus* y elíptica en *G. carpenteri*. *G. caribaeus* puede ser adicionalmente distinguido de *G. carpenteri* por presentar una placa 2''' más corta con respecto al tamaño de la hipoteca y una placa 3'' simétrica; *G. carpenteri* presenta una placa 2''' alargada y una placa 3'' asimétrica.

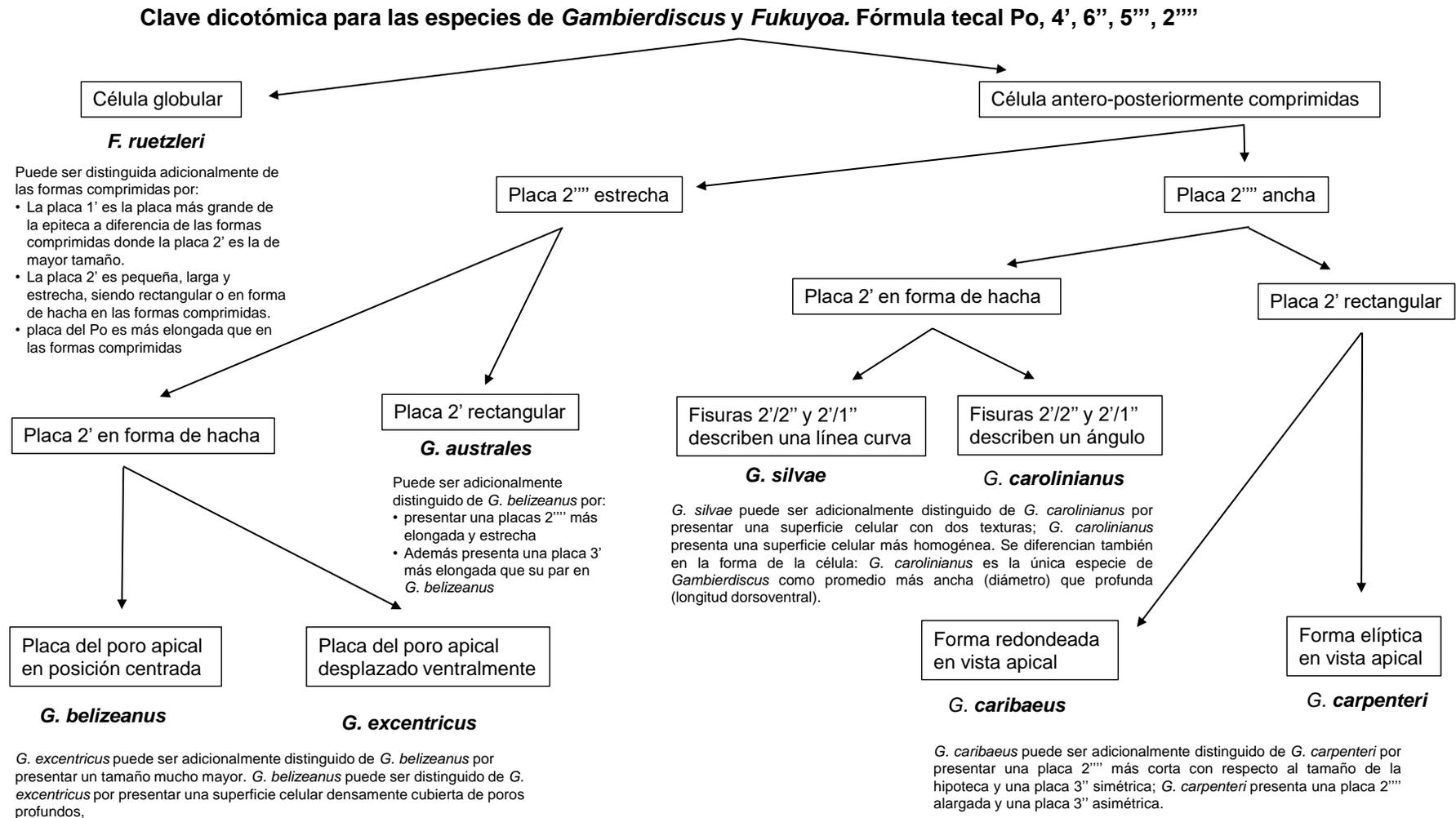


Figura 7. Árbol dicotómico para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*. Diferencias de las placas 2' y 2''', forma de la célula, posición de la placa del poro apical entre otros.

Discusión

5 Discusión

5.1 Tasas de crecimiento específica, productividad en cultivo y morfometría de las especies *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. belizeanus*.

5.1.1 Tasa de crecimiento y productividad en cultivo

Los factores que regulan la producción de toxinas en los dinoflagelados no están del todo claros, sin embargo, varios autores han sugerido que los factores ambientales y las características genéticas son importantes en este sentido. En el caso de *Gambierdiscus* se ha visto que la producción de ciguatoxinas varía con los factores ambientales tales como la luz, la salinidad, la temperatura y la concentración de nutrientes, así como con las fases de crecimiento celular (Chinain *et al.*, 2010). Por otra parte, la capacidad de producir toxinas parece estar genéticamente determinada en *Gambierdiscus* pues varios estudios sobre diferencias clonales en la producción de toxinas han sido reportados en la literatura (Chinain *et al.*, 1999b).

El estudio de las curvas de crecimiento constituye un primer paso para la evaluación de la producción de toxinas en nuevos aislados. En este trabajo se caracterizó el crecimiento de tres aislados correspondientes a tres especies de *Gambierdiscus* bajo condiciones ambientales de cultivo previamente fijadas según la literatura (Fraga *et al.*, 2011; Tester *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2016).

En sentido general, para las tres especies, se detectaron diferencias entre réplicas que pudieran ser atribuidas a la homogenización del inóculo inicial, sobre todo para el caso de *G. caribaeus*, cultivo más propenso a la formación de aglomeraciones celulares. Los valores de error asociados a algunos valores medios en los cultivos replicados también reflejan insuficiente homogenización en la toma de las alícuotas para la realización de los conteos. Sin embargo, la forma similar de las curvas replicadas, así como la correspondencia en los tiempos de crecimiento máximo entre las réplicas indica que los valores promedio de los parámetros calculados a partir del análisis de la fase exponencial de las curvas de crecimiento pueden ser utilizados con fines comparativos.

Las tasas de crecimiento calculadas para las tres especies de *Gambierdiscus* estudiadas son inferiores a las reportadas en otros estudios. Aun cuando, de modo general, la temperatura de 26 °C y salinidad de 32 resultan óptimas para el crecimiento de *Gambierdiscus* (Fraga *et al.*, 2011; Tester *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2016), individualmente por especies pueden no ser valores para los que se alcance una tasa de crecimiento máxima. En general los estudios sobre los efectos de la temperatura en *Gambierdiscus* (Fraga *et al.*, 2011; Kibler *et al.*, 2012; Tester *et al.*, 2013; Fraga *et al.*, 2016; Kibler *et al.*, 2017) indican que el óptimo crecimiento ocurre entre los 25-35 °C. Los resultados obtenidos por Kibler *et al.* (2012) y Tester *et al.* (2013) demuestran que la temperatura

óptima (T_{opt}) para *G. belizeanus* se encuentra entre 24.7–30.4 °C, para *G. carolinianus* T_{opt} 23.8–28.7 °C y *G. caribaeus* T_{opt} 29.2–32.4 °C. Kibler *et al.* (2012) reportaron, para *G. belizeanus*, una tasa de crecimiento máxima de 0.20 día⁻¹ a 28 °C, para *G. carolinianus* una tasa de 0.28 día⁻¹ a 26°C y para *G. caribaeus* una tasa máxima de 0.35 día⁻¹ a 31 °C.

Con respecto a *G. carolinianus* estos resultados coinciden con los de Tester *et al.* (2010), quienes reportaron un valor similar de temperatura (25 °C) para la cual se obtuvo un crecimiento máximo. Según estos autores *G. belizeanus* y *G. caribaeus*, entre otras especies, presentaron tasas de crecimiento máximas a 29 °C.

Con respecto a la salinidad Kibler *et al.* (2012) reportaron para *G. belizeanus* una salinidad de 28 para la cual se alcanza una tasa de crecimiento máxima de 0.24 día⁻¹, para *G. carolinianus* un valor de 30 correspondiente a una tasa de máxima de 0.30 día⁻¹ y para *G. caribaeus* una salinidad de 35 y una tasa de crecimiento máxima de 0.30 día⁻¹. Xu *et al.* (2016) reportaron rangos de salinidad óptimos para *G. caribaeus*, *G. carolinianus* y *G. belizeanus* entre 20 y 35, a niveles por debajo de 20 y por encima de 35 presentaron tasas de crecimiento muy baja o nulo crecimiento.

Los valores de temperatura y salinidad utilizados para *G. carolinianus* coinciden con aquellos para los cuales se han obtenido tasas máximas de crecimiento mayores a la reportada en este estudio. Esta baja tasa de crecimiento pudiera ser explicada por condiciones de iluminación no adecuadas para el cultivo, no solo de *G. carolinianus*, sino de las tres especies en cultivo. Los niveles de irradiancia reportados en la literatura como óptimos para el crecimiento de especies de *Gambierdiscus* están entre 50 y 100 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El control y la regulación de la intensidad de la luz deben ser tenidos en consideración para futuros estudios.

Para el caso de las tres especies en cultivo no se observaron diferencias significativas entre ellas en cuanto a la tasa de crecimiento específico esto se debe a que son especies del mismo género, y como tal pueden mostrar tasas de crecimiento similares para las tres especies. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas en la máxima densidad celular. Es de destacar que para la determinación de este parámetro se utilizan todos los puntos de la curva de crecimiento, a diferencia de la tasa de crecimiento específico, para la que se utiliza solamente la fase exponencial. El metabolismo propio de cada especie en particular y su adaptación al medio de cultivo pueden explicar estas diferencias. Cada especie y cada aislado son únicos y puede, bajo determinadas circunstancias responder de manera diferente a las condiciones de cultivo utilizadas.

El tiempo para el cual se alcanza el máximo crecimiento fue de aproximadamente 30 días para las tres especies estudiadas en las condiciones utilizadas (temperatura 26 °C, salinidad 32, fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad, 200 mL medio cultivo), con diferencias en la productividad de cultivo (mayor para *G. belizeanus* y menor para *G. caribaeus*) pero sin embargo suficiente para los análisis de toxicidad posteriores (entre 50000 y 100000 células; (Chinain *et al.*, 2010)).

G. belizeanus mostró una disminución de células más acelerada durante la fase de muerte celular con respecto a *G. caribaeus* y *G. carolinianus* esto pudo haber estado relacionado con las características intrínsecas de la especie. Después de aproximadamente tres semanas el medio de cultivo va perdiendo nutrientes y a su vez puede hacerse más ácido. Al ocurrir esto, en los cultivos la fase de declive o muerte celular se hace más evidente. Es clave destacar que para ninguna de las tres réplicas de la especie *G. belizeanus* fue evidente la fase estacionaria ocurriendo una caída brusca del crecimiento para las tres réplicas de la especie en cultivo. *G. belizeanus* mostró un pico de crecimiento muy alto en comparación a *G. caribaeus* y *G. carolinianus* lo cual pudo actuar de forma negativa sobre el cultivo. Al haber un número de células tan alto, es probable que los nutrientes pudieran haber quedado en déficit y limitar así el crecimiento del cultivo. Esto pudo también haber estado relacionado con una disminución del pH en el medio de cultivo. Sin embargo, esto son solo hipótesis pues estas variables no fueron medidas durante el estudio, siendo además una recomendación de nuestro trabajo.

Es de destacar que para ninguna de especies fue evidente la existencia de la fase estacionaria lo cual pudiera deberse al efecto del pH o de algún otro factor de estrés. La asimilación de nutrientes y fijación fotosintética de CO₂ en el cultivo de microalgas es un proceso que tiende a inducir un aumento en el pH del medio (Franchino *et al.*, 2013), donde a valores alcalinos se ha indicado la mayor actividad fotosintética (Andrade y Costa, 2007). El incremento de pH se explica en gran parte al consumo de iones HCO₃⁻ cuya disociación a CO₂ proporcionan el carbono necesario para el crecimiento de las microalgas, a la par de propiciar la acumulación de OH⁻ que ocasiona un aumento gradual del pH (Martinez *et al.*, 2000). Además del aumento de pH por consumo de CO₂, la absorción de 1 mol de NO₃⁻ por microalgas produce 1 mol de OH⁻ (Song *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2014). Bajo estas condiciones fuertemente alcalinas el NH₄⁺ generado durante los procesos de asimilación de nitrógeno puede convertirse en NH₃, cuya presencia a concentraciones mayores a 20 mg L⁻¹ tiene un efecto tóxico y disminuye las tasas de crecimiento de las microalgas en cultivo (Borowitzka, 1998). Para futuros estudios con especies del género *Gambierdiscus* es recomendable monitorear el comportamiento del pH así como evaluar el efecto de la aireación enriquecida con CO₂. El suministro de CO₂ además de ser una alternativa que aumentaría la

disponibilidad de carbono, podría amortiguar el incremento de pH a la par de mantenerlo en un valor óptimo (pH \approx 8.5) favoreciendo la productividad de las microalgas (Craggs *et al.*, 2013).

La influencia de los nutrientes en la estimulación del crecimiento de *Gambierdiscus* y la producción de toxinas es ambigua. El tema sigue sin estudiarse (menos de diez estudios de campo conocidos midieron las concentraciones de nutrientes y la abundancia de *Gambierdiscus*) y solo cuatro estudios de campo informaron resultados estadísticos (Yasumoto *et al.*, 1980; Carlson, 1984; Ichinotsubo *et al.*, 1994; Parsons y Preskitt, 2007). Yasumoto *et al.* (1980) y Ichinotsubo *et al.* (1994) no encontraron correlación entre nutrientes y densidades celulares en la Polinesia Francesa y Hawaii respectivamente. Parsons y Preskitt (2007) tampoco encontraron una correlación directa entre las densidades de *Gambierdiscus* y las concentraciones de nutrientes en Hawaii, pero sí observaron mayores densidades celulares donde las concentraciones de nutrientes eran más altas. Por el contrario, Carlson (1984) realizaron un estudio en las Islas Vírgenes Británicas y de los Estados Unidos donde encontró una correlación positiva entre las densidades *Gambierdiscus* spp. y varios nutrientes.

Pocos estudios han examinado el papel de los nutrientes en la producción de toxinas. Durand-Cleément (1986) concluyó que los niveles de nutrientes no afectan la producción de toxinas, mientras que Lechat *et al.* (1985) indicaron que las variaciones en los medios (uso de medios con alto contenido de sal metálica) dio un aumento en la producción de ciguatoxinas. Lartigue *et al.* (2009) probaron los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y la toxicidad de especies de *Gambierdiscus* en cultivo. Los resultados demostraron que *G. caribaeus* creció significativamente más rápido que *G. ribotipo 2* cuando la fuente de nitrógeno era nitrato, aminoácidos libres, o putrescina, pero no amonio; *G. ribotipo 2* creció igualmente bien con estas fuentes de nitrógeno (pero no de urea), *G. caribaeus* mostró un mejor crecimiento cuando la fuente de nitrógeno era amonio. *G. ribotipo 2* se mostró significativamente más tóxico que *G. caribaeus*, excepto cuando la fuente de nitrógeno era amonio. Estos resultados sugieren que las especies de *Gambierdiscus* tienen una absorción de nutrientes diferente, posiblemente relacionado con la toxicidad de las cepas en cultivo, por lo que es un factor a tener en cuenta en futuros estudios de crecimiento y toxicidad relacionados con las especies de nuestro estudio.

5.1.2 Morfometría de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo

Los valores promediados de longitud dorsoventral y diámetro mostraron una amplia variabilidad del tamaño de las células, estos valores coinciden con lo reportado en estudios previos realizados por Faust (1995) y Litaker *et al.* (2009) donde describen la morfología de las especies de *Gambierdiscus* en cultivo. Las células exhibieron una forma lenticular comprimida

anteroposteriormente típica de *Gambierdiscus*. El tamaño de las células es un carácter distintivo a la hora de diferenciar entre una especie u otra por lo que es de vital importancia los valores de las mediciones de cada una de ellas.

5.2 Clave dicotómica para la identificación de las especies de *Gambierdiscus* existentes en la región del Caribe.

La clave descrita por Litaker en el año 2009 sirvió de guía para la elaboración de esta propuesta. Debido a que las especies de este género difieren en distribución geográfica (Litaker *et al.*, 2009; Tester *et al.*, 2013), la clave pretendió incluir solo aquellas especies reportadas en el área del Caribe y el Océano Atlántico. Por tal motivo fueron excluidas aquellas especies contenidas en la clave original con distribución restringida al Océano Pacífico, entre ellas *G. polynesiensis*, *G. yasumotoi*, *G. pacificus* y *G. toxicus*, así como tampoco las nuevas especies descritas en esta área geográfica (Nishimura *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016; Kretzschmar *et al.*, 2017; Rhodes *et al.*, 2017). Se mantuvieron las especies *F. ruetzleri*, *G. belizeanus*, *G. carolinianus*, *G. caribaeus* y *G. carpenteri*, y se incluyeron las especies descritas recientemente en el área de interés como *G. excentricus* (Fraga *et al.*, 2011), *G. silvae* (Fraga y Rodríguez, 2014) y *G. australes*, esta última descrita en el Océano Pacífico (Chinain *et al.*, 1999a) y reportada en el Océano Atlántico recientemente (Fraga y Rodríguez, 2014).

La clave basada en caracteres morfológicos se correspondió bastante con los análisis filogenéticos reportados por Fraga y Rodríguez (2014). Los clusters obtenidos a partir de las regiones D1-D3 y D8-D10 del ADN ribosomal (LSU) se correspondieron con las agrupaciones de especies descritas morfológicamente y contenidas en la clave dicotómica.

La intención de conformar una clave para la identificación de especies de *Gambierdiscus* utilizando solo microscopía de luz (equipamiento común en muchos laboratorios del país), permitió utilizar pocos caracteres morfológicos distintivos. Sin embargo esto se vio compensado por el hecho de tener pocas especies en el análisis. Desde el punto de vista práctico esta clave es de fácil utilización y no tiene grandes requerimientos para la preparación de las muestras; sin embargo su uso requiere de experiencia en el conocimiento taxonómico del género pues las diferencias morfológicas entre las especies son a menudo sutiles. Con el incremento en las investigaciones relacionadas con este género a nivel global, en un futuro cercano nuevas especies pueden ser descritas y/o puede ampliarse el rango de distribución conocida de aquellas que ya lo están, aspectos importantes a tener en cuenta para el uso de esta clave en el futuro. Aun cuando la microscopía electrónica de barrido (SEM de sus siglas en inglés) y las técnicas

moleculares son herramientas costosas y de uso poco rutinario, seguirán siendo imprescindibles en la identificación sin ambigüedad de las especies de este género.

Conclusiones

6 Conclusiones

1. Bajo las condiciones de cultivo utilizadas se obtuvieron rendimientos máximos aproximadamente a los 30 días para las tres especies y fueron suficientes para realizar posteriores análisis de toxicidad.
2. Las tasas de crecimiento calculadas son menores a las reportadas por otros autores. Esto pudo estar relacionado con el empleo de condiciones subóptimas (temperatura, salinidad e irradiancia) en el cultivo de las tres especies estudiadas.
3. Se adecuó una clave dicotómica para la identificación mediante microscopia de luz de las ocho especies de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* descritas en la región del Atlántico.

Recomendaciones

7 Recomendaciones

1. Tener en cuenta para futuros estudios el control y la regulación de la intensidad de la luz como parámetro crítico en la obtención de tasas de crecimiento mayores en las especies de *Gambierdiscus* estudiadas.
2. Realizar experimentos para la determinación de los rangos óptimos de temperatura, salinidad e irradiancia en las especies estudiadas.
3. Monitorear el comportamiento del pH así como evaluar el efecto de la aireación enriquecida con CO₂ en las especies del género *Gambierdiscus* en cultivo.
4. Utilizar la clave dicotómica propuesta para la identificación preliminar de los nuevos aislados de *Gambierdiscus* que se obtengan en el laboratorio.

Referencias Bibliográficas

8 Referencias Bibliográficas

1. Abreu, L. y De Armas, A. C. (2017) *Crecimiento de Cryptophyta empleando vinazas cubanas como medio de cultivo*. In: *Facultad de Ingeniería Química*. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
2. Andersen, R. A. (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier/Academic Press.
3. Andrade, M. R. y Costa, J. A. V. (2007) Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*. 264: 130-134.
4. Arredondo-Vega, B. O. y Voltolina, D. (2007) Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
5. Assemany, P. P., Calijuri, M. L., do Couto, E., de Souza, M., Silva, N. C., Santiago, A. y Castro, J. (2015) Algae/bacteria consortium in high rate ponds: Influence of solar radiation on the phytoplankton community. *Ecological Engineering*. 77: 154-162.
6. Berdalet, E., Fleming, L., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L., Moore, S., Hoagland, P. y Enevoldsen, H. (2016) Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *Marine Biological Association*. 1-30.
7. Besada, E. G., Loeblich, L. A. y Loeblich, A. R. (1982) Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolla*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bull. Mar. Sci.* 32: 723-735.
8. Borowitzka, M. A. (1998) Limits to growth. En: Wong, Y. S. y Tam, N. F. Y. (eds.). *Wastewater treatment with algae*. pp. 203-226. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
9. Briggs, A. L., M. (2009) *A comparison of toxic dinoflagellate densities along a gradient of human disturbance in the North Line Islands*. [En línea] Disponible desde: http://stanford.sea.edu/research/Leff_Briggs_Final_Paper.pdf. [Consultado: 12 de enero 2016].
10. Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T. y Diogène, J. (2011) Monitoring of dissolved ciguatera toxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae*. 10: 433-446.
11. Carlson, R. D. (1984) Distribution, periodicity, and culture of benthic/epiphytic dinoflagellates in a ciguatera endemic region of the Caribbean. In: *Department of Botany* Southern Illinois University.

12. Catalá, L. (2013) *Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas Mannochloropsis Gaditana y Nannochloropsis Oculata*. Universidad de Alicante.
13. Contrera-Flores, C. (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28.
14. Craggs, R., Lundquist, T. J. y Benemann, J. R. (2013) Wastewater treatment and algal biofuel production En: Borowitzka, M. A. y Moheimani, N. R. (eds.). *Algae for biofuels and energy*. pp. 153-163. Springer, New York.
15. Chinain, M., Faust, M. A. y Pauillac, S. (1999a) Morphology and molecular analyses of three toxic species of Gambierdiscus (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov. y *G. polynesiensis* sp. nov. *Journal of Phycology*. 35: 1282-1296.
16. Chinain, M., Germain, M., Deparis, X., Pauillac, S. y Legrand, M. (1999b) Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus spp.* (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Tahiti, French Polynesia. *Marine Biology*. 135: 259-267.
17. 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: 739-750.
18. Delgado, G., Popowski, G. y Pombo, M. C. (2002) Nuevos registros de dinoflagelados tóxicos epibéntonicos en Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*. 23 229-232.
19. Delgado, G., Lechuga-Devéze, C. H., Popowski, G., Troccoli, L. y Salinas, C. A. (2006) Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Revista de Biología Tropical*. 54: 299-310.
20. Delgado, G. P., G., García, C., Lagos, N. y Lechuga-Devéze, C. H. (2005) Presence of DSP-Toxins in *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge in Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*. 26.
21. Durand-Cle´ment, M. (1986) A study of toxin production by *Gambierdiscus toxicus* in culture. *Toxicon*. 24: 1153–1157.
22. Edberg, A. (2010) Growth of *Chlorella Vulgaris* at high carbon dioxide levels in Swedish light conditions. Laboratory testing and development of methods *Revista de Bioogía Marina y Oceanografía*. 49: 230-245.
23. FAO (2004) FAO Food and Nutrition Paper. *Marine biotoxins*. 80: 278.
24. Faust, M. A. (1995) Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology*. 31: 996-1003.

25. Ferreiro, I. (2011) *Producción de biodiesel a partir de microalgas como alternativa a los cultivos clásicos*. In: *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*. Universidad Nacional del Litoral.
26. 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: 10-22.
27. 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: 839-853.
28. 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: 93-105.
29. Franchino, M., Comino, E., Bona, F. y Riggio, V. A. (2013) Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate *Chemosphere*. 92: 738-744.
30. Friedman, M. A., Lora E. Fleming, Mercedes Fernandez, Paul Bienfang, Kathleen Schrank, Robert Dickey, Marie-Yasmine Bottein, Lorraine Backer, Ram Ayyar, Richard Weisman, Sharon Watkins, Ray Granade y Reich, A. (2008) Ciguatera Fish Poisoning: Treatment, Prevention and Management. *Marine Drugs*. 6: 456-479.
31. García, R. (2012) *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂*. Universidad de Sevilla.
32. 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: 1-18.
33. Guiry, M. D. y Guiry, G. M. (2018) *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*. [En línea] Disponible desde: <http://www.algaebase.org>. [Consultado: 27 de abril de 2018].
34. Hamilton, B., Whittle, N., Shaw, G., Eaglesham, G., Moore, M. R. y Lewis, R. J. (2010) Human fatality associated with Pacific ciguatera contaminated fish. *Toxicon*. 56: 668-673.
35. Hernández-Pérez, L. J. (2014) Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Bioogía Marina y Oceanografía*. 2: 157-173.
36. Ichinotsubo, D., Asahina, A. Y., Titus, E., Chun, S., Hong, T. W. P., Shirai, J. L. y Hokama, Y. (1994) Survey for ciguatera fish poisoning in west Hawaii. *Mem. Queensl. Mus.* 34: 513–522.

37. 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: 1-14.
38. Kibler, S. R., Davenport, E. D., Tester, P. A., Hardison, D. R., Holland, W. C. y Litaker, R. W. (2017) *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* species in the greater Caribbean: Regional growth projections for ciguatera-associated dinoflagellates. *Ecological Modelling*. 360: 204-218.
39. 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: 283-297.
40. Larsson, M., Laczka, O., Harwood, D., Lewis, R., Himaya, S., Murray, S. y Doblin, M. (2018) Toxicology of *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) from Tropical and Temperate Australian Waters. *Marine Drugs*. 16: 7.
41. Lartigue, J., Jester, E. L. E. D., R. W. y Villareal, T. A. (2009) Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae*. 8: 100-125.
42. Laurent, D., Yeeting, B., Labrosse, P. y Gaudechoux, J. P. (2005) Ciguatera: field reference guide. Secretariat of the Pacific Community, pp. 88.
43. Lechat, I., Partenski, F. y Chungue, E. (1985) *Gambierdiscus toxicus*: culture and toxin production In: *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, Tahiti*. (Gabrie, C. y Salvat, B., eds.). Antenne Museum-Ephe, Moorea, pp. 443–448.
44. 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: 344-390.
45. 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: 711-730.
46. Lores, H. (2015) *Estudio a escala piloto del efecto de diferentes condiciones de operación sobre la eliminación de nutrientes en un cultivo de microalgas*. Universidad Politécnica de Valencia.
47. Llorente, M. y Cereceda, I. (2001) Dinoflagelados 12: 12-25.
48. Markou, G. D. G. (2011) Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters. *Applied Energy*. 88: 3389-3401.

49. Martinez, M. E., Sanchez, S., Jimenez, J. M.,
50. Yousfi, F. E. I., y Munoz, L. (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 73: 263-272.
51. Mohammad, S., Hyun-Joon, L., Seong-Hyun, S., Hashem, A. y Hee-Mock, O. (2015) Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *Journal of Biotechnology*. 216.
52. Moreira, A. (2009) New toxic benthic dinoflagellates from south central Cuba. *Harmful Algae News*. 39: 15-16.
53. 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*. 50: 506-514.
54. Parsons, M. L. y Preskitt, L. B. (2007) A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawaii. *Harmful Algae*. 6: 658–669.
55. 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* In: *Departamento de Biología*. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
56. Pis Ramírez, M. A. (2008) Experiencia sobre ciguatera en islas del Caribe. *Centro de Investigaciones Pesqueras, Cuba*. 15: 160-183.
57. Pombo, M. C. (2000) Dinoflagelados tóxicos bentónicos asociados con la ciguatera en dos localidades del litoral cubano. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*. 57: 230-255.
58. Popowski, G., Delgado, G., Sánchez, M. y Nodar, R. E. (2001) *Gambierdiscus toxicus* Adachi et Fukuyo, en el litoral norte de ciudad de La Habana. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*. 15: 100-128.
59. Pottier, I., Vernoux, J.-P. y Lewis, R. J. (2001) Ciguatera Fish Poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic. En: Ware, G. W. (ed.). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews*. pp. 99-141. New York, NY: Springer New York.
60. Rashid, N., Ur Rehman, M. S., Sadiq, M., Mahmood, T. y Hannon, J. I. (2014) Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40 760-778.
61. Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A. y Méndez, S. (2012) *Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas*.

- Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO and International Atomic Energy Agency (IAEA), Paris and Vienna, 66 pp.
62. Reguera, B., Alonso, R., Moreira, A., Mendez, S. y Dechraoui Bottein, M.-Y. (2016) *Guide for designing and implementing a plant to monitor toxin-producing microalgae. Second edition*. Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) of UNESCO and International Atomic Energy Agency (IAEA), Paris and Vienna, 66 pp.
63. Rhodes, L., Smith, K. F., Verma, A., Curley, B. G., Harwood, D. T., Murray, S., Kohli, G. S., Solomona, D., Rongo, T., Munday, R. y Murray, S. A. (2017) A new species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae) from the south-west Pacific: *Gambierdiscus honu* sp. nov. *Harmful Algae*. 65: 61-70.
64. Riobó, P. y Franco, J. M. (2011) Palytoxins: Biological and chemical determination. *Toxicon*. 57 368-375.
65. Rodolfi, L. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: 100-120.
66. Rodríguez, L. (2015) *Introducción del empleo de vinazas en el crecimiento de microalgas para ser integradas en las producciones de etanol de la región central*. In: *Facultad de Ingeniería Química*. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
67. Rongo, T. y van Woesik, R. (2013) The effects of natural disturbances, reef state, and herbivorous fish densities on ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Toxicon*. 64: 87-95.
68. Ruiz, A. (2011) *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. Universidad Politécnica de Valencia.
69. Sar, E. A., Ferrario, M. E. y Reguera, B. (2002) *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. 1ra Ed, 311 pp.
70. 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: 45-56.
71. Smith, K. F., Biessy, L., Argyle, P. A., Trnski, T., Halafih, T. y Rhodes, L. (2017) Molecular Identification of *Gambierdiscus* and *Fukuyoa* (Dinophyceae) from Environmental Samples. *Marine Drugs*. 15: 243.

72. Song, W., Rashid, N., Choi, W. y Lee, K. (2011) Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology*. 102: 8676-8681.
73. Tester, P. A., Feldman, R. L., Nau, A. W., Kibler, S. R. y Wayne Litaker, R. (2010) Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies. *Toxicon*. 56: 698-710.
74. 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. V., 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: 1-9.
75. 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: 56-68.
76. Xu, Y., Richlen, M. L., Liefer, J. D., Robertson, A., Kulis, D., Smith, T. B., Parsons, M. L. y Anderson, D. M. (2016) Influence of Environmental Variables on *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) Growth and Distribution. *PLOS ONE*. 11: e0153197.
77. Yasumoto, T., Fujimoto, K., Oshima, Y., Inoue, A., Ochi, T., Adachi, R. y Fukuyo, Y. (1980) Ecological and distributional studies on a toxic dinoflagellate responsible for ciguatera. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 12: 49.