



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**DINOFLAGELADOS BENTÓNICOS TÓXICOS ASOCIADOS  
A LA CIGUATERA: ABUNDANCIA, TOXICIDAD Y  
RELACIÓN CON LOS FACTORES AMBIENTALES EN UN  
ÁREA DEL LITORAL NOROCCIDENTAL DE CUBA.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales  
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

**Gilma Delgado Miranda**

La Paz, B.C.S., Diciembre del 2005

## CONFIRMACIÓN DE COMITÉS

### COMITÉ TUTORIAL

Dr. Carlos H. Lechuga Devéze	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Ana María Suárez Alfonso	Centro de Investigaciones Marinas
Dra. Lía C Méndez Rodríguez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. José J Bustillos Guzmán	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Cesar A Salinas Zavala	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Carlos H Lechuga Devéze	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Ana María Suárez Alfonso	Centro de Investigaciones Marinas
Dra. Lía C Méndez Rodríguez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. José J Bustillos Guzmán	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Cesar A Salinas Zavala	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dr Carlos H. Lechuga Devéze	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Lía C Méndez Rodríguez	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. José J Bustillos Guzmán	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Cesar A Salinas-Zavala	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Lourdes Morquecho Escamilla	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Alfredo Ortega Rubio (Suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

***Dedicatoria.***

*A mi hijo, principal razón  
de mi vida y a quién más he  
sacrificado en mi afán de  
alcanzar el máximo nivel  
de una investigadora.*

*A mis padres y hermanos por siempre confiar en mí.*

*Para que, sino para poner paz entre los  
hombres han de ser los adelantos de la  
ciencia.*

***José Martí***

## AGRADECIMIENTOS.

Quisiera expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por su apoyo financiero mediante la beca de registro 51952 otorgada para este Proyecto de estudio de doctorado.

A la Dra Adela Prieto Trujillo, por habernos exigido siempre alcanzar el grado máximo de un investigador y por su brillante idea de que estos estudios se pudieran realizar en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Al Centro de Investigaciones Pesqueras del Ministerio de la Industria Pesquera de Cuba, donde me he desempeñado como investigadora durante toda mi vida profesional.

A los integrantes de mi Comité Tutoreal Dr Carlos Lechuga-Devéze, Dra Lía Méndez Rodríguez, Dr José Bustillos-Guzmán, Dr Cesar Salinas- Zavala todos del CIBNOR y a la Dra Ana María Suárez Alfonso del Centro de Investigaciones Marinas de la Universidad de la Habana, de quienes he recibido desde el primer momento su orientación y ayuda en estos tres años de estudio.

Un agradecimiento especial al Dr Carlos Lechuga, no solo por ser el director general de la tesis, sino porque se ha convertido en un miembro más de mi familia, y a quien no solo lo recordaré por esto, sino porque la vida quiso que pudiera celebrar su cumpleaños el mismo día de quien traje a este mundo hace 24 años.

Al Dr Nestor Lagos del Laboratorio de Bioquímica de Membrana del Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, quién me brindó su apoyo y equipamiento para la determinación de toxinas diarreicas por primera vez en Cuba.

A la Dra Luisa López-Baluja, quien me enseñó el mundo del fitoplancton marino.

A Minerva Maldonado, a quien hemos denominado la representante diplomática de la Embajada Cubana en el CIBNOR, mil gracias, por tanta ayuda amiga.

A la Dra Lourdes Morquecho y Amada Reyes, de quienes recibí su cooperación para el aislamiento de mis cepas y a Izmene, quien siempre estuvo pendiente de mi tiempo en el microscopio.

A Minerva Cerro, Francisco Hernández, Martes, Iban Murillo, que me apoyaron en la realización del experimento.

Al Licenciado Erick Nuñez, quien desde el primer momento me brindó todas sus referencias sobre microalgas tóxicas y su disposición a cooperar en lo que necesitara, gracias amigo.

A Guillermo Portillo y Francisco Magallón, por poder contar con tan bella amistad.

A todo el personal de Postgrado y a los amigos del Centro de Cómputo, Horacio y Manuel.

A la familia Romero Geraldo, especialmente a María de Jesús (Chula) y sus hijos, por su amor y dedicación que me hizo sentir como en casa.

A mi hijo mexicano, Antonio Díaz (Tony), gracias por tus oraciones para que mis padres mejoren su salud, eres y serás siempre un amor.

A Lupita y Raúl por compartir con nosotros los buenos y malos momentos en La Paz.

A mis compañeros de muchos años, Servilio, la intranquila Celita, Neyda, Mireya, Rosita, Font, y a la nueva generación, Frank Abel, Katya, Helder, Roany y Julio, gracias niños por sentirme joven junto a Uds.

Al personal del laboratorio de Química y a Eusebio Perigó, por su ayuda.

A mis amigas, Loly, Odalys y Marianela por los momentos agradables que hemos pasado juntas conversando y por qué no decirlo, tomándonos algunas Cuba Libre.

A la MSc, Genoveva Popowski (Beba), con quien siempre trabajé y me estimuló para que realizara este sueño.

A Nancy Vivero, que no por ser la última representa menos para mí, a ti Nancy mi mayor agradecimiento porque has jugado mi papel de madre y durante 24 años has velado por el sueño de mi hijo, para que yo pudiera seguir superándome. Enanita mil gracias por tu ayuda incondicional.

A todos aquellos amigos, que son muchos y aunque sus nombres no aparecen aquí les agradezco el solo hecho de saber que pude contar con Uds.

## CONTENIDO GENERAL

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
<b>3. OBJETIVOS</b>	13
3.1. Objetivo general.	13
3.2. Objetivos específicos	14
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
4.1. Descripción del área de estudio	15
4.2. Métodos de muestreo	17
4.3. Análisis químicos	19
4.4. Clasificación y cuantificación de los dinoflagelados potencialmente tóxicos.	20
4.5. Aislamiento y cultivo de <i>Prorocentrum lima</i>	20
4.6. Análisis de toxinas diarreicas	21
4.7. Crecimiento celular y contenido de pigmentos en <i>P. lima</i>	22
4.8. Aislamiento y cultivo de <i>Gambierdiscus toxicus</i>	25
4.9. Métodos estadísticos.	26
<b>5. RESULTADOS</b>	27
5.1 Características físico-químicas de la zona	27
5.2. Composición de dinoflagelados epífitos nocivos	32
5.3. Abundancia y distribución de dinoflagelados epífitos nocivos	33
5.4. Composición de dinoflagelados nocivos sobre el sedimento	41
5.5. Caracterización taxonómica y toxinas de <i>P. lima</i> cultivado en medio K.	45
5.6. Análisis de DSP de <i>P. lima</i> en ambiente controlado cultivo y en medio natural	46
5.7. Crecimiento celular y concentración de pigmentos en <i>P. lima</i> a diferentes concentraciones de NO <sub>3</sub>	47
5.8. Detección de ciguatoxinas (CTX) en <i>G. toxicus</i> en ambiente controlado y en el medio por bioensayo en ratón	53
<b>6. DISCUSIÓN</b>	54
<b>7. CONCLUSIONES</b>	63
<b>8. REFERENCIAS</b>	64
<b>9. ANEXOS</b>	73

## Abreviaturas

%: Porcentaje.

$\mu\text{m}$ : Micrómetros.

$\mu\text{l}$ : Microlitros.

$\mu\text{mol}$ : Micromol.

$\mu\text{g/kg}$ : Microgramo por kilogramos.

$^{\circ}\text{C}$ . Grados celcius.

>: Mayor.

<: Menor.

AO: Ácido okadaico.

ANOSIM: Análisis de Similitud.

ANOVA/MANOVA: Análisis de varianza.

ASP: Envenenamiento amnésico por mariscos.

$\text{cél/cm}^3$ : Células por centímetros cúbicos.

$\text{cél.g}^{-1}$ : Células por gramo.

$\text{cél. ml}^{-1}$ : Células por mililitros

Cf: Cocentración final.

chl a: Clorofila a.

chl-c1: Clorofila c1.

chl-c2: Clorofila c2.

chl-c3: Clorofila c3

CIBNOR. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Ci : Concentración inicial.

cm: Centímetros.

CTX: Ciguatoxina.

CTX-1: Ciguatoxina 1.

DTX-1: Dinofisistoxina 1.

DSP: Envenenamiento diarreico por mariscos.

gr: Gramos.

h: Horas.

HPLC-FLD: Cromatografía de Alta Resolución- Fluorómetro

IOC: Intergovernmental Oceanographic Commission.

K: Velocidad de crecimiento.

km/h: Kilómetros por hora.

L: Litro.

ln : Logaritmo natural.

m : Metros.

min: Minutos.

mL: Mililitros.

mm: Milímetros.

mL/L: Mililitro por litro.

m/s: Metros por segundos.



ng : Nanogramos.

NH<sub>4</sub>: Amonio.

MDS: Escalado Multidimensional

No: Número.

NO<sub>3</sub>: Nitratos.

NO<sub>2</sub>: Nitritos.

N:P: Relación nitrógeno fósforo.

NSP: Envenenamiento neurotóxico por moluscos.

NTI: Nitrógeno total inorgánico.

p: Probabilidad.

PSP: Envenenamiento paralítico por moluscos.

PO<sub>4</sub>: Fosfatos.

PT: Fósforo total.

rpm: Revoluciones por minutos.

R: Índice de semejanza entre estaciones de acuerdo al Análisis de Similitud.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlación.

TD: Tiempo de duplicación.

Ti : Tiempo inicial.

Tf : Tiempo final.

ups: Unidades prácticas de salinidad.

UR: Unidad de ratón

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Relación nitrógeno fósforo en cada tratamiento

Tabla II. Dinoflagelados bentónicos nocivos identificados sobre el sustrato de macroalgas en el área de estudio y la abundancia relativa en los dos ciclos anuales.

Tabla III. Semejanza entre las estaciones de acuerdo a los resultados del ANOSIM.

Tabla IV. Parámetros poblacionales medidos para la fase exponencial del crecimiento de *P. lima* en los diferentes tratamientos

Tabla V. Bioensayo de ratón de toxicidad (CTX) en *G. toxicus* del medio natural y cultivado en ambiente controlado.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Macrolocalización del área de estudio.
- Figura 2. Localización de estaciones de muestreo en el área de estudio.
- Figura 3. Valores medios mensuales de la temperatura del agua en los dos ciclos anuales.
- Figura.4. Valores medios mensuales de la salinidad en los dos ciclos anuales.
- Figura.5. Concentración media de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) y el nitrógeno inorgánico total (NT), durante el período 1999-2000 (A) y el 2001-2002 (B).
- Figura.6. Concentración media de fosfatos ( $\text{PO}_4$ ) y fósforo total (PT) durante el período 1999-2000 (A) y 2001-2002 (B).
- Figura.7. Variación de la relación nitrógeno-fósforo (N:P) en los dos ciclos anuales.
- Figura.8. Variación de la velocidad media del viento en los dos ciclos de estudio
9. Distribución y abundancia media de los dinoflagelados nocivos encontrados en las estaciones de muestreos (marzo 1999-2000 y marzo 2001-2002).
- Figura. 10. Porcentaje de dinoflagelados nocivos por especies y estación desde marzo 1999 a marzo 2000 (B) y desde marzo del 2001-2002 (C).
- Figura. 11. Abundancia media mensual de dinoflagelados nocivos desde marzo 1999-2000 a marzo 2001-2002.
- Figura. 12. Porcentaje de las especies de dinoflagelados nocivos por meses desde marzo 1999 a marzo 2000 (B) y marzo 2001-2002 (C).
- Figura 13. Porcentaje de *P lima* en cada grupo de macroalgas
- Figura 14. Porcentaje de *G toxicus* en cada grupo de macroalgas
- Figura 15. Relación entre la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y las variables físico-químicas obtenidas por Análisis de Componentes Principales durante 1999-2000.

Fig.16. Relación entre la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y las variables físico-químicas obtenidas por Análisis de Componentes Principales durante 2001-2002.

Figura 17. Porcentaje de la abundancia de las principales especies de dinoflagelados nocivos encontrados sobre el sedimento en el período comprendido entre marzo del 2001 y marzo del 2002.

Figura 18. Concentración espacial (cél.cm<sup>3</sup> de sedimento) de dinoflagelados nocivos sobre el sedimento en el período entre marzo del 2000 y marzo del 2001.

Figura 19. Concentración temporal de los dinoflagelados nocivos sobre el sustrato de sedimentos durante el período marzo del 2001-marzo 2002.

Figura 20. Resultados del Escalado Multidimensional (MDS) de acuerdo a la concentración de dinoflagelados nocivos en cada submuestra de sedimento por estaciones.

Figura 21. Características morfológicas de *P. lima*.

Figura 22. Cromatograma del estandar de DTX-1 (A), en células del medio (B) y en las de *P. lima* cultivadas (C).

Figura. 23. Curva de crecimiento de *P. lima* con diferentes concentraciones de NO<sub>3</sub>.

Fig. 24. Cambios en la concentración de fosfatos durante el crecimiento de *P. lima* en los diferentes tratamientos.

Figura. 25. Cambios en la concentración del nitrato durante el crecimiento de *P.lima* en los diferentes tratamientos.

Fig. 26. Relación entre la concentración celular y el contenido de pigmentos en *P. lima* en los cuatro tratamientos: chl a (A), perididina (B), chl c<sub>2</sub> (C) y β-caroteno (D).

## RESUMEN.

El envenenamiento más importante relacionado con los dinoflagelados en regiones tropicales y subtropicales, incluyendo el área del Mar Caribe, es sin duda la ciguatera. En Cuba el primer registro de intoxicación data del 1787, donde el sabio naturalista Don Antonio Parra, narra los estragos que causó en él y su familia el consumo de un pescado de la familia Lutjanidae (*Lutjanus cyanopterus*). Sin embargo no es hasta finales de la década de los 80s, en que se realizan las primeras investigaciones para conocer los peces de la plataforma cubana que pudieran estar involucrados en este tipo de intoxicación, y en los años 90 sobre los dinoflagelados potencialmente tóxicos transmisores de estas toxinas a los peces. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decide entre 1999 y el 2002, realizar un estudio de la abundancia y distribución temporal y espacial de los dinoflagelados potencialmente tóxicos sobre los sustratos de macroalgas y el sedimento, así como su relación con las variables físico-química y ambientales durante dos ciclos anuales, en un área de la región NW de Ciudad de la Habana, en la costa norte de Cuba, donde la incidencia de ciguatera es alta. Conjuntamente con estos estudios, se realizaron aislamientos y cultivo en ambiente controlado de las especies *Prorocentrum lima* (Ehrenberd) Dodge y *Gambierdiscus toxicus* Adachi y Fukuyo, con la finalidad de identificar y cuantificar toxinas diarreicas en *P. lima* por HPLC y por bioensayo en ratón la presencia de ciguatoxinas (CTXs) en *G. toxicus*. Los resultados cualitativos obtenidos, permitieron identificar cinco nuevas especies de dinoflagelados potencialmente tóxicos para la microflora bentónica marina de la plataforma cubana: *Prorocentrum belizeanum* Faust, *P. mexicanum* Osorio-Tafall, *P. concavum* Fukuyo, *Coolia monotis* Meunier y *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo. Durante todo el año y en todas las estaciones, se observó presencia de dinoflagelados potencialmente tóxicos sobre el sustrato de macroalgas y en el sedimento, con su mayor abundancia en el período comprendido entre mayo y octubre, excepto en el mes de septiembre de 1999, donde no se observó ninguna de estas especies, siendo la causa principal las fuertes lluvias ocurridas en la zona que afectaron al sustrato de macroalgas. La abundancia fue nueve veces mayor sobre el sustrato de macroalgas que en el sedimento, siendo *P. lima* la especie dominante en los dos sustratos. La relación de la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* con los nutrientes por el método de Componentes Principales mostró para ambos períodos, una relación directa al componente I de las variables hidrográficas (nutrientes y temperatura) y negativa con la salinidad lo que sugiere el aporte de agua de baja salinidad. En el Componente II ambas especies tienen la misma importancia en su asociación con las variables medio ambientales. Esto sugiere que las condiciones en el área de estudio facilitan el desarrollo de ambas especies. El análisis cuantitativo por HPLC de las toxinas de *P. lima*, confirmó la presencia de toxinas diarreicas (CTX-1) por primera vez en las aguas de la plataforma cubana, siendo 7.15 pg.cél<sup>-1</sup> la concentración en las células cultivadas y 4.2 pg.cél<sup>-1</sup> (g<sup>-1</sup> peso húmedo de macroalga) en las del medio natural. Se observó un efecto positivo de la concentración de NO<sub>3</sub> en el crecimiento de *P. lima* en ambiente controlado, comenzando el crecimiento exponencial partir del primer día de iniciado el bioensayo, hasta el día 40 aproximadamente. En relación con los parámetros poblacionales, se pudo observar, que el tratamiento que contenía la relación N:P (20:1) fue el que produjo mayor velocidad de crecimiento (K) en la fase exponencial, siendo más marcada a partir del día 32 del cultivo, a su vez mostró menor

tiempo de duplicación para esta fase del cultivo. En cuanto al contenido de pigmentos en las células de *P. lima* los de mayor concentración en orden descendente fueron la chl a, perididina, chl c2 y diadidino, y el  $\beta$ -caroteno, este último pigmento fue el que presentó la mayor variación a través del tiempo. Los ratones inyectados con los extractos de *G. toxicus* extraídos tanto de las células del medio natural como las cultivadas, mostraron, a los 50 min los primeros signos característicos de la intoxicación en los organismos cultivados y a los 87 min los inoculados con el extracto del medio natural. De acuerdo a los resultados obtenidos, la zona de estudio puede ser considerada como una zona de riesgo de eventos de DSP y de ciguatera teniendo en cuenta la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y que se comprobó en condiciones de ambiente controlado y en el medio natural la presencia de DTX-1 en *P. lima* y de ciguatoxinas en *G. toxicus* en el bioensayo en ratón, ambas especies están asociadas a eventos de ciguatera en diferentes zonas del Caribe y en Australia.

## ABSTRACT

The most important poisoning related to dinoflagellates in tropical and subtropical regions, including of the Caribbean Sea area, is without a doubt the ciguatera. In Cuba, the first registry of poisoning dates from the 1787, where the naturalistic wise person Don Antonio Parra, narrated the damage that caused in him and his family the consumption of a fish of the Lutjanidae family (*Lutjanus cyanopterus*). Nevertheless, it is not until end of the decade of 80s, in which the first investigations were made to know Cuban's fishes, which could be involved in this type of poisoning and in 90's the potentially toxic dinoflagellates transmitters of these toxins to the fish. Considering these antecedents between 1999 and 2002 was decided to make a study of the abundance and temporary and space distribution of potentially toxic dinoflagellates on the substrates of seaweed and sediment. Also was analyzed their relation with the physical-chemistry environmental variables during two annual cycles, in a NW area of City of Havana (North coast of Cuba), where the ciguatera incidence is high. Jointly with these studies, isolation and culture in controlled environment of *Prorocentrum lima* (Ehrenberd) Dodge and *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, were made, with the purpose to identify and quantify diarrheic toxins in *P. lima* by HPLC and the presence of ciguatoxin (CTXs) in *G. toxicus* by mouse bioassay. The obtained qualitative results, allowed us to identify five new potentially toxic dinoflagellates species for marine benthic microflora of the Cuban platform: *Prorocentrum belizeanum* Faust, *P. mexicanum* Osorio-Tafall, *P. concavum* Fukuyo, *Coolia monotis* Meunier and *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo. Throughout the year and in all the stations, the presences of potentially toxic dinoflagellates were observed on the substrate of seaweed and in the sediment, with higher abundance between May and October. Only in September 1999, were not observed the species, being the main cause the heavy rains happened in the area, which affected the substrate of seaweed. The abundance was nine times major on the substrate of seaweed than in the sediment, being *P. lima* the dominant species in both substrates. The relation of the abundance of *P. lima* and *G. toxicus* with the nutrients by the Principal Components method showed for both periods, a direct relation to component I of the hydrographic variables (nutrients and temperature) and inverse with the salinity, suggesting a low salinity water contribution. In Component II, both species have the same importance in their association with environmental variables. This suggests that conditions in the study area, facilitated the development of both species. The quantitative analysis by HPLC of *P. lima* toxins, confirmed the diarrheic toxin presence (CTX-1) for the first time in waters of the Cuban platform, being 7,15 pg.cél<sup>-1</sup> the concentration in cultivated cells and 4,2 pg.cél<sup>-1</sup> (g<sup>-1</sup> humid weight of seaweed) in those of nature. Positive effect of the concentration of NO<sub>3</sub> in the growth of *P. lima* was observed in controlled environment, occurring an exponential growth since the first day of initiate bioassay, until day approximately 40. In relation to parameters population, could to observe, which the treatment that contained the relation N:P (20:1) was the one which produced higher growth speed (K) in the exponential phase, being marked at day 32 of the culture, also showed minor time of duplication in this phase of the culture. As far as the pigment content in the cells of *P. lima* of higher concentration in descendent order went chl a, perididine, chl c2 and β-carotene, this last pigment was the one that displayed the higher variation through time. The mice injected with the extracts of *G. toxicus* in cells from natural as well as the cultivated ones, showed the first

characteristic signs of poisoning, at 50 min in the cultivated organisms and at 87 min the inoculated ones with the extract of natural. According to the obtained results, the area of study should be considered as risk zone of ciguatera and DSP events, considering the abundance of *P. lima* and *G. toxicus*. The presence of DTX-1 in *P. lima* and ciguatoxins in *G. toxicus* in bioassay in mouse verified in controlled environment and in nature, demonstrated that both species are associate to events of ciguatera in different zones from the Caribbean and Australia.



## INTRODUCCION

Las microalgas juegan un papel importante como productores primarios en ambientes acuáticos. Sin embargo algunas especies pueden crecer masivamente y formar los llamados “blooms” o florecimientos nocivos, que pueden llegar a provocar la muerte de organismos marinos por disminución del oxígeno, daños físicos o por sustancias tóxicas expulsadas. Otras, que aunque no sean formadoras de “blooms”, pueden causar grandes daños a actividades económicas, como la acuicultura y el turismo, o daños a la salud pública por contaminación alimentaria con ficotoxinas; muchas de estas pertenecen al grupo de los dinoflagelados.

Los dinoflagelados están entre los organismos unicelulares más antiguos y complejos en organización y estilos de vida y son, básicamente, productores primarios (Margalef 1998). Alrededor de 300 especies fitoplanctónicas son capaces de desarrollar mareas rojas, “fenómeno natural caracterizado por un aumento de la concentración de ciertos organismos componentes del plancton, que bajo ciertas condiciones ambientales se produce un aumento exagerado de organismos fitoplanctónicos especialmente dinoflagelados. Esto también se conoce como florecimiento, floraciones algales o "bloom", causando grandes cambios de coloración del agua debido a que poseen pigmentos con los que captan la luz del sol. Estos pigmentos pueden ser de color rojo, amarillo, verde, café o combinaciones, siendo la más frecuente la coloración rojiza de ahí que se haya generalizado mundialmente el término "Marea Roja". De esas especies solo unas 80 fitoplanctónicas tienen la capacidad de producir potentes toxinas (Sournia *et al.* 1991), la mayoría de las cuales son dinoflagelados.

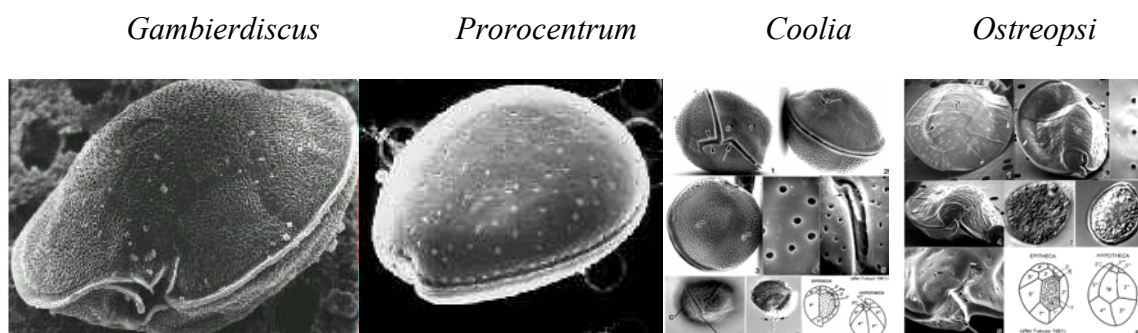
La acción nociva de estos organismos sobre el hombre se ejerce a través de dos vías:

- (1) Por el consumo de moluscos filtradores expuestos a eventos esporádicos de mareas rojas que producen las toxinas paralíticas (PSP), diarreicas (DSP), amnésicas (ASP) y neurotoxinas (NSP).
- (2) Por el consumo de peces de mares tropicales y subtropicales con presencia de dinoflagelados planctónicos y bentónicos que le transmiten la ciguatera (Margalef 1998)

En el crecimiento de las microalgas bentónicas intervienen factores naturales y antropogénicos, que permiten el crecimiento de las macroalgas hospederas. Dentro de los factores naturales se encuentran la temperatura, turbulencia y concentración de sales minerales. A su vez puede ser controladas por otros organismos bentónicos, tipos de sustratos, fuertes corrientes, oleaje, acarreamiento del material arcilloso sobre los corales muertos o sobre de hierbas marinas y alteraciones climáticas como entradas de frentes fríos y huracanes (Taylor 1985, Diogéne *et al.* 1992, Grzebyk *et al.* 1994). La actividad antropogénica que modifica el sustrato (dragados, destrucción de arrecifes, etc.) provoca mortandad de corales en los arrecifes que permiten la proliferación de las macroalgas donde se desarrollan los dinoflagelados tóxicos (Koike *et al.* 1991)

La principal intoxicación alimentaria provocada por la ingestión de ciertos peces tropicales y subtropicales, es denominada como ciguatera y se manifiesta con diferentes síntomas: gastrointestinales, circulatorios y neurológicos (Yasumoto 2001). Esta es causada, principalmente, por dinoflagelados bentónicos pertenecientes a cuatro géneros: *Gambierdiscus* (Adachi y Fukuyo 1979), *Ostreopsis*, *Prorocentrum* (Fukuyo 1981) y *Coolia* (Besada *et al.* 1982), en asociación epífita con algas verdes, rojas y pardas (Carlson

1984). Se han encontrado, además, libres en la columna de agua y en el sedimento, (Faust 1990a; 1990b; 1991; 1996) y sobre los arrecifes coralinos (Yasumoto *et al.* 1980, Fukuyo 1981).



La ciguatera representa un serio problema de salud pública y un impedimento económico para el desarrollo de la industria pesquera y del turismo. Su relevancia puede variar en dependencia de las regiones, debido a diferencias sociales y culturales entre las mismas tales como: la actividad pesquera, los hábitos alimentarios, la asistencia médica, el control epidemiológico y aspectos legales. Se estima que alrededor de 400 millones de personas viven en áreas donde la intoxicación por ciguatera está presente (Halegraff 1995). El riesgo de contraerla también existe en regiones no endémicas como consecuencia de la importación de pescado y el turismo (Glaziou y Legrand 1994). Anualmente más de 50,000 personas a nivel mundial son registradas por esta intoxicación (Legrand 1998).

Aun conociendo que el aumento de los florecimientos de algas nocivas es un problema en las aguas de las zonas costeras templadas y tropicales donde las formas fitoplanctónicas se han estudiado de forma intensiva, sin embargo se han conducido pocas investigaciones a los organismos bénticos (Purdie y Morris 2005). Entre los países

tropicales se encuentra Cuba, donde desde 1993 hasta el primer semestre del 2002, se registraron 1266 brotes de ciguatera con 3843 casos de intoxicación, de ellos 8 muertes hasta 1996, no obstante, se desconoce el ciclo estacional de los dinoflagelados potencialmente tóxicos, involucrados en esta enfermedad, ni cuales son los factores del medio que influyen en su desarrollo, es por ello que en el presente estudio se analizará la distribución espacial y temporal de estos organismos en los sustratos de macroalgas y en el sedimento, su relación con las variables ambientales

## **2. ANTECEDENTES**

Muchos son los trabajos relacionados con los aspectos clínicos de la intoxicación y la acción de las toxinas sobre el organismo humano. Sin embargo, solo existe alrededor de un 4% de la literatura relacionada con los organismos causantes o sintetizadores de las toxinas y de los factores que rigen su desarrollo en el medio natural (Berland *et al.* 1992)

Prego (1993) reconoce que aun cuando se han estudiado las condiciones oceanográficas de las regiones donde se producen los fenómenos que causan ciguatera, no se ha podido determinar cuáles son los factores que favorecen estos procesos en el medio natural. Berland *et al.* (1992) plantean que el deterioro de arrecifes y el enriquecimiento del medio marino, conjuntamente con el desarrollo de macroalgas como sustratos y la actividad antropogénica, pueden ser factores importantes en el desarrollo de los organismos causantes de esta intoxicación.

Muestreos sistemáticos de dinoflagelados tóxicos en diferentes sustratos naturales: macroalgas, arrecifes coralinos y sedimentos, y la respuesta de estos a determinadas variables físico-químicas del agua, fenómenos atmosféricos y antropogénicos, han

permitido conocer la abundancia y la distribución temporal y espacial de estos organismos bentónicos asociados a la ciguatera en diferentes mares y océanos: En las costas de Estados Unidos, Florida y Hawai (Lawrence *et al.* 1980, Mc Caffrey *et al.* 1990), Australia (Gillespie *et al.* 1985), en las islas del Pacífico Sur (Lewis 1984), en el Océano Índico (Bagnis *et al.* 1988, Thomassin *et al.* 1993, Grzebyk *et al.* 1994) y en Puerto Rico (Ballantine 1985, Tosteson 1998) entre otros.

En el Océano Índico, en monitoreos realizados desde 1993 hasta 1996 en la isla Reunión, Francia, (Turquet *et al.* 1998), encontraron bajas concentraciones de *G. toxicus* en mayo y junio, cuando las condiciones eran desfavorables para esta especie, por la presencia en el área de fuertes vientos, oleaje y alta salinidad, y un incremento en septiembre y octubre cuando la temperatura aumentó y la salinidad retornó a niveles normales (35 ups).

Bernard *et al.* (1992) en estudios realizados durante el período 1985-1991 sobre la evolución de *G. toxicus* en los arrecifes coralinos de la isla francesa Mayotte, en el Océano Índico encontraron un incremento en la densidad en septiembre de 1988. Este incremento lo asociaron con la insolación, la incidencia de precipitaciones, el desarrollo estacional de las macroalgas, y fundamentalmente con los aportes terrígenos ocasionados por la construcción de una carretera alrededor de la isla, lo que contribuyó a perturbación del ecosistema. En estas mismas islas Grzebyk *et al.* (1994) realizaron investigaciones sobre la ecología de los dinoflagelados tóxicos, donde concluyen que abundan sobre las macroalgas, fundamentalmente las rojas, sugiriendo que este sustrato estimula el desarrollo de estos organismos. Thomassin *et al.* (1993) observaron un incremento significativo de estos organismos en los corales muertos sobre los cuales existía una cubierta de algas.

En O'ahu, Hawaii, McCaffrey *et al.* (1990) observaron, un marcado aumento de *G. toxicus* desde marzo hasta diciembre, con la máxima abundancia en noviembre. En esta misma región, Hokama *et al.* (1996), en un estudio realizado durante 15 meses observaron altas concentraciones de *G. toxicus* en mayo y julio de 1993.

Existen criterios diferentes sobre la influencia de los factores ambientales en el desarrollo de los dinoflagelados tóxicos. Yasumoto *et al.* (1980), en estudios ambientales realizados sobre los dinoflagelados tóxicos responsable de la ciguatera, encontraron que el nitrógeno inorgánico y el fósforo no son factores que influyen en la variabilidad de la distribución de estos organismos.

Carlson y Tindall (1985) concluyeron que la intensidad de luz y el movimiento de las aguas, afectan la distribución espacial de estos organismos. Bernard *et al.* (1992) consideran que el incremento de silicatos y de óxido de hierro provenientes de tierras lateríticas, la materia orgánica particulada proveniente del detrito de algas, así como el desarrollo de mantos de macroalgas provocado por los aportes de nutrientes, conjuntamente con bajas temperatura, salinidad, e intensidad luminosa durante la época de lluvia o en aquellas zonas con influencia continua de descargas de ríos, parecen estar relacionados con el desarrollo de *G. toxicus*. Holmes *et al.* (1997) observaron que la baja salinidad de las aguas de Singapur puede reducir el crecimiento de *G. toxicus*.

En la región del Caribe, donde el fenómeno de intoxicación es recurrente, los estudios oceanográficos asociados a la ciguatera son también escasos (Polonia *et al.* 1995). En Cayo Caracoles, Puerto Rico, Ballantine (1985) encontró la mayor abundancia de *G. toxicus* en el mes de octubre, y Tosteson *et al.* (1998), en esta misma área reportan predominio de *Ostreopsis lenticulares* en octubre de 1985 - 1986, y noviembre y diciembre

de (1987,1989 y 1994), la que relacionan con la frecuencia de ciguatoxinas en la barracuda (*Sphyraena barracuda*) y con períodos de Índice de Calor en el Caribe bajos, pero precedidos de meses de elevadas temperaturas (29.5 °C). Para los Cayos de la Florida Bomber (1985) y Bomber *et al.* (1988a) encontraron un máximo de *G. toxicus* también para el mes de octubre.

Taylor y Gustavson (1986) en muestreos realizados en 86 localidades de 15 islas del Caribe oriental concluyeron que *G. toxicus* vive preferentemente sobre especies de algas marinas ramificadas y raramente sobre el detrito y la arena. Aún cuando estuvo presente en todos los grupos de macroalgas, fue más abundante sobre las algas rojas.

Investigaciones realizadas sobre la abundancia de los dinoflagelados tóxicos en diferentes sustratos, han demostrado que son más abundantes en el sustrato de macroalgas, y la preferencia por los grupos de macroalgas varía de acuerdo a la región por ejemplo en los cayos de La Florida (Bomber *et al.* 1985), en las Islas Vírgenes (Carlson y Tindall 1985) y en Océano Indico (Saint-Martin *et al.* 1988) encontraron que eran más abundantes sobre las algas rojas; mientras que la región NW de Cuba Delgado *et al.* 2000 y Popowski *et al.* 2002, encontraron preferencia por las algas pardas.

Existe poca información acerca del desarrollo de estos organismos sobre el sedimento. Carlson y Tindall (1985) después de un año de estudio sobre la asociación de estos organismos con los sustratos de macroalgas, corales muertos y sedimento arenoso en las Islas Vírgenes, concluyeron que eran más abundantes sobre las macroalgas colectadas entre 0.5-3.0 m de profundidad.

Faust (1993) realizó estudios sobre la ecología de diferentes especies de dinoflagelados tóxicos y encontró que la abundancia de estos organismos sobre el detrito

puede tener magnitudes hasta dos veces superiores a las encontradas en la columna de agua. Además concluyó, que los dinoflagelados tóxicos suspendidos sobre el detrito, pueden jugar un papel significativo en el desarrollo de poblaciones ciguatóxicas. Morton y Norris (1989) encontraron en Cayo Knight en La Florida, que el desarrollo de *P. lima* era inhibido en ambientes someros y de fondo arenoso.

En ambiente controlado, se han realizado estudios sobre el efecto de la temperatura, salinidad, intensidad de luz, concentración de nutrientes y exudados algales sobre el crecimiento y toxicidad de *G. toxicus* y *P. lima* aislados del medio natural.

Morton y Norris (1990), en experimentos realizados con *P. lima* en los cayos de La Florida, determinaron que el pico de crecimiento ocurrió a 26 °C y a una salinidad de 30 ups. En Nueva Escocia, esta misma especie fue aislada y cultivada a 16 °C con ciclo de 14:10 de luz y oscuridad, determinándose la presencia de DSP (Lawrence *et al.* 1998). En la misma región, Jackson *et al.* (1993), determinaron el efecto de la temperatura en el crecimiento y la producción de DSP en cultivos de *P. lima* incubados a temperaturas de 5, 10, 15, 20 y 25 °C, observando en todos los cultivos, producción de toxinas y el de mayor crecimiento celular fue el que se encontraba a 25 °C.

Tomas y Baden (1993), determinaron la influencia del fósforo en el crecimiento y toxicidad de *P. lima* aislada del medio natural en la Florida y cultivada en medio enriquecido con fosfato y glicerol fosfato. Ellos observaron un rápido crecimiento con densidades celulares moderadas en el que contenía fosfato (0.75 div/día), mientras que, con glicerol fosfato la velocidad de crecimiento fue menor (0.16 y 0.45 div/día) con densidades celulares altas. Los niveles de toxicidad fueron mayores en las células que crecieron en medio enriquecidos con fosfato orgánico, que las crecidas en medio con fosfato inorgánico.



*P. lima* fue aislado desde el sustrato rocoso en las costas del Golfo de California y cultivado en medio ES-Si a temperatura de  $22 \pm 1$  °C (Heredia *et al.* 2002) y su toxicidad fue probada en bioensayos con *Artemia franciscana* y ratón. Donde observaron en el primer caso que *A. franciscana* moría al cabo de las 2h, y los ratones mostraron síntomas típicos de las toxinas diarreicas.

Burns *et al.* (2000) estudiaron el efecto de fuentes de nitrógeno en el crecimiento y toxicidad de especies de dinoflagelados potencialmente nocivas del género *Prorocentrum* en el medio de cultivo L1 con nitrato, amonio, urea, ácido L-Glutámico y nitrógeno orgánico disuelto. El crecimiento fue medido usando diferentes técnicas y los resultados preliminares indicaron que algunas formas del nitrógeno orgánico e inorgánico apoyan el crecimiento, como la urea, que es la forma de nitrógeno inorgánico que más ayudó al crecimiento.

En experimentos realizados por Morton y Tindall (1995), sobre la morfología y variabilidad bioquímica de 17 cepas de *P. lima* aislado de tres localidades situadas al sur, norte y sureste de la isla Heron, en Australia, encontraron que la chl a era el pigmento predominante. Al comparar el contenido de pigmento en las cepas del sitio sur y las del sureste, no observaron una variación notable y sí encontraron diferencias entre una cepa de la zona norte respecto a las restantes de esa misma área. Un patrón similar fue observado para la perididina y otras xantofilas (dinoxantina y diadinoxantina). La concentración de la chl c<sub>2</sub> tuvo variaciones en las cepas de la zona sur, no ocurriendo lo mismo en las de la zona norte y noreste.

Nascimento *et al.* (2005) realizaron estudios sobre el crecimiento, composición de toxinas y contenido de pigmentos en cultivos de *P. lima* aislados en una laguna del sur del

Reino Unido, donde concluyen que el crecimiento de *P. lima* fue ( $0.11 \text{ div días}^{-1}$ ), el contenido de toxinas varió entre 2.0 a 12.2 pg de AO  $\text{cél}^{-1}$  y 1.8 a 12.5 pg de DTX-1  $\text{cél}^{-1}$ . La concentración de toxinas por células decreció del primer día al octavo. Los pigmentos chl a, peridinina y diadinoxantina, fueron los de mayor concentración, mientras que chl-c1+chl-c2, chl-c3, diatoxantina y  $\beta$ -caroteno fueron los menos detectados.

Holmes *et al.* (1991) investigaron 13 extractos de *G. toxicus* provenientes de Queensland (Australia), Hawaii, Polinesia Francesa y las Islas Vírgenes, donde analizaron la ciguatoxina como precursora de gambiertoxina. Ellos proponen que los brotes de ciguatera ocurren cuando las floraciones de *G. toxicus* son capaces genéticamente de producir los precursores de ciguatoxinas que entran en la cadena alimentaria marina.

Berland *et al.* (1992) en experimentos con cinco clones de *G. toxicus*, concluyeron que la especie es estenohalina (32 y 42 ups) y estenotérmica (18 y 30 °C) alcanzando el máximo crecimiento a los 26 °C.

Grzebyk *et al.* (1994) en bioensayos realizados con agua de mar enriquecida con exudados de dos especies de macroalgas, observaron que la concentración de los nutrientes: nitrógeno total, amonio, nitrito, nitrato, fosfato y silicatos, aumentaban. A su vez observaron un crecimiento mayor de *G. toxicus* en medios conteniendo exudados que al obtenido en el que sólo tenía agua de mar sin tratar, donde no se observó crecimiento.

En Cuba, el primer reporte que trata sobre la ciguatera fue realizado por el naturalista portugués Don Antonio Parra (1787) quien narró los estragos que provocó en él y su familia, el consumo de un pescado (*Lutjanus cyanopterus*) fresco y sin señales de enfermedad.

El término “ciguatera” fue definido en 1866 para designar una intoxicación neurodigestiva frecuente en Cuba, después de ingerir un pequeño gasterópodo (*Livona pica*), conocido como “cigua” Diogéne *et al.* (1992). Ese mismo año el sabio naturalista cubano Felipe Poey publicó algunos trabajos donde se propuso si no esclarecer, por lo menos interpretar científicamente diferentes aspectos sobre la ciguatera.

El primer registro de *G. toxicus* para aguas cubanas fue para el Oeste de Ciudad de La Habana (Bagnis 1979, citado por Popowski 2001). Valdés (1980) realizó una serie de investigaciones sobre la distribución de los peces ciguatóxicos. Blanco (1981) estudió la transmisión de la toxina, así como las características clínicas de la intoxicación y el tratamiento para disminuir los efectos tóxicos en el hombre. Rodríguez y Hernández (1990) realizaron estudios epidemiológicos.

Sin embargo, no es hasta finales de la década de los 80 que comienzan las investigaciones ecológicas de los dinoflagelados tóxicos causantes de la ciguatera. Valdés *et al.* (1992) realizaron un análisis de la distribución y composición de los dinoflagelados tóxicos sobre el sustrato de macroalgas, en los meses de marzo y octubre de 1989, en la costa norte de la provincia de Pinar del Río, en la región noroccidental de Cuba. Dichos investigadores encontraron que la densidad de *Prorocentrum sp* fue mayor que la de *G. toxicus* con el valor más alto sobre el complejo macroalgal *Halimeda-Lobophora* y el más bajo en *Dictyota menstrualis*, no encontrando presencia de dinoflagelados tóxicos sobre *Turbinaria tricostata* en el mes de marzo. En octubre, *Prorocentrum sp* sigue dominando sobre *G. toxicus* en menor densidad que en el mes de marzo y *G. toxicus* no estuvo presente sobre *D. menstrualis* ni en *Sargassum hystrix*.

Delgado *et al.* (2000) colectaron a *P. lima* sobre *D. menstrualis*, *Bryothamnium triquetrum* y *Styopodium zonale* en mayo de 1998, en una bahía artificial en la costa norte de Ciudad de la Habana. Las densidades encontradas estuvieron por debajo de 100 cel.g<sup>-1</sup>, no encontrando en ninguna de las macroalgas *G. toxicus*.

Popowski *et al.* (2001), destacaron que el cambio observado en la composición y abundancia de estos organismos es mayor durante el verano, coincidiendo con la mayor incidencia de casos de intoxicación por ciguatera. Se determinó que *P. lima* es más abundante que *G. toxicus* y en cuanto a la distribución espacial, estos organismos son más abundantes en la laguna interior que en la zona arrecifal debido fundamentalmente a que es una zona protegida de las corrientes, el oleaje y con un buen lecho de macroalgas.

De acuerdo con los antecedentes anteriores, los dinoflagelados asociados a la ciguatera, tienen preferencia por el sustrato de macroalgas, principalmente a las pertenecientes al grupo de las Rhodophyta y de ambientes con predominio de nutrientes orgánicos, baja velocidad del viento, alta insolación y transparencia en la columna de agua.

## **2.1. JUSTIFICACION.**

La ciguatera es la principal causa de intoxicación alimenticia registrada en Cuba, principalmente en la época de verano, siendo el área noroccidental la más afectada. Teniendo en cuenta que el vector transmisor de las toxinas son los dinoflagelados bentónicos y que en el país se desconoce la variación estacional y la influencia de los factores bióticos y abióticos en el desarrollo de estos organismos, se consideró necesario profundizar sobre los factores que influyen o pudieran regir su abundancia, variabilidad y

toxicidad en un área del litoral norte afectada por actividad antropogénica, por la influencia directa de descarga de un río y por la acción de la variabilidad climática anual.

## **2.2. HIPOTESIS.**

La abundancia y composición de dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos que se desarrollan en la zona aledaña al río Jaimanitas, presentan variaciones en espacio y tiempo, debido a la influencia de variables físico-químicas y ambientales de la zona. La toxicidad de las especies se manifiesta tanto en el medio natural como bajo condiciones controladas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general.**

Identificar las variables físico-químicas, climáticas y el tipo de sustrato que influyen sobre la variación espacio-temporal y la abundancia de los dinoflagelados bentónicos potencialmente tóxicos en el medio natural, así como, su crecimiento y toxicidad bajo condiciones controladas y en el medio.

### **3.2. Objetivos específicos.**

1. Clasificar los dinoflagelados bentónicos tóxicos presentes tanto en el sustrato de macroalgas y en sedimento.
2. Evaluar y determinar la variación espacio-temporal de la concentración de cada especie potencialmente tóxica en los sustratos de macroalgas y sedimento.
3. Evaluar su incidencia de acuerdo a la variabilidad de los nutrientes en el área de estudio.
4. Determinar cuales son las variables ambientales que influyen sobre la variación espacio temporal de los dinoflagelados potencialmente tóxicos
5. Aislamiento y cultivo de *P. lima* y *G. toxicus*
6. Determinar el tipo y nivel de concentración de las toxinas presentes en las especies cultivadas y en el medio natural.

## **4. MATERIALES Y METODOS.**

### ***4.1. Descripción del área de estudio***

El área de estudio es una ensenada formada por la desembocadura del río Jaimanitas, situada en los (22° 54' N y 83° 21' W) al Noroeste de la Ciudad de la Habana (Fig. 1). Sus tres cuartas partes están protegidas del embate directo de las olas por dos cayos rocosos pequeños, la profundidad máxima es de 4m, el sedimento es fangoso en las proximidades de la desembocadura del río, areno- fangoso y arenoso en el resto. Durante la época de seca la cual coincide con la entrada de frentes fríos (noviembre-abril) las variaciones del clima se hacen más notables, con cambios bruscos diarios, asociados al paso de sistemas frontales, a la influencia anticiclónica de origen continental y de centros

de bajas presiones extratropicales, donde la velocidad del viento varía desde <1 km/h (mar en calma) hasta > de 30 km/h y la temperatura del agua llega a alcanzar valores alrededor de los 26 °C. Por el contrario de mayo a octubre (verano y período lluvioso), se presentan pocas variaciones en el tiempo, con la influencia más o menos marcada del Anticiclón del Atlántico Norte (González 2002).

Los cambios más importantes en la zona se vinculan con la presencia de disturbios en la circulación tropical (ondas del este y ciclones tropicales) y la temperatura es más alta entre 29 y 35 °C, pudiendo alcanzar valores mayores en las zonas más bajas (González 2002). La mayor parte del año la salinidad está entre los 32 y 38 ups valores menores se han observado durante la época de lluvias por la influencia que ejerce el río en el área de estudio. Montalvo *et al.* (2002) consideran la zona como altamente eutrofizada por la carga contaminante que recibe diariamente a través del río.

La microflora, sobre la cual se colectaron los dinoflagelados potencialmente tóxicos estuvo representada por: *Galaxaura obtusata* (Ellio y Solander) Lamouroux, *Tricleocarpa fragilis* (Linnaeus) Huisman & Townsend *Bryothamniom triquetrum* (Gmelin) Howe, *Hypnea cervicornis* (C. Agardh) Kützing, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen, *Gracilaria blodgetti* Harvey, *Gelidium sp.*, *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörnig & Weber-Peukert, *Padina sp.*, *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss, *Ulva lactuca* Linnaeus, *Ulva sp.* *Halimeda sp.*, *Codium sp.* y *Chaetomorpha sp.*

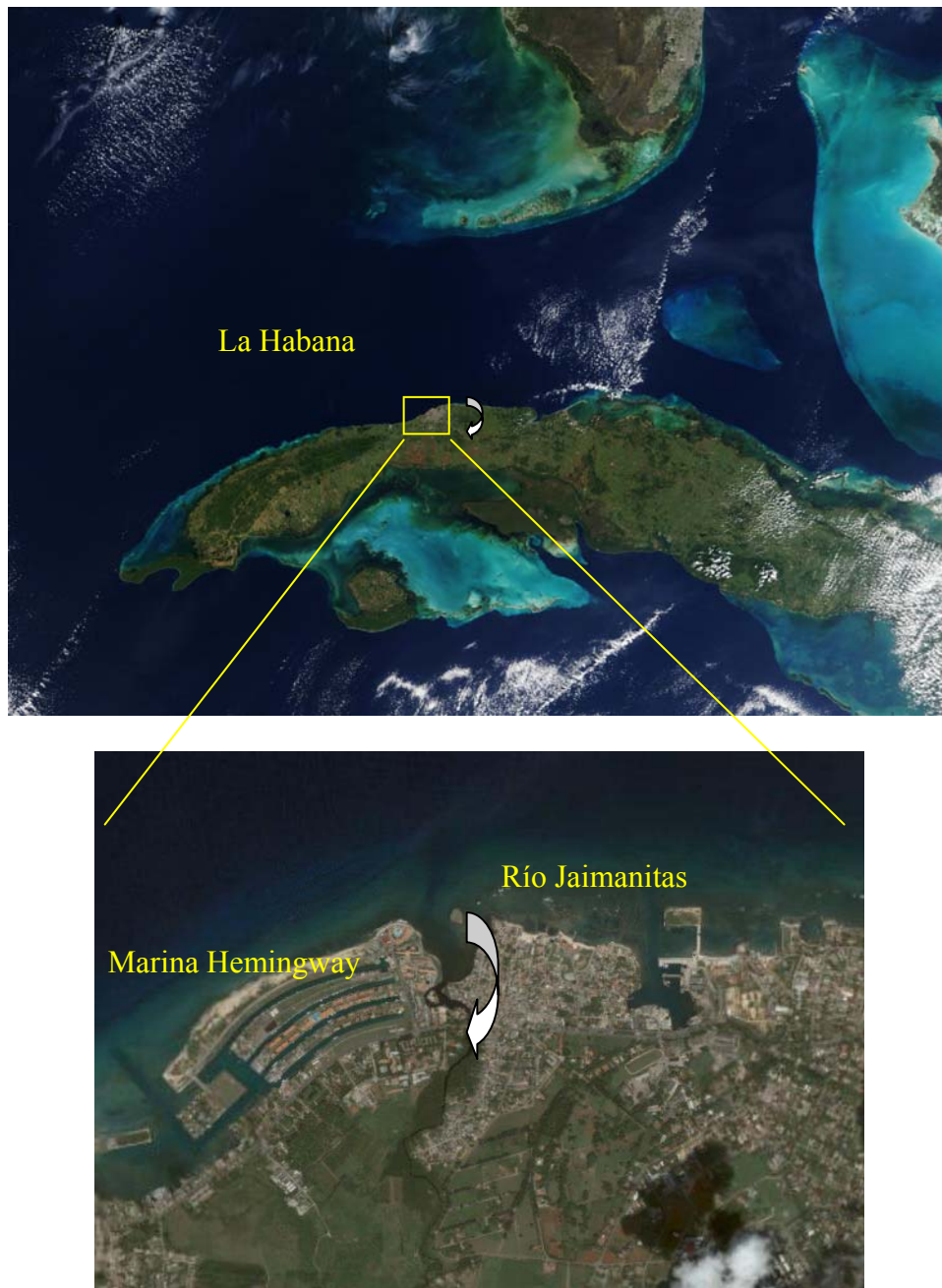


Figura 1. Macrolocalización del área de estudio.



#### 4.2. Métodos de muestreo.

Esta investigación enmarca dos ciclos anuales de muestreo desde marzo de 1999 hasta marzo del 2000 y desde enero del 2001 hasta enero del 2002 en un banco natural de macroalgas de la plataforma cubana al Noroeste de la Ciudad de la Habana, (Fig. 1). Los muestreos se realizaron en dos transectos perpendiculares a la costa en la zona submareal a profundidades entre 0.5 y 3 m de profundidad, en cada uno se ubicaron 5 estaciones a una distancia aproximada de 50m cada una (Fig. 2). En cada estación se colectaron las macroalgas presentes en 1 m<sup>2</sup> considerándose cada especie de macroalga como una unidad muestral. En el muestreo del 2001 se incluyen además muestras de sedimento en seis de los puntos de muestreo, señalados en la figura con números romanos

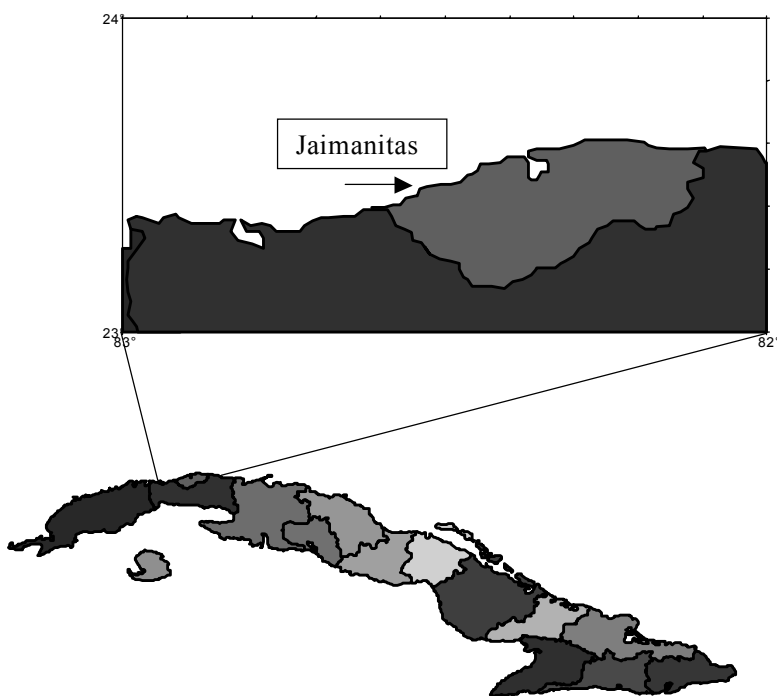




Figura 2. Localización de estaciones de muestreo en el área de estudio. Los números arábigos indican los puntos de muestreos de macroalgas y los romanos los de sedimentos.

La frecuencia del muestreo fue mensual, colectándose las muestras mediante buceo autónomo a una profundidad entre 0.5 y 3 m y se siguió el método propuesto por Quod *et al.* (1995) de la siguiente forma:

- Se tomaron no menos de 20g de cada macroalgas colocándose en bolsas de nylon independientes. En el laboratorio se agitaron vigorosamente durante 5 min, para desprender los dinoflagelados epífitos presentes en ellas, filtrándose por una columna de tamices de diferente luz de malla de 150  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 75 $\mu\text{m}$  y 20 $\mu\text{m}$ , y se colectó lo que quedó en la malla de 20  $\mu\text{m}$ , agregándole solución de lugol ácido para su preservación. Las macroalgas fueron secadas a la sombra durante 72 horas y

se pesaron en una balanza monoplato marca Sauter D-7470 Ebingen, 0.01 g de precisión.

Las muestras de sedimentos se tomaron en seis estaciones en los que se colectaron tres submuestras, según la metodología propuesta por Fleeger (1988), utilizando una jeringuilla de 2.5 cm de diámetro interno, de la cual se tomó el primer centímetro que corresponde al sedimento superficial y se guardó en un frasco de cristal con agua de mar filtrada, hasta su traslado al laboratorio. En el laboratorio se agitaron con un agitador magnético para desprender los dinoflagelados bentónicos, y la suspensión se pasó por una columna de tamices de 150  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 75 $\mu\text{m}$  y 20 $\mu\text{m}$ . Se colectó la última fracción agregándole 25 mL de agua de mar filtrada y 2 mL de solución de lugol. Además se hicieron *in situ* mediciones de temperatura y la salinidad del agua de mar, utilizando un termómetro de copa y un refractómetro manual marca Atago respectivamente y la transparencia se estimó con un disco de Secchi.

#### ***4.3. Análisis químicos.***

Simultáneamente a la toma de muestras de macroalgas y sedimento, se tomaron muestras de agua de fondo para cuantificar amonio ( $\text{NH}_4$ ), nitrato ( $\text{NO}_3$ ), nitrito ( $\text{NO}_2$ ) según las metodologías de IOC (1993), nitrógeno total (NT) determinado por la suma de  $\text{NH}_4 + \text{NO}_3 + \text{NO}_2$ , fósforo reactivo ( $\text{PO}_4$ ) y fósforo total (PT) de acuerdo a IOC/UNESCO (1983).

#### ***4.4. Clasificación y cuantificación de los dinoflagelados potencialmente tóxicos***

El análisis cualitativo y cuantitativo de los dinoflagelados bentónicos, tanto del sustrato de microalgas como el sedimento, se realizó tomando de las muestras preservadas alícuotas de un 1 ml y en una cámara Sedgwick-Rafter se revisaron bajo un microscopio biológico Karl Zeiss, con 120 y 180X de magnificación.

La clasificación de los organismos se realizó según los criterios taxonómicos y morfológicos dados por: Adachi y Fukuyo (1979), Fukuyo (1981), Balech (1988), Larsen y Moestrup (1989), Faust (1990, 1991, 1993 y 1996), Licea *et al.* (1995) y Steindinger y Jangen (1997).

Para todas las muestras epífitas (1340 en total) se calculó la concentración celular, expresándose en número de células por gramos de peso húmedo del macroalga y para las de sedimento (78 en total) en  $\text{cél}/\text{cm}^3$ .

#### ***4.5. Aislamiento y cultivo de *P. lima*.***

Las células de *P. lima* para determinar su toxicidad en el medio natural y en ambiente controlado se colectaron sobre la macroalga *Padina* sp. El aislamiento se realizó por el método de micropipeta bajo un microscopio invertido y sometidas a un proceso de lavado transfiriéndolas a diferentes gotas de agua de mar estéril, para posteriormente ser inoculadas en 10 mL de medio K (Keller y Guillard, 1985) y ser mantenidas en condiciones controladas a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C con luz fluorescente y un ciclo de luz y oscuridad de 12: 12 h. El cultivo final se estableció en 75 mL de medio inoculándose los 10 mL del inóculo inicial, manteniéndose bajo las mismas condiciones de control. El número de células se contó al inicio y al final del experimento. Las células del medio natural se

centrifugaron y el concentrado se conservó a temperatura de -20 °C hasta el momento de la extracción de las toxinas.

#### ***4.6. Análisis de toxinas diarreicas.***

Los extractos de las células de *P. lima*, para la cuantificación e identificación de las toxinas se realizó según el método descrito por García *et al.* (2003). El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, durante 5 min, al precipitado se le agregó 1 mL de metanol al 80% y se sonicó a  $42 \pm 6$  % KHZ (kilohertz) durante 1 min a temperatura ambiente, centrifugándose nuevamente siendo el precipitado tratado nuevamente con 1ml de metanol acuoso al 80%. Los dos sobrenadantes se unieron y se pusieron a secar en un equipo de secado al vacío (Speed Vac. SC 210A), con una trampa de vapor refrigerada RVT400 (SAVANT). El residuo fue disuelto en 2 mL de metanol al 80% y extraído con 2 mL de hexano. La capa metanólica fue secada y guardada en refrigeración para preparación de la derivatización de ADAM.

#### ***Derivatization de ficotoxinas de DSP con el cromóforo ADAM.***

Las mediciones de los estándares de ADAM y las toxinas de las muestras se analizaron por HPLC según el método descrito por Uribe *et al.* (2001). Los residuos de los extractos de las muestras se trataron brevemente con una solución de 0.1% ADAM en 100  $\mu$ L de acetona y 400  $\mu$ L de metanol (Lee *et al.* 1987). Después de una hora a 25 °C en la oscuridad, la muestra se evaporó a la sequedad y el residuo se diluyó en 200  $\mu$ L diclorometano/hexano, 1:1 (v/v) transfiriéndose a un cartucho de sílica gel (SEP PAK) de 500 mg. El sistema se lavó consecutivamente con 5 mL de diclorometano /hexano, 1:1 (v/v) y 5 mL diclorometano.

Finalmente, se disolvió con 5 mL de diclorometano /methanol, 1:1 (v/v). El último fragmento se evaporó a sequedad, disolviéndose posteriormente en 1 mL de metanol, del que se tomaron 10  $\mu$ L para ser inyectados en el HPLC en línea por fluorescente.

*Condiciones cromatográficas para el análisis de toxinas diarreicas.*

El análisis químico se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos (Shimadzu Liquid Chromatograph System), equipado con una bomba (Shimadzu LC-6A), un inyector rheodyne (7725i Rheodyne. Cotati, Ca. EE.UU) y un detector de fluorescencia (Shimadzu RF-535). Se inyectaron diez microlitros de derivados de la toxina en una columna de fase invertida Supelcosil LC-18 (5  $\mu$ m; 25 cm x 4 mm) (Supelco, Bellefonte, PA. USA). Una fase isocrática móvil de acetonitrilo/metanol/H<sub>2</sub>O 8:1:1 (v/v) con una proporción de flujo de 1 mL/min y se corrió a la temperatura ambiente. La excitación y longitudes de onda de la emisión estaban fijas en 365 y 415 nm respectivamente. El pico de toxina detectada fue identificado por la comparación con el pico de retención del estándar de ficotoxinas de toxinas diarreicas por envenenamiento de moluscos. Este método separa cromatográficamente y detecta a las toxinas por fluorescencia luego de la derivatización pre-columna.

***4.7. Crecimiento celular y contenido de pigmentos en P. lima.***

Las células aisladas fueron mantenidas en ambiente controlado con ciclos de luz y oscuridad de 12 h, con iluminación entre 279  $\mu$ E/cm<sup>2</sup>/min y temperatura de 25  $\pm$  3 °C. Una vez que se logró la multiplicación celular (> 50 céls.) en algunos de los pocillos de la

placa, el inóculo se mantuvo en tubos de vidrio de 10 mL, reinoculándose a volúmenes mayores hasta alcanzar 2 L para ser utilizado en el experimento.

Una vez obtenido el cultivo, se prepararon cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno con diferentes relaciones de Nitrógeno: Fósforo (N:P) de 7:1, 16:1, 20:1 y 40:1. Las modificaciones del medio f/2 (Guillard 1983) con las relaciones N:P se muestran en la tabla I.

Tabla I. Relación nitrógeno fósforo (N:P) en cada tratamiento

<b>RELACION N:P</b>	<b>mL de NO<sub>3</sub> por L de medio</b>
7:1	0.29 mL/L
16:1	0.666 mL/L
20:1	0.833 mL/L
40:1	1.666 mL/L

Se utilizaron 100 mL del cultivo y se adicionaron 500 mL del medio f/2 modificado en cada réplica y para cada tratamiento. Una vez iniciado el experimento se muestreó al tiempo inicial y posteriormente cada cuatro días. El volumen para los conteos celular fue de 2 mL y se preservaron con solución de Lugol, y 20 mL para la determinación de pigmentos y nutrientes. Los pigmentos incluyeron clorofila c<sub>2</sub> (chl c<sub>2</sub>), clorofila a (chl a), perididina, diadino y β-caroteno y fueron medidos por HPLC, usando el método descrito por Vidussi *et al.* (1996). Para la determinación de nitratos disueltos en agua el método de Morris y Riley (1963) y para los ortofosfatos disueltos en agua el de Murphy y Riley (1962), ambos con límites de detección de 0.1 μmol.

Para el análisis de pigmentos se filtró 20 mL de cultivo a través de una membrana de fibra de vidrio GF/F de 0.7 μm de tamaño de poro. Los filtros se colocaron en tubos

ependorf y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior extracción. La extracción de los pigmentos se llevó a cabo con acetona grado HPLC al 100 %, se dejaron extraer por 24 hrs a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm 15 min a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El extracto se recuperó con ayuda de pipetas Pasteur de vidrio, se transfirió a viales criogénicos y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente se extrajeron  $20\text{ }\mu\text{L}$  y se inyectó en el Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, modelo 1100, Hewlett Packard).

La separación de los pigmentos se hizo, utilizando una fase móvil, conjugando dos soluciones. La solución A fue una mezcla de metanol y acetato de amonio 1N, en una proporción 70:30 v/v y la solución B metanol grado HPLC al 100 %. La fase estacionaria utilizada fue una columna MOS Hypersil C8, de 10 cm de longitud, de 0.45 cm de diámetro y rellena de partículas de sílice de  $5\text{ }\mu\text{m}$ . El detector utilizado fue un arreglo de diodos con un rango de longitud de onda de 190-900 nm y capacidad para determinar cinco longitudes de ondas fijas.

La identificación se realizó tomando en cuenta dos criterios:

- a) Tiempo de retención de los estándares
- b) Espectro de absorción luminosa (350-750 nm), obtenidos con el detector de arreglo de diodos.

La cuantificación se realizó construyendo una curva de calibración para cada pigmento, inyectando varias concentraciones conocidas de los estándares entre (3 y 10 ng/ $\mu\text{l}$ ). También utilizando el factor respuesta de cada pigmento.

El conteo celular de cada réplica y tratamiento se realizó en una cámara Sedgwick-Rafter de 1mL de capacidad, bajo un microscopio biológico de luz de transmisión (Leica



DMLS) con 120x de magnificación, expresando la concentración en células por mililitros (cél/mL).

En la fase exponencial de cada tratamiento se determinaron los parámetros poblacionales: velocidad de crecimiento (K), Tiempo de duplicación TD (días), según Leal *et al.* (2004). Estos parámetros se determinaron según las fórmulas:

$$K = (\ln C_f - \ln C_i) / (t_f - t_i)$$

Donde:

C<sub>i</sub> = densidad celular inicial

C<sub>f</sub> = densidad celular final

t<sub>i</sub> = tiempo al inicio de la fase exponencial

t<sub>f</sub> = tiempo al final de la fase exponencial

y

$$TD = \ln 2 / K$$

#### **4.8. Aislamiento y cultivo de *G. toxicus*.**

*G. toxicus* fue aislado sobre las macroalgas de los cayos que protegen la zona de estudio, siguiendo la metodología descrita para *P. lima*.

El cultivo se mantuvo durante tres meses en medio K (Keller y Guillard, 1985) en frascos de cristal de 250 mL de capacidad. La concentración celular se contó al inicio y al final del cultivo. La cosecha de las células se realizó por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min.

Para detectar la toxicidad en las células cultivadas y en las del medio natural, se utilizó el método biológico de bioensayo en ratón descrito por Yasumoto *et al.* (1984), utilizando primeramente acetona como solvente y después una solución salina de Tween 60/0.9%. Del extracto diluido se tomaron 0.5ml y se inyectaron intraperitoneal con cada extracto 4 ratones de  $20 \pm 2$  gr de peso y uno con solución salina de Tween 60% (patrón). Se tomó el tiempo en que apareció en cada ratón el primer síntoma de la intoxicación, hasta su muerte. El bioensayo se realizó durante 24 horas. La mortalidad se expresa en unidades de ratón (UR que es igual a 5 ng CTX-1).

La relación entre la dosis y el tiempo de muerte de ratón se determinó según la ecuación de Lewis (1995):

$$\log UR = 2.3 * \log(1 + T^{-1})$$

Donde:

UR = número de unidades de ratón con extractos de ciguatoxinas inyectados

T= Tiempo de muerte expresado en horas.

#### **4.9. Métodos estadísticos.**

Para la interpretación de los resultados de la abundancia sobre el sustrato de macroalgas se utilizó un análisis de ANOVA/MANOVA para relacionar la abundancia total en espacio y tiempo de dinoflagelados épifitos potencialmente tóxicos con las variables físico-químicas y ambientales en los dos ciclos anuales. Cuando se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se utilizó el método a posteriori (LSD), para determinar cuales de las variables independientes diferían del resto. La relación entre la abundancia de *G. toxicus*

y *P. lima* con las variables físico-químicas se realizó a través de un Análisis de Componentes Principales. Todo el análisis se realizó utilizando Statistic v. 4.5 (StatSoft INC, 1993).

Para los datos de sedimento se utilizó el Software Primer 5 para Windows v. 5. 2. 9, para determinar la afinidad entre las especies mediante un análisis de ordenación NMDS con la abundancia de los dinoflagelados potencialmente tóxicos utilizando la opción de agrupamiento promedio, partiendo de la matriz de similaridad de Bray-Curtis. Para establecer diferencias significativas entre las muestras a nivel espacial y temporal se efectuó un análisis de similaridad ANOSIM (Clarke y Warwick 1994).

## **5. RESULTADOS.**

### **5.1 Características físico-químicas de la zona.**

Los valores de temperatura se corresponden con la época del año. La temperatura comienza a aumentar a partir del mes de abril hasta alcanzar su valor promedio máximo durante el mes de agosto en los dos períodos (31.44 °C y 31.68 °C). Los mínimos se corresponden con la entrada de frentes fríos durante el período de seca, registrándose el mínimo en el mes de febrero 26.42 °C en el año 2000 y 25.26 °C en el 2002, (Fig 3). Los valores de la salinidad fueron desde un medio salobres (11.61 ups) en septiembre de 1999, hasta los característicos del agua marina (37.97 ups) en el mes de octubre del mismo año, mientras que en el período 2001-2002, estuvieron por encima de 30.8 ups (Fig 4). La velocidad del viento osciló entre 0.5 y 10.5 m/s, con la velocidad media más baja entre los meses de mayo y octubre en 1999 y entre mayo y noviembre en el 2001 (Fig 5).

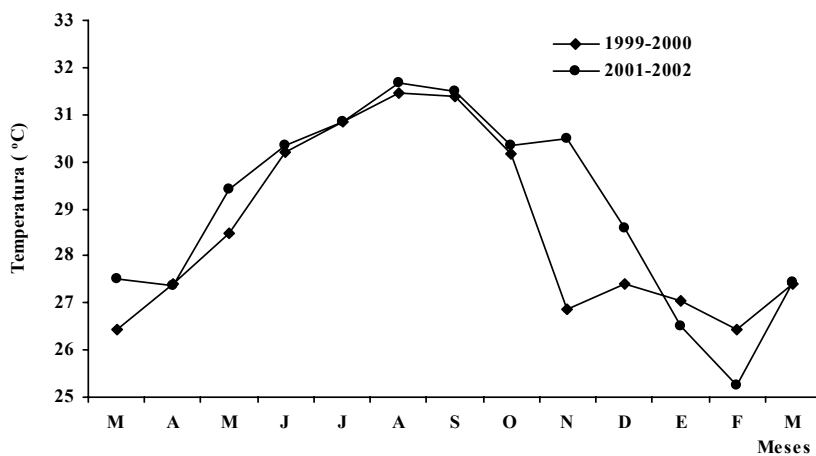


Fig. 3 Valores medios mensuales de la temperatura del agua durante los dos ciclos anuales.

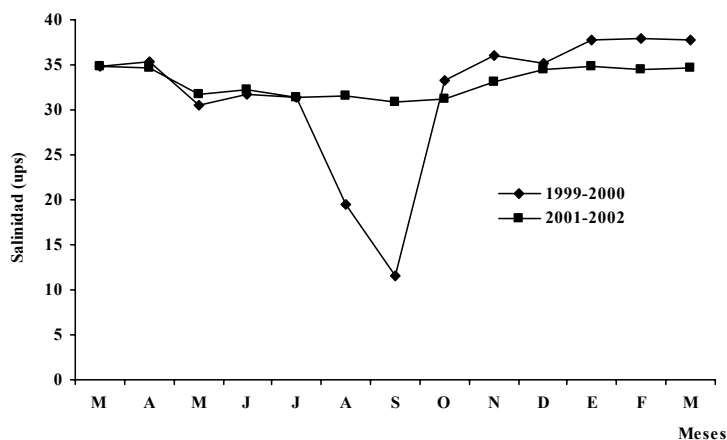


Fig. 4. Valores medios mensuales de la salinidad en los dos ciclos anuales

### *Nutrientes.*

Al analizar la variabilidad mensual de los nutrientes, se observó de forma general la misma tendencia en los dos ciclos anuales. En el caso de los compuestos del ciclo del nitrógeno, nitrato y amonio ( $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4$ ), tanto en el período 1999-2000, como en el del 2001-2002, la mayor concentración media se encontró en el mes de septiembre, siendo

mayor en el primer período y el  $\text{NH}_4$ , fue el más abundante, representando más del 65 % del NT en cada estación, llegando a alcanzar concentraciones hasta dos veces superiores en el período 1999-2000 a las registradas en el 2001-2002 (Fig 5 A y B).

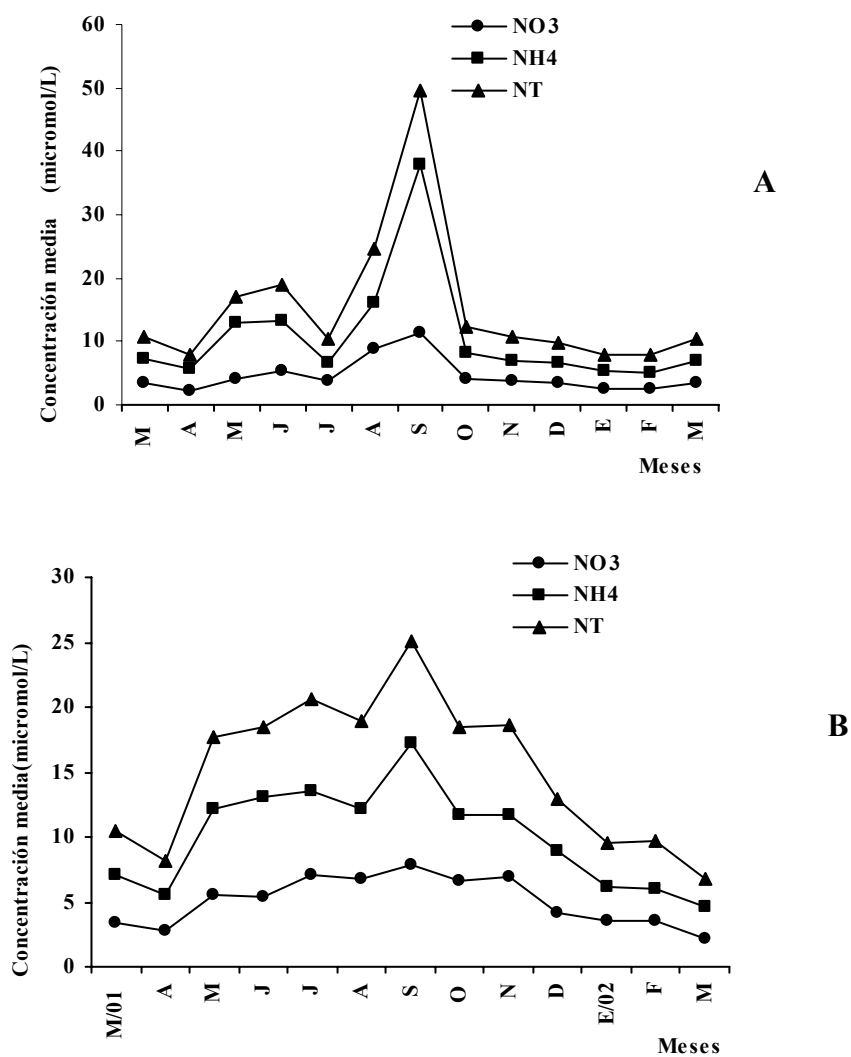


Fig. 5. Concentración media de nitratos ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) y el nitrógeno inorgánico total (NT), durante el período 1999-2000 (A) y el 2001-2002 (B).

La variación de la concentración del fósforo ( $\text{PO}_4$ ) para ambos períodos, se muestra en la Fig. 6, en el período 1999-2000, se observó la mayor concentración en septiembre (7,07  $\mu\text{mol/L}$ ), encontrándose valores mínimos muy similares en abril de 1999 y enero y febrero del 2000 (0,22 y 0,21  $\mu\text{mol/L}$ ), (Fig. 6A

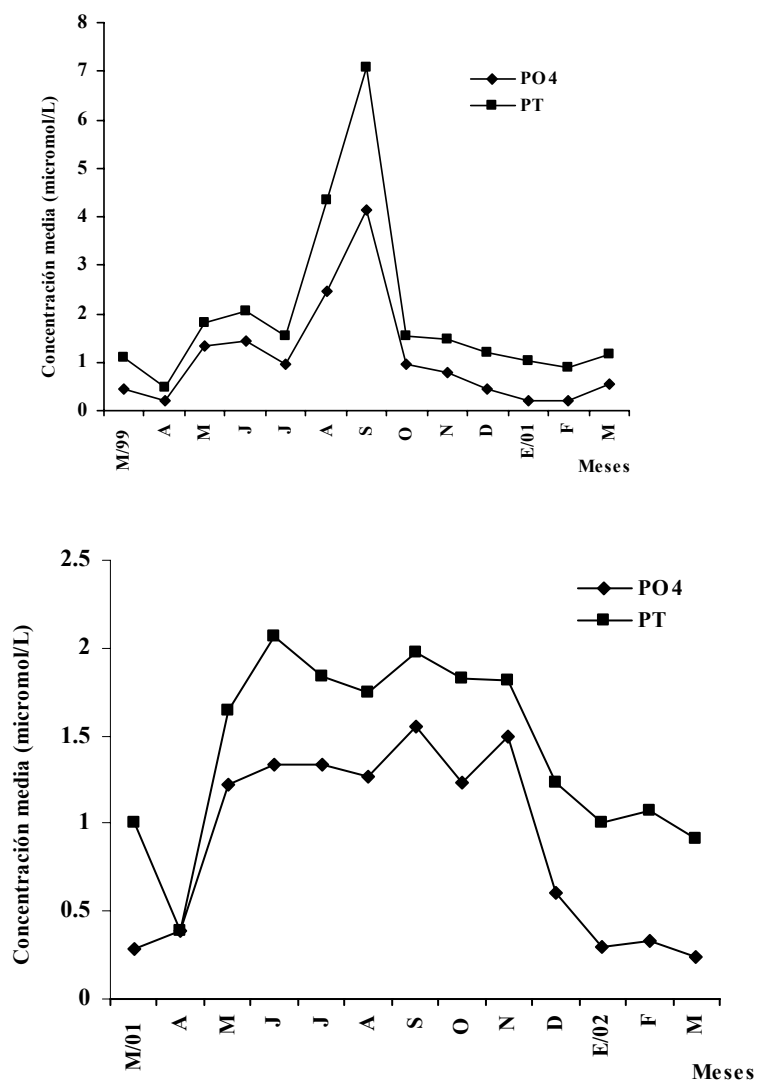


Fig.6. Concentración media de fosfatos ( $\text{PO}_4$ ) y fósforo total (PT) durante el período 1999-2000 (A) y el 2001-2002 (B).

Por su parte, el período 2001-2002, aun cuando la concentración fue menor que en el anterior, se observó una mayor variación entre los meses, correspondiéndole al mes de septiembre del 2001 el valor mayor (1,55  $\mu\text{mol/L}$ ) y el mínimo (0,20  $\mu\text{mol/L}$ ) en marzo del mismo año (Fig 6B).

La relación N:P, en los dos ciclos de estudio muestran un comportamiento similar desde el mes de marzo hasta mayo, con el máximo de la relación para ambos en el mes de abril (16:1 y 21:1), la primera correspondiente al período 1999-2000 y la segunda al 2001-2002. En los meses siguientes se observa de manera general un comportamiento diferente entre los dos ciclos, variando la relación entre 7 y 13, siendo en este caso el valor de la relación mayor en el período 2001-2002 (Fig 7).

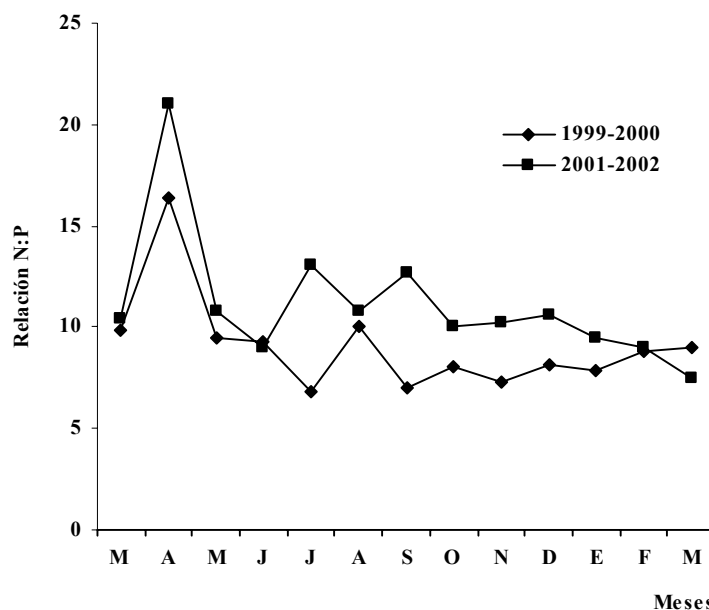


Fig. 7. Variación de la relación nitrógeno-fósforo (N:P) durante los dos ciclos anuales.

La velocidad media del viento en la zona, se mantiene la mayor parte del año por debajo de los 3 m/seg durante las primeras horas del día, principalmente en el período comprendido entre mayo y octubre, pudiendo solo verse afectada durante esta época del año por algunas tormentas, huracanes y a partir del mes de noviembre hasta en mes de abril por la entradas de frentes fríos (Fig 8).

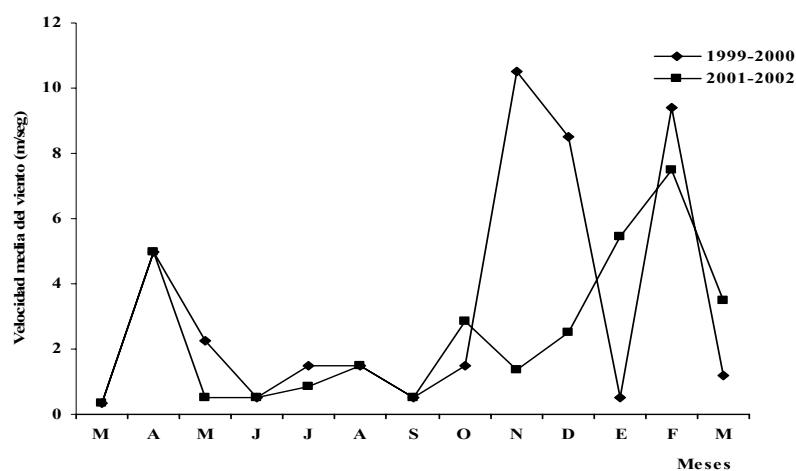


Fig.8. Variación de la velocidad media del viento durante los dos ciclos de estudio.

## 5.2. Composición de dinoflagelados epifitos nocivos.

El análisis cualitativo de los dinoflagelados epifitos permitió identificar cuatro género y siete especies de dinoflagelados nocivos; cinco de ellos son nuevos registros para las aguas cubanas. El género *Prorocentrum* fue el más abundante con cuatro especies. (Tabla III).



Tabla II. Dinoflagelados bentónicos nocivos identificados sobre el sustrato de macroalgas en el área de estudio y la abundancia (cél.g<sup>-1</sup>) en los dos ciclos anuales.

Especies	Períodos	
	1999-2000	2001-2002
<i>Gambierdiscus toxicus</i> Adachi & Fukuyo	6716 ±1124.6448	15 358 ±1176.2302
<i>Prorocentrum lima</i> (Ehrenberg) Dodge	26 009 ±2526.3194	37 778 ±2399.4809
<i>P. belizeanum</i> Faust*	647 ±94.2683	398 ±167.0422
<i>P. mexicanum</i> Osorio-Tafall*	52 ±14.4222	110 ±50.2486
<i>P. concavum</i> Fukuyo*	651 ± 180.5549	118 ±164.5266
<i>Coolia monotis</i> Meunier*		457 ±43.1724
<i>Ostreopsis lenticularis</i> Fukuyo*		471 ±42.9318

\*Nuevos registros para Cuba.

### 5.3. Abundancia y distribución de dinoflagelados epífitos nocivos.

En todas las estaciones se encontraron dinoflagelados nocivos durante ambos ciclos anuales. No se encontró diferencia significativa entre el número de célula entre transectos (ANOVA/MANOVA  $p < 0.05$ ). La mayor abundancia se encontró en las estaciones más profundas (estaciones 5 y 6) con valores medios de 1 150 y 1 120 cél. g<sup>-1</sup> para el primer ciclo anual y 1 437 y 1 409 cél g<sup>-1</sup> para el segundo. En los dos ciclos anuales la abundancia más baja se encontró en la estación 1 (cerca de la desembocadura del río), con concentraciones promedio de 175 y 348 cél. g<sup>-1</sup> (Fig. 9).

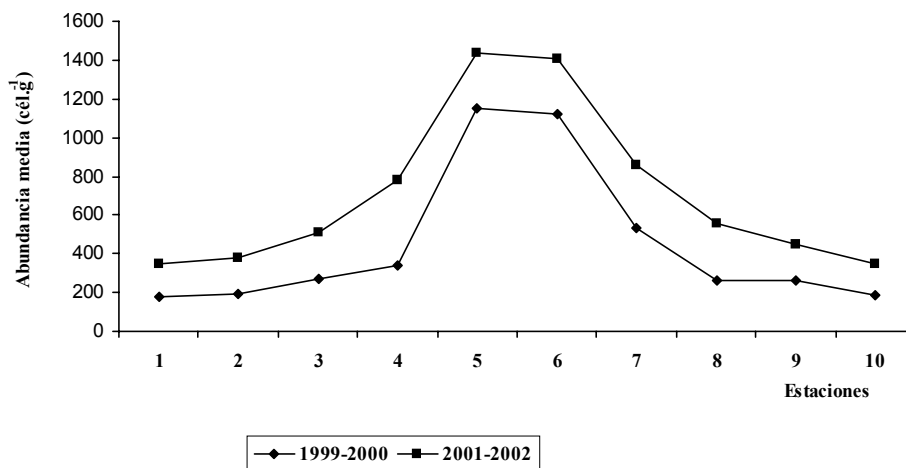
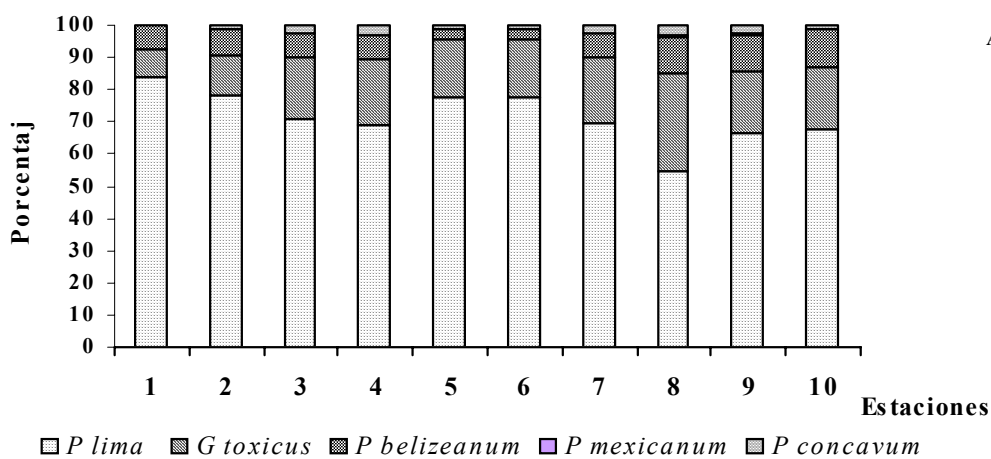


Fig. 9. Distribución y abundancia media de los dinoflagelados nocivos encontrados en las estaciones de muestreos (marzo 1999-2000 y marzo 2001-2002).

*P. lima* fue la especie dominante (> 50%) en todas las estaciones seguida de *G. toxicus* (8 a 33%), las especies restantes estuvieron por debajo del 8% (Fig. 10A y 10B).



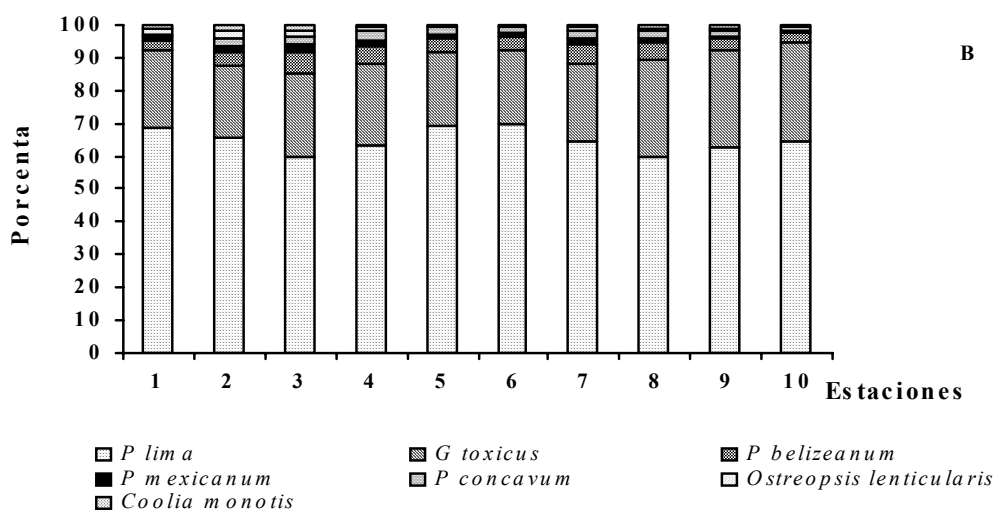


Fig. 10 Porcentaje de dinoflagelados nocivos por especies y estación desde marzo 1999 a marzo 2000 (A) y desde marzo del 2001-2002 (B).

La abundancia media en los dos ciclos, mostró una conducta similar en el período marzo-julio donde alcanza el valor promedio más alto en junio (1,012 y 1,089 cél. g<sup>-1</sup>) respectivamente.

El modelo de distribución temporal (Fig. 11) cambia entre agosto y noviembre durante los dos ciclos y a partir de este mes, se ve como comienzan a disminuir hasta alcanzar la concentración más baja (21 cél. g<sup>-1</sup>) en febrero. En el período 1999-2000, se observó una disminución muy abrupta en la concentración celular en agosto y septiembre. Durante el último mes no hubo registro de especies de dinoflagelados nocivos en el área, el segundo pico de abundancia (609 cél.g<sup>-1</sup>) fue registrado en octubre.

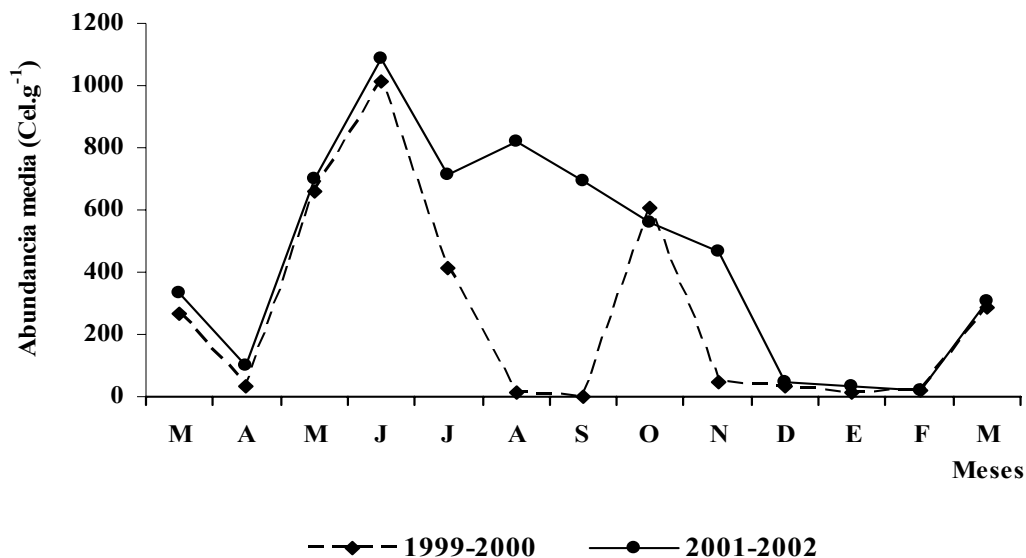
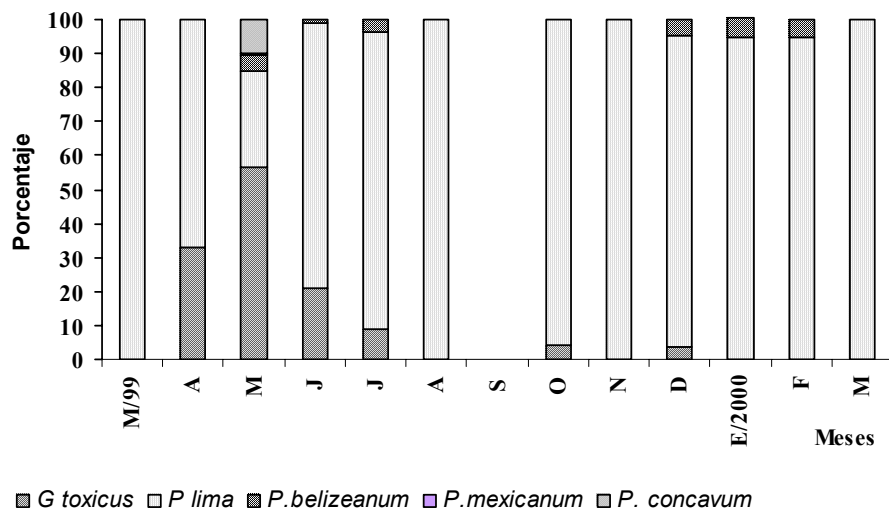


Fig. 11. Abundancia media mensual de dinoflagelados nocivos desde marzo 1999-2000 a marzo 2001-2002

*P. lima* fue la especie más abundante en su distribución temporal durante los dos ciclos anuales, excepto en el mes de mayo, donde *G. toxicus* representó el 66.75 y 51 % de la concentración total; las demás especies aun cuando estuvieron presentes durante gran parte de los meses, se encontraban en concentraciones por debajo del 8 %. (Figs. 12A y 12B).

A



B

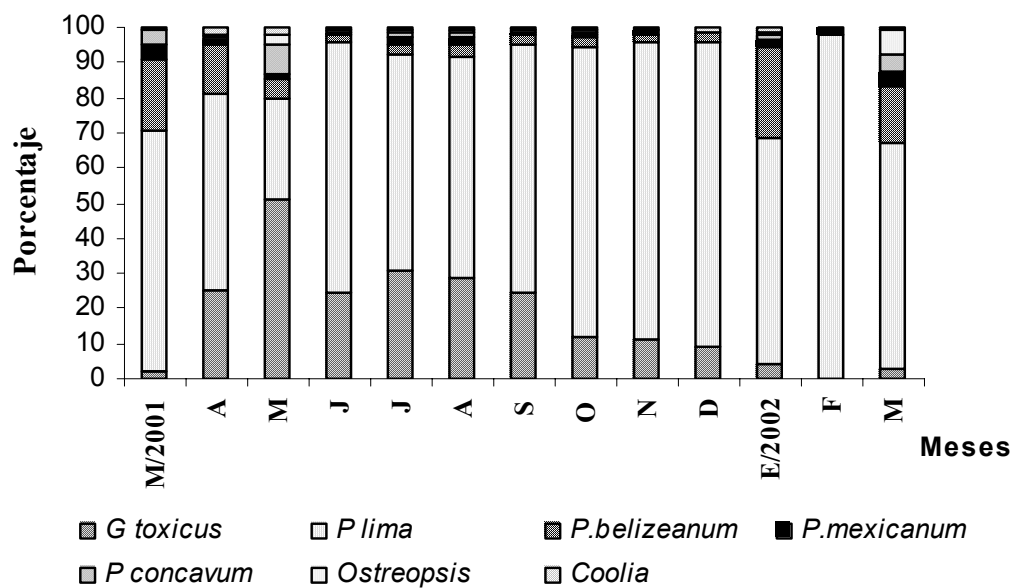


Fig 12. Porcentaje de las especies de dinoflagelados nocivos por meses desde marzo 1999 a marzo 2000 (A) y desde marzo del 2001-2002 (B).

La abundancia total de dinoflagelados nocivos fue mayor sobre las macroalgas de los grupos Phaeophyta y Chlorophyta durante los períodos 1999-2000 y 2001-2002 (39 a 57%, y 36 a 62%). La de *P. lima* fue mayor sobre *Padina* sp. y *Dictyota menstrualis* (Phaeophyta, 82%), y de *Ulva lactuca* y de *Chaetomorpha* sp (Chlorophyta, 17%) (Fig. 12).

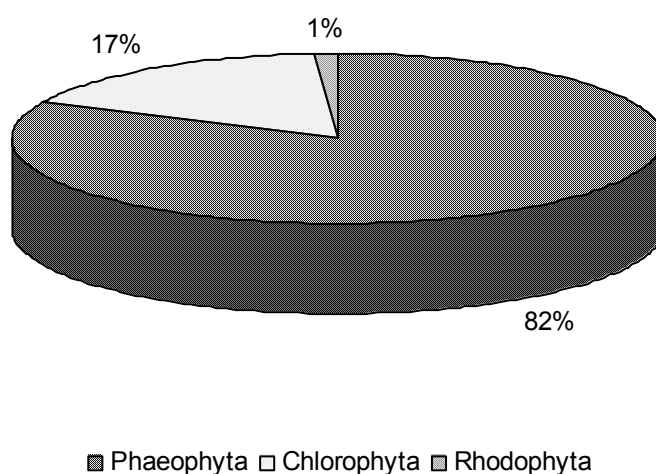


Fig 13. Porcentaje de *P lima* en cada grupo de macroalgas (Phaeophyta, Chloropyta, y Rhodophyta).

*G. toxicus* principalmente se encontró sobre *D. menstrualis* y *Padina* sp (Phaeophyta, 78%), en *Hypnea cervicornis* (Rhodophyta, 17%), así como en *Chaetomorpha* sp y *Ulva lactuca* (Chlorophyta, 5%). (Fig. 14). En *Padina*. sp fue la única macroalga donde se encontraron las siete especies de dinoflagelados nocivos.

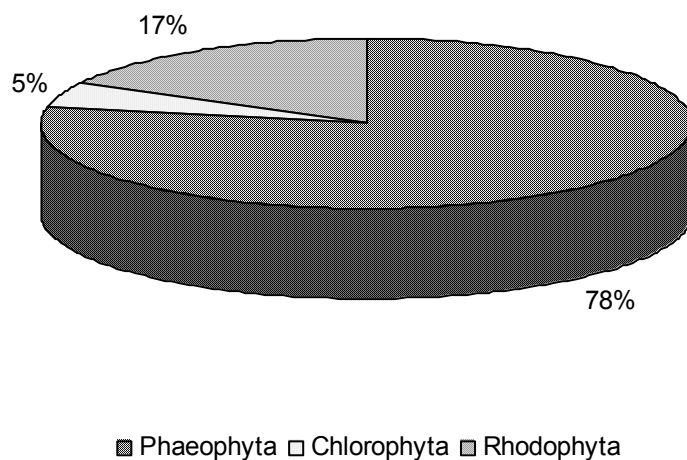


Fig 14. Porcentaje de *G. toxicus* en cada grupo de macroalgas (Phaeophyta, Chlorophyta, y Rhodophyta).

El resultado del análisis de ANOVA/MANOVA aplicado a la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* entre los transectos, estaciones y meses, no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los transectos para las dos especies durante el estudio. Para *P. lima* hubo diferencias significantes ( $p > 0.05$ ) entre las estaciones y meses. El análisis a posteriori (LSD) mostró que la estación No. 5 difiere de las demás en los meses mayo y octubre de 1999 y en junio del 2001.

*G. toxicus* mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) de la abundancia entre los meses, siendo los meses que diferían mayo y junio (período 1999-2000) y mayo (para el período 2001-2002).

En el período 1999-2000 se observa correlación significativa y positiva de la abundancia de *G. toxicus* y *P. lima* al componente I de las variables hidrográficas (nutrientes y temperatura) y negativa con la salinidad lo que sugiere el aporte de agua de

baja salinidad. En el Componente II ambas especies tienen la misma importancia en su asociación con las variables medio ambientales. Esto sugiere que las condiciones en el área de estudio facilitan el desarrollo de ambas especies. (Fig.15).

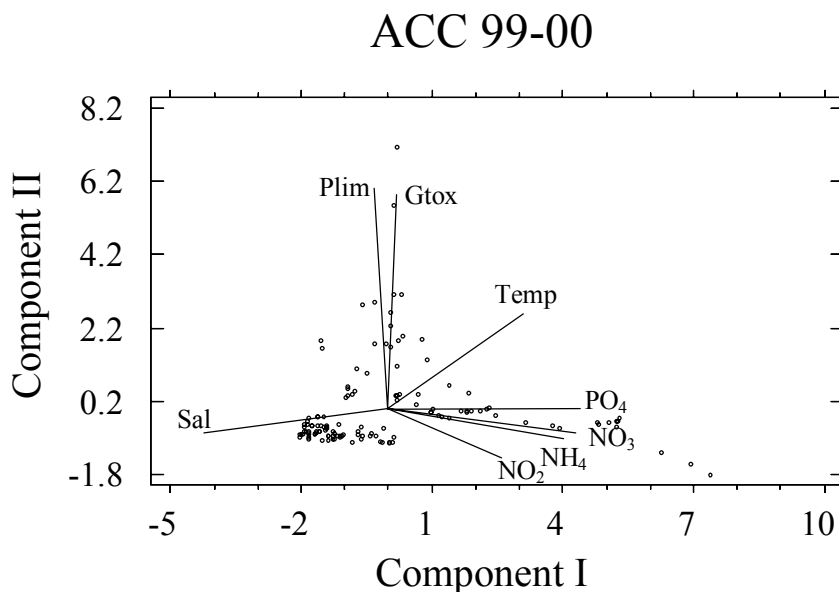


Fig. 15. Relación entre la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y las variables físico-químicas obtenidas por Análisis de Componentes Principales durante 1999-2000.

En el análisis del período 2001-2002, se observa que el comportamiento fue similar al año anterior. Se ven los nutrientes asociados positiva y significativamente al componente I (con excepción del nitrito) y en forma negativa a la salinidad ratificando la tendencia de aportes de agua de baja salinidad. Igual ocurre para el Componente II donde las dos especies de dinoflagelados se hayan asociadas significativamente. (Fig.15).



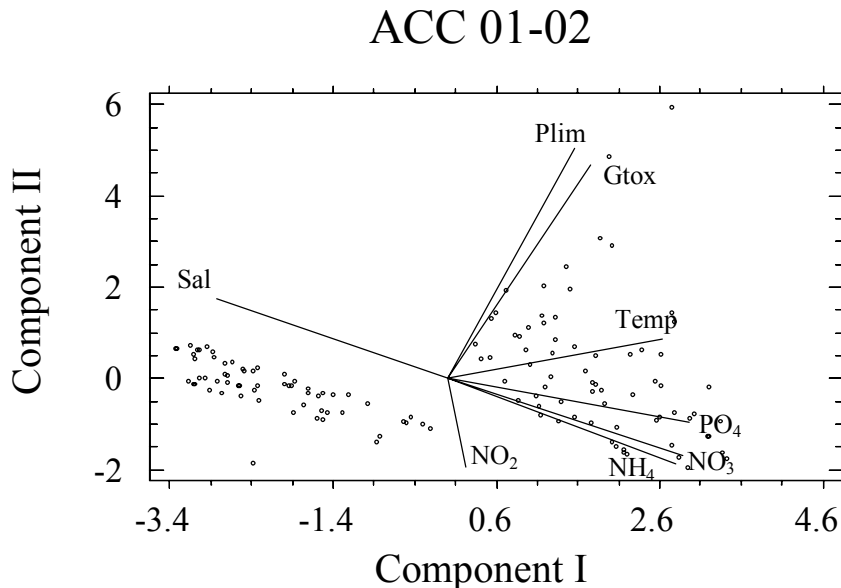


Fig.16. Relación entre la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y las variables físico-químicas obtenidas por Análisis de Componentes Principales durante 2001.2002.

#### 5.4. Composición de dinoflagelados nocivos sobre el sedimento.

El análisis cualitativo mostró la presencia de siete especies pertenecientes a cuatro géneros (*Gambierdiscus*, *Prorocentrum*, *Coolia* y *Ostreopsis*). El género *Prorocentrum* fue el más representativo, con cuatro especies (*P. lima*, *P. belizeanum*, *P. concavum* y *P. mexicanum*).

En cuanto a la composición espacial de las especies sobre el sedimento (Fig. 17), se pudo observar que las estaciones I y VI son las menos representadas (cuatro especies), mientras que el resto tuvo al menos seis especies, de las cuales *P. lima* fue dominante, principalmente en la I y VI, con valores superiores al 75 %.

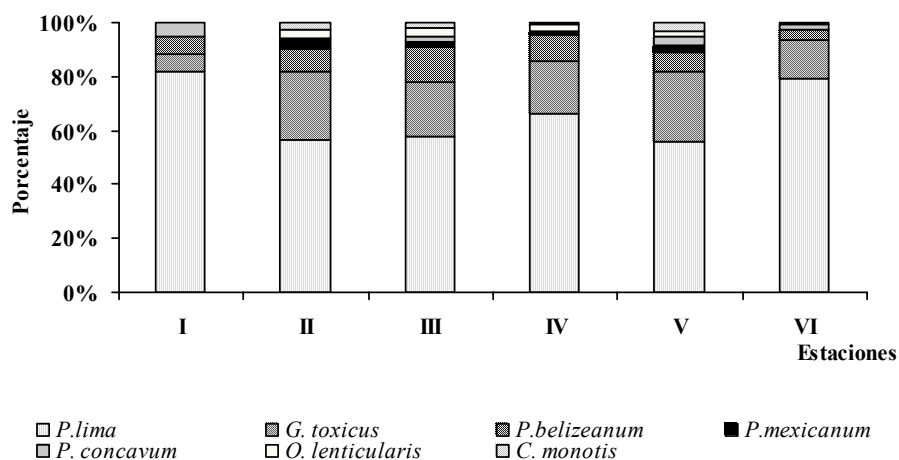


Fig 17. Porcentaje de la abundancia de las principales especies de dinoflagelados nocivos en sedimento en el período comprendido entre marzo del 2001 y marzo del 2002

La variación espacial de la densidad celular osciló entre 740 y 2 360 cél.cm<sup>3</sup>. El menor valor se encontró en la estación I, que es la más próxima a la desembocadura del río, mientras que el máximo se encontró en la estación III. (Fig. 18).

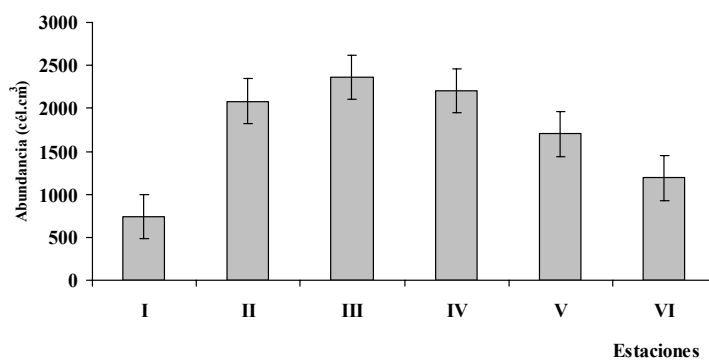


Fig 18. Variación de la abundancia espacial (cél.cm<sup>3</sup>) y el error estándar (n=78) de dinoflagelados nocivos sobre el sedimento en el período entre marzo del 2000 y marzo del 2001.

La variación temporal de la densidad celular de los dinoflagelados bentónicos (Fig. 19) fluctuó entre 120 y 2 090  $\text{cél.cm}^3$ , registrándose la menor abundancia en los meses de enero y febrero, mientras que el máximo se encontró en el mes agosto.

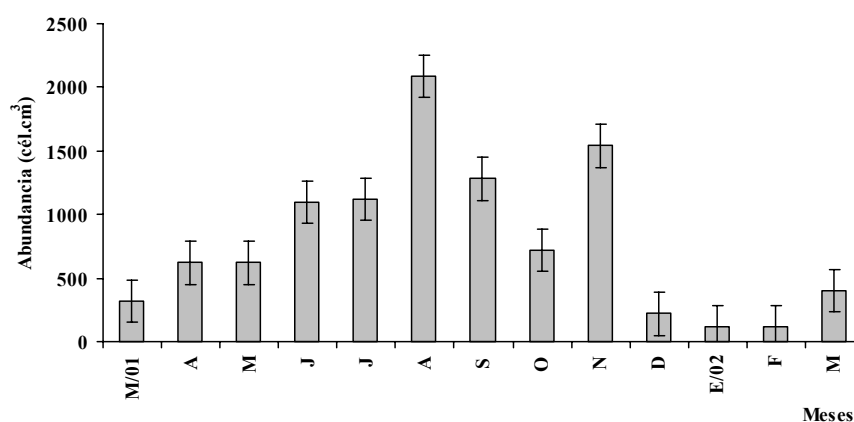


Fig. 19. Variación de la densidad y el error estándar ( $n=18$ ) de los dinoflagelados nocivos sobre el sustrato de sedimento durante el período marzo del 2001-marzo 2002.

Al analizar los resultados por el método del Escalado Multidimensional (MDS), se pudieron diferenciar de acuerdo a la concentración celular tres grupos de estaciones: uno formado por las tres submuestras de la estación I, el otro por las submuestras de la VI y el otro con las de las restantes estaciones. A su vez dentro del último grupo se diferencian tres subgrupos, uno conformado por las submuestras de la estación II, otro por las de la V y el tercero por la combinación de las submuestras de las estaciones III y IV. (Fig 20).

*submuestras*

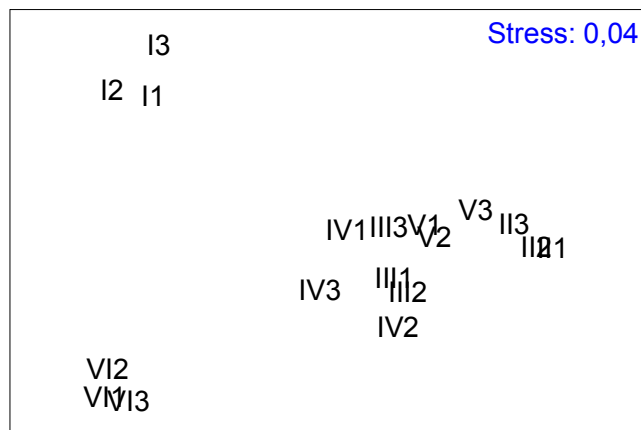


Fig.20. Agrupamiento de las estaciones y submuestras de acuerdo a la abundancia de dinoflagelados potencialmente tóxicos sobre el sedimento.

Los resultados del ANOSIM se expresan en la tabla III, donde el índice R oscila entre 0 y 1, los valores más próximos al cero, demuestran mayor semejanza entre estaciones y viceversa. De acuerdo a estos resultados las estaciones III y IV son las que más se asemejan, seguidas de la III y V.

Tabla III. Semejanza entre las estaciones de acuerdo a los resultados del ANOSIM.

<b>ESTACIONES</b>	<b>R</b>	<b>ESTACIONES</b>	<b>R</b>
I-II	1	II-VI	1
I-III	1	III-IV	0
I-IV	1	III-V	0.519
I-V	1	V-VI	1
I-VI	1	IV-V	0.778
II-III	1	IV-VI	1
II-IV	1	III-IV	1
II-V	0.963		

### 5.5. Caracterización taxonómica y toxinas de *P. lima* cultivado en medio K.

El crecimiento celular al inicio del cultivo fue de 400 cél .mL<sup>-1</sup> y a los 27 días cuando se concluyó fue de 65000 cél. mL<sup>-1</sup> de *P. limas*. En las características taxonómicas de las células, se observó una depresión en forma de V en la parte anterior de las células, y la distribución de poros en la superficie valvar y marginal, excepto en la parte central. (Fig.21).

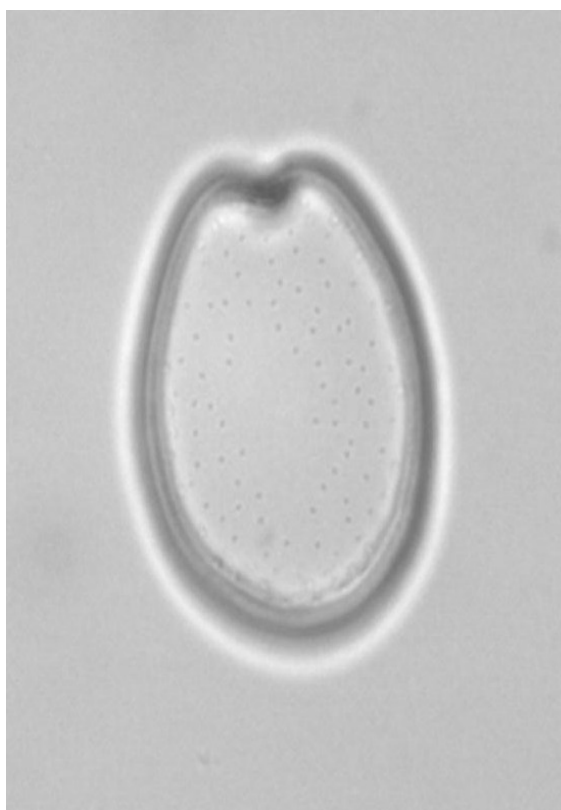
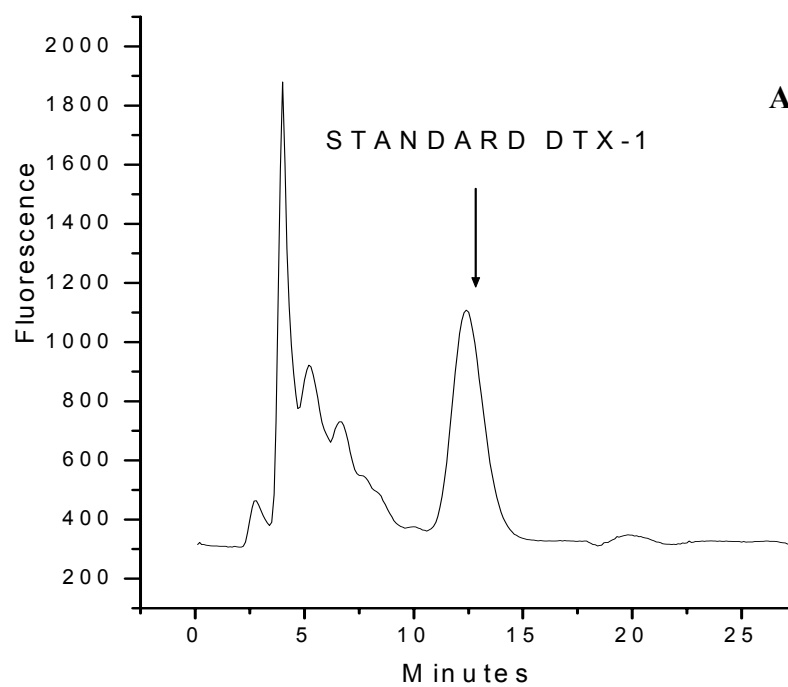


Fig 21. Características morfológicas de *P. lima*.

### 5.6. Análisis de DSP de *P. lima* en ambiente controlado cultivo y en medio natural.

El análisis cuantitativo por HPLC de las toxinas de *P. lima* (Fig. 22), confirmó la presencia de toxinas diarreicas (CTX-1) por primera vez en las aguas de la plataforma cubana, el que fue determinado con el cromatograma estándar de DTX-1 (Fig. 22A).



Los correspondientes a la concentración de las células cultivadas y las del medio natural se muestran (Fig. 22B y 22C). El contenido de toxinas de las células cultivadas fue de 7.15  $\text{pg.cél}^{-1}$  y para las del medio natural fue de 4.2  $\text{pg.cél}^{-1}$  ( $\text{g}^{-1}$  peso húmedo de macroalga).

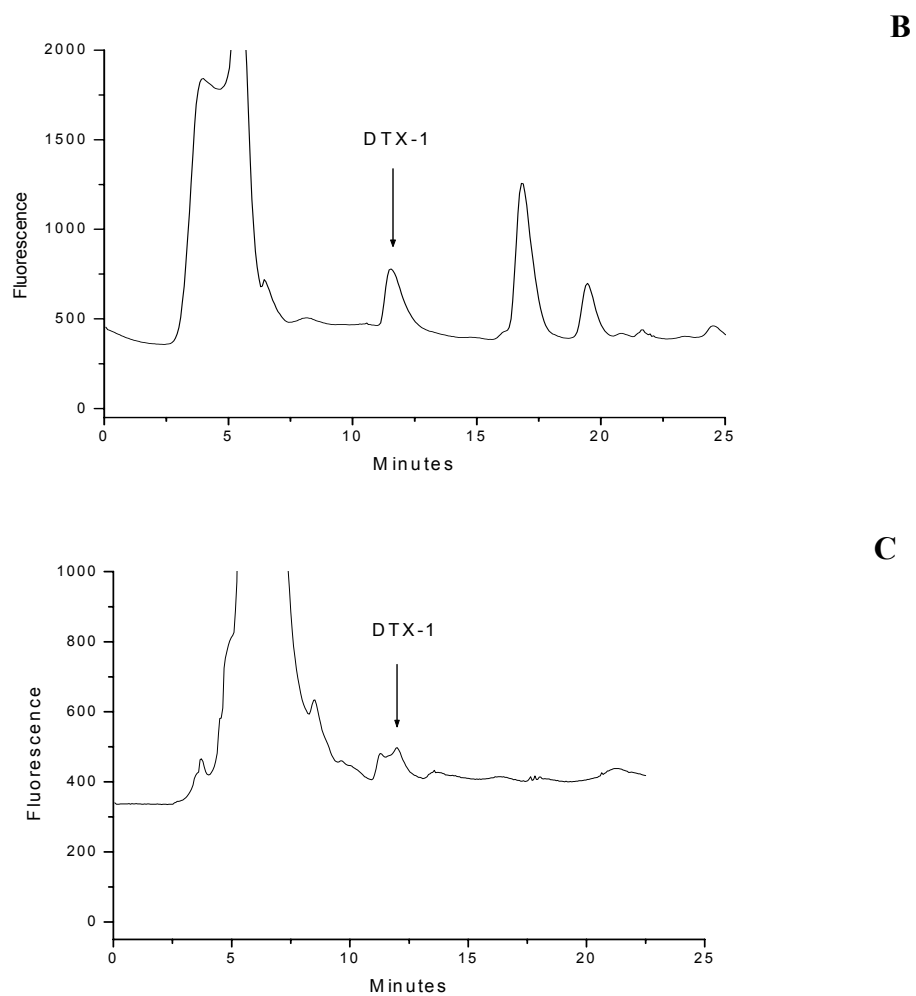


Fig 22. Cromatograma del estandar de DTX-1 (A), en células del medio (B) y en células de *P. lima* cultivadas (C).

### 5.7. Crecimiento celular y concentración de pigmentos en *P. lima* con diferentes concentraciones de $\text{NO}_3$ .

En todos los tratamientos se observó un efecto positivo de la concentración de  $\text{NO}_3$  en el crecimiento de *P. lima*. La concentración media celular al inicio y al final del experimento fue diferente para cada tratamiento. En el tratamiento donde la relación N:P

era 7:1 (900 - 86 291 cél/mL), 16:1 (1392-90 932cél/mL), 20:1 (966 - 99 884cél/mL) y 40:1 (1 325- 116 779 cél/mL). Fig.23.

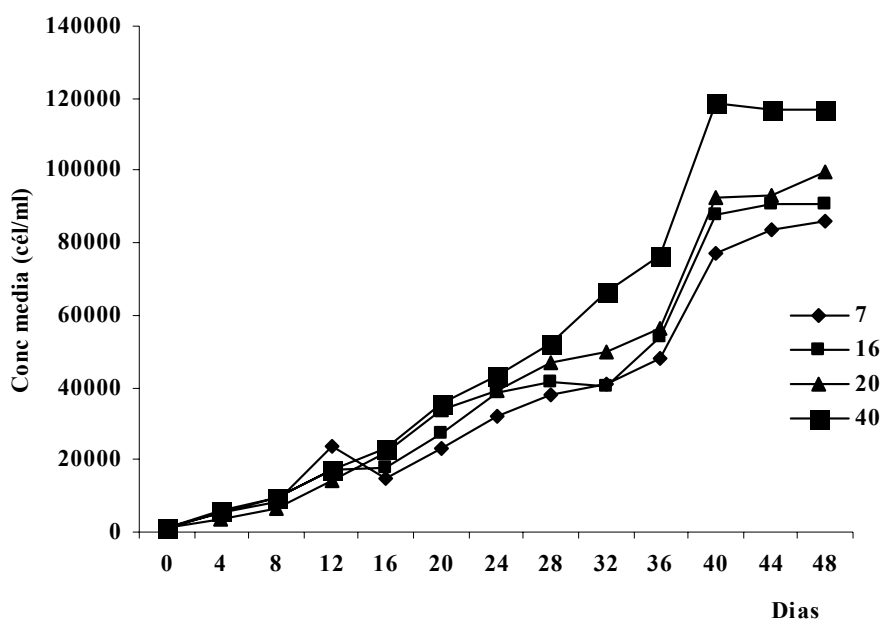


Fig. 23. Curva de crecimiento de *P. lima* en los tratamientos con diferentes concentraciones de NO<sub>3</sub> (7:1, 16:1, 20:1 y 40:1).

En relación con los parámetros poblacionales, se pudo observar, que la especie tiene un crecimiento muy lento en todos los tratamientos ( $0.058 \pm 0.031$  y  $0.066 \pm 0.0355$ ), con una fase exponencial prolongada comenzando a partir del primer día de iniciado el experimento, hasta el día 40 aproximadamente. El tratamiento que contenía la relación N:P (20:1) fue el que produjo una mayor velocidad de crecimiento en la fase exponencial ( $0.066 \pm 0.0355 \text{ div.d}^{-1}$ ), siendo más marcada a partir del día 32 del cultivo, a su vez mostró menor tiempo de duplicación para esta fase del cultivo. Tabla IV.



Tabla IV. Parámetros poblacionales medidos para la fase exponencial del crecimiento de *P. lima* en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	K	TD
1: (N:P=7:1)	0.065 ±0.0369	<b>9.700</b> ± 2.778
2: (N:P=16:1)	0.061 ±0.0368	<b>9.933</b> ± 2.397
3: (N:P=20:1)	0.066 ±0.0355	<b>9.637</b> ± 2.410
4: (N:P=40:1)	0.058 ±0.031	<b>9.905</b> ± 1.474

La concentración de fosfatos (Fig.24) tuvo en todos los tratamientos una drástica disminución a partir del inicio del experimento, hasta llegar a agotarse al octavo día de iniciado.

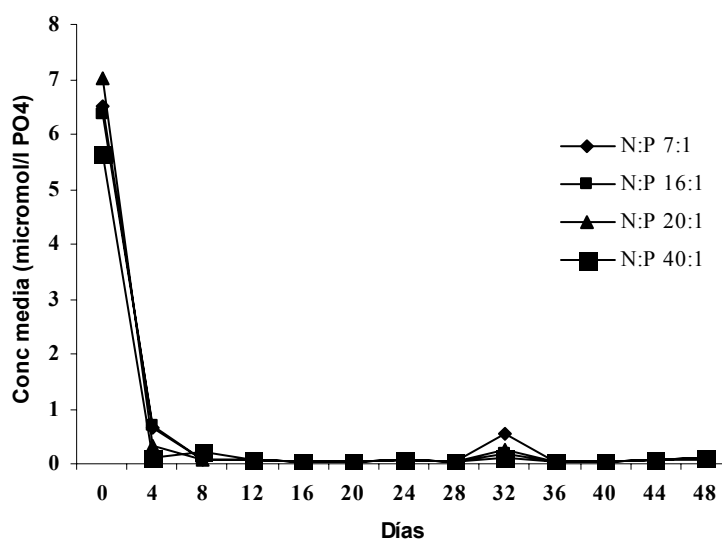


Fig. 24. Cambios en la concentración de fosfatos durante el crecimiento de *P. lima* en los diferentes tratamientos.

El comportamiento del  $\text{NO}_3$  (Fig.25) fue diferente entre tratamientos, observándose en cada uno un decrecimiento gradual. En el caso del tratamiento con la relación N:P (7:1),

se agotó al mismo tiempo que el fosfato (día 8), y en los de 16:1 y 20:1, ocurrió a los 20 y 28 días respectivamente, ambos antes de que terminara la fase exponencial del crecimiento, mientras que en el de 40:1, se agotó al inicio de la fase estacionaria del cultivo.

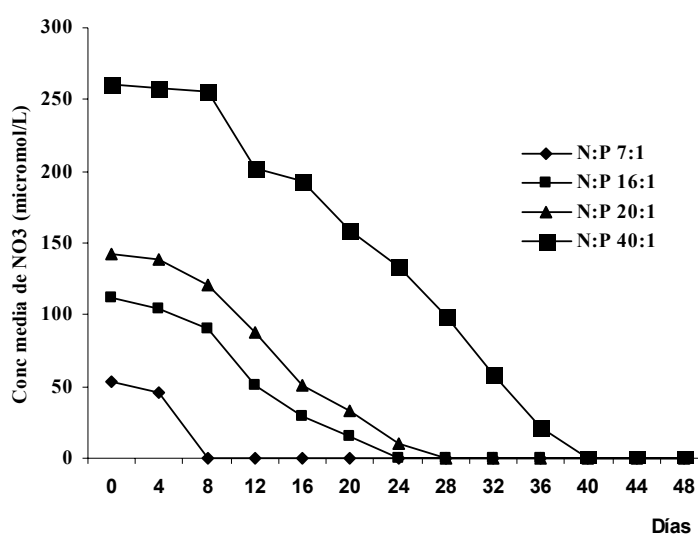
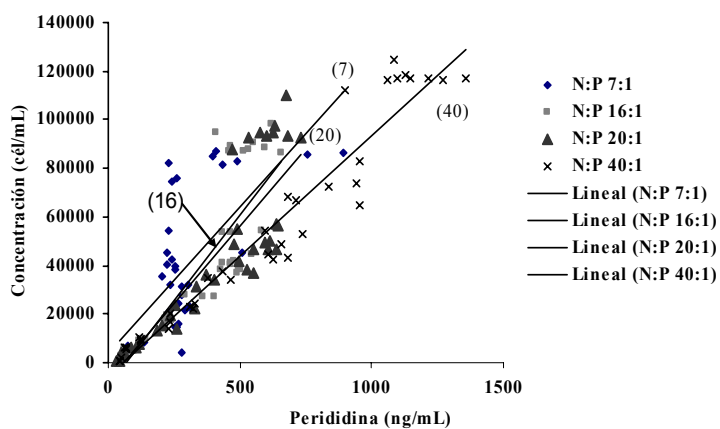
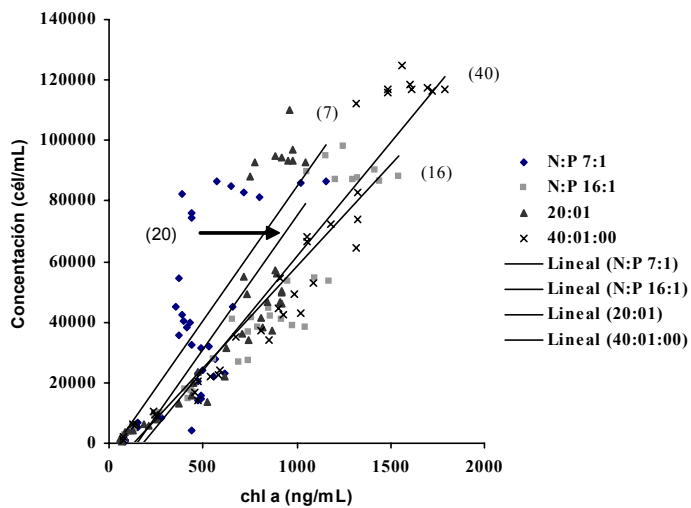


Fig. 25. Cambios en la concentración del nitrato durante el crecimiento de *P. lima* en los diferentes tratamientos.

De los pigmentos analizados en las células de *P. lima* (Fig. 26) se vio que, en todos los tratamientos el pigmento predominante fue la chl a (Fig. 26A), seguido de la perididina (Fig. 26B), chl c<sub>2</sub> (Fig. 26C) y en menor cantidad el β-caroteno (Fig. 26D). Este último presentó la mayor variación a través del tiempo. Al analizar la correlación entre la concentración celular y la de los pigmentos se pudo observar que las mejores correlaciones se encontraron en el tratamiento donde la relación N:P es 40:1, aún con el β-caroteno que fue el pigmento menos abundante. En ninguno de los tratamientos se

encontró diferencias significativas entre la concentración de los pigmentos ( $p > 0.05$ ) y la concentración celular.



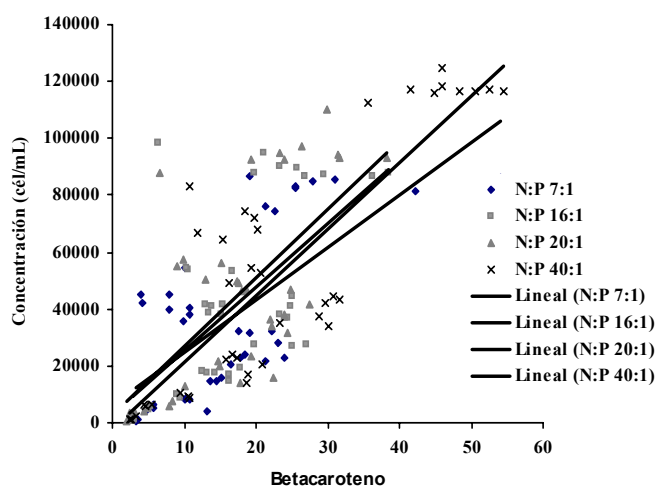
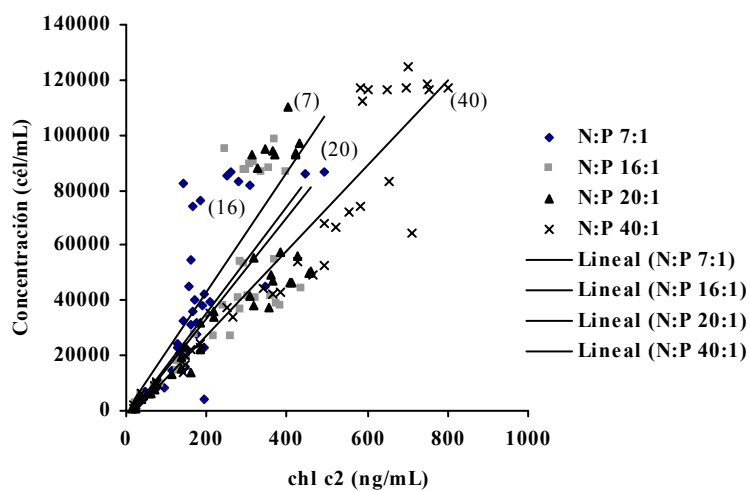


Fig. 26. Relación entre la concentración celular y el contenido de pigmentos en *P. lima* en los cuatro tratamientos: chl a (A), perididina (B), chl c<sub>2</sub> (C) y β-caroteno (D).

### 5.8. Detección de ciguatoxinas (CTX) en células de *G. toxicus* en ambiente controlado y en el medio por bioensayo en ratón.

Los ratones inyectados con los extractos de *G. toxicus* extraídos tanto de las células medio como las de cultivo, mostraron signos característicos de la intoxicación, a los 50 min, en los organismos cultivados y a los 87 min los inoculados con el extracto de las células del medio. Los signos observados fueron salivación, diarrea, lagrimeo, disnea y descoordinación en sus movimientos y muerte por asfixia (Tabla VII). La primera muerte ocurrió a los 95 min en los ratones inyectados con el extracto de las células cultivadas, mientras que en las del medio fue a los 108 min.

Tabla V. Bioensayo de ratón de toxicidad (CTX) en *G. toxicus* del medio natural y cultivado en ambiente controlado.

<b>Extractos</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Tiempo de supervivencia</b>	<b>Toxicidad CTX (µg/kg)</b>
<b>Cultivo</b>	Diarrea, salivación, vómitos, temblores, descoordinación de movimientos, convulsiones y asfixia.	7 hrs	1.5 ± 0.53
<b>Medio natural</b>	Diarrea, salivación, vómitos, temblores, descoordinación de movimientos, convulsiones y asfixia..	10 hrs	1.73± 0.60

## 6. DISCUSION

Los resultados de la concentración de nutrientes encontrados durante este estudio, demuestran una eutrofización en las aguas de esta zona, donde se ve la influencia que ejerce sobre la misma el aporte del río Jaimanitas, el que descarga diariamente altas cantidades de nitrógeno y fósforo provenientes de los residuales domésticos e industriales de asentamientos de la población e industrias cercanas a sus márgenes. Montalvo *et al.* (2001) en un estudio realizado en esta misma zona, encontraron al igual que en el presente trabajo, altas concentraciones de compuestos nitrogenados, fundamentalmente amonio, coincidiendo de que la zona está eutrofizada. Lo anterior está avalado por los resultados de Boynton *et al.* (1995) en la Bahía de Chesapeake en Estados Unidos, D'Avanzo (1994) en la Bahía Waquiot en Massachussets y Ortiz *et al.* (1993) en la Bahía de Guaymas, Sonora, México, donde todos coinciden, en que elevadas cantidades de nitrógeno y fósforo en el medio, inducen un efecto de deterioro y eutrofización en las zonas costeras. Particularizando para la región del Caribe, Schaffalke (1999) nos dice que la actividad antropogénica ha provocado un incremento en la entrada de nutrientes a las zonas costeras, facilitando el desarrollo de las macroalgas en diferentes ecosistemas, pudiendo ser esta una de las causas de que en la zona seleccionada para este estudio, la mayor parte del año haya presencia de diferentes especies de macroalgas pertenecientes a los grupos de las Phaeophyta, Chlorophyta y Rhodophyta, las que a su vez sirven de hospederas a los dinoflagelados epífitos.

Todas las especies de dinoflagelados registradas sobre las macroalgas y el sedimento en la zona de estudio, han sido consignadas como potencialmente tóxicas y muchas de ellas asociada a brotes de ciguatera, en diferentes regiones. *G. toxicus*, especie principal involucrada

en este tipo de intoxicación en humanos por consumo de peces, se reporta conjuntamente con *P. lima* y *O. lenticulares* para las aguas de las islas de la Polinesia Francesa (Bagnis, et al (1988), en las costas de Belice, Morton y Faust (1997), reportan además de las especies anteriores a *P. belizeanum* y *P. mexicanum*, y plantean que las bajas densidades de estas especies sobre la macroalga parda *Thalassia testudinum* en el extremo sur de la barrera de coral, puede ser responsable de la baja incidencia de ciguatera en Belice. A su vez plantean que en estudios ecológicos en áreas endémicas de ciguatera muchos dinoflagelados además de *G. toxicus* son capaces de producir toxinas asociadas a esta intoxicación, donde incluyen a *P. mexicanum* y *C. monotis*.

La abundancia de las especies registradas, están dentro del rango reportado para el Océano Pacífico (Gillespie *et al.* 1985; Bagnis *et al.* 1988; McCaffrey *et al.* 1990), y para el Caribe y los Cayos de la Florida (Taylor y Gustavson, 1986; Carlson y Tindall 1985 y Morton y Faust, 1997), y por debajo de los encontrados en las islas Gambierd ( $5.5 \times 10^5$  cél.g<sup>-1</sup>) por Yasumoto *et al.* 1980, así como el reportado por Turquet *et al.* (2000) en las Islas Mayotte para la especie *G. toxicus*, la cual llegó a alcanzar densidades del orden de las 60 400 cél.g<sup>-1</sup> de macroalga.

El incremento en la concentración de dinoflagelados potencialmente tóxicos encontrado en el período de mayo a octubre, está inducido por las condiciones físico-químicas imperantes en el área, donde se ve una mayor estabilidad en la temperatura, la velocidad del viento, mayor transparencia en la columna de agua, lo que conjuntamente con la concentración de nutrientes presentes en sus aguas, facilita el desarrollo del sustrato de macroalgas y a su vez el desarrollo de los dinoflagelados epífitos. La baja abundancia en agosto y septiembre de 1999, fue debido a las lluvias que tuvieron lugar (338 mm), en solo

tres días, que provocaron disminución de la salinidad y la transparencia del agua, lo que afectó la permanencia del sustrato de macroalga, quedando solamente algas filamentosas del género *Chaetomorpha*, cerca de la desembocadura del río y en las estaciones más alejadas se encontraron algunos parches de *Padina* sp. Estas macroalgas mostraron una deposición de sedimento, que limitó el crecimiento de los dinoflagelados epífitos sobre ellas, pudiendo haber ocurrido lo planteado por Vila, *et al.* (2001) de que la superficie de las macroalgas en ambientes con turbulencia, se ve limitada para ser colonizadas por las microalgas epífitas, las que tienen que migrar a la columna de agua, o hacia zonas de mayor estabilidad. Por otra parte, Ballesteros, (1999) hace referencia, sobre el efecto negativo que ejercen los fenómenos meteorológicos como, tormentas y abundantes lluvias sobre las macroalgas, reduciendo su biomasa y la de los organismos epífitos.

Esta misma situación de turbulencia, se pone de manifiesto durante la entrada de los frentes fríos, en la costa norte de Cuba, pudiendo ser una de las causas que esté incidiendo en la abundancia de los dinoflagelados epífitos y bentónicos en la zona, en el período comprendido entre los meses de noviembre y abril, donde se observa una disminución en la concentración de dinoflagelados potencialmente tóxicos en ambos períodos, y que coincide con la entrada de los frentes fríos, donde el efecto de la velocidad del viento en el medio además de provocar turbulencia en la columna de agua, facilita el desprendimiento de estos organismos de la superficie del sustrato de macroalgas y del sedimento, si se tiene en cuenta que los nutrientes no están deficitarios en el medio con relaciones de N:P superiores a (7), y en el caso específico del mes de abril llegaron a ser de 16:1 en el período de 1999-2000 y de 21:1 en el 2001-2002, con concentraciones promedios de dinoflagelados de 36 y 99 cél.g<sup>-1</sup> de microalga. Todo lo anterior corrobora lo planteado por Carlson y Tindall (1985) sobre los



resultados de la abundancia de estos organismos en las Islas Vírgenes, de que la distribución y abundancia de estos organismos no están limitadas a un solo factor sino a un conjunto de factores del medio en que se desarrollan.

Los escasos estudios con que se cuenta en Cuba, sobre los dinoflagelados epífitos potencialmente tóxicos, concuerdan con nuestros resultados, de que la mayor abundancia es durante el período mayo-octubre, coincidiendo con la época de verano (Valdés *et al.* 1992, Popowski *et al.* 2001) De acuerdo con las estadísticas del Ministerio de Salud Pública, también se reportan el mayor número de intoxicaciones por ciguatera en Cuba, fundamentalmente en la región NW. Carrera y Castro (2002) concluyen que, aunque la enfermedad está presente durante todo el año la mayor incidencia ocurre en el período de mayo a octubre.

*Prorocentrum*, es uno de los géneros más importante entre los dinoflagelados, debido al número de especies potencialmente tóxicas que presenta, así como, a su gran abundancia y distribución. Particularizando para el área de Jaimanitas, se registraron cuatro especies de *Prorocentrum*, siendo *P. lima* la especie que predomina tanto espacial como temporalmente durante todo el año como epífita sobre todos los sustratos de macroalgas, excepto en el mes de mayo, donde predomina *G. toxicus*. El predominio de *P. lima* en la zona de estudio, obedece entre otras causas a lo planteado por (Carlson y Tindall, 1985 y Pan, *et al.* 1999), de que esta especie está asociada a hábitats con altas concentraciones de fuentes de nitrógeno, principalmente al amonio, compuesto que en la zona, representó más del 65% de la concentración del nitrógeno total en todas las estaciones durante todo el año. Bomber *et al.* (1985) también la reportan como perenne durante todo el año en los Cayos de

la Florida, con mayor abundancia en el período de noviembre a mayo, cuando la temperatura era menor de 26 °C. Para las aguas australianas, Heil *et al.* (1998) la dan como la más abundante y asociada a la ciguatera, mientras que, Tindall y Morton, (1998) la asocian como un frecuente componente de la comunidad epífita en áreas endémicas de ciguatera.

Debido al predominio de *P. lima*, tanto espacial como temporal, no podemos afirmar de que existe un patrón de distribución de esta especie en la zona, cosa que sí ocurre para *G. toxicus*, donde solo abunda en los meses de verano (mayo-octubre), con el máximo en el mes de mayo en ambos períodos, coincidiendo con el inicio del verano en Cuba, donde las condiciones imperantes en el medio, como alta temperatura, mayor estabilidad en la columna de agua, debido a la disminución en la velocidad del viento, facilita su desarrollo. Estos resultados concuerdan en parte con los reportados por Chinain, *et al.* (1999), quienes encontraron en Tahití (Polinesia Francesa), que *G. spp* alcanza su máxima densidad al inicio y final de la época de calor, en nuestro caso, nunca fue abundante en el mes de octubre, cuando finaliza la época de calor. Para otra área de la costa norte de La Habana fue abundante en mayo y agosto en ausencia de fuertes lluvias, mar en calma, buena transparencia del agua y vientos débiles (Popowski *et al.* 2001) y en el Caribe Oriental fue encontrado en todos los puntos de muestreos excepto en aquellos que recibían directamente la influencia de agua dulce como también ocurre en este estudio donde fue más abundante en las estaciones más alejadas de la costa.

En cuanto a los resultados obtenidos sobre la abundancia de *G. toxicus* y *P. lima* en los diferentes grupos de macroalgas, en el área de Jaimanitas, aun cuando se reportaron

sobre todas las macroalgas, esta fue siempre mayor sobre las macroalgas del grupo de las algas pardas (Phaeophyta), no coincidiendo con los resultados encontrados para *G. toxicus* por Yasumoto *et al.* (1980) en las Islas Gambier y Grzebyk *et al.* (1994) para las Islas Mayotte, donde sostienen el criterio de que se desarrolla mejor sobre las algas rojas (Rhodophyta). Nuestros resultados, los atribuimos, a que sobre ellos estén incidiendo las características morfológicas de las macroalgas, que aun predominando en géneros las algas rojas, prevalecen de forma general, las especies del tipo filamentosas y tubículas, por lo que la superficie para fijarse los dinoflagelados epífitos es menor, no ocurriendo lo mismo con las del grupo de las pardas, que tienen mayor superficie por predominar las del morfotipo foliaceas, coincidiendo con lo planteado por Bomber *et al.* (1985), donde plantean que el área de superficie macroalgal parece ser un factor controlador de la densidad de los dinoflagelados epífitos. A su vez coinciden con los resultados obtenidos por Delgado *et al.* (2000) y Popowski *et al.* (2001), en una bahía artificial al NW de Ciudad de la Habana, Cuba. Heil *et al.* (1998) en aguas australianas, sugieren que *P. lima* no solamente es la especie más abundante de los dinoflagelados asociados a la ciguatera, sino también sobre las algas pardas. Sin embargo Saint-Martin *et al.* (1988) sugirieron que la preferencia de *G. toxicus* es independiente del grupo de macroalga.

En el sedimento fangoso, el fuerte olor a sulfuro de hidrógeno detectado en las estaciones I y VI evidencia la presencia de material orgánico en descomposición, que llegan a la zona por el arrastre del río. Pérez (com pers), en un estudio previo realizado en los sedimentos de la misma zona, encontró presencia de metales pesados, como Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, alcanzando su máxima concentración (excepto el Co y el Cd) en la estación situada frente a la desembocadura del río. Todos estos elementos, aunque en la

literatura consultada, no se hace referencia de como son utilizados sí se conoce que forman parte de los micronutrientes, en los medios de cultivo de las microalgas planctónicas y bentónicas.

La concentración de dinoflagelados potencialmente tóxicos sobre el sedimento, fue nueve veces menor, que la reportada por Delgado *et al.* (en prensa), sobre el sustrato de macroalgas para el mismo período y la misma zona, aun así, estos organismos pueden jugar un papel significativo en el desarrollo de poblaciones ciguatóxicas, como se ha visto en algunas zonas de Belice (Faust 1993).

Las diferencias encontradas entre la abundancia en las estaciones pueden estar condicionadas fundamentalmente por el tipo de sedimento, la ubicación respecto a la desembocadura del río (diferencias en cuanto a carga de contaminantes) y la profundidad de las mismas, donde el oleaje provocado el viento, actúa sobre la remoción del sedimento y de la concentración de estos organismos, lo que se pone de manifiesto durante el período diciembre-febrero, donde ocurre la mayor entrada de frentes fríos a la zona, aumentando la velocidad del viento y la turbulencia, factores que limitan el desarrollo de dinoflagelados bentónicos (Bordeaux y Durant-Clement 1991).

Las características morfológicas de *P. lima* observadas en las células cultivadas tanto en medio K como en el f/2, este último modificado con diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3$ , coinciden a las descritas por otros autores en organismos de la misma especie aislados en otras regiones (Fukuyo 1981, Faust 1991, Heredia *et al.* 2002).

Las concentraciones de la toxina diarreica del tipo DTX-1 ( $7.15 \text{ pg.cél}^{-1}$   $4.2 \text{ pg.cél}^{-1} \text{ g}^{-1}$  peso húmedo de macroalga) encontradas en las células de *P. lima* en cultivo y en las

medio caen dentro del rango dado para esta especie aislada en otras regiones del océano. Lee *et al.* (1989) observaron las variaciones en la concentración de DTX-1 entre 6 y 14.3 pg. cél<sup>-1</sup> obtenidos en cinco cepas de *P. lima* aislados de las costas de Galicia. Bravo *et al.* (2001) en estudios también realizados en cultivos esta especie de las costas de Galicia, informan valores medios de 1.01 pg.cél<sup>-1</sup> en el extracto de (PL6V) y de 12.45 pg. cél<sup>-1</sup>, para la cepa (PL9V). Nascimento *et al.* (2005) obtuvieron un rango entre 0.4 a 11.3 pg cél<sup>-1</sup>. En las costas del Pacífico mexicano Heredia *et al.*, (2002) informan valores superior a los nuestros (19.5 pg.cél<sup>-1</sup>). Si bien la concentración de DTX-1 de la cepa cubana, no es tan baja comparada con algunas de las anteriores, si pudo haber influido corto período en que se realizó el experimento (27 días), donde todavía no había concluido su fase de crecimiento exponencial.

Morton y Norris (1990) y Jackson *et al.* (1993), concuerdan en que las condiciones del medio, como alta temperatura, salinidad e intensidad de luz, pueden determinar un aumento de la toxicidad en *P. lima*, condiciones del medio que prevalecen la mayor parte del año en las aguas de la plataforma cubana, de ahí que exista un alto riesgo de eventos de DSP y de ciguatera relacionado con la presencia de esta especie en el área, aún si se tiene en cuenta su permanencia y concentraciones altas en que se encuentra durante todo el año en la zona.

La cepa de *P. lima* cubana, presenta un crecimiento por días muy bajo comparado con las cepas aisladas por Tomas y Baden (1993) en los Cayos de la Florida, que presenta un alto crecimiento (0.75 div.d<sup>-1</sup>), donde el cultivo estaba enriquecido con fosfato y de (0.16 y 0.45 div.d<sup>-1</sup>) donde el medio contenía glicerofosfato, las de Morton y Tindall (1995) en tres localidades de la Isla Heron, Australia (0.35-0.20 div.d<sup>-1</sup>), Pan, *et al.* (1999) en una

estación de acuicultura en Nueva Escocia ( $0.1-0.15 \text{ div.d}^{-1}$ ), Heredia *et al.* (2002) en el Golfo de California ( $0.107 \pm 0.003 \text{ div.d}^{-1}$ ). El comportamiento de la concentración de pigmentos en cada tratamiento, confirman los resultados obtenidos por Morton y Tindall (1995) y Nascimento *et al.* (2005), de que la chl a es el pigmento que presenta la mayor concentración

La disminución drástica del fosfato en el experimento casi al inicio de la fase de crecimiento exponencial (días 1-8) y los cambios paulatinos en la concentración del nitrato, hasta que el fosfato se fue agotado, da evidencia de que este compuesto es la fuente preferida de fósforo y el compuesto limitante para el crecimiento de esta especie.

Los signos clínicos que manifestaron los ratones en el bioensayo, cuando fueron inyectados con los extractos de *G. toxicus* del medio y los del cultivo, son típicos a los descrito para la ciguatera por (Anderson *et al.* 1983, Hokama 1988, Gascón *et al.* 2003). El tiempo de muerte en los ratones, está dentro del rango (37 min- 24 h) dado por Lewis (1995), para que ocurra la primera muerte una vez que son inyectados.

## 7. CONCLUSIONES.

Se realizaron cinco nuevos registros para el microfitobentos de la plataforma cubana *P. belizeanum*, *P. concavum*, *P. mexicanum*, *C. monotis* y *O. lenticulares*

El análisis de la variación espacio temporal de los dinoflagelados nocivos tanto las epífitas como las bentónicas sobre sedimento, mostraron su mayor abundancia en el período comprendido entre mayo y octubre, coincidiendo con la época de calor en Cuba y cuando se registra la mayor cantidad de intoxicación ciguatérica en el país, principalmente en la región noroccidental.

La especie dominante durante los dos ciclos anuales fue *P. lima* seguido de *G. toxicus* y fueron nueve veces más abundantes sobre macroalgas que en sedimento.

La abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* está relacionada directamente con la concentración de nutrientes, la temperatura del agua y la velocidad del viento.

La zona de estudio puede ser considerada como una zona de riesgo de eventos de DSP y de ciguatera teniendo en cuenta la abundancia de *P. lima* y *G. toxicus* y que se comprobó en condiciones controlada y en el medio la presencia de DTX-1 en *P. lima* por HPLC y de ciguatoxinas en *G. toxicus* en bioensayo de ratón

## 8. REFERENCIAS.

- Adachi, R., Fukuyo, Y. (1979). The thecal structure of the marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen sp. Nov. Collected in a ciguatera- endemic area. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 45(1): 67-71.
- Anderson, B.S., Sims, J.K., Wiebenga, N.H., Sugi, M. (1983). The epidemiology of ciguatera fish poisoning in Hawaii, 1975-1981. *Hawaii Medical Journal*, 42(10) p 326-334.
- Bagnis, R. J., Julvez, A., Allaoui., B, Dubray., Conan H., Ali Halidi, M.A., Mieli, L., Galtier, J. (1988). Le risque ciguaterique dans l'île de Mayotte ( Archipel des Comores). Rev. Int. Océanogr. Médicale, Vol.91-92, pp.43-54.
- Bagnis, R. J., Bennett., C. Prieur., A.M, Legrand. 1985. The dynamics of three toxic benthic dinoflagellates and the toxicity of Ciguateric surgeonfishes in French Polynesia. In: Toxic Dinoflagellates, Anderson, White and Baden, Editors. 177-182.
- Balech, E. (1988). Los dinoflagelados del Atlántico sudoccidental. Pub. Especiales del Inst. Español de Oceanog. Min. de Agricultura, pesca y alimentación. Madrid. España, 310pp.
- Ballantine, D. L., Bardales, A. T., Torteson, T. R., Dupontdurst., H. (1985). Seasonal abundance of *Gambierdiscus toxicus* and *Ostreopsis sp.* in Coastal waters of southwest Puerto Rico. In: Gabrie C. y Salvat B. (Eds.) "Proceedings of the Fifth\_Int. Coral Reef Congress", Thaiti, Antenne Museum EPHE, 4: 417-422.
- Bernard, A., Mohammed, E. A., Halidi, A., Quod, J-P., Maggiorani, J.M., Berland, B., Grzebyk, D., Coqueugniot, J. (1992). Evolution of *Gambierdiscus toxicus* populations in the coral reef complex of Mayote Island (SW Indian Ocean) durin the 1985-1991 period. Bull.Soc. Path. Ex., 85, 449-452.
- Berland, B., Grzebyk D., Thomassin B-A. (1992). Benthic dinoflagellates from coral reef lagoon of Mayotte Island (S-W Indian Ocean); identification, toxicity and preliminary ecophysiological study. Bull.Soc. Path.Ex 85, 453-456p.



- Besada, E. G., Loeblich., L. A., Loeblich, A. R. (1982). Observations on tropical benthic dinoflagellates from ciguatera area: *Coolia*, *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*. *Bull. Mar. Sci.* 32 (3): 723-735p.
- Ballesteros, E. (1992). Els vegetals i la zonació litoral: espècies, comunitats i factors que influyesen en la seva distribució. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.
- Bravo, I., Fernández, Ramilo., M. L. I., Martínez, A. (2001). Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolate from different locations along the Galician coast (NW Spain). *Toxicon* 39: 1537-1545.
- Blanco, J. L. (1981). Conoce la ciguatera?. *Bohemia* 13: 90-91
- Bomber, J. W., Norris, D. R., Mitchell, L.E. (1985). Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. II. Temporal, spatial and substrate heterogeneity of *Prorocentrum lima*. In: Anderson, D. M., A. W. White y D. G. Baden (Eds.) "Toxic dinoflagellates" Elsevier Scientific, New York, pp. 45-50
- Bomber, J. W., Morton, S. L., Babinchak, J. A., Norris, D. R., Norton, J. G. (1988a) Epiphytic dinoflagellates of drift algae-another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull Mar Sci.* 43: 204-214
- Bomber, J. W., Rubio M. G., Norris, D. R. (1989). Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera: substrate specificity and nutrition. *Phycologia*, 28: 360-368.
- Bordeau, P., Durand-Clement, M. (1991). Ichtyosarcotoxine de type ciguatera: Etude e'cotoxicologique et morphologique de *Gambierdiscus toxicus* aux Antilles Francaise (Saint Barthélemy ). *Actes Coll. Biotox. Mar.* Paris, J. M. Fremy Ed., Publ. CNEMA, 61-67.
- Boynton, W., Garber, R., Summerr, R., Kemp, W. M. (1995). Inputs, transformations, and transport of nitrogen and phosphorous in Chasapeake Bay and select tributaries. *Estuarios*, 18: 285-314.
- Burns, C., Pennock, J., Greene, R., Lores, E. (2000). The effect of nitrogen source on the growth and toxicity of potentially harmful dinoflagellate species in the genus *Prorocentrum*. *Harmful Algal Blooms. Ninth Conference Tasmania*.
- Carlson, R. D. (1984). Distribution, periodicity and culture of benthic epiphytic dinoflagellates in a ciguateric endemic regions of Caribbean. Ph. D. Thesis Southern Illinois University Carbondale, 308 pp
- Carlson, R. D., Tindall, D. R. (1985). Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands. In: Anderson, D. M., A. W. White y D. G. Baden (Eds) "Toxic dinoflagellates", Elsevier Scientific, New York, 171-176.

- Chinain, M., Germain, M., Deparais, X., Pauillac, S., Legrand, A. M. (1999). Seasonal abundance and toxicity of the dinoflagellate *Gambierdiscus* spp (Dinophyceae), the causative agent of ciguatera in Thaití, French Polynesia. *Mar Biol.* 135: 259-277.
- Clarke, K. R., Warwick, Y R. M. (1994). Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Natural Enviroment Research Council, UK., 144 pp.
- Carrera, J., Castro, A. (2002). Ciguatera, control y prevención en Cuba. Informe técnico del área de Higiene y Epidemiología. MINSAP. Havana, Cuba.
- D'Avanzo, C. (1994). Diel oxygen dynamics and anoxic event in an eutrophic sestuary os Waquiot Bay. *Estuaries.* 17(1B): 131-139.
- Delgado, G. Popowski G., Nodar, R. (2000). Primer registro de *Prorocentrum lima* (Ehr) Dodge 1975, en aguas cubanas. *Rev.Inv. Mar.* 21(1-3).
- Delgado, G., Lechuga C.H., Popowski G, Troccoli, L., Salinas, C.A. (En Prensa). Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. (en prensa Vol.54. 2006).
- Diogéne, G., Durand-Clement, M., Puiseux-Dao, S. (1992). La ciguatera intoxication alimentaire d'origine marine et la maítotoxine composante du complexe toxinique ciguatérique. *Revue Scientifique et Technique de la Défense.* 2e trimestre: 37-47.
- Faust, M. A. (1990a). Cysts of *Prorocentrum marinum* (Dinophyceae) in floating detritus at Twin Cays, Belize mangrove habitats. En: Graneli, E., B. Sundstrom, L. Edler, y D. M. Anderson (Eds) "Toxic Marine Phytoplankton" Elsevier, New york,;138-143.
- Faust, M. A. (1990b). Morphologic details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrophyta) from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including two new species. *J. Phycol.* 26: 548-58.
- Faust, M. A. (1991). Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites. *J. Phycol.*27: 642-648.
- Faust, M. A. (1993). Three new benthic species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) from Twin Cays, Belize: *P. maculosum* sp. nov., *P. foraminosum* sp. nov. and *P. formosum* sp. nov.. *Phycologia* 32(6): 410-418
- Faust, M. A. (1996). Dinoflagelates in a mangrove ecosystem, Twin Cays, Belize. *NOVA HEDWIGIA*, Beiheft. 112: 447-460.
- Fukuyo, Y. (1981). Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reef. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47: 967-78.

- Fleeger, J. W. (1988). Sampling equipment-In: Introduction to study of Meiofauna. Edit by Hignings and Thiel, H., *Smithsonian Inst. Press*, Washington D.C. 115-125 pp.
- García, C., Pereira, P., Valle, L., Lagos, N. (2003). Quantitation of diarrhetic shellfish poisoning toxins in Chilean mussel using pyrenyldiazomethane as fluorescent labeling reagent. *Biol Res* 36: 171-183.
- Gascón, J.G., Macía, M., Oliveira, I., Corachán, M. (2003). Intoxicación por ciguatera en viajeros. *Med. Clin. (Barcelona)*, 120 (20) : 777-779.
- Gillespie, N., M. J, Holmes., J. B, Burke., J, Dolley. (1985). Distribution and periodicity of *Gambierdiscus toxicus* in Queensland, Australia. In: D. M. Anderson, A. W. White y D. G. Baden (eds.) "Toxic dinoflagellates" New York: Elsevier, 183-188.
- Glaziou, P., Legrand A. M. (1994). The Epidemiology of Ciguatera Fish Poisoning. *Toxicon* 8 (32): 863-873
- González, C. (2002). Resumen de la Temporada Invernal 2001-2002 en Cuba. Centro de Pronósticos I, Instituto de Meteorología, CITMA.
- Grzebyk, D., Berland, B., Thomassin B.A., Bosi, C., Arnoux, A. (1994). Ecology of ciguateric dinoflagellates in the coral reef complex of Mayotte Island (S.W. Indian Ocean). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178:51-66
- Guillard, R.R.L. (1983). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrates Animals* (W. L. Smith and M. H. Chanley, eds), pp: 29-60.
- Hallegraeff, G. M. (1995). Harmful algal bloom: A global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G. M., D. M. Anderson, A. D. Cembella (Eds). IOC Manual and Guides, No. 33, UNESCO, 1-22p.
- Heil, C. A., Bird, P., Denninson, W. C. (1998). Macroalgal habitat preference of ciguatera dinoflagellates at Heron Island, a coral cay in the southeastern great barrier reef, Australia. In: Reguera, B., J. Blanco, M. L. Fernández y T. Wyatt (Eds.) "Harmful Algae" Xunta de Galicia and International Governmental Commission of UNESCO, 52-53.
- Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B.O., Núñez-Vázquez, E. J., Yasumoto, T., Yasuda, M., Ochoa, J. L. (2002). Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon* 40: pp 1121-1127.
- Hokama, Y. (1988). Ciguatera Fish Poisoning. *J. Clin. Anal.* 2(1): 44-50.

- Holmes, M. J., Lewis, R. J., Poli, M. A., Gillespie, N. C. (1991). Strain dependent production of ciguatoxin precursors (gambiertoxins) by *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* 29(6): 761-775.
- Holmes, M. J., Chin, F., Ming, S.L., Woo, H. (1997). A survey of benthic dinoflagellates on Singapore reefs. En: B. Reguera, J. Blanco, Ma.L. Fernández and T. Wyatt (eds) Harmful algae. Proceeding of the VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 50-51
- Hokama, Y., Ebesu, J. S. M., Asunción, D. A., Nagai, H. (1996). Growth and cyclic studies of *Gambierdiscus toxicus* in the natural environment and in culture. Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto, T., Oshima, Y and Fukuyo, Y. (Eds) Intergovernmental Oceanographic Comisión of UNESCO. pp 313-315.
- IOC/UNESCO. (1983). Manual and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commission. Chemical Methods for use in Marine Environmental Monitoring. 53p.
- IOC. (1993). Manual and Guides 33. Intergovernmental Oceanographic Commission. Nutrient analysis in tropical marine water. 42p.
- Jackson, A. E., Marr, J. C., McLachlan, J. L. (1993). The production of diarrhetic shellfish toxins by an isolate of *Prorocentrum lima* from Nova Scotia, Canada. In: Smayda, T. J., Shimizu, Y. (Eds) Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp 513-518.
- Keller, M. D., Guillard, R.R.L. (1985). Factors significant to marine dinoflagellate culture. In: Toxic Dinoflagellates. D. Anderson, A. W. White and D. G. Baden (eds). Elsevier/ New York, pp 113-116.
- Koike, K., Ishimaru, T., Murano, M. (1991). Distributions of benthic Dinoflagellates in Akajima Island, Okinawa, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1051-1053.
- Larsen, J., Moestrup, O. (1989). Guide to toxic and potentially toxic marine algae. The Fish Inspection Service, Ministry of Fisheries, Copenhagen, Denmark, 61pp.
- Lawrence, D. N., Enriquez, M. B., Lumish, R. M., Maceo, A. (1980). Ciguatera fish poisoning in Miami. *JAMA* 244(3): 254-258.
- Lawrence, J. E, Bauder, A. G., Quilliam, M. A., Cembella, A. D. (1998). *Prorocentrum lima*: Apuntative link diarrhetic shellfish poisoning in Nova Scotia, Canada. En: B. Reguera, J. Blanco, Ma.L. Fernández and T. Wyatt (eds) Harmful algae. Proceeding of the VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 78-79.

- Lee, J. S., Yanagi, T., Kenma, R., Yasumoto, T. (1989). Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem* 51:877-81.
- Leal, S., Nodar, R., Delgado, G., Almaguer, Y. (2004). Efecto de cinco tipos de productos zeolíticos sobre el crecimiento de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. *Rev. Invest. Mar.* 25(3): 241-244.
- Legrand, A-M. (1998). Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans. Harmful algae. VIII International Conference. Vigo.
- Lewis, R. J. (1995). Detection of ciguatera and related benthic dinoflagellate toxins: in vivo and in vitro methods. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. UNESCO. P 135-161.
- Licea, S., Moreno, J. L., Santoyo, H., Figueroa, G. (1995). Dinoflageladas del Golfo de California, Impresiones Integradas del Sur, UABCS, México, 166 pp.
- Margalef, R. (1998). Red tides and ciguatera as successful ways in the evolution and survival of an admirable old phylum. En: B. Reguera, J. Blanco, Ma.L. Fernández and T. Wyatt (eds) Harmful algae. Proceeding of the VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 3-7.
- McCaffrey, E. J., Shimizu, M. M. K., Scheuer, P. J., Miyahara, J. T. (1990). Seasonal abundance and toxicity of *Gambierdinus toxicus* Adachi et Fukuyo from O'ahu, Hawai'i. In Tosteson, T.R. (Ed). Proceedings of the third International Conference Ciguatera.
- Montalvo, J.F.; Cano, M., Díaz, J., Pérez, R., Esponda, S.C., César, M. E., Peón, C.M., Rendón, J. (2001). Nutrientes en la zona litoral entre los ríos Quibú y Jaimanitas, Ciudad de La Habana, Cuba. *Contribución a la Educación y la Protección Ambiental. Cátedra de Medio Ambiente. ISCTN*. Vol. 2 (CD) del VII Taller.
- Morton, L., Norris, D. R. (1990). Role of temperature, salinity, and light on the seasonality of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. Toxic Marine Phytoplankton Editors E. Graneli, B-Sundström L. Edler and D.M. Anderson. 545pp.
- Morton, S. L., Tindall, D. R. (1995). Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from three locations at Heron Island, Australia. *J. Phycol.* 31, 914-921.
- Morton, S. L., Faust, M. A. (1997). Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bull. Mar. Sci.* 61(3): 899-906.

- Morris, A. W., Riley, J. P. (1963). Determination of reactive nitrate. *Anal. Chem. Acta*, 29: 272.
- Murphy, J., Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*. 27: 31-36
- Nascimento, S. M., Purdie, D. A., Morris, S. (2005). Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK. *Toxicon* 45 (2005) 633-649.
- Ortíz, S. M., de la Lanza G., García, M. R. (1993). Hidrología vs. Contaminación en la Bahía de Guaymas al nordeste de México. Serie ocasional [2:285-296]. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile.
- Pan, Y., Cembella, A. D., Quilliam, M. A. 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Mar Biol.* 134:541-549.
- Parra, A. (1787). *Siguatera En: Descripción, de diferentes piezas de Historia Natural las más del ramo marítimo representadas en setetenta y cinco láminas.* Habana, Cuba, 135pp
- Popowski, G., Delgado, G., Sánchez, M., Nodar, R. (2001). *G. toxicus* Adachi y Fukuyo, en el litoral norte de Ciudad de la Habana. *Rev. Invest. Mar.* 22(1):69-72.
- Prego, R. (1993). Sales nutrientes y mareas rojas. III Reunión Ibérica sobre Fitoplancton tóxico y Biotoxinas. Pp 118 – 124.
- Purdie, D. A., Morris, S. (2005). Impact of eutrophication on toxic benthic microalgal in UK coastal water: In Dynamic content generated from the SOES database on Thu 13 October.2005.  
<http://serpentproject.com/soes/graduated/admissions/proyects/?link=details.php&=209>.
- Quod, J. P. Turouet, J., Diogéne, G., Fessard, V. (1995). Screening of extracts of dinoflagellates from coral reefs (reunion Island, SW Indian Ocean), and their biological activities. In: Lassus, P., G. Arzul, P. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou (Eds) "Harmful Marine Algal Blooms" Lavoisier Publishing, Paris. 815-820p.
- Rodríguez, C., Hernández, A. M. (1990). Informe de Cuba al Seminario Taller Regional sobre intoxicaciones paralíticas por mariscos (marea roja) para Centroamérica, México, Cuba y República Dominicana. Guatemala 16-19 Octubre. Comisión Interministerial de Guatemala para la vigilancia de la maera roja. O.P.S y O.M.S., 133pp

- Saint-Martin, K., Durand-Clement, M., Bourdeau, P. (1988). Contribution a l'étude des rapports entre les macroalgues et *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae), agent causal de la ciguatera. *Cryptogamie, Algologie* 9(3): 195-202.
- Schaffalke, B. (1999). Short-term nutrient pulses as tools to assess responses of coral reef macroalgae to enhanced nutrient availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 182: 305-310.
- Sournia, A., Chretiennot-Dinet, M. J. Ricard, M. (1991). Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *Journal of Plankton Research*, 13:1093-1099.
- Steidinger, K. A., Jangen, K. (1997). Dinoflagellates. Chapter 3. In: Identifying Phytoplankton Dinoflagellates. 387-588.
- Taylor, F.J. R. (1985). The distribution of the dinoflegellate *Gambierdiscus toxicus* in the Eastern Caribbean. In, Proc. 5<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp. Thaiti. (Ed) Gabrie & B. Salvat, Antenne Museum-EPHE, Moorea, French Polynesia, Vol.4, pp. 423-428.
- Taylor, F. J. R., Gustavson, M. S. (1986). An underwater survey of the organism chiefly responsible for "ciguatera" fish poisoning in the Eastern Caribbean region: the benthic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. In: "Proceedings of the 7th. Intern. Diving Science Symposium", Padodova. CMAS, Univ. Pad. La Garangola: 95 –111.
- Thomassin, B. A., Ali Halidi, M. E. A., Quod, J. P., Maggiorani, J. M., Berland, B., Grzebyk., D. J. Oqueugniot, C. (1993). Evolution of *Gambierdiscus toxicus* populations in the coral ref. Complex of Mayotte Island (SW Indian Ocean) during the 1985-1991 period. In, Proc.4<sup>th</sup> Int. Cof. Ciguatera Fish Poisoning, Tahiti 1992, Bull. Soc. Path. Ex., Vol.85, pp.449-452.
- Tindall, D. R., Dickey, R. W., Carlson, R. D., Morey-Gaines, G. (1984). Ciguatogenic dinoflagellates from the Caribbean Sea. In Ragelis, E. P. (ed) "Seafood toxins" *Am. Chemical Soc. Series* 262: 225-240.
- Tindall, D. R., Morton S. L. (1998). Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraff, G. M. (Eds), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer, Berlin, pp. 293-313.
- Tomas, C. R., Baden, D. G. (1993). The influence of phosphorus on the growth and cellular toxin content of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* . T. J. Smayda and Y. Shimizu, editors. 1993 Elsevier Science Publishers B.V. pp 565-569.
- Tosteson, T. R., D. L. Ballantine., Winter, A. (1998). Sea surface temperature, Benthic dinoflagellate toxicity and toxin transmission in the ciguatera food chain, pp. 48-49. *In*

- B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & E. Wyatt (eds.). Harmful Algae. Xunta de Galicia, Spain, & IOC, UNESCO.
- Turquet, J., Quod J. P., Couté A., Faust M. A. (1998). Assemblage of Benthic dinoflagellates and monitoring of harmful species in Reunion Island, SW Indian Ocean, 1993-1996. In: B. Reguera, J. Blanco, Ma.L. Fernández and T. Wyatt (Eds) Harmful algae. Proceeding of the VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 44-47.
- Turquet, J., Quod, J. P., Ten-Hage, L., Dalahani, Y., Wendling, B. (2000). Example of a *Gambierdiscus toxicus* flare-up following the 1998 coral bleaching event in Mayotte island (Comoros, South-West Indian Ocean). In: Harmful Algal Bloom. Ninth Conference Tasmania.
- Uribe, J. C., Garcia, C., Rivas, M., Lagos, N. (2001). First report diarrhetic toxins in Magellanic Fiords. Southern Chile. *J. Shellfish Res* 20: 69- 74
- Valdés, E. (1980). Toxicidad y alimentación de algunos peces sospechosos de provocar la ciguatera. Informe Científico Técnico No 123: 1-16.
- Valdés, E., Popowski, G., Jiménez, C.; Martínez, R., Borrero, N., Berland, B. (1992) Ciguatera in Cuba: preliminar results. *Bull. Soc. Path. Ex.* 85: 522.
- Vila, M., Garcés, E., Masó M. (2001). Potentially toxic epiphytic dinoflagellates assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat Microb Ecol.* 26: 51-60.
- Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán Cailleau, J. C., Marty J. C. (1996). Rapid HPLC method for determination of phytoplankton chemotaxonomic pigments: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.* 18: 2377-2382.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Murakami, Y., Nakijama, I., Bagnis, R., Fukuyo, Y. (1980). Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral reef. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46: 327-31.
- Yasumoto, T., U. Raj., Bagnis, R. (1984). Seafood poisoning in tropical regions. Lab of Food Hyg, Fac of Agric., Tohoku Univ, Japan (citado desde J.C. de Fouw, H.P. van Egmond, G.J.A. Speijer 2001).
- Yasumoto, T. (2001). The Chemistry and Biological Function of Natural Marine Toxins. *Chem. Rec.* 1, 228-242.